



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

LEILSON CARVALHO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO HALOPERIDOL
EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Candida* spp. SENSÍVEL E
RESISTENTES AO FLUCONAZOL: DETERMINAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO
DE AÇÃO**

**FORTALEZA
2026**

LEILSON CARVALHO DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO HALOPERIDOL
EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Candida* spp. SENSÍVEL E
RESISTENTES AO FLUCONAZOL: DETERMINAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE
AÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Profa. Dr^a. Cecília Rocha da Silva.

Coorientador: Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

FORTALEZA
2026

LEILSON CARVALHO DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO HALOPERIDOL
EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Candida* spp. SENSÍVEL E
RESISTENTES AO FLUCONAZOL: DETERMINAÇÃO DO POSSÍVEL MECANISMO DE
AÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Profa. Dr^a. Cecília Rocha da Silva.

Coorientador: Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

Data: 29/01/2026

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Solange de Oliveira Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof^a. Dr^a. Livia Gurgel do Amaral Valente Sá
Universidade Federal de Fortaleza (UFC)

A Deus,
À minha família, minha razão

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelo dom da vida e por todas as oportunidades. A Nossa Senhora, que nos momentos difíceis eu recorri por sua intercessão.

Aos meus pais, Luciano e Iolanda, por todo o apoio, paciência, amor, carinho e muito esforços.

À minha orientadora, prof^ª. Dr^ª. Cecília Rocha, por todos os ensinamentos, conselhos, paciência, confiança e orientação.

Ao meu coorientador, prof. Dr. Hélio Vitoriano, pela confiança, oportunidades e palavras de sabedoria, às quais sempre foram de alto valor na minha jornada.

Aos professores Dr^ª. Livia Gurgel e Dr. João Batista, pela disponibilidade, colaboração neste trabalho e em muitos momentos os quais foram sempre muito solícitos.

Ao Prof. Dr. Bruno Coêlho, pelas enriquecedoras contribuições e apontamentos.

Aos integrantes do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas por toda a colaboração neste trabalho. Dentre os quais, Vitória, Janielly, Thaís, Amanda Dias, Amanda C., Lara, Dávylly, Sarah, Daniel, Bia e Rayanne foram fundamentais em todo este processo.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM/UFC).

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, pela viabilização de etapas deste trabalho.

À FUNCAP, pela manutenção da bolsa de auxílio e à Secretaria da Ciência, Tecnologia e Educação Superior.

Aos membros da banca, Prof^ª Dr^ª Ana Cristina, Solange Pinheiro e Livia Gurgel, pela disponibilidade e tempo.

“O que fazemos agora ecoa pela eternidade”

RESUMO

Infecções causadas por fungos têm ganhado destaque devido sua alta taxa de morbidade e mortalidade. Estimativas de que 1 bilhão de indivíduos podem apresentar/conviver com alguma infecção fúngica, onde estima-se causar a morte de 3,8 a 4 milhões anualmente. A candidíase é a infecção fúngica oportunista com maior prevalência no mundo, sendo causada por leveduras do gênero *Candida* e apresentando alta prevalência de isolados clínicos resistentes aos antifúngicos convencionais, sendo primordial o desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Diante disso, o reposicionamento de fármacos é uma estratégia que visa utilizar medicamentos já disponíveis no mercado para fins diferentes de seu uso inicial, para o qual o haloperidol, um antipsicótico de primeira geração, tem demonstrado potencial no âmbito antimicrobiano. Nesta perspectiva o presente estudo tem como finalidade avaliar a atividade do haloperidol, de forma isolada e associada a antifúngicos clássicos, em cepas de clínicas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol, e os possíveis mecanismos associados à sua ação antifúngica. Foram realizados testes de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), como indicado no documento M27-A3 do CLSI, do haloperidol e antifúngicos (anfotericina B, itraconazol e fluconazol), juntamente com ensaios de *checkerboard* e o índice da concentração inibitória fracionada, citometria de fluxo, avaliação do dano ao DNA pelo ensaio do cometa, ensaios de biofilme formado e em formação e avaliação do biofilme por MEV. Os resultados mostraram CIMs do haloperidol variando de 26,67 a 256 µg/mL. Acerca dos ensaios de interação farmacológica, foram constatadas 18,75% e 31,25% de interações sinérgicas entre o haloperidol e azólicos, fluconazol e itraconazol, respectivamente, e 12,5% de sinergismo com anfotericina B. Os resultados também revelaram que o haloperidol induz a processos apoptóticos em espécies de *C. albicans* e *C. auris*, causando dano e metilação ao DNA e induzindo expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, corroborando para desregulação da homeostase, causando danos severos e induzindo a morte celular. Os ensaios de biofilme mostraram uma redução da viabilidade do biofilme formado em todas as espécies testadas, variando de 34,91% a 51,30% na concentração CIM das cepas. Comportamento semelhante foi observado no biofilme em formação, onde a redução de viabilidade variou de 38,99% a 51,32%. Assim, o haloperidol tem grande potencial de ação antifúngica e se destaca como uma promissora alternativa terapêutica a ser mais estudada para futuros usos com ação anti-*Candida*.

Palavras-chave: Resistência; Antifúngico; Reposicionamento de fármaco; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Fungal infections are particularly noteworthy due to their high morbidity and mortality rates. Estimates suggest that 1 billion individuals may have or live with some type of fungal infection, which is estimated to cause 3.8 to 4 million deaths annually. Candidiasis is the most prevalent opportunistic fungal infection worldwide, caused by yeasts of the genus *Candida* and exhibiting a high prevalence of clinical isolates resistant to conventional antifungals, making the development of new therapies paramount. In this context, drug repositioning is a strategy that aims to utilize medications already available on the market for purposes different from their initial use, for which haloperidol, a first-generation antipsychotic, has demonstrated potential in the antimicrobial field. From this perspective, the present study aims to evaluate the activity of haloperidol, alone and in combination with classic antifungals, against fluconazole-sensitive and fluconazole-resistant clinical strains of *Candida* spp., and the possible mechanisms associated with its antifungal action. Broth microdilution tests were performed to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), as indicated in the Clinical & Laboratory Standards Institute document M27-A3, for haloperidol and antifungals, along with checkerboard assays and the fractional inhibitory concentration index, flow cytometry, DNA damage assessment by comet assay, assays of formed and forming biofilms, and biofilm assessment by SEM. The results showed MICs of haloperidol ranging from 26.67 to 256 $\mu\text{g/mL}$. Regarding drug interaction assays, synergistic interactions were found between haloperidol and azoles, fluconazole and itraconazole, respectively, and 12.5% synergism with amphotericin B. The results also revealed that haloperidol induces apoptotic processes in *C. albicans* and *C. auris* species, causing DNA damage and methylation and inducing the expression of genes related to oxidative stress, contributing to homeostatic dysregulation, causing severe damage and inducing cell death. Biofilm assays showed a reduction in the viability of the formed biofilm in all species tested, ranging from 34.91% to 51.30% at the MIC concentration of the strains. Similar behavior was observed in the forming biofilm, where the reduction in viability ranged from 38.99% to 51.32%. Thus, haloperidol has great potential for antifungal action and stands out as a promising therapeutic alternative that needs further scientific investigation for future uses with anti-*Candida* action.

Keywords: Resistance; Antifungal; Drug Repositioning; Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1 -	Aspectos morfológicos de <i>Candida</i> spp.	26
2 -	Etapas de formação de biofilme de <i>Candida</i>	27
3 -	Mecanismos de resistência relacionados ao uso de azólicos	30
4 -	Distribuição geográfica dos países com pesquisas envolvendo moléculas antifúngicas	32
5 -	Estrutura química do haloperidol	33
6 -	Ensaio de citometria de fluxo para identificar para estudo do provável mecanismo de ação do haloperidol após 24 h de exposição em cepas de <i>Candida</i> spp.	56
7 -	Avaliação do ciclo celular de cepas de <i>Candida</i> spp. por citometria de fluxo	57
8 -	Haloperidol induz um influxo de Ca^{2+} nas células e a liberação de Citocromo c da mitocôndria para o citoplasma	59
9 -	Níveis de GSH e redução do ATP intracelular em células de <i>Candida</i> spp.	60
10 -	O tratamento com haloperidol foi capaz de ativar a metacaspase	61
11 -	Fragmentação do DNA de <i>C. albicans</i> e <i>C. auris</i> avaliada pelo teste cometa alcalino enzimático	62
12 -	Metilação global do DNA em cepas de <i>Candida</i> spp. após tratamento de ao haloperidol	63
13 -	Avaliação da fragmentação do DNA associado à metilação após tratamento com haloperidol	64
14 -	Avaliação de sobrevivência de cepas mutantes de <i>C. albicans</i>	65
15 -	Expressão gênica de genes associados a resposta do estresse oxidativo causado por haloperidol	67
16 -	Efeito inibitório do haloperidol sobre viabilidade de biofilmes maduros em cepas de <i>Candida</i> spp. em diferentes concentrações	68
17 -	Efeito do haloperidol sobre biofilmes em formação de <i>Candida</i> spp.	69
18 -	Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) de Biofilmes maduros de <i>C. auris</i> tratados e não tratados com haloperidol	70
19 -	Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) de Biofilmes em formação de <i>C. auris</i> tratados e não tratados com haloperidol	71
20 -	Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) de Biofilmes formado de <i>C. albicans</i> tratados e não tratados com haloperidol	72
21 -	Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) de Biofilmes em formação de <i>C. albicans</i> tratados e não tratados com haloperidol	73

LISTA DE TABELAS

1 -	Espécies de <i>Candida</i> spp. Isoladas em ambientes clínicos e seus sítios	25
2 -	Lista de patógenos prioritários OMS 2022	31
3 -	Cepas mutantes utilizadas no estudo	46
4 -	<i>Primers</i> utilizados neste estudo	48
5 -	Avaliação da atividade antifúngica do haloperidol de forma isolada e associada a antifúngicos	52
6 -	Interações farmacológicas do haloperidol e antifúngicos	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANFO	Anfotericina B
ANT	Antagonismo
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CAP1	Codifica proteína associada a ciclase
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dUTP	2'-Desoxiuridina 5'-Trifosfato
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLC	Fluconazol
FPG	Formamidopirimidina DNA-glicosilase
GLR1	Gene que codifica a glutatona redutase
GSH	Glutationa
HAL	Haloperidol
HCl	Ácido clorídrico
HClO ₄	Ácido perclórico
HIV	<i>human immunodeficiency viruses</i>
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
IND	Indiferente
IP	Iodeto de Propídio
ITC	Itraconazol
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

KCl	Cloreto de potássio
KHCO ₃	Bicarbonato de potássio
KH ₂ PO ₄	Di-hidrogenofosfato de Potássio
KOH	Hidróxido de potássio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
mtDNA	Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Hidrogenado
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
Rho	rodamina 123
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SIN	Sinergismo
SOD2	Superóxido dismutase 2
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TRR1	Tiorredoxina redutase
TUNEL	Desoxinucleotidil-transferase
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WT	<i>Wild type</i>
YEPD	Extrato de levedura Peptona Dextrose
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Fungos e seu potencial patogênico ao homem	22
2.2	Epidemiologia relacionada a infecção fúngica	22
2.3	Infecções fúngicas e gênero <i>Candida</i> spp.	24
2.4	Fatores de virulência relacionadas à levedura <i>Candida</i>	27
2.5	Resistência dos microrganismos ao tratamento com antifúngicos	28
2.6	Avaliação do haloperidol como potencial agente antifúngico frente a cepas de <i>Candida</i> spp.	32
3	HIPÓTESES	36
4	OBJETIVOS	37
4.1	Objetivo geral	37
4.2	Objetivos específicos	37
5	MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1	Obtenção dos microrganismos do estudo	38
5.2	Ativos fármacos utilizados	38
5.3	Avaliação da atividade antifúngica - teste de sensibilidade	38
5.3.1	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	38
5.4	Avaliação da interação entre haloperidol e antifúngicos (técnica de <i>checkerboard</i>)	39
5.5	Ensaio para avaliação dos possíveis mecanismos de ação	40
5.5.1	<i>Preparação das células de levedura para tratamento com haloperidol</i>	40
5.5.2	<i>Avaliação da viabilidade celular</i>	40
5.5.3	<i>Determinação do potencial mitocondrial transmembrana ($\Delta\Psi_m$)</i>	40
5.5.4	<i>Investigação do potencial apoptótico do haloperidol</i>	41
5.5.5	<i>Análise do ciclo celular após exposição ao haloperidol</i>	41
5.5.6	<i>Análise dos dados dos ensaios de citometria de fluxo</i>	41

5.5.7	<i>Investigação da fragmentação do DNA</i>	42
5.5.8	<i>Avaliação dos níveis de Ca²⁺</i>	42
5.5.9	<i>Avaliação do citocromo c após exposição do fármaco</i>	42
5.5.10	<i>Avaliação do conteúdo intracelular de glutathiona reduzida (GSH)</i>	42
5.5.11	<i>Atividade da Metacaspase</i>	43
5.5.12	<i>Avaliação dos Níveis Intracelulares Totais de ATP após Tratamento com Haloperidol</i>	43
5.5.13	<i>Ensaio cometa alcalino para identificar dano ao DNA</i>	44
5.5.14	<i>Avaliação da metilação causada pelo tratamento com haloperidol</i>	45
5.5.15	<i>Isolamento de DNA e Determinação da Metilação do DNA</i>	45
5.5.16	<i>Avaliação de sobrevivência de cepas mutantes de C. albicans</i>	46
5.5.17	<i>Coleta de amostras e isolamento de RNA</i>	47
5.5.18	<i>Análise estatística</i>	48
5.6	Ensaio para determinação de atividade frente à biofilme de Candida spp.	49
5.6.1	<i>Preparação dos biofilmes formados de Candida spp.</i>	49
5.6.2	<i>Avaliação da atividade do haloperidol frente aos biofilmes formados de Candida spp.</i>	49
5.6.3	<i>Determinação da atividade do haloperidol no biofilme em formação Candida spp.</i>	50
5.6.4	<i>Análise dos dados da avaliação do haloperidol frente aos ensaios de biofilme</i>	51
5.7	Visualização das estruturas microscópicas de Candida por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	51
5.7.1	<i>Ensaio dos biofilmes</i>	51
6	Resultados	52
6.1	Determinação da concentração inibitória mínima frente a cepas de Candida spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol	52
6.2	O haloperidol demonstra diferentes tipos de interações farmacológicas na associação a antifúngicos	54
6.3	Avaliação das vias de ação antifúngicas do haloperidol	55

6.3.1	<i>Ação do haloperidol sobre a viabilidade celular de Candida spp.</i>	55
6.3.2	<i>Alteração do potencial de despolarização mitocondrial de Candida spp. mediado pelo haloperidol</i>	55
6.3.3	<i>Exteriorização de fosfatidilserina em células de Candida spp. tratadas com haloperidol</i>	55
6.3.4	<i>Detecção de fragmentação do DNA pelo teste TUNEL após tratamento com haloperidol em Candida spp.</i>	56
6.3.5	<i>Haloperidol impactou no ciclo celular de Candida spp.</i>	57
6.3.6	<i>O haloperidol impactou nos níveis de Ca²⁺ mitocondrial e citosólico de Candida spp.</i>	57
6.3.7	<i>Verificação do nível de citocromo C no citosol e mitocôndria de Candida spp. após tratamento com haloperidol</i>	57
6.3.8	<i>Níveis de glutathiona (GSH) são reduzidos em células de Candida spp. tratadas com haloperidol</i>	59
6.3.9	<i>O haloperidol reduz os níveis de ATP intracelular de Candida spp.</i>	59
6.3.10	<i>Exposição ao haloperidol induziu a ativação da metacaspase em Candida spp.</i>	61
6.4	<i>Verificação de dano ao DNA</i>	62
6.4.1	<i>Haloperidol induz lesões ao DNA evidenciadas pelo ensaio do cometa alcalino enzimático</i>	62
6.4.2	<i>Metilação global do DNA após exposição ao haloperidol</i>	63
6.4.3	<i>Avaliação da fragmentação do DNA associado à metilação após tratamento com haloperidol</i>	63
6.5	<i>Haloperidol exerce efeito frente à cepas clínicas e mutantes de C. albicans .</i>	65
6.5.1	<i>Avaliação da expressão gênica por meio de RT-PCR das cepas clínicas e mutantes de C. albicans</i>	65
6.6	<i>Atividade do haloperidol frente aos biofilmes de Candida spp.</i>	68
6.6.1	<i>Células tratadas com haloperidol têm redução da viabilidade dos biofilmes pré-formados de Candida spp.</i>	68
6.6.2	<i>O haloperidol pode auxiliar na prevenção na formação de biofilme de</i>	69

	<i>Candida spp.</i>	
6.6.3	<i>O haloperidol causa danos estruturais à arquitetura do biofilme de Candida auris</i>	70
6.6.4	<i>O haloperidol causa danos estruturais à arquitetura do biofilme de Candida albicans</i>	72
7	DISCUSSÃO	74
	REFERÊNCIAS	82

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas têm impactado a vida de bilhões de pessoas, tornando-se um grande problema de saúde pública. Dentre os patógenos de maior relevância médica envolvidos estão *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* (REVIE *et al.*, 2018; HEUNG, 2020). Doenças causadas por fungos têm ganhado destaque devido sua alta taxa de morbidade e mortalidade. Estimativas de que 1 bilhão de indivíduos podem apresentar/conviver com alguma infecção fúngica, sendo aproximadamente mais de 150 milhões de nível considerado grave, estudos apontam que 2,55 milhões de mortes são atribuídas diretamente a infecções fúngicas por ano (Bongomin *et al.*, 2017; Denning, 2024).

A OMS (2022) publicou um relatório no qual aponta a primeira lista de patógenos classificados como prioritários fúngicos, englobando um catálogo dos 19 fungos que representam a maior ameaça à saúde pública, divididos em grupos de risco crítico, alto e médio, onde no grupo de risco crítico temos *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* e no de alto risco *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.

