

Vitamina C modula danos oxidativos induzidos pelo Fluconazol em *Saccharomyces cerevisiae*

Vitamin C modulates oxidative damage induced by Fluconazole in *Saccharomyces cerevisiae*

Hyamara Araújo Leal¹, Anna Carolina Aguiar Monteiro¹, Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar², Ana Maria Oliveira Ferreira da Mata², Stefhânia Coelho do Rego², Antonio Luiz Gomes Júnior³, Márcia Fernanda Correia Jardim Paz², Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante^{1,2,3}

¹ Curso de biomedicina/Centro Universitário UNINOVAFAPI, Teresina, Piauí, Brazil

² Laboratório de Genética Toxicológica, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

³ Laboratório de Genética Toxicológica, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

* Correspondência:

E-mail: marcus-alencar@msn.com

RESUMO

O estresse oxidativo é relatado na etiologia de doenças incluindo as neurodegenerativas, diabetes, aterosclerose e o câncer, tendo sua origem no desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e sua eliminação no organismo humano. O Fluconazol (FLU) é um antifúngico com conhecida toxicidade por mecanismos relacionados à indução de estresse oxidativo. Neste sentido, o presente estudo avaliou os efeitos da vitamina C frente aos danos oxidativos induzidos pelo FLU em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e deficientes em enzimas antioxidantes. O FLU foi avaliado por meio do teste do disco central nas concentrações de 18.75, 37.5 e 75 µM/mL, de forma isolada, bem como em associação com vitamina C (2 µM/mL). Foram utilizados peróxido de hidrogênio (10 mM) e salina estéril (0.9%) como controle positivo e negativo, respectivamente. O FLU nas duas maiores concentrações induziu ($P < 0,001$) danos oxidativos em todas as linhagens de *S. cerevisiae*, exceto para a linhagem com genótipo Sod1Δ/Cat1Δ, que sofreu oxidação apenas quando exposta à maior concentração de FLU, em relação ao controle negativo. Por outro lado, os efeitos oxidantes observados em *S. cerevisiae* foram modulados ($P < 0,001$) pela vitamina C em todas as linhagens testadas. Estudos com outros biomarcadores em eucariotos são importantes para avaliar a segurança do FLU de forma associada com a vitamina C para doenças relacionadas com estresse oxidativo.

Palavras-chave: Fluconazol; estresse oxidativo; ácido ascórbico.

ABSTRACT

Oxidative stress is reported in the etiology of neurodegenerative diseases including diabetes, atherosclerosis and cancer, due to the imbalance between the formation of free radicals and their disposal in humans by this process. Fluconazole (FLU) is an antifungal drug with known toxicity mechanisms related to oxidative stress. In this sense, the present study aimed at evaluation the effects of vitamin C on the oxidative damage induced by FLU both in proficient and deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. The FLU was evaluated by the central disc test at concentrations of 75.00 to 18.75 µM/mL isolated form as well as in combination with vitamin C (2 µM/mL). Hydrogen peroxide (H₂O₂) (10 mM) and sterile saline (0.9% NaCl solution) were used as positive and negative controls, respectively. Results suggest that FLU with 18.75 µM/mL and 37.50 µM/mL produced significant ($P < 0.001$) oxidative damage to all *S. cerevisiae* strains, except for strain with Sod1Δ/Cat1Δ genotype which only suffered rust when exposed to higher concentration of FLU in relation to negative control. Furthermore, a modulated oxidative damage was observed with vitamin C to all tested strains. In summary, the studies with eukaryotes may be an important mode to assess the safety of FLU with vitamin C for diseases related to oxidative stress.

Keywords: Fluconazole; oxidative stress; ascorbic acid.

INTRODUÇÃO

O Fluconazol é um agente antimicótico de amplo espectro, sendo comumente utilizado para tratamento de doenças causadas por *Candida spp.*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton spp.*, *Microsporium spp.* e *Trichophyton spp.*, (SATERNO, CARLUCCI e BREGNI, 2010). Entretanto, existem relatos de toxicidade e hepatotoxicidade desta droga, bem como outros efeitos colaterais (EGUNSOLA et al., 2013).

Diversas drogas bactericidas, antivirais e antifúngicas apresentam diferentes efeitos colaterais incluindo os efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. Algumas drogas que apresentam efeitos antifúngicos, como o cloranfenicol, dapsona, entecavir, griseofulvina, isoniazida, metronidazol, nitrofurantoina, nitrofurazona, estavudina, zalcitabina e zidovudina, em diversos bioensaios foram evidenciados resultados positivos para genotoxicidade e carcinogenicidade (BRAMBILLA et al., 2013; BRAMBILLA et al., 2012; BRAMBILLA e MARTELLI, 2009).