Na atualidade, a candidíase é a infecção fúngica oportunista com maior prevalência no mundo, causada por leveduras do gênero *Candida*. Este gênero engloba mais de 200 espécies de leveduras, onde *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada em infecções humanas, existindo mais de 20 espécies capazes de causar patologias no homem. Estas leveduras são residentes comuns do trato intestinal de seres humanos, podendo também ser encontradas nas mucosas, como a vaginal. Dificilmente são isoladas da pele íntegra, e quando ocorre pode ser indicativo de uma proliferação anormal no intestino ou ligada a uma doença de pele preexistente (Arya; Naureen, 2025; Brunke *et al.*, 2016; Fornari *et al.*, 2016; Papon *et al.*, 2013).

Devido a sua alta prevalência, quando comparado aos demais organismos fúngicos patogênicos ao homem, o gênero *Candida* se destaca sendo reconhecido como o mais frequentemente isolado em amostras clínicas, principalmente de pacientes internados em ambientes hospitalares, sendo responsabilizado por aproximadamente 750 mil casos de doenças invasivas anualmente (Bongomin *et al.*, 2017; Neto-Junior *et al.*, 2024). Dentre as espécies deste gênero, de grande importância médica e patológicas ao ser humano, a nível global são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*), *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) e recentemente *C. auris* (Arendrup; Patterson, 2017; Cabrera-Guerrero *et al.*, 2025; Colombo *et al.*, 2017).

No Brasil, os casos de candidemias vem crescendo, foram reportadas taxas de 2,49 casos de candidemias a cada 1000 internações, com aproximadamente 50% de mortalidade (CONITEC, 2022; Colombo, et al., 2006). Dentre as espécies não-albicans mais frequentemente isoladas temos: *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Nucci, et al., 2013).

O gênero *Candida* dispõe de diversos fatores de virulência, destacando-se: proteases e lipases, hemolisinas, enzimas hidrolíticas extracelulares, como fosfolipase e proteinase, alteração fenotípica e produção de biofilmes, formados principalmente em ambiente hospitalar, em cateteres e dispositivos protéticos, constituindo um importante fator de infecções disseminadas por *Candida*, principalmente por tolerância intrínseca e resistência a quase todos os antifúngicos em uso clínico, como os azólicos e a anfotericina B (Cavalheiro; Teixeira, 2018; MBA; Nweze, 2020).

Associado à alta incidência dessas infecções, a resistência aos antifúngicos se torna uma preocupação (Fisher et al., 2018), já que o número de agentes antifúngicos disponíveis no mercado é reduzido, quando comparado com antibacterianos (Chang et al., 2017; Cortés et al., 2019). Segundo Firacative *et al.* (2021), os quadros de infecções fúngicas são desafiantes, desde obter o sucesso da terapia, tendo em vista que o tratamento pode ser mais demorado do que a de infecções bacterianas.

Nesse contexto, o desenvolvimento de novas opções terapêuticas antifúngicas que apresentem eficácia não apenas em células planctônicas, mas também em biofilme, se torna necessário. O reposicionamento de fármacos é uma estratégia que visa utilizar medicamentos já disponíveis no mercado para fins diferentes dos originais (Gómez-Gaviria et al., 2024; Pushpakom et al., 2018). Nos últimos anos, diversos estudos e publicações científicas vêm abordando a temática de reposicionamento, onde a pesquisa por novas opções terapêuticas utilizando fármacos já conhecidos, com outras indicações terapêuticas, é uma proposta interessante para o tratamento de espécies resistentes aos antimicrobianos (Andrade Neto et al., 2019; Costa e Silva et al. 2017; da Silva et al., 2013; Duarte, 2020).

Vários medicamentos antipsicóticos, como por exemplo clozapina, quetiapina, risperidona, têm sido estudados com o objetivo de redirecioná-los para tratamento frente a microrganismos (Nehme *et al.*, 2018). O haloperidol é um fármaco pertencente à primeira geração de antipsicóticos, pertencente à classe das butirofenonas. Seu mecanismo de ação acontece por meio de uma ligação de força antagonista aos receptores dopaminérgicos,

especialmente D2, localizados na via mesolímbica e cortical, onde sua principal ação é de efeito antipsicótico (Rang; Dale, 2016).

Yang *et al.* (2021) avaliaram derivados do haloperidol frente às cepas de *Candida* spp. e de *Cryptococcus* spp. e como resultado, obtiveram concentração inibitória mínima (CIM) para *C. albicans* maiores de 128 µg/mL, mas em *C. parapsilosis* e *C. glabrata* os valores variaram de 32 à 128 µg/mL. Já para cepas de *Cryptococcus* variou de 32 à 128 µg/mL.

Portanto, diante do exposto, vemos que o haloperidol é um potencial fármaco a ser estudado para fins de tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., com promissora atividade dentro do gênero. No entanto, poucos estudos publicados exploram essa atividade, apesar de ser efetiva em baixas concentrações, se faz necessário a avaliação por meio de parâmetros que possam verificar sua ação frente os organismos mais resistentes e na formação de biofilmes, bem como segurança de seu uso como droga antifúngica, além da elucidação de seu mecanismo de ação, para que seja possível seu planejamento como formulação para tratamento e inserção no mercado.

2. Referencial teórico

2.1 Fungos e seu potencial patogênico ao homem

A nível ambiental, os fungos atuam como um importante componente biótico dos ecossistemas, desempenhando como funções a fixação de nutrientes e minerais, reguladores de ecossistemas na proteção contra estresses ambientais e inibindo a disseminação de outros microrganismos prejudiciais (atuando no controle de pragas e doenças), desempenha papel importante na regulação da dinâmica dos processos fisiológicos no ambiente do solo, além de serem considerados saprófitas e atuarem na decomposição e transformação da matéria orgânica, disponibilizando no solo substâncias fundamentais para o desenvolvimento de outros organismos, além de melhorar aspectos físicos do solo (Frac et al., 2018; Perotto et al., 2013).

O papel do fungo não é limitado ao meio ambiente, o ser humano também conseguiu desenvolver tecnologias e métodos para utilizar os benefícios desses organismos no dia a dia, podendo serem consumidos diretamente ou serem utilizados como aditivos na fabricação e processamento de alimentos, na produção de produtos alimentícios específicos (pães, bolos, bebidas lácteas e cervejas) (Pouris et al., 2024). A indústria de biotecnologia de alimentos faz o uso considerável de fungos, como cogumelos, leveduras para fermentação e fungos filamentosos, esses alimentos possuem alto valor nutricional (Singh et al., 2020).

É válido ressaltar a importância dos fungos em diversas searas, não servindo apenas como fonte de alimento, mas com importante papel em diversas aplicações de valor agregado, como por exemplo na obtenção de proteases, amilases, invertase, ácido cítrico, ácido glucônico, proteínas inativadoras de ribossomos, vitaminas, pigmentos e outros (Bolognesi et al., 2016; Porro; Branduardi, 2017; Singh et al., 2020).

A capacidade de habitar diferentes ambientes demonstra como o modo de vida desses microrganismos é bastante diversificado, desempenhando várias formas de relações ecológicas importantes, interagindo com outros organismos e modo a trazer benefícios a ambos (mutualismo); bem como essa interação pode ocasionar apenas benefícios próprios e prejuízos ao organismo parasitado (parasitismo); ou quando a resultante desta interação não gera nenhum dano ao organismo associado, retirando dele apenas recursos benéficos ao fungo (comensalismo) (Bahram; Maherali; Klironomos, 2007; Netherway, 2022). Além de organismos vivos, os fungos conseguem habitar perfeitamente o solo, possuindo alta plasticidade e, com isso, conseguem

sobreviver e se adaptar mesmo em condições adversas ou desfavoráveis (Fricker et al., 2017; Sun et al., 2005).

Os organismos fúngicos pertencem ao domínio Eukarya, este tem um ancestral em comum com os animais, reino Fungi, estima-se que possui em torno de cinco milhões de espécies, onde até então 120 mil foram identificadas, são organismos ubíquos, os quais podem habitar ecossistemas terrestres, aquáticos (englobando rios e lagos e/ou marinhos) (Lücking et al., 2020; Tortora; Funke ; Case, 2016).

A interação fúngica com o ser humano pode culminar em patologias, evento associado principalmente a indivíduos com comprometimento da sua imunidade ou condição de risco o qual está exposto, como exemplo imunossupressão em indivíduos transplantados, pessoas com HIV (não tratadas), pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) e hospitalizados por longos períodos (Lockhart; Guarner, 2019; Zhou et al., 2020).

Logo, é possível verificar a participação de diversas variáveis que influenciam no aumento das infecções fúngicas, os tratamentos médicos em determinadas comorbidades podem, por outro lado, favorecer uma redução da imunidade do paciente, apesar do avanço alcançado pelos tratamentos médicos, como exemplo os transplantes de medula e demais órgãos, tendo em vista o uso de medicamentos para a imunossupressão, tratamento com quimioterápicos também podem afetar o sistema imunológico, tornando esses pacientes mais vulneráveis e susceptíveis à infecções fúngicas graves (Firacative, 2020; Maertens, 2024; Maschmeyer, 2006).

O avanço de técnicas e procedimentos tendem a melhorar a qualidade de vida das pessoas, entretanto, em determinadas situações, tais avanços acabam sendo fatores responsáveis o aumento na susceptibilidade de infecções fúngicas invasivas nessa população, uma vez que tem se relacionado bastante fungos como agentes de infecções nosocomiais, visto o aumento de isolados identificados desses agente, onde os principais acometidos são pacientes não imunocompetentes ou com fator de risco associado (Badiie; Hashemizadeh, 2014; Köhler et al., 2017; Matta; Souza; Colombo, 2017).

2.2 Epidemiologia relacionada a infecção fúngica

Segundo Murray, Rosenthal e Pfaller (2017) os agentes patogênicos fúngicos de alta relevância médica pertencem aos filos Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota e

Deuteromycetes, este último, por sua vez, encontram-se inseridos os fungos anamórficos. Na clínica, os fungos descritos como relacionados à morbidade e mortalidade em humanos são pertencentes aos gêneros *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp., destacando-se o primeiro por se tratar do mais isolado dentre esses, pesquisas indicam ser o quarto principal agente causador de infecções na corrente sanguínea, com taxa de mortalidade variando de 50 a 70% (Diekema et al., 2012; Ghazi et al., 2019; Janbon et al., 2019; Pappas et al., 2018).

As infecções fúngicas têm grande impacto ao redor do mundo, estimativas sobre esta temática apontam uma incidência anual de 6,55 milhões de novos casos de infecções fúngicas invasivas, deste quantitativo aproximadamente 3,8 milhões vem a óbito, das quais 2,55 milhões são diretamente atribuídas a essas infecções, no entanto esse número pode ser ainda maior, uma vez que a margem desta estimativa varia de 30 a 90% (Denning, 2024).

A aspergilose invasiva é uma das infecções mais incidentes, com mais de 2,1 milhões de pessoas afetadas por ano, ocorrendo principalmente em indivíduos com comorbidades graves associadas, como: doença pulmonar obstrutiva crônica, pacientes em terapia intensiva, pacientes com câncer de sangue ou pulmão, com alta taxa de mortalidade (85,2%). As infecções causadas por *Candida* causam em torno de 1 milhão de mortes anualmente, sendo a cada ano 1,57 milhão de novas infecções com uma taxa de mortalidade aproximada de 63,6% (Bongomin et al., 2017; Denning, 2024).

Estudo avaliando as hospitalizações nos EUA relacionadas às infecções causada por agentes fúngicos por um período de 10 anos demonstrou que o microrganismo mais isolado foi *Candida* spp., totalizando 26.750 mil internações, o que impactou nos gastos com saúde, aproximadamente 1,4 bilhão de dólares (Benedict et al., 2019). No entanto, recentemente, as estimativas atualizadas dos custos com as doenças fúngicas sejam de US\$ 19,4 bilhões por ano nos Estados Unidos, os maiores custos estão relacionados aos cuidados médicos-hospitalares (US\$ 13,4 bilhões), os demais custos incluem afastamento do trabalho (US\$ 1,7 bilhão) e com óbitos (US\$ 4,3 bilhões) (Benedict et al., 2025).

Na Europa e nos Estados Unidos, as taxas de internações causadas por infecção fúngica causada por *Candida* foi de 0,2-1,87 e 0-2,4 a cada 1000 admissões hospitalares, respectivamente (Benedict et al., 2019). A nível mundial a terceira causa mais comum de infecções da corrente sanguínea são causadas por microrganismos do gênero *Candida* spp. De

grande impacto, a candidíase invasiva tem sido responsável por uma taxa de mortalidade de 40% a 50% em unidades de terapia intensiva (UTIs) (Chen *et al.*, 2021).

O Brasil está entre os países com maior número de casos relacionados às infecções fúngicas no mundo, Giacomazzi *et al.* (2019) revelou em seu estudo uma estimativa de que 3,8 milhões de brasileiros possam estar acometidos por alguma doença fúngica grave, o que aumenta a gravidade da situação é a falta de dados epidemiológicos fidedignos.

Dados do estudo realizado por Damasceno *et al.* (2021) revelou a densidade de mortalidade observada em diversos casos de infecções fúngicas, especialmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, sendo a paracoccidioidomicose a causa primária de óbito mais relatada, já em pacientes HIV positivos as micoses oportunistas foram as infecções fúngicas mais frequentes registradas (criptococose e histoplasnose).

No Brasil, os casos de candidemias vem crescendo, foram reportadas taxas de 2,49 casos de candidemias a cada 1000 internações, com aproximadamente 50% de mortalidade (Colombo, *et al.*, 2006; Conitec, 2022). Um recente estudo realizado no sul do país apontou que 2,7 casos de candidemia para cada mil pacientes por dia, sendo 1,2 episódios em casos relacionados à casos de internações, apesar do grande número de espécies, cinco são responsáveis por causar cerca de 95% dos casos de candidíase invasiva: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, complexo *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*. Das quais *Candida albicans* é mais comum (Conitec, 2022).

Estudos sobre a incidência global de doenças fúngicas são delicados, uma vez que o levantamento de dados sobre a temática sofre com falhas dos sistemas nacionais de vigilância regulares, principalmente pela ausência de notificação obrigatória de doenças fúngicas, pelo subdiagnóstico na clínica fora de unidades especializadas, seguido do baixo desempenho dos testes para diagnósticos e pelos poucos estudos relacionados publicados (Bongomin *et al.*, 2017; Denning, 2015). Logo, estratégias e medidas voltadas ao combate desta problemática são necessárias, desde o diagnóstico até o tratamento mais eficaz.

2.3 Infecções fúngicas e gênero *Candida* spp.

Os fungos deste gênero são microrganismos os quais podem ser encontrados em diversos ambientes (ubíquos), comensais ao ser humano, habitando sítios da região de mucosa (vulva vaginal em mulheres), no trato gastrointestinal, na uretra e no trato respiratório (Ciurea et al., 2020). Taxonomicamente, estes fungos pertencem ao reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae* e gênero *Candida* (Giolo; Svidzinski, 2010).

Nos últimos anos, é possível perceber a preocupação com o aumento de infecções fúngicas, esses microrganismos são reconhecidos como agentes de infecções nosocomiais de importância médica, sendo o gênero *Candida* spp. responsável pela maioria das infecções fúngicas invasivas (Matta; Souza; Colombo, 2017). Apesar disso, essa levedura pertence à microbiota normal da pele e das mucosas, presente no trato gastrointestinal e geniturinário, no entanto em situações que afetem o equilíbrio da microbiota e estado imunológico do hospedeiro a *Candida* spp. pode se tornar um agente infeccioso de alto risco (Davidson; Netea; Kullberg, 2018).

Apesar da ampla variedades de fungos, o gênero *Candida* spp. tem se destacado como um dos principais agentes relacionados às infecções fúngicas, despontando como as principais causadoras de morbidade e mortalidade, responsáveis por mais de 26 mil hospitalizações anualmente, gerando impacto nos gastos com saúde em torno de 1,4 bilhões de dólares (Arendrup; Petterson, 2017; Benedict et al., 2019; Firacative, 2020). Estudos indicam que, globalmente, existe um aumento dos casos de candidemia e candidíase invasiva, estima-se que os números de infecções ficam entre 250.000 e 700.000 (Tsay et al., 2020).

O gênero *Candida* spp. tem sido responsável pelo maior número de casos envolvendo infecções fúngicas em humanos (Tabela 1). Ao observarmos a tabela, verificamos que as espécies mais frequentemente associadas a infecções são também comensais, o qual está conectado ao oportunismo, principalmente, em pacientes com sistema imune fragilizados, em especial indivíduos com HIV/AIDS (Köhler et al., 2017; Tamo, 2020). Estudos recentes apontam que, a cada ano, aproximadamente 1.565.000 pessoas são acometidas por infecção sanguínea por *Candida* ou candidíase invasiva, deste quantitativo 995.000 vem a óbitos (63,6%) (Denning, 2024).