Diversos mecanismos de genotoxicidade podem ser induzidos pelos fármacos, tais como quebras de fitas simples, duplas, pontes inter e intracadeias, aductos e, em especial, danos oxidativos (BRAMBILLA et al., 2013). Pesquisas revelam que as espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas primariamente nas mitocôndrias, apresentam riscos para vários caminhos de sinalização celular. Além disso, muitos fatores de riscos estão associados ao estresse oxidativo, incluindo o tabaco, poluentes ambientais, radiações, infecções virais e bacterianas, a dieta, bem como agentes quimioterápicos (GUPTA e VYAS, 2012).

Entretanto, existem mecanismos de defesas endógenos e exógenos que podem atuar neutralizando as EROs e prevenindo o estresse oxidativo. A exemplo destes, as defesas enzimáticas superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase, bem como os mecanismos não enzimáticos, como a vitamina E, vitamina C, glutatona e ubiquinona (ALLEMAN; BAUMANN, 2008). A enzima superóxido dismutase acelera a conversão de O_2^- em H_2O_2 , caracterizando a primeira linha de defesa antioxidante. A catalase reduz o H_2O_2 formando água e oxigênio; já a vitamina C é responsável pela remoção direta de radicais O_2^- (ZHANG; DU; HUANG, 2011).

O peróxido de hidrogênio, o radical hidroxil ou o superóxido são constantemente gerados e eliminados nos sistemas biológicos (DICKINSON e CHANG, 2011). Entretanto, em condições

normais, os níveis de EROs são balanceados pela eliminação de radicais livres, por mecanismos de sequestro (WINTERBOURN, 2008).

A avaliação da capacidade oxidante de um composto pode ser realizada por meio da sobrevivência de microrganismos tratados concomitantemente com o oxidante ou associados a antioxidantes. Os testes realizados nestes sistemas são rápidos e permitem a utilização de um grande número de células com as mesmas características genéticas. Por estas razões, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo. Além disso, sua eficiência em estudos comparados a mamíferos tem se mostrado cada vez maior (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Neste sentido, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da vitamina C na modulação dos danos oxidativos induzidos pelo Fluconazol em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Químicos

A substância teste Fluconazol (Medley[®]) foi obtida em farmácia popular (Piauí, Brasil). O ácido ascórbico (CAS nº 50-81-7) foi obtido da Sigma.

Preparação das concentrações de Fluconazol

Para alcançar a concentração final (75 $\mu\text{M}/\text{mL}$), a quantidade do pó equivalente contendo 2.29 mg de Fluconazol foi dissolvido em 100 mL de água destilada. Diluições seriadas foram realizadas para obtenção das demais concentrações (18.75 e 37.5 $\mu\text{M}/\text{mL}$), a partir da concentração de 75 $\mu\text{M}/\text{mL}$. A vitamina C foi dissolvida em tampão fosfato 50 mM (pH 7.4) e diluída até a concentração final de 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$.

Teste do disco central em *S. cerevisiae*

Foram utilizados no teste do disco central (OLIVEIRA et al., 2013) linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e deficientes em defesas antioxidantes para as enzimas superóxido dismutase citoplasmática (Sod1 Δ) e mitocondrial (Sod2 Δ) e para o duplo mutante (Sod1 Δ /Sod2 Δ), bem como para a catalase (Cat1 Δ) e duplo mutante para catalase e superóxido dismutase citoplasmática (Cat1 Δ /Sod1 Δ) (Quadro 1). As linhagens foram gentilmente cedidas pela Universidade Federal do

Quadro 1. Descrição das linhagens utilizadas no estudo. Adaptado de Oliveira et al., 2013.

Origem: Edith Gralla, L Angeles	
DESCRIÇÃO	GENÓTIPO
EG103 (SodWT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+
EG118 (Sod1Δ)	Sod1::URA3
EG110(Sod2Δ)	Sod2::TRP1
EG133(Sod1Δ/Sod2Δ)	Sod1::URA3 Sod2::TRP1
EG223 (Cat1Δ)	Cat1:: TRP1
EG (Sod1Δ/Cat1Δ)	Sod1:: URA3 e Cat1:: TRP1

O crescimento das células foi realizado em meio líquido YEL (1% de extrato de levedura, 2% de bacto peptona e 2% de glicose). Foram feitas semeaduras em meio sólido YEPD (preparado adicionando-se à composição do meio YEL 2% de ágar bacto) utilizando aproximadamente 10^5 células/mL, provenientes da fase estacionária de crescimento, em linha contínua da borda ao centro de uma placa de petri. Para a avaliação das atividades oxidantes e antioxidantes, em um disco de papel estéril posicionado no centro de cada placa foi adicionado 10 µL das concentrações de Fluconazol (18.75, 37.5 e 75 µM/mL), aplicadas de forma isolada, bem como em co-tratamento com vitamina C (2 µM/mL). Além disso, foram utilizados peróxido de hidrogênio (10 mM) e salina (0.9%) como controles positivo e negativo, respectivamente. Após 48 horas de incubação em estufa a 30°C, o halo de inibição do crescimento das linhagens foi medido em milímetros.

Análise dos dados

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do programa GraphpadPrism5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), com aplicação de análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Os dados foram considerados significantes com valor de $P < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação dos danos oxidativos do Fluconazol em *Saccharomyces cerevisiae*

Os ensaios com leveduras têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos. Além disto, a levedura possui um sistema endógeno de ativação metabólica por um complexo enzimático

(citocromo P450) e detoxificação, sem a necessidade da adição de um sistema exógeno, sendo, desta forma, uma vantagem sobre os ensaios bacterianos (TOUSSAINT e CONCONI, 2006; TOUSSAINT et al., 2006).

Danos oxidativos foram observados para as duas maiores concentrações do Fluconazol (37.5 e 75 µM/mL) na linhagem proficiente em defesas antioxidantes (SodWT), por meio da inibição ($P < 0,001$) do crescimento desta linhagem. Danos similares ($P < 0,001$) foram observados para as linhagens deficientes na enzima superóxido dismutase citoplasmática (Sod1Δ), bem como superóxido dismutase mitocondrial (Sod2Δ), em relação ao controle negativo (Figura 1).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, leva a um estado pró-oxidante que favorece à ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares que podem provocar a morte celular (FU et al., 2010). O Fluconazol induziu ($P < 0.001$) danos oxidativos nas duas maiores concentrações em linhagens de *S. cerevisiae* deficientes para superóxido dismutase citoplasmática e mitocondrial (Sod1Δ/Sod2Δ), bem como para catalase (Cat1Δ). Além disso, para o duplo mutante de superóxido dismutase citoplasmática e catalase (Sod1ΔCat1Δ) foram evidenciados danos oxidativos em todas as concentrações de Fluconazol, comparado ao controle negativo (Figura 2).

O controle primário da resposta ao estresse oxidativo está relacionado com a transcrição dos genes responsáveis pela síntese de proteínas envolvidas na proteção celular, considerando seres unicelulares. Nestes organismos, o peróxido de hidrogênio induz a ativação de um fator de transcrição, o qual promove a transcrição de pelo menos nove produtos de genes envolvidos na detoxificação de espécies reativas de oxigênio, como o gene da catalase e alquil-hidroperóxido redutase (KALYANARAMAN, 2013).

Avaliação dos efeitos da vitamina C nos danos oxidativos induzidos pelo Fluconazol em *Saccharomyces cerevisiae*

A vitamina C (2 µM/mL) inibiu ($P < 0,001$) os danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 em todas as linhagens testadas, destacando seu efeito antioxidante (Figura 1 e 2). De forma similar, para o duplo mutante superóxido dismutase (Sod1Δ/2Δ) foi evidenciado modulação ($P < 0.01$) dos efeitos oxidantes pela associação de Fluconazol + Vitamina C nas duas maiores concentrações do

fármaco (37.5 e 75 µM/mL). Além disso, para a linhagem deficiente em catalase foi evidenciado modulação ($P < 0.01$) dos danos oxidativos apenas para a associação de Vitamina C e Fluconazol na concentração intermediária (37.5 µM/mL) (Figura 3 e 4).

Não foram encontrados relatos de efeitos antagônicos da vitamina C em relação aos antifúngicos. Entretanto, em relação a antineoplásicos, cujos mecanismos de ação estão relacionados com a indução de estresse oxidativo, a vitamina C antagoniza a eficácia terapêutica, não sendo permitida a sua suplementação durante a quimioterapia (HEANEY et al., 2008; FROMBERG et al., 2011).