Tabela 1 - Espécies de *Candida* spp. Isoladas em ambientes clínicos e seus sítios

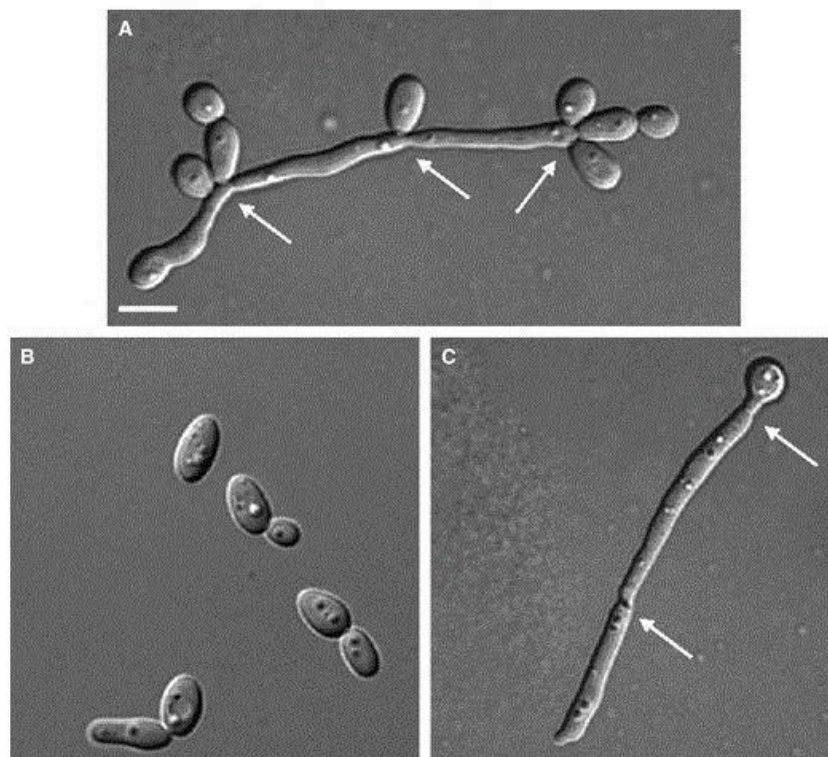
Espécies mais frequentes	Ecologia
<i>C. albicans</i>	Levedura comensal do trato digestivo, genital e respiratório, representa mais de 75% das leveduras isoladas em humanos
<i>C. glabrata</i>	Mucosa digestiva e urogenital
<i>C. parapsilosis</i>	Pele
<i>C. tropicalis</i>	Solo, água, trato digestivo, urinário e respiratório
<i>C. krusei</i>	Comida (laticínios, cerveja)
Espécies menos comum	Ecologia
<i>C. ducliniensis</i>	Aves, trato digestivo
<i>C. guilliermondii</i>	Pele
<i>C. lusitaniae</i>	Ambiente, trato digestivo de animais
<i>C. kefyr</i>	Alimentos, trato digestivo, trato respiratório e urinário
<i>C. lipolytica</i>	Animais e plantas
<i>C. ciferri</i>	Onicomicoses
<i>C. inconspicua</i>	Trato digestivo, ambiente hospitalar
<i>C. rugosa</i>	Água, comida (produtos lácteos)
<i>C. famata</i>	Pele
<i>C. africana</i>	Vagina

Fonte: Adaptado de Tamo, 2020.

Em torno de 200 espécies compõe o gênero em questão, no entanto, apenas algumas são relacionadas às infecções em humanos, onde cerca de 90% são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *C. auris*, esta última, apesar de recente, vem causando grande preocupação no meio acadêmico, devido ter se demonstrado possuir sensibilidade reduzida aos antifúngicos disponíveis (Rhodes; Fisher, 2019; Borman; Johnson, 2021; Köhler et al., 2017; Pappas et al., 2015). Fungos pertencentes ao gênero *Candida* spp., como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. auris*, e, até pouco tempo, *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*), *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) têm um forte potencial patogênico e estão comumente associadas a como principal causa de infecções oportunistas em humanos, como podemos observar na tabela 1 (Lopes; Lionakis, 2022; Wiederhold, 2021).

Quanto aos aspectos morfológicos de *Candida* spp., em algumas espécies, são pleomórficas, onde a forma leveduriforme como blastoconídio pode ser encontrada, bem como a forma filamentosa (hifas verdadeiras e pseudohifa), essa capacidade de alternar, podendo assumir distintas formas ao mesmo tempo está associado a transição entre a forma comensal e patógena (Figura 1) (Tsui; Kong; Jabra-Rizk, 2016).

Figura 1. Aspectos morfológicos de *Candida* spp



Fonte : Veses; Gow, 2009

Morfologias de células de *Candida albicans* (barra de escala representa 10 μ m). (A) apresenta estrutura pseudohifal ramificada com brotos laterais, (B) células de leveduriformes e (C) filamento pseudohifal altamente alongado. As setas apontam para constrições nos septos.

O emergente patógeno do gênero *Candida* spp. (*C. auris*) tem sido um fator preocupante, principalmente, por ser caracterizado em infecções invasivas, surtos em ambientes de saúde e resistência aos múltiplos tratamentos antifúngicos clínicos disponíveis (Lass-Flörl; Steixner, 2023; Parsons; Diekman, 2023). Atualmente, encontra-se na lista de patógenos fúngicos prioritários, juntamente com a *C. albicans* no grupo crítico, reafirmando sua importância clínica (OMS, 2022).

2.4 Fatores de virulência relacionadas à levedura *Candida*

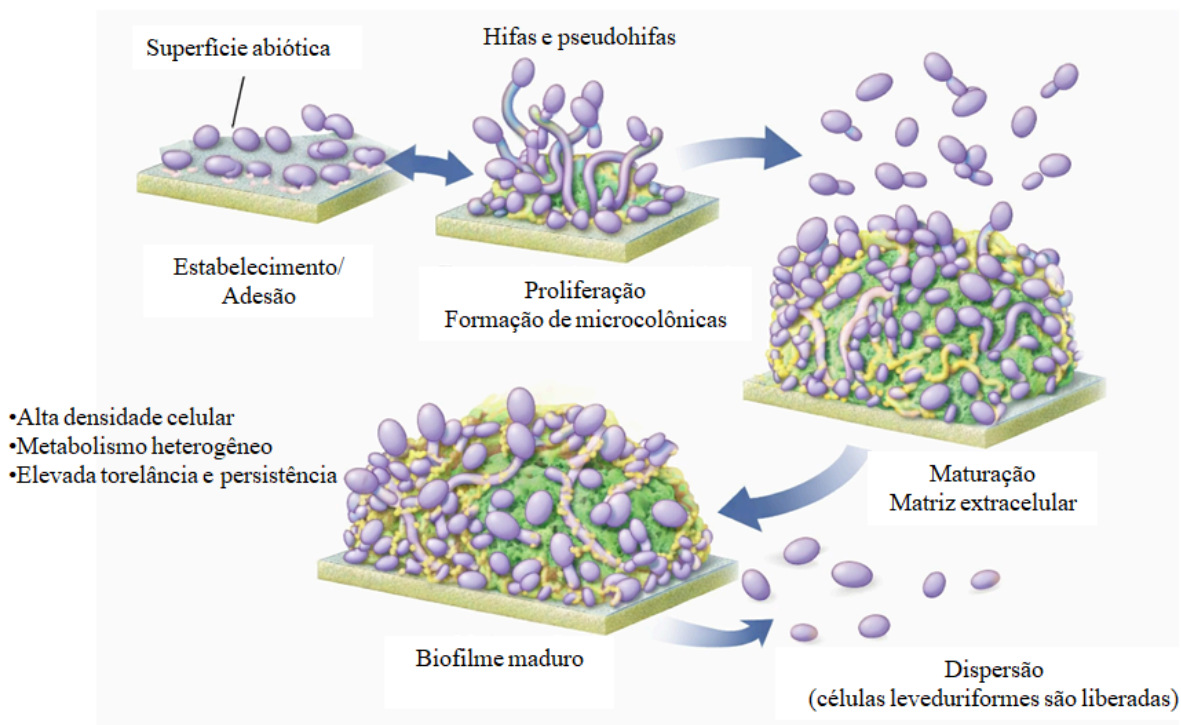
O gênero *Candida* possui importantes mecanismos para que o microrganismo possa vencer as adversidades ambientais, o que auxilia em sua capacidade de sobreviver e se adaptar às diferentes condições do ambiente o qual se encontra. Com isso, esses microrganismos são capazes de exercer funções primordiais para seu estabelecimento em locais diversos, resistindo às variações do clima e temperatura, meios para aquisição dos nutrientes essenciais, conferir resistência para instalação da infecção frente ao sistema imune do seu hospedeiro e resistir aos tratamentos com antifúngicos (Köhler et al., 2017).

Este gênero dispõe de diversos fatores de virulência, destacando-se: proteases e lipases, hemolisinas, enzimas hidrolíticas extracelulares, como fosfolipase e proteinase, alteração fenotípica e produção de biofilmes, formados principalmente em ambiente hospitalar, em cateteres e dispositivos protéticos, constituindo um importante fator de infecções disseminadas por *Candida*, principalmente por tolerância intrínseca e resistência a quase todos os antifúngicos em uso clínico, como os azólicos e a anfotericina B (Cavalheiro; Teixeira, 2018; MBA; Nweze, 2020).

A instalação, manutenção e disseminação no hospedeiro são favorecidos e contribuídos pelos fatores de virulências do microrganismo, dentre eles podemos citar: a adesão do patógeno aos tecidos, o dimorfismo, a secreção de enzimas, a regulação do pH que circunda o organismo, a adaptação metabólica e a formação de biofilmes. (Mayer; Wilson; Hube, 2013).

Um fator de virulência importante dos microrganismos fúngicos é sua capacidade de formar biofilmes, tanto em superfícies abióticas, como bióticas. Uma gama de materiais, como cateteres, dentaduras e superfícies de células mucosas são exemplos comuns vistas na clínica. O processo de formação dos biofilmes ocorre de modo sequencial que inclui a adesão de células de levedura ao substrato, crescimento e proliferação das células de levedura, a formação de hifas na parte superior do biofilme, o acúmulo de material da matriz extracelular e, por fim, ocorre a dispersão das células de do complexo do biofilme (Figura 2). O biofilme já maduro possui maior resistência às adversidades e a ação de agentes antimicrobianos e fatores imunológicos do hospedeiro, quando comparadas às células planctônicas (Hube, 2013; Wang et al., 2024; Mayer; Wilson).

Figura 2. Etapas de formação de biofilme de *Candida*



Fonte: Lohse et al (2017). Adaptado

A etapa de adesão é fundamental para a formação do biofilme. Neste processo adesinas são utilizadas para promover a ligação à outras células, tanto epiteliais como a outras células microbianas circundantes, ou superfícies abióticas. Uma vez aderidas, o desenvolvimento do biofilme segue através de modificações à nível morfológicos, incluindo o aumento do número de células e a produção de EPS (substâncias poliméricas extracelulares), fundamentais para a arquitetura final do biofilme. Os biofilmes formados dependem do EPS produzido, conferindo uma estrutura tridimensional hidratada semelhante a um gel, nesta as células ficam parcialmente imóveis. O EPS pode desempenhar diferentes funções, desde a defesa contra a fagocitose, estrutura para integridade do biofilme e prevenção da chegada de fármacos nas células (Cavalheiro; Teixeira et al., 2018).

A formação de biofilmes de *Candida* spp. Pode ser compreendida em três fases: a fase inicial compreende as primeiras 6 horas, seguida da fase intermediária (7-12 horas) e sua fase madura (13-48 horas). Após o contato inicial, seguida da adesão das leveduras à superfície, microcolônias são formadas na camada basal e camadas superiores serão posteriormente

formadas, com a presença de hifas e produção da matriz extracelular. (Ghannoum et al., 2015). Com o biofilme maduro e estabelecido existe a possibilidade de disseminação de células progênes do biofilme, as quais se desprendem migrando para outros pontos para formar mais biofilme (Cavalheiro; Teixeira et al., 2018).

O biofilme funciona como uma comunidade coordenada de microrganismos, os quais permanecem irreversivelmente aderidos a uma superfície, produzindo matriz extracelular. As células presentes no biofilme podem apresentar de modo diferente, quando não associadas ao biofilmes em suas características fisiológicas e morfológicas, um exemplo ocorre na metabolização lenta ou ausente de moléculas de antimicrobianos, o que confere a esta comunidade resistência aos tratamentos e a adversidades externas (Cavalheiro; Teixeira, 2018; Borghi et al., 2015).

Os biofilmes de *C. albicans* são fortemente estruturados, contendo diferentes formas de células: leveduriforme, pseudohifais e hifais protegidas por uma matriz extracelular que as circunda. Na clínica, a formação de biofilme em dispositivos médicos implantados: cateteres, próteses articulares e marca-passos, os biofilmes de *C. albicans* também podem ser formados em superfícies do hospedeiro (Lohse et al., 2017).

Os biofilmes de *Candida* spp. podem agravar as infecções causadas, logo o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no âmbito clínico, bem como a procura de novas soluções, sejam elas isoladas ou em conjunto, possam ser utilizadas no combate do biofilme em suas diferentes etapas de maturação.

2.5 Resistência dos microrganismos ao tratamento com antifúngicos

Os organismos vivos têm como processo natural e espontâneo a mutação do seu material genético, por meio desse processo, a exposição desses organismos a agentes antimicrobianos vem a contribuir para seleção de cepas resistentes, uma vez que a população de cepas sensíveis é reduzida (Steenwyk; Rokas, 2018; Fiol; Mattos Filho; Groppo, 2000). As mutações que têm como resultante a resistência antimicrobiana ocorrem alterando a ação do fármaco, o qual envolve mecanismos que impedem a ação da molécula frente ao microrganismo, como exemplo: ativação de mecanismos de efluxo (com isso retirando o agente nocivo);

alteração do alvo antimicrobiano, reduz a relação de afinidade, diminuindo sua absorção (Munita; Arias, 2016).

O perfil de resistência pode ser identificado quando as concentrações já preconizadas de uso nos tratamentos não são mais efetivas no combate da infecção, ou quando seu efeito é alcançado ao elevar a dose de concentração, sendo específica para determinadas resistências, mas ainda sem efetividade clínica comprovada (Pfaller, 2012).

A resistência impacta alterando os mecanismos, à nível molecular e bioquímico, envolvidos no processo de metabolização, reduzindo a eficácia dos antimicrobianos normalmente utilizados nos tratamentos de infecções fúngicas e bacterianas, os principais mecanismos conhecidos envolvidos são: as bombas de efluxo, enzimas que atuam na inativação e modificação das moléculas antimicrobianas, alteração da permeabilidade da membrana e alteração no sítio de ação do fármaco (local de ligação da molécula antimicrobiana) (Elshobary et al., 2025; Arzanlou; Chai; Venter, 2017).

Os fatores ligados ao desenvolvimento de resistência podem ter influências diversas, como situações de estresse do ambiente; uso de moléculas antimicrobianas de maneira indevida ou não indicada (automedicação), provocando pressão seletiva onde as cepas sensíveis são eliminadas e as cepas resistentes sobrevivem; grande uso de moléculas antimicrobianas em atividades agrícolas e pecuárias no controle de pragas e manejo de animais; e a transferência de cepas com perfil resistente que colonizam outros microrganismos (Uddin et al., 2021).

Estudos sobre a temática de resistência aos antimicrobianos as classificam em três tipos distintos: adaptativa, adquirida e intrínseca, dentre elas, a adaptativa decorre do processo evolutivo e adaptativo, em resposta aos estímulos do ambiente e tem caráter transitório; na resistência adquirida o material genético (gene de resistência) é recebido de um outro organismo doador resistente; a intrínseca é mais ligada a uma característica própria (fenotípica) do microrganismo; (Arzanlou; Chai; Venter, 2017; Lee, 2018; Munita; Arias, 2016).

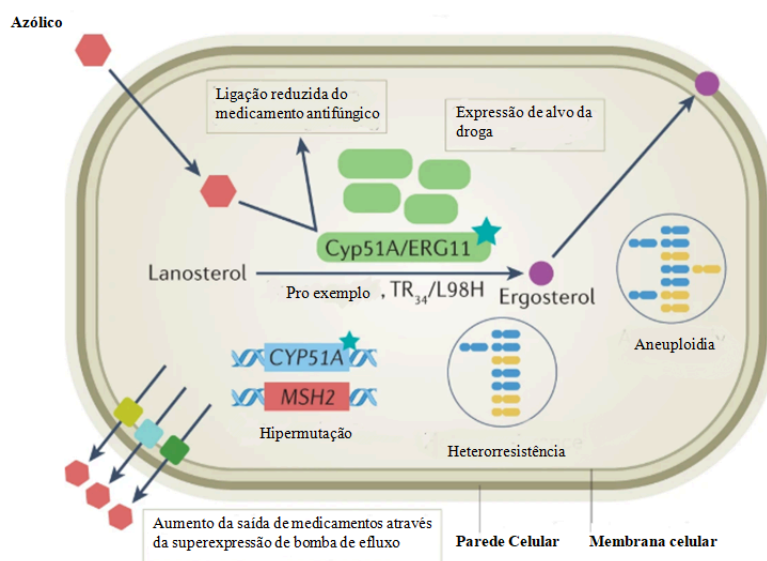
Apesar da plasticidade dos microrganismo e ocorrer de forma natural, a resistência fúngica é uma preocupação a nível global, tendo em vista o aumento nas altas taxas de infecção e morte causadas por microrganismos resistentes aos tratamento fúngicos, o que também causa impacto nos custos (Gupta; Datta, 2019). A resistência fúngica é vista como um grande problema de risco à saúde, sendo uma realidade presente ao redor do mundo, diretamente relacionada a ambientes hospitalares, gerando preocupação em toda a comunidade acadêmica e clínica devido

às altas taxas de morbidade e mortalidade, situação se torna ainda mais problemática quando os pacientes acometidos já possuem comorbidades base que os fragilizam a este cenário (Bongomin et al., 2017; Friedman; Schwartz, 2019).

Disponível na clínica o tratamento de infecções fúngicas têm se baseado principalmente em apenas quatro classes de antifúngicos: os azóis, as equinocandinas, os polienos e o análogo de pirimidina 5-flucitosina (Bongomin et al., 2017). Diversos estudos apontam a preocupação com o crescimento da resistência aos antifúngicos, em especial o fluconazol (FLC), medicamento mais comum utilizado para tratamento de infecções fúngicas (Wiederhold, 2022, Hui; Gifford; Rhodes, 2023) (Figura 3).

O surgimento de cepas resistentes é um enorme problema ao sistema de saúde, uma vez que dificulta o tratamento das doenças ocasionadas por suas infecções, destacando-se a necessidade de buscar novas alternativas (Fang et al., 2023).

Figura 3. Mecanismos de resistência relacionados ao uso de azólicos



Fonte: Fischer et al., (2022). Adaptado pelo autor

Na literatura é relatado que a principal resistência aos azóis deve-se ao aumento do efluxo do fármaco da célula fúngica, em particular em espécies de *Candida* spp., seguida das modificações que ocorrem nas vias de biossíntese de esteróis, acredita-se que essas alterações

são causadas por mutações pontuais e inserções no promotor do CYP51A, como em *Aspergillus fumigatus*. Em *Cryptococcus neoformans*, tem-se como mecanismo de resistência a superexpressão do alvo do fármaco e das bombas de efluxo, neste contexto causada por aneuploidia cromossômica e hipermutação (Fischer, 2022).

Com a crescente preocupação da temática sobre a resistência de medicamentos antifúngicos em todo o mundo, a OMS (2022) publicou um documento, contendo uma lista de patógenos fúngicos prioritários, indicando 19 fungos os quais representam risco à saúde pública, dividido em três grupos de prioridades: crítico, alto e médio (Tabela 2). No grupo crítico, possuem duas espécies do gênero *Candida* de relevante importância clínica, *Candida albicans* e *C. auris*, esta última é considerada uma espécie emergente, resistente a múltiplos medicamentos antifúngicos (Rhodes; Fischer, 2019; WHO, 2025).

Tabela 2 - Lista de patógenos prioritários OMS 2022

Grupo de Prioridade	Espécies
Crítico	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Candida auris</i>
Alto	<i>Nakaseomyces glabratus</i> (<i>Candida glabrata</i>), Agentes causadores de eumicetoma, <i>Fusarium spp.</i> (Resistente à vancomicina), <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Histoplasma spp.</i> , <i>Mucorales</i> e <i>Candida tropicalis</i>
Médio	<i>Scedosporium spp.</i> , <i>Lomentospora prolificans</i> , <i>Coccidioides spp.</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>), <i>Cryptococcus gattii</i> , <i>Talaromyces marneei</i> , <i>Pneumocystis jirovecii</i> , <i>Paracoccidioides spp.</i>

Fonte: OMS (2022). Adaptado pelo autor

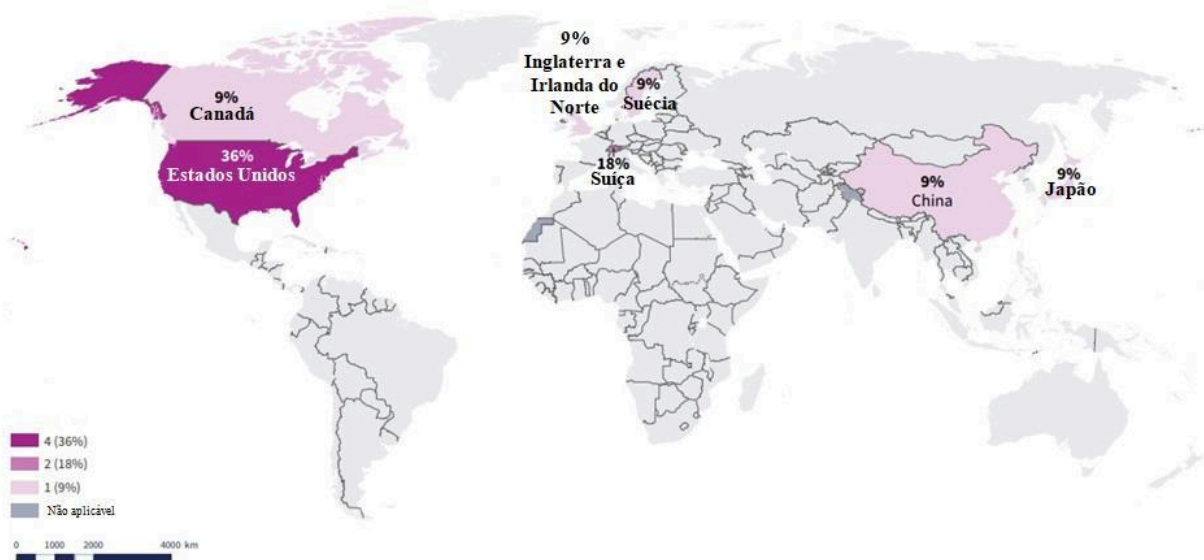
A pesquisa de novas moléculas antimicrobianas é fundamental e de alta prioridade, especialmente visando o tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes, uma vez que poucas moléculas, principalmente para infecções fúngicas, foram aprovadas na última década (TACCONELLI et al., 2018; OMS, 2025).

2.6 Avaliação do haloperidol como potencial agente antifúngico frente a cepas de *Candida spp.*

Um recente relatório divulgado pela OMS (2025) aponta um preocupante dado referente ao desenvolvimento de novas moléculas antifúngicas, onde, na última década, foram aprovados apenas quatro novos medicamentos antifúngicos por autoridades regulatórias dos Estados Unidos, da União Europeia e da China.

A OMS (2022) ao abordar os patógenos fúngicos prioritários, indicou que a letalidade dos agentes fúngicos mais mortais podem chegar à 88%, o que corrobora com a urgência em se investir em pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas. Recentemente, a OMS (2025) divulgou que o desenvolvimento de medicamentos antifúngicos (especialmente frente aos patógenos fúngicos prioritários) está sendo realizado, predominantemente, por empresas localizadas em países de alta e média-alta renda (Figura 4).

Figura 4 - Distribuição geográfica dos países com pesquisas envolvendo moléculas antifúngicas



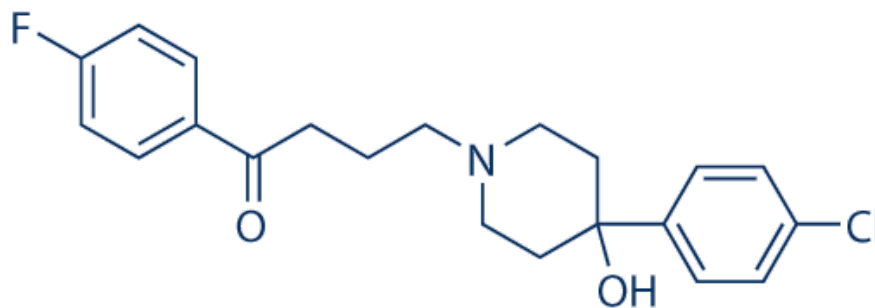
Fonte: OMS, 2025. Adaptado pelo autor.

Vários medicamentos antipsicóticos têm sido estudados com o objetivo de redirecioná-los para tratamento frente a microrganismos (Nehme et al., 2018). O haloperidol é um medicamento antipsicótico de primeira geração, descoberto no final da década de 1950, tem como finalidade de aplicação médica no controle de sintomas positivos da esquizofrenia (alucinações e delírios), síndrome de Tourette e no tratamento de distúrbios comportamentais em

crianças (hiperatividade, dificuldade de atenção, alterações do humor, agressividade e impulsividade), onde estas aplicações foram aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) (Rahman; Marwaha, 2023; López-Muñoz; Alamo, 2009).

O haloperidol é um fármaco pertencente à primeira geração de antipsicóticos, pertencente à classe das butirofenonas de nomenclatura IUPAC 4-[4-(4-clorofenil)-4-hidroxipiperidin-1-il]-1-(4-fluorofenil)butan-1-ona. Seu mecanismo de ação acontece por meio de uma ligação de força antagônica aos receptores dopaminérgicos, especialmente D2, localizados na via mesolímbica e cortical, onde sua principal ação é de efeito antipsicótico (Rang; Dale, 2015). O haloperidol possui em sua estrutura central de piperidina, com substituintes hidroxila e p-clorofenila na posição 4 e uma porção de p-fluorobutirofenona, a qual é ligada ao nitrogênio. Como mecanismo de ação, pode atuar como: antagonista serotoninérgico, antagonista dopaminérgico, agente antidiscinesia e antiemético (Figura 5) (NCBI, 2004).

Figura 5 - Estrutura química do haloperidol



Fonte: Ji et al., 2020.

O haloperidol é utilizado em diversos países amplamente, com formulações diversas e doses variando, normalmente, de 0,5 a 2 mg, onde pode ser prescrita de 0,05 a 0,075 mg/kg/dia. Clinicamente, a concentração plasmática de haloperidol sugerida pode variar de 4 µg/L até 25

$\mu\text{g/L}$, no máximo, para se obter uma resposta terapêutica, a meia-vida plasmática é de 24 a 38 horas (eliminação terminal) quando administrada oralmente e de 21 a 36 horas após a administração intramuscular (Rhama; Marwaha, 2023; López-Muñoz; Alamo, 2009).

O trabalho de Ji et al. (2019) avaliou a atividade de compostos a partir da molécula do haloperidol, ou seja, derivados do benzeno ciclano, onde frente a *Candida albicans* os CIM variaram de 16 à $> 128 \mu\text{g/mL}$, para *Candida glabrata* de 2 a $>128 \mu\text{g/mL}$ e *Cryptococcus neoformans* de 2 à $>128 \mu\text{g/mL}$, no mesmo estudo a molécula inalterada do haloperidol apresentou CIM variando de 2 a $>128 \mu\text{g/mL}$, em *Candida albicans* e *C. parapsilosis* $> 128 \mu\text{g/mL}$, *C. glabrata* e *tropicalis* $64 \mu\text{g/mL}$ e em *Cryptococcus neoformans* $32 \mu\text{g/mL}$, no mesmo estudo. Yang et al. (2021) avaliaram derivados do haloperidol frente à cepas de *Candida* spp. e de *Cryptococcus* spp. e como resultado, obtiveram concentração inibitória mínima (CIM) para *C. albicans* maiores de $128 \mu\text{g/mL}$, mas em *C. parapsilosis* e *C. glabrata* os valores variaram de 32 à $128 \mu\text{g/mL}$, já para cepas de *Cryptococcus* variou de 32 à $128 \mu\text{g/mL}$.

O bromperidol, derivado a partir da molécula do haloperidol (mudança no grupo cloro (Cl) para um Bromo (Br), tem apresentado resultados promissores de ação antimicrobiana (Zolotareva et al., 2025). Ramón-Garcia et al. (2011), ao avaliar a atividade do bromperidol em *Mycobacterium tuberculosis*, obteve um CIM de 64 g/mL , tendo atividade bactericida e quando associada à espectinomicina atua sinergicamente na morte do microrganismo.

Uma pesquisa feita com bromperidol e seus derivados, quando associados a azóis de relevância clínica, podem atuar sinergicamente inibindo o crescimento fúngico e reduzindo efetivamente a quantidade necessária de azóis para alcançar a atividade antifúngica equivalente (Holbrook et al., 2017).

Portanto, diante do exposto, vemos que o haloperidol é um potencial fármaco a ser estudado para fins de tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., com promissora atividade dentro do gênero. No entanto, poucos estudos publicados exploram essa atividade, apesar de ser efetiva em baixas concentrações, se faz necessário a avaliação por meio de parâmetros que possam verificar sua ação frente os organismos mais resistentes e na formação de biofilmes, bem como segurança de seu uso como droga antifúngica, além da elucidação de seu mecanismo de ação, para que seja possível seu planejamento como formulação para tratamento e inserção no mercado.

3. HIPÓTESES

3.1 O haloperidol possui atividade antifúngica, *in vitro*, em cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.

3.2 Há sinergismo do haloperidol associado ao fluconazol, anfotericina B e itraconazol em cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.

3.3 O haloperidol apresenta atividade isolado e associado ao fluconazol, anfotericina B e itraconazol em biofilme de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

3.4 O haloperidol apresenta efeito preventivo na formação de biofilme de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol

3.5 O haloperidol age negativamente sobre a estrutura da célula fúngica, auxiliando na ação dos antifúngicos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a ação antifúngica do haloperidol em cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol, nas formas planctônicas e biofilme.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do haloperidol, fluconazol, anfotericina B e itraconazol em cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.

4.2.2 Determinar o tipo de interação farmacológica *in vitro* do haloperidol com o fluconazol, anfotericina B e itraconazol em cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.

4.2.3 Investigar o possível mecanismo de ação do haloperidol em cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

4.2.4 Avaliar a ação do haloperidol isolado em biofilme formado de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

4.2.5 Verificar o efeito inibitório do haloperidol frente ao biofilme em formação de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

4.2.6 Avaliar o efeito do haloperidol nas estruturas microscópicas do microrganismo por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos microrganismos do estudo

Foram utilizadas treze cepas clínicas de *Candida* spp. (4 *C. albicans*, 4 *C. parapsilosis*, 3 *C. tropicalis*, 2 *C. glabrata*). Além destas, utilizou-se *C. auris* 01256P obtida do CDC B11903. Para fins de controle, duas cepas padrão foram empregadas nos testes: *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258). Todos os isolados pertencem à micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas da Universidade Federal do Ceará (LABIMAN/UFC), os quais se encontravam armazenadas em meio caldo Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (dinâmica, São Paulo, Brasil) em freezer à -22°C.

O procedimento de recuperação foi realizado através da transferência de uma alíquota de 100 µL da amostra mãe para 1000 µL de meio caldo Sabouraud dextrose, incubadas em seguida por um período de 24 h a 35 ± 2°C. Seguidamente, fazendo o uso de alça bacteriológica, aproximadamente 10 µL da suspensão foi semeada em meio de cultura ágar batata dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia), novamente seguiu-se para incubação por 24 h a 35 ± 2°C. Todos os processos citados foram realizados seguindo normas de biossegurança nível 2 (DA SILVA et al., 2013).

5.2 Ativos fármacos utilizados

Os fármacos: haloperidol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich Co (Sigma-chemical, St. Louis, MO, USA). Para os ensaios, a anfotericina B e o itraconazol foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração ≤ 2,5%, enquanto o fluconazol e o haloperidol foram dissolvidos em água destilada estéril.

5.3 Avaliação da atividade antifúngica - teste de sensibilidade

5.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A atividade antifúngica do haloperidol frente a cepas de *Candida* spp. foi medida utilizando a microdiluição em caldo preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) (CLSI, 2008) para determinação da CIM. Para o início dos testes, as cepas foram repicadas em meio ágar batata dextrose e incubadas em estufa durante 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para garantir que estivessem na fase exponencial de crescimento. Os inóculos foram preparados suspendendo os microrganismos em solução salina estéril (0,85%), obtendo-se turvações semelhantes à escala 0,5 de McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil), referente à concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Em seguida, foi realizada mais uma diluição em concentrações de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 (pH 7,0) tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS, Sigma-chemical).

Em placas de 96 poços com fundo arredondado, foram adicionados 100 μL de RPMI 1640 nos poços das colunas 1 e de 3 a 12. Nos poços da coluna 2, foram adicionados 200 μL das drogas, neste momento a concentração encontra-se o dobro da concentração inicial a ser testada, as quais foram realizadas diluições seriadas na ordem 2 até os poços da coluna 11. Terminada esta etapa, foram adicionados 100 μL dos inóculos diluídos aos poços referentes às colunas 2 a 12. As colunas 1 e 12 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e sua leitura realizada visualmente.

Por definição, a concentração inibitória mínima (CIM) das drogas é tida como a menor concentração a qual houve inibição visual de 50% do crescimento do microrganismo, em relação ao seu controle positivo. Os pontos de corte para os antifúngicos foram observados de acordo com o documento M27-S4 (CLSI, 2012), onde para que fossem constatada como cepas resistentes ao fluconazol deve apresentar $\text{CIM} \geq 8 \mu\text{g/mL}$, com exceção da *C. glabrata*, a qual é considerada resistente quando $\text{CIM} \geq 64 \mu\text{g/mL}$. Os testes foram realizados em triplicata, como controle de qualidade dos antifúngicos utilizados no teste as cepas padrões *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6528. O haloperidol foi testado em uma faixa de concentração de 2 a 1.024 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o fluconazol, itraconazol e anfotericina B na faixa de 0.0625 a 32 $\mu\text{g/mL}$.

5.4 Avaliação da interação entre haloperidol e antifúngicos (técnica de *checkerboard*)

O teste *checkerboard* foi realizado de acordo com Odds (2003) com base nos valores de CIM de haloperidol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B. As soluções foram preparadas com concentrações CIM₅₀ de combinações das drogas, em que as concentrações específicas das drogas utilizadas foram com base no perfil de sensibilidade de cada isolado (L. J. Silva et al., 2022).

A partir disso, foi calculado o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), segundo a classificação de Odds (2003), onde $ICIF \leq 0,5$ é considerado sinérgico (SIN), $0,5 < ICIF \leq 4,0$ é Indiferente (IND) e $ICIF > 4$ é antagônico (ANT).

5.5 Ensaios para avaliação dos possíveis mecanismos de ação

5.5.1 Preparação das células de levedura para tratamento com haloperidol

Os isolados *C. albicans* 3 e *C. auris* 01256P foram utilizados como representativos para os ensaios devido à relevância clínica e epidemiológica destas espécies. As células para suspensões foram coletadas durante a fase exponencial. As células foram centrifugadas (2.500 rpm por 5 min) e lavadas (3x) com solução salina 0.85%. Posteriormente, o concentrado celular foi ressuspenso em RPMI tamponado com MOPS (Sigma-Chemical, MO, EUA) a uma concentração de aproximadamente 10^6 células/mL. Em seguida, as células foram tratadas com haloperidol (MIC), anfotericina B (4 µg/mL) e incubadas por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Todos os testes de citometria de fluxo foram realizados utilizando FACSCalibur citômetro de fluxo (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) (Rocha da Silva et al., 2022; L. J. Silva et al., 2022).

5.5.2 Avaliação da viabilidade celular

Para a avaliação da densidade celular, as células foram tratadas com iodeto de propídio (IP), 2 mg/L, em 24 horas após a exposição à droga e a fluorescência analisada por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Um total de 10.000 eventos foram analisados por experimento, com restos celulares omitidos na análise (Rocha da Silva et al., 2022; Neto et al., 2014).

5.5.3 Determinação do potencial mitocondrial transmembrana ($\Delta\Psi_m$)

Após a lavagem das células com *phosphate-Buffered Saline* (PBS), estas foram incubadas com rodamina 123 (Rho) a 5 mg/L 37°C por 30 min na ausência de luz. A retenção de Rho determinou $\Delta\Psi_m$. Um total de 10.000 eventos foram investigados por experimento, com restos celulares omitidos da análise (Rocha da Silva et al., 2022; L. J. Silva et al., 2022).