Embora os benefícios dos antioxidantes já sejam bem descritos na prevenção do câncer, ainda existem dúvidas sobre sua eficácia no tratamento oncológico. Teoricamente, eles captam o radical superóxido, e, conseqüentemente, esgotam o fornecimento de peróxido de hidrogênio intracelular, o que agrava o câncer. Mas, por outro lado, eliminam radicais hidroxilas. Assim, o uso de antioxidante pode diminuir os efeitos da quimioterapia ou radioterapia, bem como de outras drogas, devido à eliminação dos radicais livres, já que a radiação e a maioria das drogas antineoplásicas atuam justamente na produção de radicais livres para combater as células cancerosas (ABDOLLAHI; SHETAB-BOUSHEHRI, 2012).

CONCLUSÕES

O Fluconazol no presente estudo apresentou danos oxidativos nas duas maiores concentrações em todas as linhagens de *S. cerevisiae* testadas, exceto para linhagem Sod1ΔCat1Δ, a qual apresentou oxidação em todas as concentrações. Aspectos relevantes para células eucarióticas observados foram os resultados da associação do Fluconazol com a Vitamina C, que, como excelente antioxidante, inibiu os danos oxidativos induzidos pelo Fluconazol nas duas maiores concentrações para a linhagem Sod1ΔSod2Δ e para Sod1ΔCat1Δ na concentração intermediária. Esse dado aponta para novos estudos visando à associação do antifúngico Fluconazol com Vitamina C, como uma estratégia para a prevenção de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

SATERNO, C.; CARLUCCI, A.M.; BREGNI, C. Study of *in vitro* drug release and percutaneous absorption of fluconazole from topical dosage forms. **AAPS Pharmaceutical Science and**

Technology, v.11, n. 2, 2010;

ABDOLLAHI, M.; SHETAB-BOUSHEHRI, S.V. Is it right to look for anti-cancer drugs amongst compounds having antioxidant effect? **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 61, 2012;

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of analgesics, anti-inflammatory drugs and antipyretics. **Pharmacological Research**, v. 60, n. 1, 2009;

BRAMBILLA, G.; MATTIOLI F.; ROBBIANO L.; MARTELLI, A. Studies on genotoxicity and carcinogenicity of antibacterial, antiviral, antimalarial and antifungal drugs. **Mutagenesis**, v. 27, n. 4, 2012;

BRAMBILLA, G.; MATTIOLI, F.; ROBBIANO, L.; MARTELLI, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of bronchodilators and antiasthma drugs. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, n. 5, 2013;

HEANEY, M.L.; GARDNER, J.R.; KARASAVVAS, N.; GOLDE, D.W.; SCHEINBERG, D.A.; SMITH, E.A.; O'CONNOR, O.A. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic. **Cancer Research**, v. 68, n. 19, 2008;

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research**, v. 650, n. 1, 2008;

DICKINSON, B.C.; CHANG, C.J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 8, 2011;

ALLEMAN, I.B.; BAUMANN, L.S. **Antioxidantes e as formulações para cuidados com a pele.** Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=3980>. Acesso em 23 jun. 2015;

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, 2013;

GUPTA, M.; VYAS, S.P. Development, characterization and *in vivo* assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of

fluconazole against cutaneous candidiasis.

Chemical and Physics Lipids, v.165, n. 4, 2012;

FROMBERG, A.; GUTSCH, D.; SCHULZE, D.; VOLLBRACHT, C.; WEISS, G.; CZUBAYKO, F. Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 67, n. 5, 2011;

WINTERBOURN, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 5, 2008;

TOUSSAINT, M.; LEVASSEUR, G. GERVAIS-BIRD, J.; WELLINGER, R.J.; ELELA, S.A.; CONCONI, A. A high-throughput method to measure the sensitivity of yeast cells to genotoxic agents in liquid cultures. **Mutation Research**, v. 606, n. 1-2, 2006;

TOUSSANT, M.; CONCONI, A. High-throughput and sensitive assay to measure yeast cell growth: a bench protocol for testing genotoxic agents. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, 2006;