5.5.4 Investigação do potencial apoptótico do haloperidol

Os microrganismos tratados com as drogas foram centrifugados (1.600 g por 10 min a 4°C), em seguida as células foram digeridas com 2 mg/l de zimoliase (Seikagaku Corp., Abingdon, Reino Unido) em tampão fosfato de potássio (sorbitol 1 M, pH 6,0) por um período de 2 h a 30 °C. Posteriormente, os protoplastos (células sem parede celular) foram corados com Anexina V marcada com FITC e IP, utilizando o kit de detecção de apoptose FITC-Anexina V (Nexin Kit, Guava Technologies). Assim, as células foram lavadas com tampão fosfato de potássio e incubadas em tampão de ligação à anexina contendo FITC-Anexina V e PI durante 20 min, seguido de análise. Um total de 10.000 eventos foram analisados por experimento e os restos celulares foram omitidos da análise (L. J. Silva et al., 2022).

5.5.5 Análise do ciclo celular após exposição ao haloperidol

Primeiramente, foi realizada a fixação das células com etanol a 70% em PBS, em seguida foram lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS contendo 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de iodeto de propídio e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de RNase a 37 °C por 30 min. A fluorescência emitida foi analisada usando um citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Cerca de 10.000 eventos foram analisados (de Andrade Neto et al., 2018).

5.5.6 Análise dos dados dos ensaios de citometria de fluxo

As médias foram obtidas por meio de triplicata, em experimentos independentes. Os dados foram comparados para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as

concentrações usadas, por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelo Turkey (p <0,01), utilizando o programa Prism versão 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.5.7 Investigação da fragmentação do DNA

Visando a análise da fragmentação do DNA, a técnica de marcação final de dUTP mediada por desoxinucleotidil-transferase (TUNEL) foi realizada. Após o tratamento, as células foram fixadas em paraformaldeído de 7% à 35°. Sendo então impregnadas com 1% de Triton X-100 por 10 min em gelo, seguidamente foram incubadas com a mistura de reação TUNEL por 1 hora a 37 ° C. As células foram então examinadas usando um microscópio de fluorescência (Olympus, Tóquio, Japão). Duzentas células foram contadas por amostra para determinar a porcentagem de células positivas (DE ANDRADE NETO et al., 2020).

5.5.8 Avaliação dos níveis de Ca^{2+}

Mitocôndrias (1 mg/mL) foram incubadas em tampão MSH, tampão misto (100 mM KCl/100 mM sacarose/5 mM Tris · HCl, pH 7,4) ou tampão KCl (150 mM KCl/5 mM Tris · HCl, pH 7,4) sob agitação contínua para evitar a anoxia. As etapas da análise seguiram de acordo com Ott et al., (2002). Os fluxos de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna foram monitorados utilizando um eletrodo sensível a Ca^{2+} (modelo 97-20, Orion Research, Beverly, MA).

5.5.9 Avaliação do citocromo c após exposição do fármaco

Mitocôndrias foram isoladas de células de *C. albicans* e *C. auris* cultivadas até a fase estacionária, após esta etapa, foram coletadas e ressuspensas em Extrato de levedura Peptona Dextrose (YEPD), na ausência ou presença de Haloperidol por quatro horas. Todas as etapas do experimento ocorreram de acordo com Ludovico et al. (2002) e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), com pequenas modificações.

5.5.10 Avaliação do conteúdo intracelular de glutatona reduzida (GSH)

O conteúdo de GSH foi determinado por um ensaio espectrofotométrico baseado na formação de 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) a partir de DTNB, de acordo com Cavalcante et al. (2020). Em resumo, células tratadas (CIM) e não tratadas ($1,5 \times 10^6$ células/ml) foram lavadas com PBS gelado, ressuspensas em fosfato de sódio 0,1 M - EDTA 5 mM, pH 8, e sonicadas para obter o homogeneizado celular. Um volume igual de HClO_4 2 M-EDTA 4 mM foi adicionado ao extrato celular, as proteínas precipitadas foram centrifugadas a 8.000 g por 15 min a 4°C , formando paletes.

O sobrenadante foi neutralizado com KOH 2 M, e o resíduo insolúvel foi removido por centrifugação, sob as mesmas condições. Para a determinação espectrofotométrica, 910 μL do sobrenadante do extrato celular (ou de uma solução padrão de GSH), no mesmo tampão fosfato-EDTA, foram misturados a 50 μL de 4 mg/ml de NADPH em 0,5% (p/v) de NaHCO_3 , 20 μL de 6 U/mL de glutathiona redutase (GR) em tampão fosfato-EDTA e 20 μL de 1,5 mg/mL de DTNB em 0,5% de NaHCO_3 . O aumento da absorbância foi medido a 412 nm. Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de proteína e expressos como $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína (Cavalcanti et al., 2020; Lowry et al., 1951).

5.5.11 Atividade da Metacaspase

Por meio do marcador *in situ* CaspACE FITC-VAD-fmk da Promega, foi possível medir a atividade da metacaspase de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, 5×10^6 células de levedura foram coradas com 100 μM de FITC-VAD-fmk à temperatura ambiente, no escuro, pelo tempo de 20 minutos. As células foram então lavadas e ressuspensas em tampão de solução salina tamponada de fosfato. Por fim, a análise FACS das células foi realizada com excitação a 488 nm e emissão entre 525 e 550 nm (Qi et al., 2003).

5.5.12 Avaliação dos Níveis Intracelulares Totais de ATP após tratamento com Haloperidol

Após ser realizado o tratamento das células e o período de incubação (à 35°C por 24 horas), os microtubos foram centrifugados por 5 min à 2.500 rpm. Com cuidado, o sobrenadante de cada microtubo foi descartado e, em seguida, adicionou-se HClO_4 a 5% gelado, posteriormente levado à incubação por 30 min a 4°C (para precipitação de proteínas). Em

seguida, os microtubos foram centrifugados a 1.500 rpm por 10 min. Os sobrenadantes ácidos foram então coletados e armazenados a -80 °C para futura determinação do conteúdo de ATP. Os pellets celulares obtidos foram ressuspensos em NaOH 1 M (durante a noite, a 4 °C) e armazenados a -20 °C até serem utilizados para a quantificação de proteínas.

Para fins de determinação dos níveis intracelulares de ATP, soluções padrão de ATP (0–16 µM) foram preparadas em HClO₄ a 5% para a construção das curvas de calibração de ATP, sendo armazenadas a -80 °C até o uso. Os padrões do sobrenadante ácido foram neutralizados, bem como as amostras, utilizando KHCO₃ 0,76 M gelado (1:1) e homogeneizados por vortex. Os microtubos foram então centrifugados por 10 min a 13.000 rpm (4 °C). Em todas as etapas dos procedimentos de preparação das amostras e dos padrões foram realizadas em gelo. Foi utilizada placa de 96 poços branca, e pipetados 75 µL dos sobrenadantes neutralizados das amostras ou dos padrões em duplicata. Para leitura no leitor de placas, foram adicionados 75 µL da solução de D-luciferina-luciferase (0,15 mM de luciferina e 3.000.000 unidades de luz de luciferase/mL preparadas em uma solução tampão de pH 7,6, 50 mM de glicina; 10 mM de MgSO₄; 1 mM de Trizma; 0,55 mM de EDTA e 1% de BSA). Logo após a adição das amostras, a bioluminescência foi imediatamente medida a 560 nm (28 °C) em um leitor de placas de múltiplos poços (PowerWave-X, BioTek Instruments, Vermont, EUA). Para controle positivo, a anfotericina B foi utilizada. O conteúdo intracelular de ATP nas amostras foi normalizado pelo conteúdo proteico, e utilizando o kit de ensaio de proteínas Bio-Rad DCTM, foi possível quantificar (Costa et al., 2024). O experimento foi realizado em triplicata.

5.8.13 Ensaio cometa alcalino para identificar dano ao DNA

Para investigar e avaliar danos ao DNA, as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em solução tampão (sorbitol e KH₂PO₄), com alíquotas misturadas em agarose, sendo espalhado em lâminas e incubadas (20 min a 30 °C), desintegrando a parede celular da levedura e obtendo esferoplastos. Para minimizar a atividade celular enzimática, os procedimentos seguintes foram realizados em sala fria (8 a 10 °C). Após esse período, as lâminas foram incubadas (1 h) em solução contendo NaOH, NaCl, lauril, sarcosina e EDTA, lavadas (3x - 20 min) e levadas para a eletroforese, sendo realizado a 0,5 V/cm por 20 min com 24 mA. Após isso, os géis foram neutralizados (solução Tris/HCl) e incubados em álcool etílico 76 e 96% por

10 min cada (Collins, 2004; Miloshev et al., 2002). Finalmente, as lâminas foram secas e coradas com brometo de etídio (1 mg/mL) e visualizadas em microscópio de fluorescência.

5.5.14 Avaliação da metilação causada pelo tratamento com haloperidol

O procedimento padrão para este segue o ensaio do cometa alcalino é seguido até a etapa de lise do protocolo (Gryzinska et al., 2023). Após o processo de lise, o procedimento padrão é alterado para que assim possa permitir a determinação do estado global de metilação do DNA. Logo, após a etapa de lise, as lâminas foram incubadas com McrBC (New England Biolabs, 10.000 U/mL), uma endonuclease de restrição, a qual é sensível à metilação e gera quebras adicionais em sítios que se encontram metilados. Após esta etapa, foram realizadas a lavagem das lâminas por três vezes com tampão de lavagem frio (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9) para remover os detritos celulares. Seguidamente, foram adicionados 50 µl de tampão de tratamento de controle (tampão de lavagem (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9) mais 100 µg/ml de BSA e 1 mM de GTP) e 50 µl de tampão específico para metilação (tampão de tratamento de controle (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9, 100 µg/ml de BSA, 1 mM de GTP) mais 0,035 U/µl de McrBC) foram adicionados.

Na próxima etapa, as lâminas foram cobertas com lamínulas e incubadas a 37 °C em câmara úmida pré-aquecida por 105 minutos. Passado o tempo de incubação, as lâminas foram mantidas em gelo por 10 minutos e, após esse tempo, as lamínulas foram removidas. As lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo uma solução alcalina fria (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) por 45 minutos, para permitir o desenrolamento do DNA a 4 °C. A eletroforese foi realizada no mesmo meio a 20 V e 300 mA por 25 minutos. As etapas subsequentes e as análises das lâminas foram realizadas de acordo como descrito no protocolo padrão de cometa alcalino.

5.5.15 Isolamento de DNA e Determinação da Metilação do DNA

As etapas desta análise seguem de acordo com Gryzinska et al. (2023), com pequenas modificações. O DNA foi isolado utilizando o kit NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel), de

acordo com o fabricante. para determinação do nível total de metilação do DNA o um kit para análise quantitativa da metilação do DNA foi utilizado: o Imprint Methylated DNA Quantification Kit (MDQ1) (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha).

O kit utilizado tem como limite de detecção 5 ng de DNA totalmente metilado por 200 ng de quantidade total de DNA testada (2,5%). Para avaliar o nível de DNA metilado em células de *C. auris* e *C. albicans* expostas ao haloperidol (24 h) e em culturas controle, foram utilizadas placas de 96 poços. As amostras de DNA foram diluídas em solução de ligação para obter uma concentração final de 150 ng/μL. As amostras de DNA diluídas (30 μL) foram transferidas para os poços e incubadas a 37 °C por 1 h para ligação do DNA. Em seguida, adicionou-se a solução de bloqueio e as amostras foram incubadas novamente a 37 °C por 30 min. Após esse período, o DNA metilado foi capturado utilizando anticorpos de captura diluídos e detectado pela ligação aos anticorpos de detecção previamente diluídos.

Após a adição da solução reveladora e incubação (10 min), adicionou-se a solução de parada (a solução mudou de cor de azul para amarelo). Tanto um controle em branco quanto um controle metilado (controle positivo) foram analisados juntamente com as amostras de DNA. A absorbância foi medida a 450 nm. O nível global de metilação do DNA foi estabelecido como o nível de metilação nas amostras em relação ao controle metilado.

O nível de metilação do DNA foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$[(A450S - A450B) / (A450MC - A450B)] \times 100$$

Onde:

A450S—absorbância média da amostra;

A450B—absorbância média do branco;

A450MC—absorbância média do controle metilado.

5.5.16 Avaliação de sobrevivência de cepas mutantes de *C. albicans*

As cepas utilizadas no presente estudo estão listadas na Tabela 3. Para realização do experimento, todas as cepas de *C. albicans* mutantes foram cultivadas a 30°C em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriana, 2% de glicose) (Sherman, 1991). Para que

fosse determinada a sobrevivência, células em fase exponencial de crescimento foram diluídas em YPD (10^4 células) e tratadas com os compostos do presente estudo e plaqueadas em ágar YPD para visualização das unidades formadoras de colônias. O HAL foi avaliado em uma faixa de concentração de 1 a 60 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h e o H_2O_2 (controle positivo) foi avaliado a 0,5 mM por 2 h. Posteriormente, as placas foram incubadas a 30°C por 24 h e a sobrevivência (%) foi expressa em relação ao controle de culturas não tratadas. Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes e a ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Turkey, foi usada para calcular o valor de p de significância.

Tabela 3. Cepas mutantes utilizadas no estudo

Cepas	Genótipo relevante	Fonte
JC747 (WT)	SN148 + Clp30 (URA3, HIS1, ARG4)	da Silva Dantas et al., 2010
JC842 (<i>cap1</i> Δ)	<i>cap1::loxP-HIS1-loxP/cap1::loxP-ARG4-loxP, Clp20 (HIS1, URA3)</i>	da Silva Dantas et al., 2010
JC1317 (<i>gpx3</i> Δ)	<i>gpx3::loxP-HIS1-loxP/gpx3::loxP-ARG4-loxP Clp20 (HIS1, URA3)</i>	Patterson et al., 2013

Fonte: da Silva Dantas et al. (2010); Patterson et al. (2013).

5.5.17 Coleta de amostras e isolamento de RNA

A análise seguiu a metodologia segundo Livak e Schmittgen (2001), com pequenas modificações. As cepas foram cultivadas durante a noite em meio YPD a 30°C , diluídas para uma DO600 de 0,1 em meio YPD fresco e cultivadas até uma DO600 de 1,0, respectivamente. Para cada cepa de estudo avaliada, uma amostra foi usada como controle e a outra foi tratada com haloperidol (30 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa selvagem e 15 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas deficientes durante 24 h) ou H_2O_2 (0,5 mM; 30 min). Após os tratamentos, as células foram coletadas por centrifugação a 4500 rpm por 1 min. Os sobrenadantes foram removidos e as amostras foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido. Experimentos independentes em duplicata foram conduzidos para cada amostra. Posteriormente, as células foram rompidas utilizando um almofariz e um pilão esterilizados e congelados.

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol (Ambion®, Carlsbad, EUA), em conformidade com as recomendações do fabricante. A pureza e a concentração do RNA foram analisadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA). Para remoção do DNA contaminante, 1 μg de RNA extraído foi tratado com

DNase I (Turbo DNase Treatment and Removal Reagents - Invitrogen™, Carlsbad, EUA) e transcrito em DNA complementar (cDNA) utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix para qRT-PCR com SYBR® Green (Invitrogen™, Carlsbad, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Os primers específicos para cada gene (Tabela 4) foram sintetizados pela Twist Bioscience (San Francisco, CA, EUA).

O cDNA transcrito foi amplificado para a quantificação relativa dos níveis de expressão dos genes *Cap1*, *GLR1*, *SOD2* e *TRR1* em relação à concentração do gene de referência selecionado, o rRNA 18S. A PCR quantitativa em tempo real foi realizada utilizando o kit Platinum® SYBR®Green PCR SuperMix-UDG (Applied Biosystems, Framingham, MA, EUA) no aparelho StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Framingham, MA, EUA). O método 2-DDCT foi utilizado para analisar as alterações relativas na expressão gênica a partir do experimento de RT-qPCR quantitativa (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 4 - Os primers utilizados neste estudo

Gene	Primer sequence (5'-3')	Number of bases
<i>18S rRNA</i>	(F) TCTTTCTTGATTTTGTGGGTGG	22
	(R) TCGATAGTCCCTCTAAGAAGTG	22
<i>Cap1</i>	(F) ACCGTGAAGGTAAAGAACG	19
	(R) GCTACCACCAGTATATTTAGCC	22
<i>GLR1</i>	(F) GCTCATCTAAGTCATTGTGACC	22
	(R) GCTGGACCAGAAGAAAAAGTTG	22
<i>SOD2</i>	(F) AACTTGGCTCCTGTCTC	17
	(R) TATCACCATTGGCTTTG	17
<i>TRR1</i>	(F) TACGCCATTGGTCACATC	18
	(R) CAAAGCAGCCATACATCC	18

F, *Forward*; R, *reverse*.

Fonte: Livak; Schmittgen (2001)

5.5.18 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata em dias diferentes, utilizando a média aritmética para análise de CIM. O prisma do GraphPad programa (versão 8 para Windows,

GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para as análises. Para ensaios de avaliação do mecanismo de ação, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) two-way seguido do teste de Turkey ($p < 0,01$).

5.6 Ensaios para determinação de atividade frente à biofilme de *Candida* spp.

Para o ensaio de biofilme, foram selecionadas 4 cepas de diferentes espécies de *Candida* como representativas, sendo elas *C. albicans* 3, *C. glabrata* 2, *C. parapsilosis* 2 e a cepa padrão *C. auris* 01256P.

5.6.1 Preparação dos biofilmes formados de *Candida* spp.

Os ensaios de formação do biofilme foram realizados conforme a metodologia descrita por Pierce et al. (2008), com pequenas modificações. As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose incubadas em estufa por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, para obter as mesmas em fase exponencial. Após esse período, as leveduras foram suspensas em 3 mL de meio caldo extrato de levedura nitrogênio dextrose (YND) e reincubadas sob as mesmas condições. Em seguida, as células foram então centrifugadas (2500 rpm, 5 min) e lavadas por três vezes com PBS. Posteriormente, ajustou-se a densidade celular no padrão 0,5 ($1,5 \times 10^6$ UFC. mL^{-1}) da escala de McFarland em meio RPMI 1640 (pH 7). Por fim, foram inseridos 200 μL do inóculo em uma placa de 96 poços fundo chato e incubadas por 48 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

No dia seguinte, foi realizada a aspiração do sobrenadante e a placa foi lavada delicadamente com PBS por três vezes para remoção das células não aderentes. Ao final desta etapa, foi possível visualizar a formação de biofilme no fundo de cada poço.

5.6.2 Avaliação da atividade do haloperidol frente aos biofilmes formados de *Candida* spp.

Diferentes concentrações do fármaco foram utilizadas para avaliação da atividade do haloperidol frente ao biofilme formado de *Candida* spp, as referidas foram: CIM/2, CIM, 2 x CIM e 4 x CIM para cada cepa. Aos biofilmes formados de acordo com o tópico 5.6.1 foram adicionados 200 μL da concentração do ativo e posteriormente as placas foram incubadas por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Seguidamente, foi realizada a lavagem, delicadamente, dos biofilmes com PBS por

três vezes. A verificação da viabilidade celular foi realizada utilizando o corante brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difenil tetrazólio (MTT) (1 mg/mL) (Sigma, USA). Após incubação de três horas, protegidas da exposição a luz, o corante foi então removido e os poços lavados 3 vezes com PBS. Por fim, foram adicionados 200 µL DMSO e após 15 minutos, destes foram retirados 100 µL de cada poço e transferidos para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. A redução do crescimento foi comparada ao poço que corresponde a 100% de crescimento, livre de drogas (PIERCE et al., 2008).

5.6.3 Determinação da atividade do haloperidol no biofilme em formação *Candida* spp.

Neste teste, as concentrações utilizadas para avaliar a atividade do haloperidol frente ao biofilme em formação foram: CIM/2, CIM, 2 x CIM e 4 x CIM para cada cepa. As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. No dia seguinte, as leveduras foram suspensas em 3 mL de meio YND e reincubadas sob as mesmas condições. Seguidamente, as células foram centrifugadas (2500 rpm, 5 min) e lavadas com PBS por três vezes. As células foram ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI (pH 7,0). Em seguida, foram inseridos 100 µL do inóculo e 100 µL da concentração das drogas em placa de 96 poços de fundo chato. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h.

No dia seguinte, o sobrenadante foi então retirado e a placa lavada delicadamente com PBS por três vezes. A verificação da viabilidade celular foi obtida utilizando o corante brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difenil tetrazólio (MTT) (1 mg/mL) (Sigma, USA). Após incubação de três horas ao abrigo da luz, o corante foi removido e os poços lavados delicadamente por 3 vezes com PBS e então foram adicionados 200 µL DMSO. Após 15 minutos, foram retirados 100 µL de cada poço e transferidos para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. O controle de comparação da redução do crescimento foram os poços não tratados com haloperidol, os quais correspondem a 100% de crescimento (PIERCE et al., 2008).

5.6.4 Análise dos dados da avaliação do haloperidol frente aos ensaios de biofilme

O programa GraphPad Prism (versão 8 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para analisar a significância estatística de cada ensaio, utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,01$). Os valores médios das absorbâncias dos testes foram comparados com o controle. Os ensaios foram realizados em triplicata em dias diferentes e a média dos resultados foi calculada.

5.7 Visualização das estruturas microscópicas de *Candida* por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

5.7.1 Ensaio dos biofilmes

A MEV foi utilizada para uma melhor visualização o efeito da HAL em estruturas microscópicas do biofilme fúngico (Do Amaral Valente Sá et al., 2020). As cepas *Candida auris* e *C. albicans* foram escolhidas como representativas devido à relevância clínica. Primeiramente, o microrganismo foi suspenso e incubado em caldo YND por 24 h a 35°C. As células foram centrifugadas (2500 rpm, 5 min) e lavadas com solução salina três vezes, depois suspensas (0,5 McFarland) em meio caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS e adicionadas a uma placa de 12 poços em cada poço continha lamínula circular (13 mm), incubando-as por 48 h a 35°C para a formação do biofilme na superfície do material.

Em seguida, realizou-se a preparação do HAL em concentrações de CIM e 4xCIM, diluídas em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, foram colocadas em cada poço e as placas incubadas novamente nas mesmas condições já mencionadas. Para a observação do efeito da HAL em biofilme em formação, o microrganismo e o fármaco (CIM, 4xCIM) foram adicionados concomitantemente à placa e incubados.

As amostras foram fixadas por solução de glutaraldeído 2,5% adicionada de tampão cacodilato de sódio 0,15 M e azul alcian (0,01%) e incubadas durante a noite a 4°C. Em seguida, foi realizada a desidratação alcoólica (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100% de etanol). Por fim, as amostras foram submetidas à solução de hexametildisilazano (Sigma-chemical) para a secagem completa e revestidas com 20 nm de ouro. O biofilme fúngico foi observado utilizando microscópio eletrônico de varredura Quanta 450-FEG em modo de alto vácuo.

6. Resultados

6.1 Determinação da concentração inibitória mínima frente a cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol

O haloperidol (HAL) demonstrou atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. com concentrações inibitórias mínimas variando de 26,67 a 256 µg/mL, onde 75% das cepas apresentaram CIM ≤ 128 µg/mL. As concentrações para o fluconazol (FLC) variaram de 0,25 a 64 µg/mL, onde sete cepas clínicas apresentaram perfil de resistência a este antifúngico (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* CIM ≥ 8 µg/mL e *C. glabrata* CIM ≥ 64 µg/mL) (CLSI, 2012). Os resultados para anfotericina B (ANFO) ficaram entre 0,5 e 2 µg/mL e para itraconazol (ITRA) de 0,125 a 4 µg/mL (Tabela 4).

Tabela 5 - Avaliação da atividade antifúngica do haloperidol

Cepas ^a	CIM ^b (µg/mL)			
	HAL	FLC	ANFO	ITRA
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	96	2	1	0,5
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	32	16	1	0,5
<i>Candida auris</i> 01256P *	53,33	4	1	0,25
<i>Candida albicans</i> 1	256	0,5	0,5	0,25
<i>Candida albicans</i> 2	256	0,5	1	0,25
<i>Candida albicans</i> 3 *	32	16	2	1
<i>Candida albicans</i> 4	256	32	0,5	1
<i>Candida parapsilosis</i> 1	48	1	0,5	0,25
<i>Candida parapsilosis</i> 2	26,67	32	1	0,125
<i>Candida parapsilosis</i> 3	213,33	32	2	2
<i>Candida parapsilosis</i> 4	26,67	4	0,5	0,5
<i>Candida tropicalis</i> 1	64	0,25	1	0,5
<i>Candida tropicalis</i> 2	32	32	2	1
<i>Candida tropicalis</i> 3	128	32	1	4
<i>Candida glabrata</i> 1	53,33	2	2	0,5
<i>Candida glabrata</i> 2	64	64	2	2

^a Cepas de *Candida* spp. pertencentes à micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN)

^b CIM de haloperidol, fluconazol, anfotericina B e itraconazol isolados

* Cepas usadas em ensaios de mecanismo de ação

6.2 O haloperidol demonstra diferentes tipos de interações farmacológicas na associação a antifúngicos

Na associação entre haloperidol e fluconazol em cepas clínicas, foi obtido 76,92% de interações indiferentes, e 23,07% de interações sinérgicas, das três cepas que apresentaram este resultado, duas eram resistentes ao fluconazol. Na interação de haloperidol e itraconazol, 61,53% também foram indiferentes à associação e 38,46% mostraram-se sinérgicas. Por fim, na interação haloperidol com anfotericina B, 84,61% foi de interação indiferente, apresentando apenas 15,38% de interações sinérgicas (Tabela 5).

Tabela 6 - Interações farmacológicas do haloperidol e antifúngicos

Cepas ^a	(µg/mL)								
	HAL/FLC	ICIF ^b	Interpretação ^c	HAL/ITRA	ICIF	Interpretação	HAL+ANFO	ICIF	Interpretação
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	96/2	2,0	IND	16/0,25	0,7	IND	96/1	2,0	IND
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	16/8	1,0	IND	32/0,5	2,0	IND	32/1	2,0	IND
<i>C. auris</i> 01256P	53,33/2	1,5	IND	16/0,125	0,8	IND	32/1	1,6	IND
<i>Candida albicans</i> 1	128/0,25	1,0	IND	64/0,0625	0,5	SIN	256/0,5	2,0	IND
<i>Candida albicans</i> 2	128/0,25	1,0	IND	64/0,0625	0,5	SIN	128/0,5	1,0	IND
<i>Candida albicans</i> 3	32/16	2,0	IND	8/0,25	0,5	SIN	32/2	2,0	IND
<i>Candida albicans</i> 4	128/16	1,0	IND	256/1	2,0	IND	256/0,5	2,0	IND
<i>Candida parapsilosis</i> 1	24/0,5	1,0	IND	24/0,125	1,0	IND	24/0,25	1,0	IND
<i>Candida parapsilosis</i> 2	13,84/16	1,0	IND	16/0,0625	1,1	IND	26,67/1	2,0	IND
<i>Candida parapsilosis</i> 3	53,25/8	0,5	SIN	213,33/2	2,0	IND	106,65/1	1,0	IND
<i>Candida parapsilosis</i> 4	6,67/1	0,5	SIN	26,67/0,5	2,0	IND	13,3/0,25	1,0	IND
<i>Candida tropicalis</i> 1	64/0,25	2,0	IND	8/0,0625	0,3	SIN	16/0,25	0,5	SIN
<i>Candida tropicalis</i> 2	8/8	1,0	IND	8/0,25	0,5	SIN	16/05	1,0	IND
<i>Candida tropicalis</i> 3	32/8	0,5	SIN	256/64	4,0	IND	32/0,25	0,5	SIN
<i>Candida glabrata</i> 1	23,65/1	0,9	IND	16/0,25	0,8	IND	53,33/1	1,5	IND
<i>Candida glabrata</i> 2	32/32	1,0	IND	32/1	1,0	IND	64/2	2,0	IND

^a Cepas de *Candida* spp. pertencentes à micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN)

^b Índice de concentração inibitória fracionária (ICIF)

^c Interpretação da atividade associada com base no ICIF em sinérgica, indiferente ou antagônica

HAL:haloperidol; FLC: fluconazol; ANFO: anfotericina B; ITRA itraconazol

6.3 Avaliação das vias de ação antifúngicas do haloperidol

6.3.1 Ação do haloperidol sobre a viabilidade celular de *Candida* spp.

A exposição ao haloperidol gerou uma redução significativa na densidade celular em relação ao controle negativo, de $2,57 \cdot 10^6$ para $1,60 \cdot 10^6$ células em *C. auris* uma redução de 40,87%, redução semelhante foi observada em *C. albicans* de $3,56 \cdot 10^6$ para $1,83 \cdot 10^6$ (37,94%) (Figura 6a). A redução no controle positivo de morte (anfotericina B) foi, para *C. albicans* e *C. auris* respectivamente, maior que o tratamento com haloperidol. Estes valores foram diferentes significativamente ($p < 0,01$).

6.3.2 Alteração do potencial de despolarização mitocondrial de *Candida* spp. mediado pelo haloperidol

Os tratamentos com anfotericina B e haloperidol foram capazes de alterar significativamente o potencial de despolarização mitocondrial ($p < 0,01$) em relação ao controle sem tratamento. O haloperidol causou maior despolarização em comparação ao controle de morte (anfotericina B). A despolarização em células de *C. albicans* foi de 54,16% e de *C. auris* 47%, enquanto que no controle dessas mesmas espécies, respectivamente, foram de 2,93% e 2,09%. Assim, os dados demonstram que ação do haloperidol resultou em disfunção mitocondrial, afetando a homeostase do microrganismo (Figura 6b).

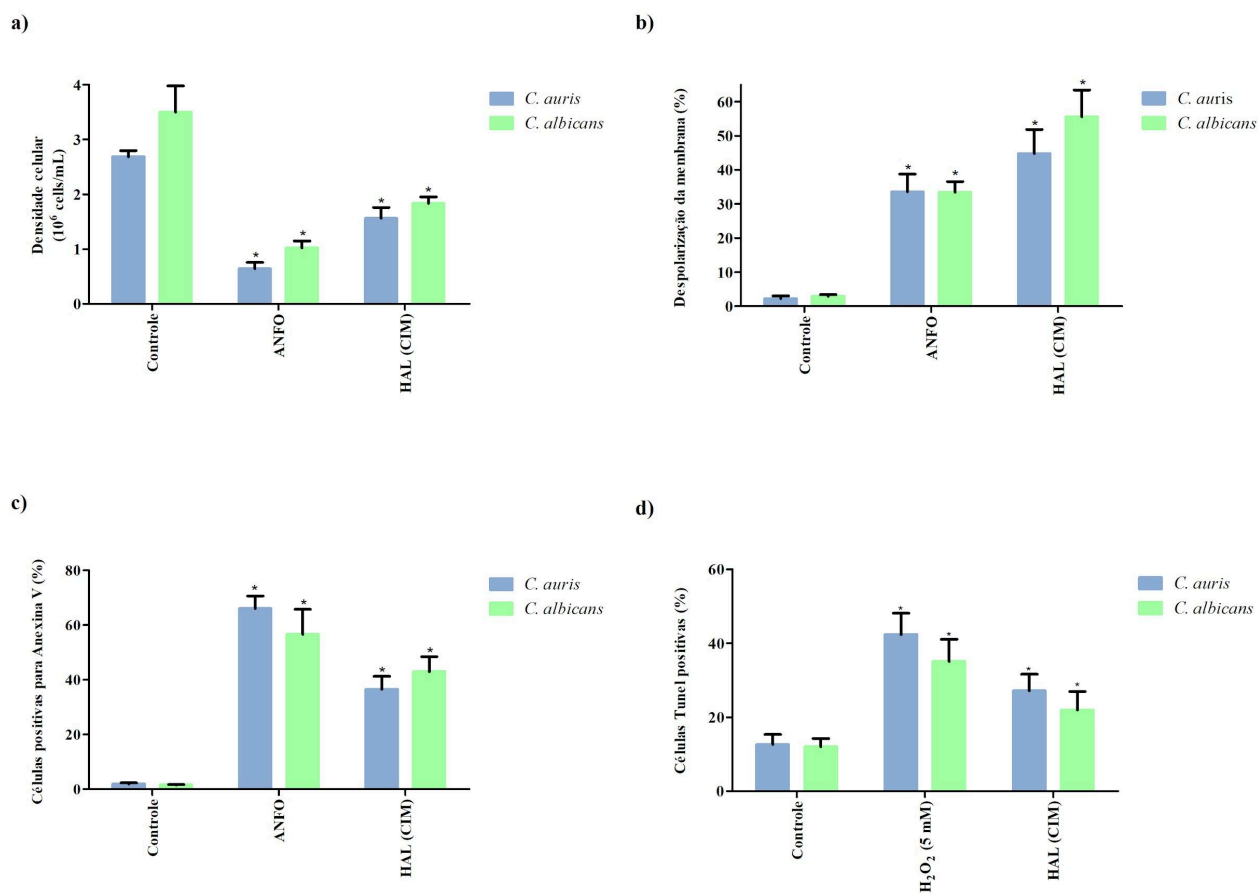
6.3.3 Exteriorização de fosfatidilserina em células de *Candida* spp. tratadas com haloperidol

A exposição à fosfatidilserina é um marcador crítico de apoptose, principalmente em seus estágios iniciais. O tratamento com haloperidol na concentração de 32 $\mu\text{g/ml}$ para *C. albicans* e 53,33 $\mu\text{g/ml}$ para *C. auris*, resultou em um aumento significativo em relação ao controle ($p < 0,01$) na externalização da fosfatidilserina em células de *C. albicans* (40,30%) e de *C. auris* (42,39%). Para a anfotericina B (ANFO), esses valores foram de 58,71% para *C. albicans* e 67,86% para *C. auris* (Figura 6c).

6.3.4 Detecção de fragmentação do DNA pelo teste TUNEL após tratamento com haloperidol em *Candida* spp.

A fragmentação do DNA pode ser observada como resultado de processo apoptótico mais avançado. O resultado do tratamento com haloperidol em células fúngicas apontou para um significativo aumento ($p < 0,05$) de detecção de fragmentação do DNA em comparação ao controle negativo. Em cepas de *C. albicans* foram detectados 21,96% em comparação ao seu controle obteve 12,05%, um aumento de 82,24%. Já o observado em *C. auris* 27,11% e seu controle 12,67%, um aumento de 113,97% (Figura 6d). O mesmo comportamento foi observado com o tratamento realizado com H_2O_2 , resultado sugestivo de um processo apoptótico.

Figura 6 - Ensaio de citometria de fluxo para identificar para estudo do provável mecanismo de ação do haloperidol após 24 h de exposição em cepas de *Candida* spp.