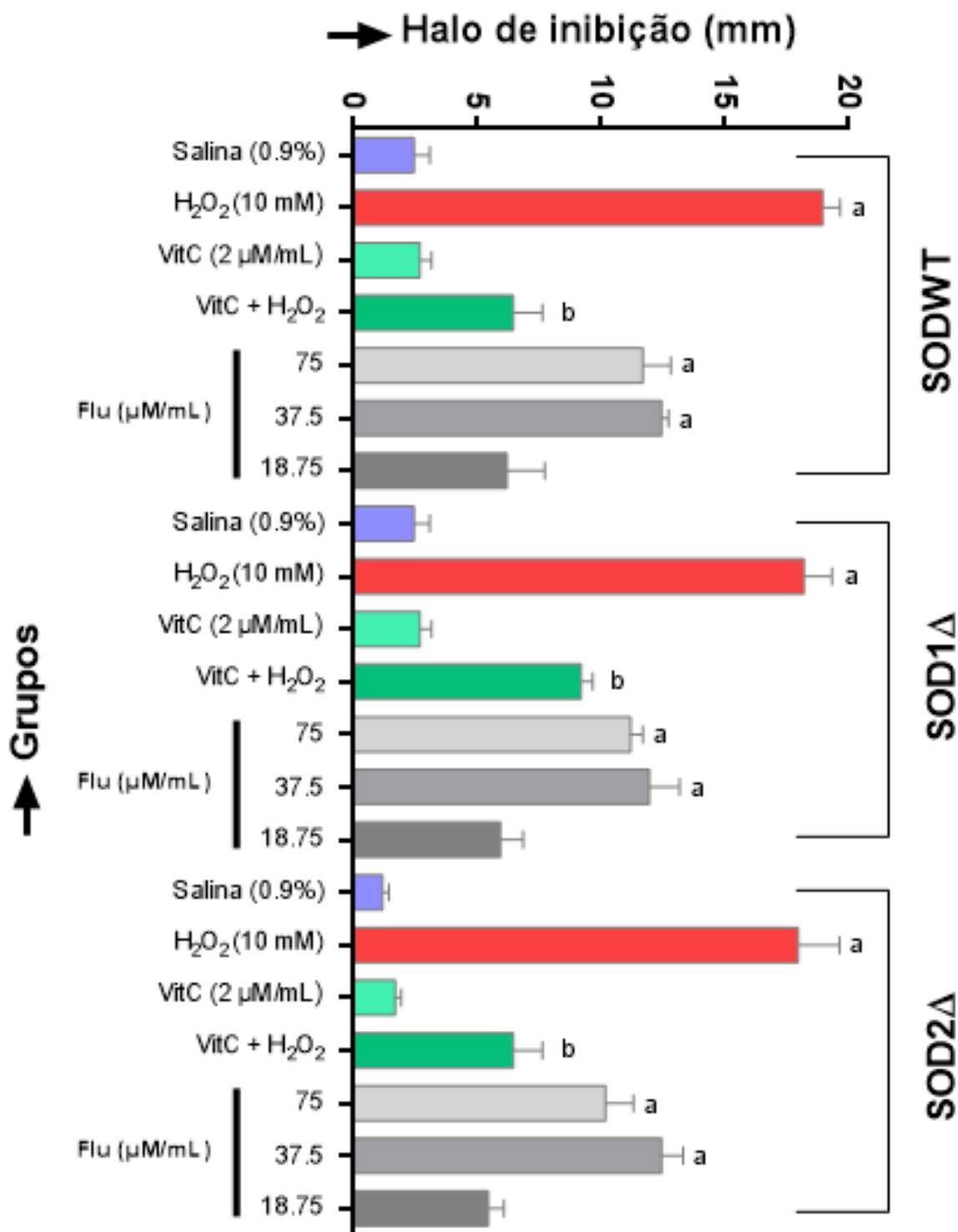
ZHANG, Y.Q.; DU, X.Z.; HUANG, W.L. Temperature effect on the kinetics of persulfate oxidation of p-chloroaniline. **Chinese Chemical Letters**, v. 22, n. 3, 2011;

EGUNSOLA, O.; ADEFURIN, A.; FAKIS, A.; JACQZ-AIGRAIN, E.; CHOONARA, I.; SAMMONS, H. Safety of fluconazole in paediatrics: A systematic review. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, n. 6, 2013;

FU, L.; XU, B.T.; XU, X.R.; QIN, X.S.; GAN, R.Y.; LI, H.B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. **Molecules**, v. 15, n. 12, 2010.