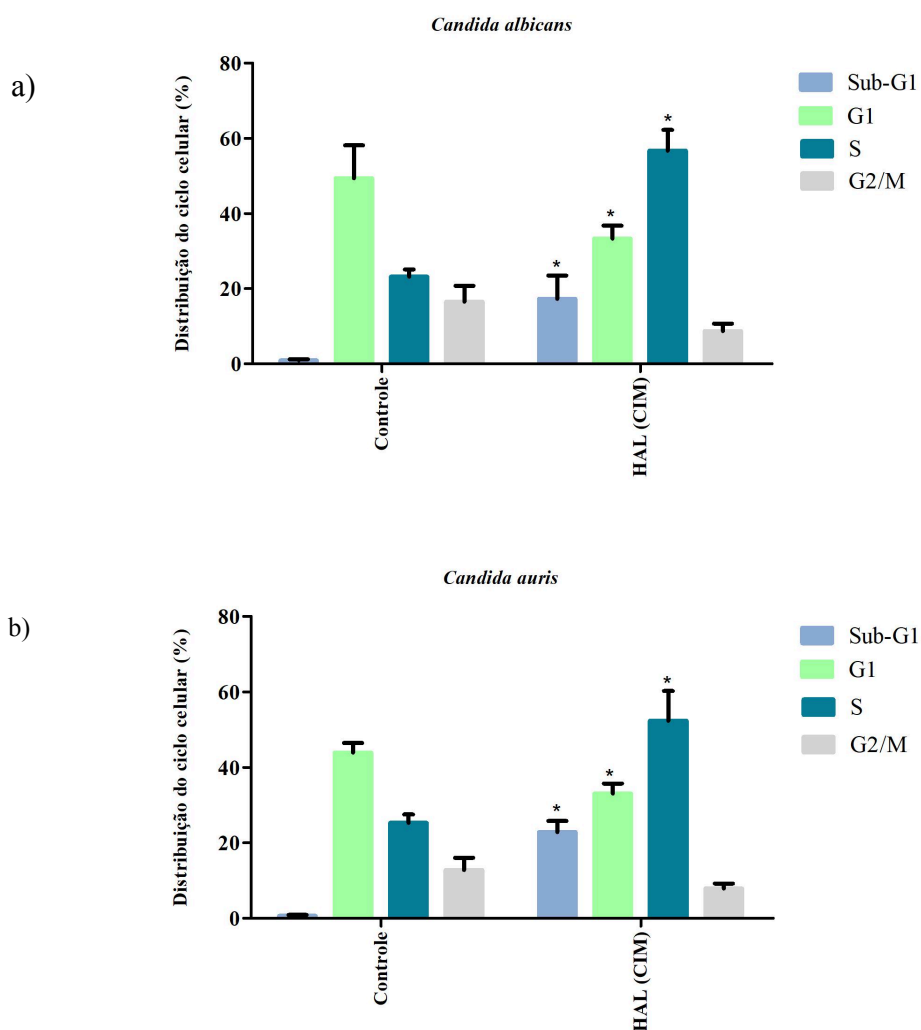


As células foram tratadas com haloperidol (CIM = 53,33 μ g/ml em *C. albicans* e 32 μ g/ml em *C. auris*), ANFO (controle de morte) (CIM = 4 μ g/ml) e células não tratadas (controle negativo) e foram analisadas por citometria de fluxo; *($p < 0,01$) significância em relação ao controle

6.3.5 Haloperidol impactou no ciclo celular de *Candida spp.*

O ciclo celular de *C. albicans* e *C. auris* foi alterado após exposição ao haloperidol, mudando a distribuição nas diferentes fases de seu ciclo. Em comparação ao controle negativo, as fases Sub-G1, G1 e S se diferenciam significativamente ($p < 0,01$), passando, respectivamente, de 0,88%, 49,43% e 23,18% para 17,27%, 33,34% e 56,74% em *C. albicans* (Figura 7a). Mesmo comportamento foi observado para *C. auris*, ficando a distribuição da seguinte forma: Sub-G1 passou de 64,5% para 22,87%, G1 de 43,96% para 33,09% e S de 25,33% para 52,38% (Figura 6b). Apesar da redução observada G2/M para ambas as espécies, estas não foram significativas estatisticamente ($p < 0,01$) (Figura 7b). Esse pode ser indicativo de parada de replicação e dano ao DNA.

Figura 7 - Avaliação do ciclo celular de cepas de *Candida spp.* por citometria de fluxo



7a. Ciclo celular após tratamento com haloperidol em *Candida albicans*; 7b. Ciclo celular após tratamento com haloperidol em *Candida auris*; O controle é composto por células não tratadas. O tratamento com HAL foi realizado de acordo com a CIM de cada cepa (53,33 µg/ml em *C. albicans* e 32 µg/ml em *C. auris*) *(p<0,01) significância em relação ao controle

6.3.6 O haloperidol impactou nos níveis de Ca²⁺ mitocondrial e citosólico de *Candida* spp.

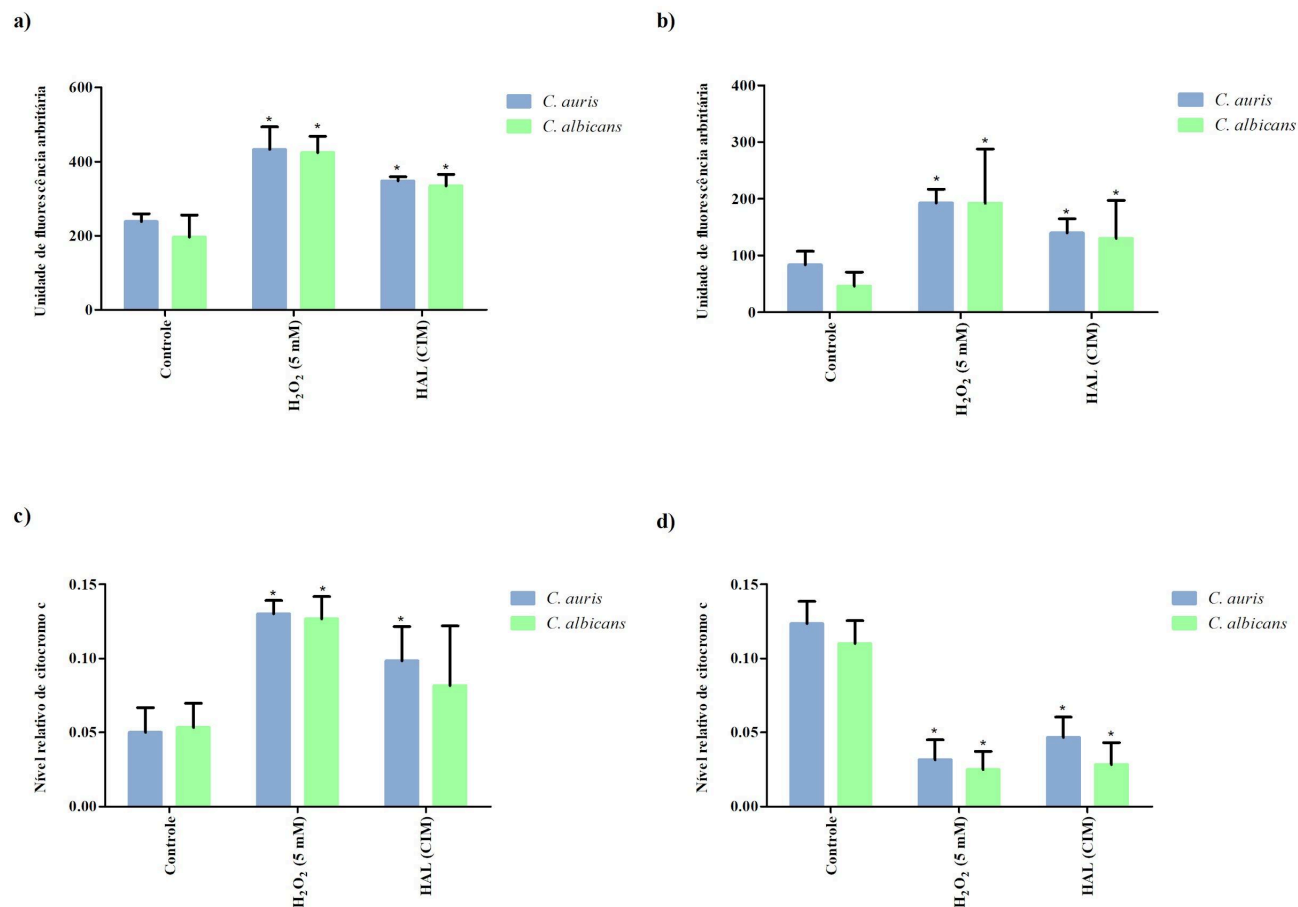
Os níveis de Ca²⁺ no citosol aumentaram em relação ao controle negativo (p < 0,01) após tratamento com haloperidol e H₂O₂ (controle positivo). Tanto em células de *C. albicans*, quanto de *C. auris* (Figura 8a e 8b). Os dados indicam que o haloperidol induz um influxo de Ca²⁺ nas células, causando perturbação na homeostase do Ca²⁺ mitocondrial e citosólico.

6.3.7 Verificação do nível de citocromo c no citosol e mitocôndria de *Candida* spp. após tratamento com haloperidol

Após quatro horas de exposição do microrganismo ao haloperidol, foi verificado um significativo aumento dos níveis de citocromo c no citosol (p < 0,01). Essa variação foi obtida por meio da quantificação realizada de acordo com a absorbância ultravioleta registrada, que indica um extravasamento possivelmente causado pela perturbação no potencial de membrana mitocondrial. O tratamento com o controle positivo (H₂O₂) também apresentou, como esperado, grande aumento dos níveis de citocromo c, chegando a dobrar em relação ao controle negativo para ambas espécies (p<0,01).

Já o oposto foi verificado quando avaliado os níveis na porção mitocondrial, os quais diminuíram significativamente em relação ao controle negativo (p<0,01), tanto para o tratamento com o haloperidol, como com o H₂O₂ (controle positivo) (Figura 8d).

Figura 8 - Haloperidol induz um influxo de Ca^{2+} nas células e a liberação de Citocromo c da mitocôndria para o citoplasma



As células foram tratadas com haloperidol (CIM = 53,33 $\mu\text{g/ml}$ em *C. albicans* e 32 $\mu\text{g/ml}$ em *C. auris*), H_2O_2 (controle positivo, 5nM) e células não tratadas (controle negativo). Em 8a. absorvância Ca^{2+} no citosol; 8b. absorvância de Ca^{2+} na mitocôndria; 8c. Nivel relativo de citocromo c no citosol; 8d. nível relativo de citocromo; *($p < 0,01$) significância em relação ao controle

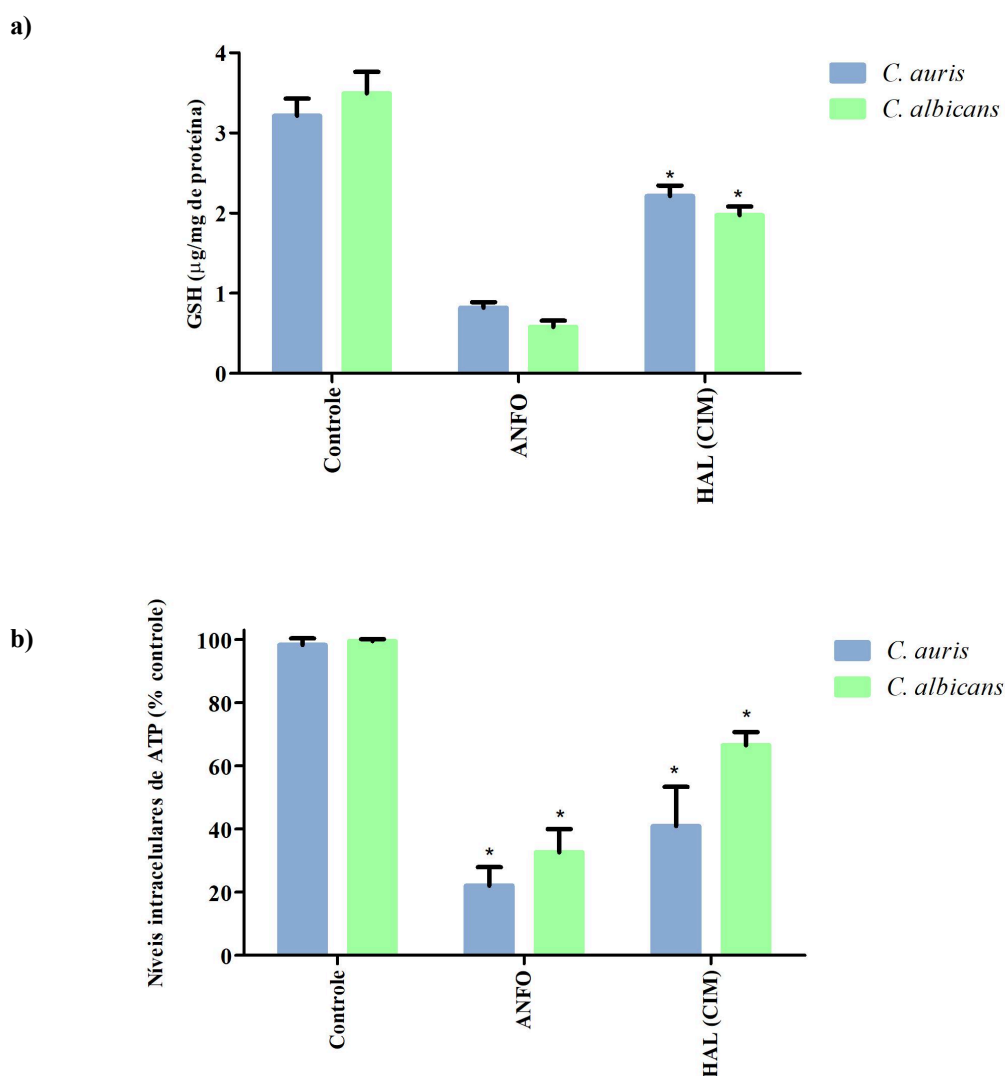
6.3.8 Níveis de glutatona (GSH) são reduzidos em células de *Candida* spp. tratadas com haloperidol

O GSH é um importante componente do sistema glutatona para respostas ao estresse e desintoxicação dos radicais livres. Os níveis de GSH reduziram após o tratamento com anfotericina B e haloperidol isolados em relação ao controle negativo ($p < 0,01$). O tratamento com anfotericina B causou maior redução comparado ao haloperidol, também houve diferença significativa entre os mesmo ($p < 0,01$) (Figura 9a).

6.3.9 O haloperidol reduz os níveis de ATP intracelular de *Candida spp.*

Após a exposição ao haloperidol, foi detectada redução dos níveis de ATP intracelular, quando comparados ao controle negativo (células não tratadas), de forma estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Este mesmo comportamento foi observado com a exposição à anfotericina B (figura 9b). Os valores em células de *C. albicans* foi de 67,32% e de *C. auris* 39,09%. O tratamento com anfotericina B se mostrou diferente do haloperidol ($p < 0,01$), uma vez que os níveis intracelulares de ATP foram ainda menores, 33,75% e 25,47%, respectivamente para *C. albicans* e *C. auris*.

Figura 9 - Níveis de GSH e redução do ATP intracelular em células de *C. albicans* e *C. auris* após tratamento com haloperidol

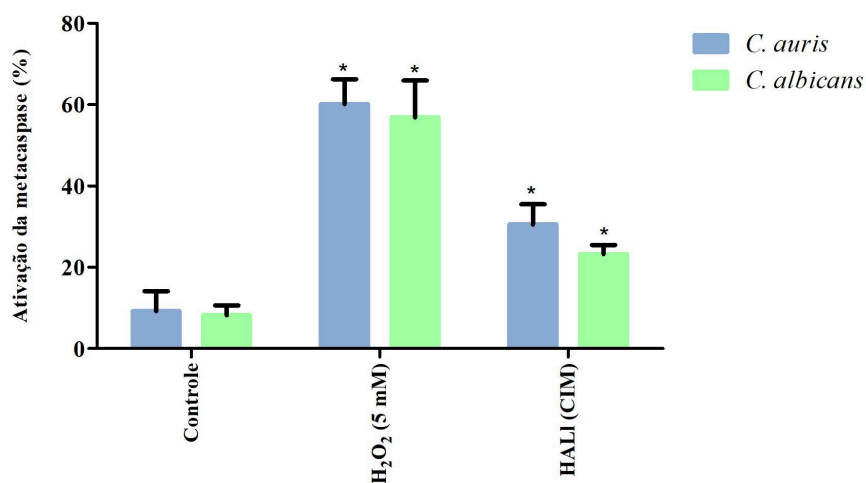


9a. Níveis de GSH após tratamento com haloperidol; 9b. Níveis do ATP intracelular após tratamento com haloperidol. As células foram tratadas com haloperidol (CIM = 53,33 µg/ml em *C. albicans* e 32 µg/ml em *C. auris*), ANFO (controle de morte) (CIM = 4 µg/ml) e células não tratadas (controle negativo) *(p<0,01) significância em relação ao controle

6.3.10 Exposição ao haloperidol induziu a ativação da metacaspase em *Candida* spp.

O tratamento com haloperidol na CIM foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,01$) a ativação da metacaspase, importante no processo de apoptose após estresse e danos. Os resultados demonstram a ativação da metacaspase em ambas as espécies avaliadas. Em relação ao controle negativo, os tratamentos mostraram um maior aumento da metacaspase, 23,25% em *C. albicans* e 30,52% em *C. auris* em células tratadas com haloperidol e para anfotericina B 56,88% e 60,17% para *C. albicans* e *C. auris*, respectivamente. O que demonstra um significativo efeito.

Figura 10 - O tratamento com haloperidol foi capaz de ativar a metacaspase



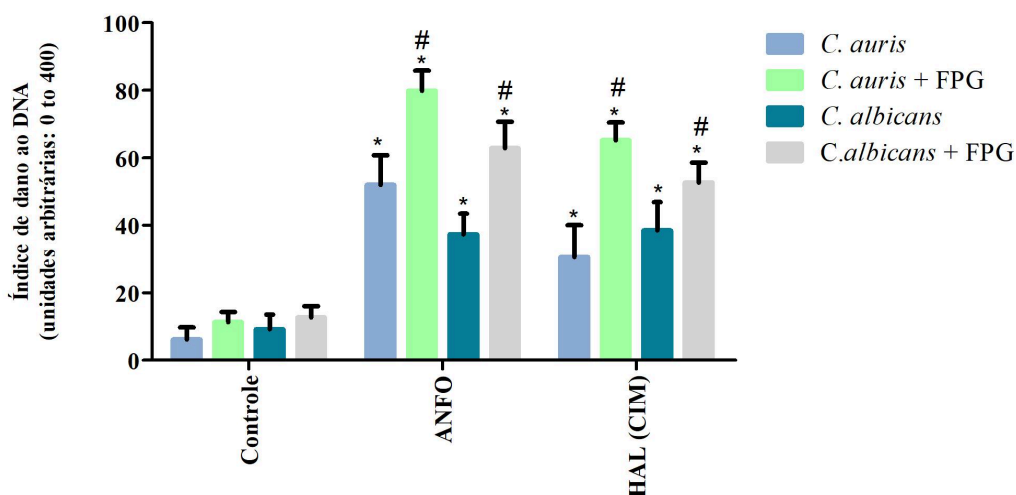
As células foram tratadas com haloperidol (CIM = 53,33 µg/ml em *C. albicans* e 32 µg/ml em *C. auris*), H₂O₂ (controle de morte, 5 mM) e células não tratadas (controle negativo); *(p < 0,01) em comparação com o controle

6.4 Verificação de dano ao DNA

6.4.1 Haloperidol induz lesões ao DNA evidenciadas pelo ensaio do cometa alcalino enzimático

Os tratamentos com ANFO e HAL elevaram significativamente ($p < 0,01$) o dano oxidativo ao DNA de ambas as espécies de *C. albicans* e *C. auris*, em relação ao controle (células não tratadas) (Figura 11). Nas células tratadas com a enzima de restrição FPG (formamidopirimidina DNA glicosilase), a qual identifica e remove bases de DNA danificadas, normalmente resultantes da ação de radicais livres, a sensibilidade do teste é aprimorada ao evidenciar lesões oxidativas. Neste sentido, em relação ao controle com FPG, os tratamentos com HAL+FPG revelaram um aumento em *C. albicans* e em *C. auris*. Não houveram diferenças significativas dentro do controle negativo com e sem FPG ($p < 0,01$).