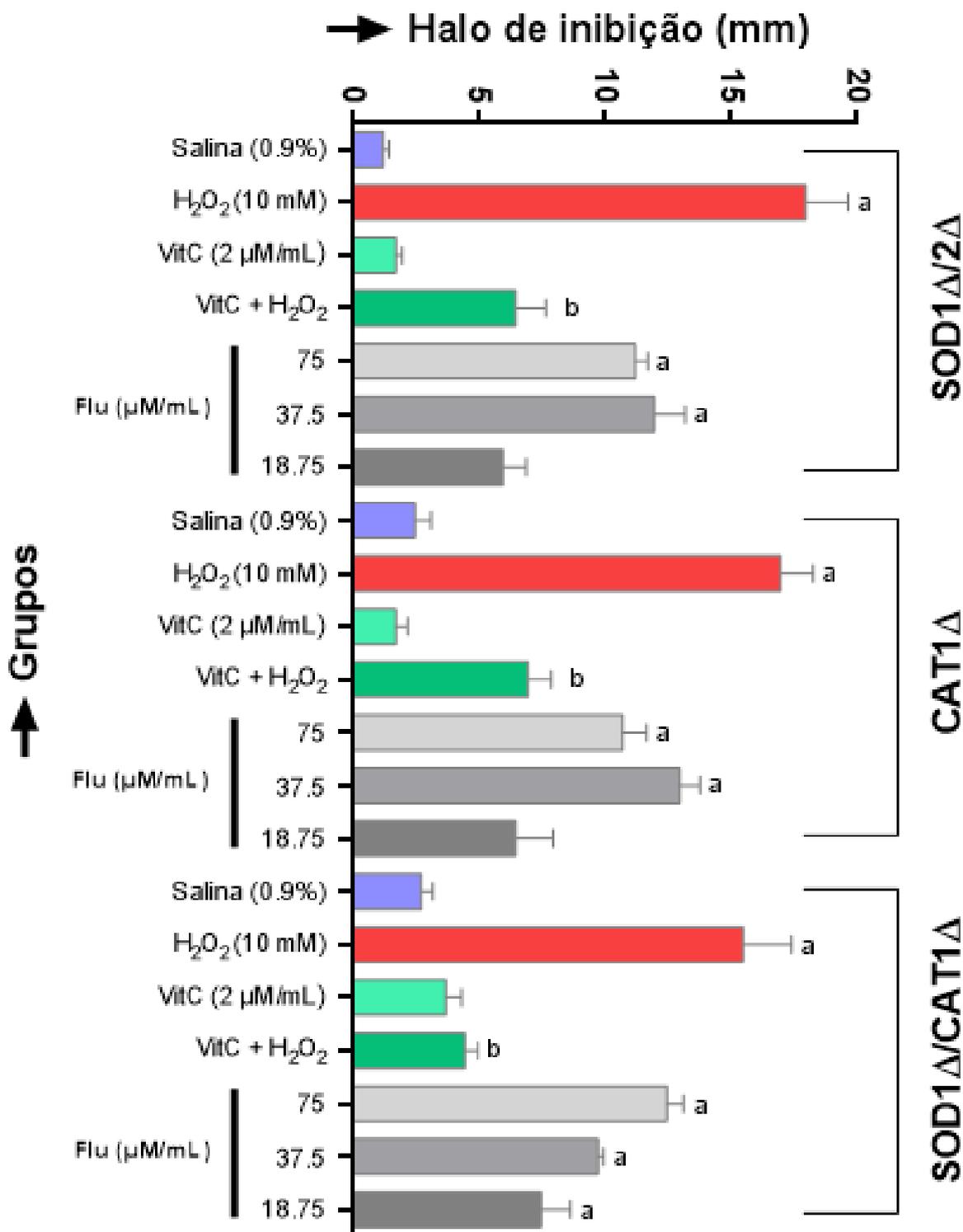
OLIVEIRA, G.L.S.; OLIVEIRA, F.R.A. M., ALENCAR, M.V.O.B.; GOMES-JUNIOR, A.L.G.; SOUZA, A.A.; CAVALCANTE, A.A.C.M.; FREITAS, R.M. Evaluation of antioxidant capacity of the aqueous extract of *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) *in vitro* and in *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 5, 2014.

Figura 1-Avaliação do potencial oxidante do Fluconazol nas linhagens de *S. cerevisiae* Sod WT, Sod1Δ e Sod2Δ por meio do teste do disco central.



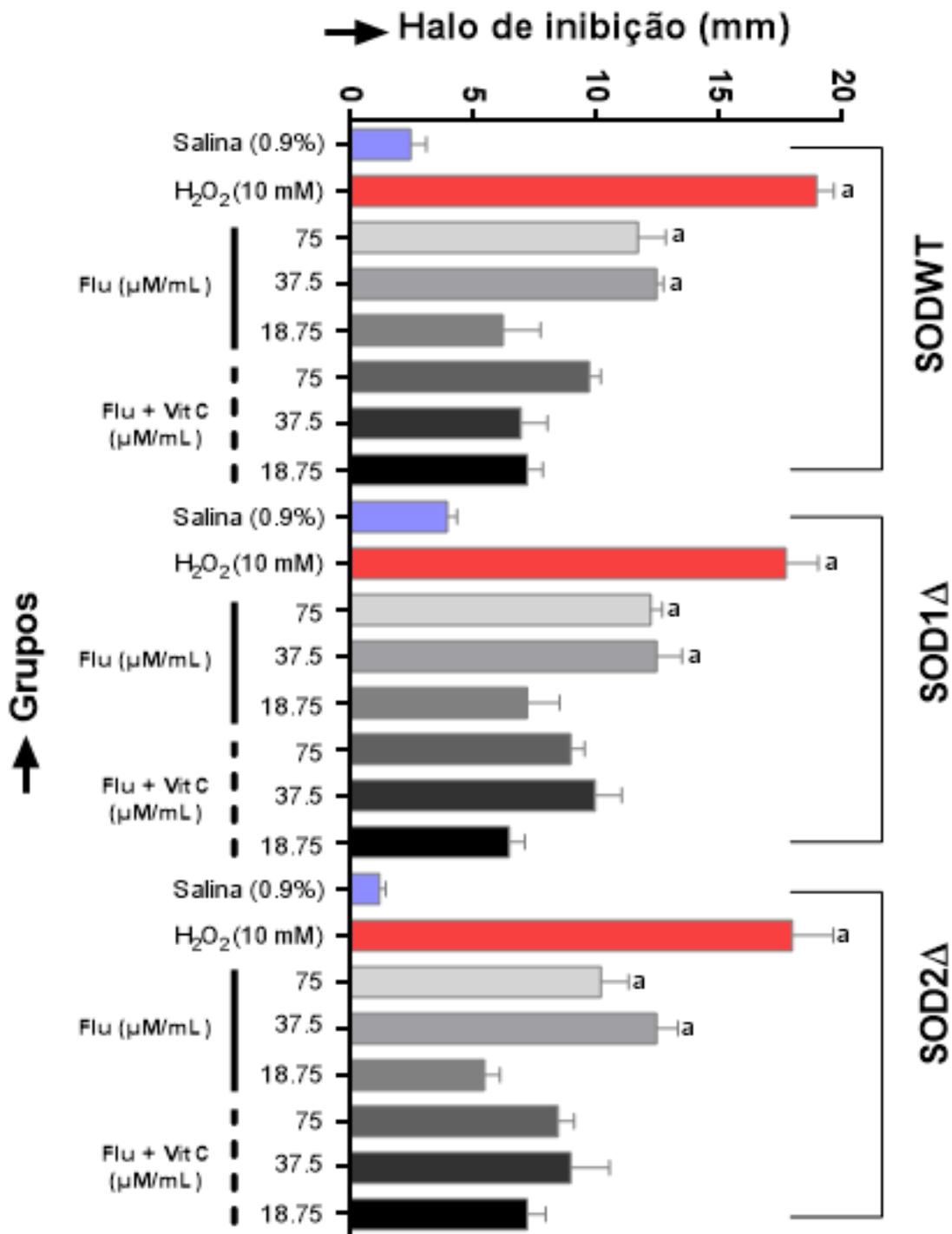
Legenda: Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. ^a $P < 0.001$ comparado ao controle negativo (Salina 0.9%). ^b $P < 0.001$ comparado ao controle positivo (H₂O₂ 10 mM). VitC: Vitamina C. H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio. Flu: Fluconazol.

Figura 2-Avaliação do potencial oxidante do Fluconazol nas linhagens de *S. cerevisiae* Sod1Δ/2Δ, Cat1Δ e Sod1Δ/Cat1Δ por meio do teste do disco central.



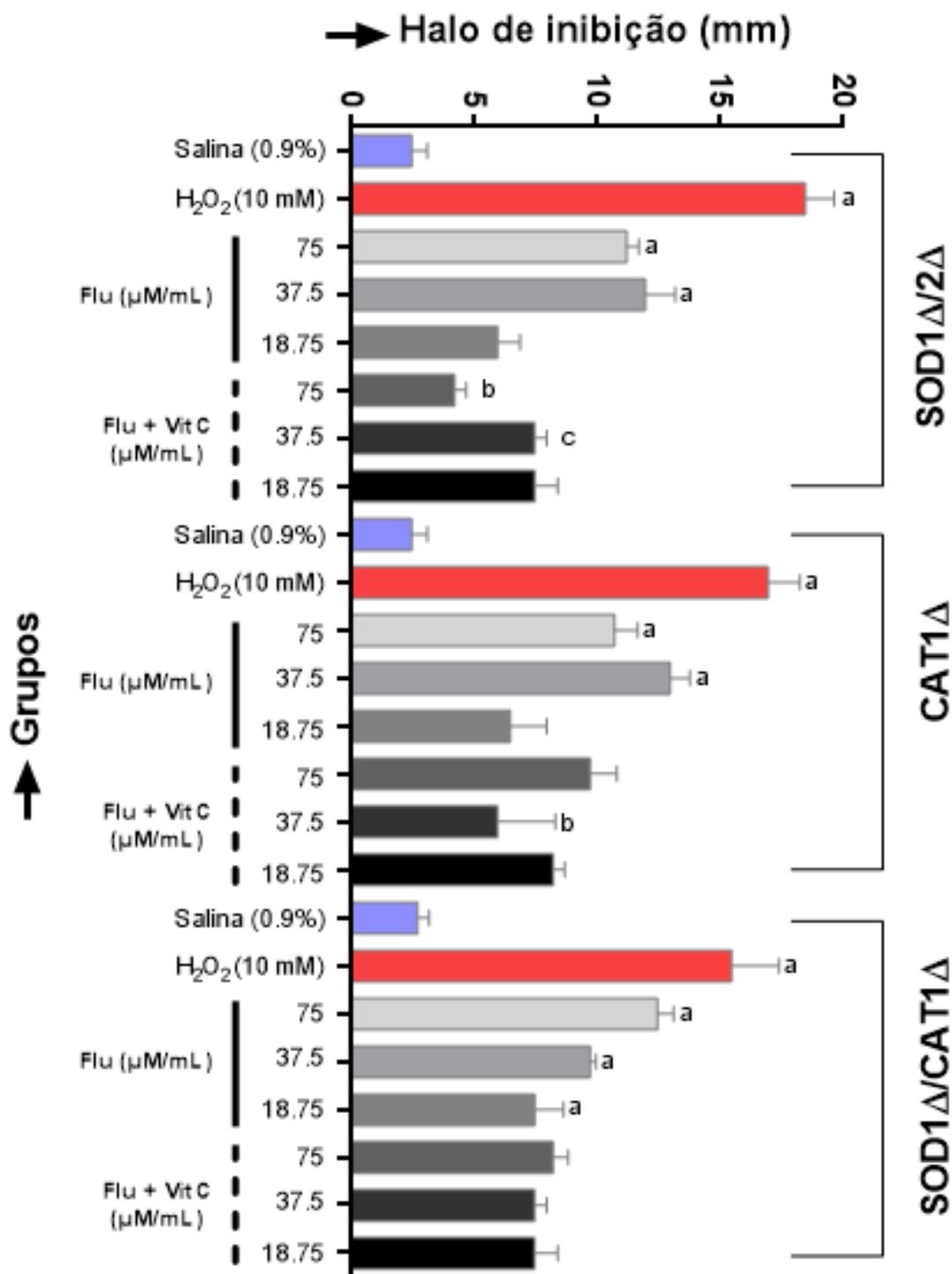
Legenda: Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. ^aP<0.001 comparado ao controle negativo (Salina 0.9%). ^bP<0.001 comparado ao controle positivo (H₂O₂ 10 mM). VitC: Vitamina C. H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio. Flu: Fluconazol.

Figura 3—Efeito modulador da Vitamina C nos danos oxidativos induzido pelo Fluconazol nas linhagens de *S. cerevisiae* SodWT, Sod1Δ e Sod2Δ por meio do teste do disco central.



Legenda: Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. ^aP<0.001 comparado ao controle negativo (Salina 0.9%). Flu + VitC: Vitamina C (2 μM/mL) + Fluconazol. H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio. Flu: Fluconazol.

Figura 4 - Efeito modulador da Vitamina C nos danos oxidativos induzido pelo Fluconazol nas linhagens de *S. cerevisiae* Sod1Δ/2Δ, Cat1Δ e Sod1Δ/Cat1Δ por meio do teste do disco central.



Legenda: Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. ^aP<0.001 comparado ao controle negativo (Salina 0.9%). Flu + VitC: Vitamina C (2 μM/mL) + Fluconazol. H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio. Flu: Fluconazol.