Figura 11 - Fragmentação do DNA de *C. albicans* e *C. auris* avaliada pelo teste cometa alcalino enzimático

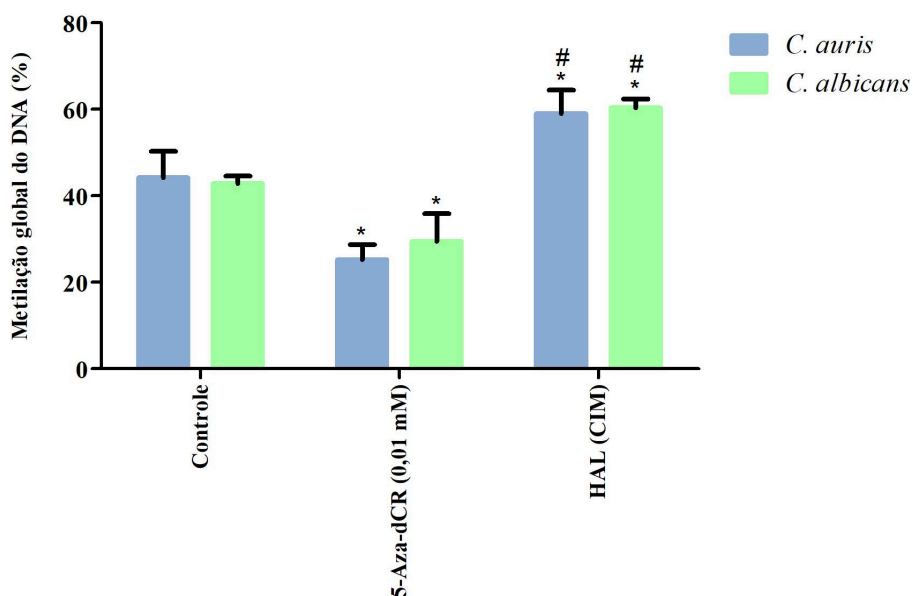


O tratamento com HAL foi realizado de acordo com a CIM de cada cepa (53,33 $\mu\text{g/ml}$ em *C. albicans* e 32 $\mu\text{g/ml}$ em *C. auris*). O controle é composto por células não tratadas com haloperidol e células tratadas apenas com FPG; (* $p < 0,01$) significativo em comparação com o controle #($p < 0,01$) significativo em relação ao tratamento sem FPG

6.4.2 Metilação global do DNA após exposição ao haloperidol

O tratamento com haloperidol aumentou significativamente ($p < 0,01$) a metilação global do DNA em células fúngicas de *C. albicans* e *C. auris* (Figura 12). Em células de *Candida albicans* 60,36% encontram-se metiladas aumento 28,96% em relação ao controle, enquanto que em *C. auris* a metilação global foi de 59,02% maior que seu controle 32,63%. Além do controle negativo, foi realizado o controle com 5-Aza-dCR (agente hipometilante em células que replicam o DNA, inibindo a DNA metiltransferase), as células tratadas com esse agente, encontram-se hipometiladas em relação ao controle ($p < 0,01$) e também se diferenciam dos tratamento com haloperidol para ambas espécies ($p < 0,01$).

Figura 12 - Metilação global do DNA em cepas de *Candida* spp. após tratamento de ao haloperidol



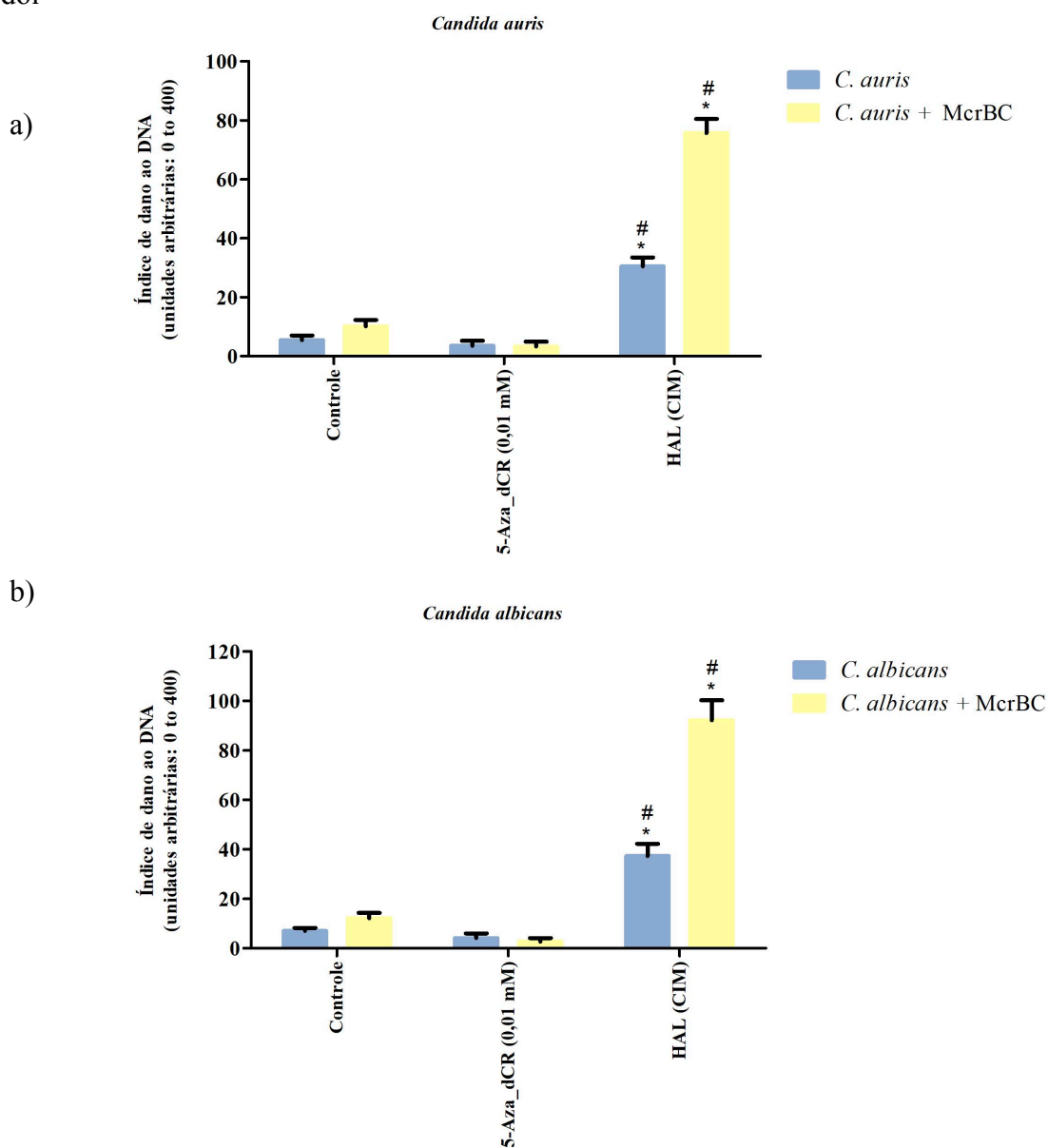
O tratamento com HAL foi realizado de acordo com a CIM de cada cepa (53,33 $\mu\text{g/ml}$ em *C. albicans* e 32 $\mu\text{g/ml}$ em *C. auris*). O controle células não tratadas com haloperidol, controle experimental é tratado com 5-Aza-dCR.

6.4.3 Avaliação da fragmentação do DNA associado à metilação após tratamento com haloperidol

Os dados obtidos demonstram um significativo aumento ($p < 0,01$) no dano ao DNA em células de *C. auris* tratadas com haloperidol em relação ao controle negativo e este aumento fica

mais evidente em células também adicionadas de McrBC, uma endonuclease que cliva DNA contendo metilcitosina e também se comporta como uma enzima de restrição dependente de metilação, evidenciando o dano causado (Figura 13a). Na Figura 13b, o tratamento em células de *C. albicans* demonstra resultados semelhantes, células tratadas apenas com HAL e HAL+McrBC ($p < 0,01$). Foi realizado um tratamento utilizando o 5-Aza-dCR (0,01 mM), como controle. Logo, os resultados apontam uma alteração nos níveis de metilação global, podendo estar correlacionado a uma resposta ao estresse ou alguma modulação epigenética induzida pelo haloperidol.

Figura 13 - Avaliação da fragmentação do DNA associado à metilação após tratamento com haloperidol



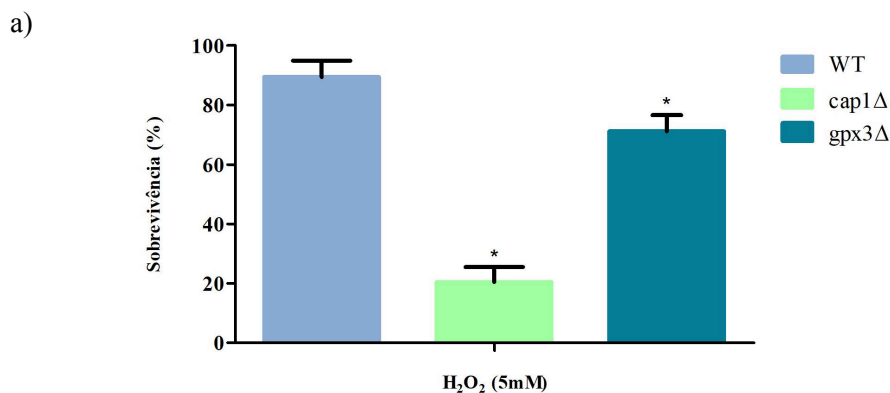
O tratamento com HAL foi realizado de acordo com a CIM de cada cepa (53,33 $\mu\text{g/ml}$ em *C. albicans* e 32 $\mu\text{g/ml}$ em *C. auris*). 13a. e 13b. Controle células não tratadas e células tratadas apenas com McrBC, controle experimental é tratado com 5-Aza-dCR *($p < 0,01$) significância em relação ao controle # diferem em relação ao controle experimental

6.5 Haloperidol exerce efeito frente à cepas clínicas e mutantes de *C. albicans*

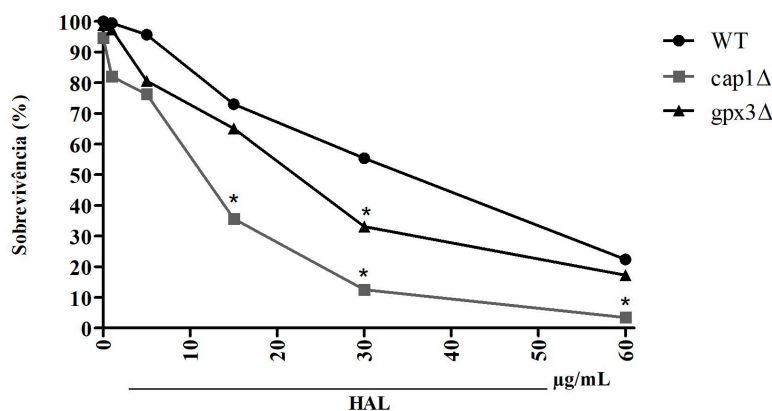
No primeiro gráfico controle, temos o resultado das diferentes cepas mutantes de *C. albicans* modificadas utilizadas no teste avaliando a taxa de sobrevivência após a exposição ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,5mM por duas horas, verificando-se que 89,38% da cepa selvagem (wt) sobreviveu, seguida pela *gpx3* Δ com 71,14% e com apenas 20,48% da cepa *cap1* Δ . Todas as cepas diferem significativamente entre si ($p > 0,01$) (figura 14a).

Seguidamente, as cepas foram avaliadas frente a concentrações crescentes de haloperidol (Figura 14b). Foi possível observar que, mesmo em baixas concentrações (5 $\mu\text{g/mL}$), o haloperidol reduziu a taxa de sobrevivência em 4,3% (WT), 18,87% (*gpx3* Δ) e 24,89% (*cap1* Δ). A uma concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ a taxa de sobrevivências das cepas mutantes ficaram abaixo de 50% (34,17% para *gpx3* Δ e 12,33% para *cap1* Δ), sendo que 56,76% das cepas WT sobreviveram a esta concentração. Já na maior concentração (60 $\mu\text{g/mL}$) todas a cepas possuem taxa de sobrevivência menor que 30%, sendo respetivamente: 23,21% (WT), 16,06% (*gpx3* Δ) e 3,55% (*cap1* Δ).

Figura 14 - Avaliação de sobrevivência de cepas mutantes de *C. albicans*



b)



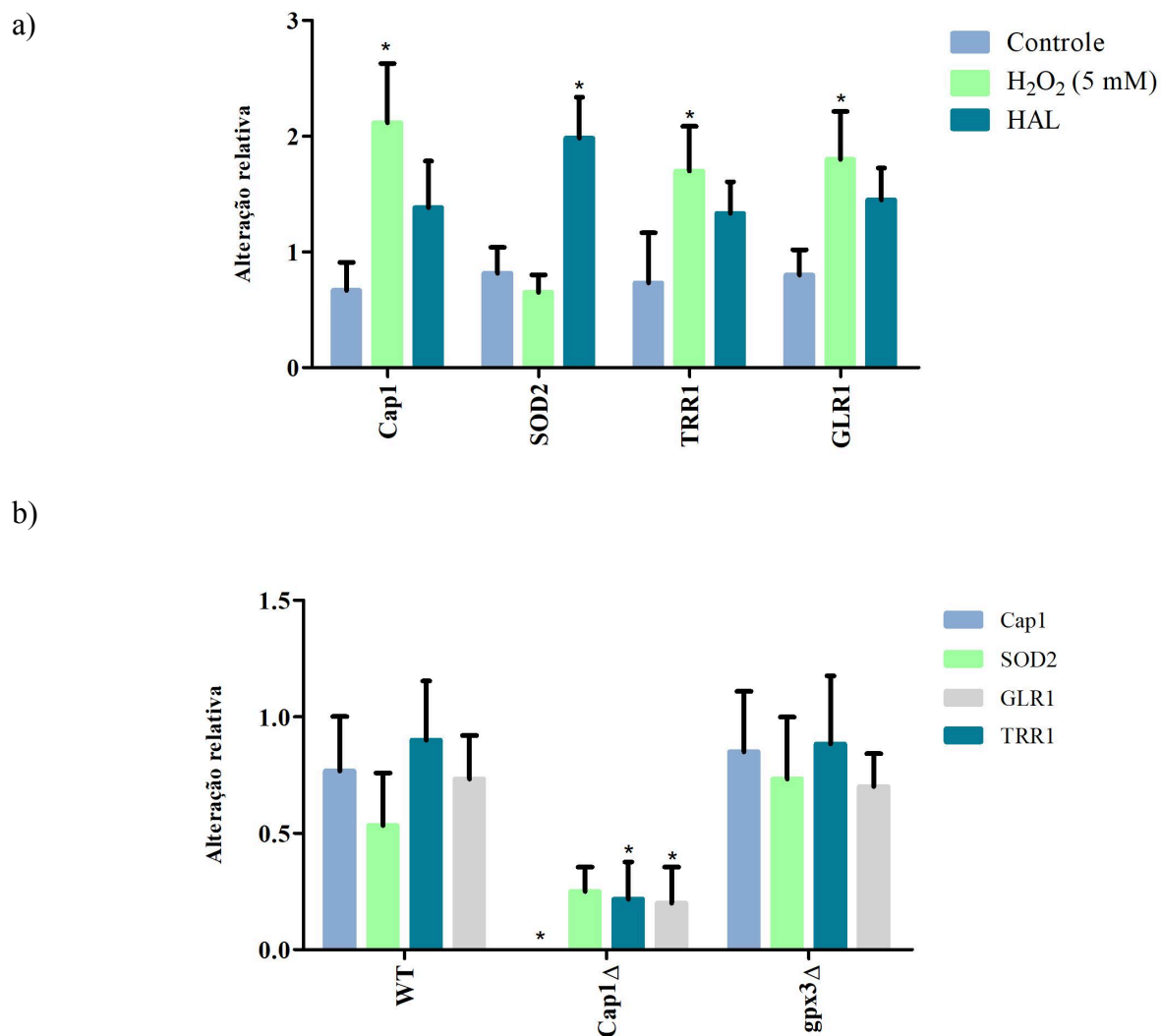
14.a As células de *Candida albicans* (mutantes) foram tratadas com H₂O₂ (5mM); 14b. Células de *Candida albicans* (mutantes) tratadas com concentrações crescentes de haloperidol; como controle foi utilizada a cepa wild type (WT); cap1Δ: cepa com deleção do gene CAP1; gpx3Δ: cepa com deleção do gpx3 * (p<0,01) significância em relação ao controle

6.5.1 Avaliação da expressão gênica por meio de RT-PCR das cepas clínicas e mutantes de *C. albicans*

Em relação a cepas selvagem (WT) a cepa cap1Δ, houve uma redução em todos os genes avaliados após a exposição ao haloperidol, sendo significativo (p<0,01) para os genes: CAP1, TRR1 e GLR1. Nos resultados da expressão após o tratamento para a cepa gpx3Δ em relação a WT não foi verificada diferença significativa nos resultados (Figura 15a).

Por meio de RT-PCR da cepas clínica de *Candida albicans* foi possível avaliar a expressão dos seguintes genes: *adenylate cyclase-associated protein* (CAP1), *glutathione reductase* (GLR1), *manganese-seperoxide dismutase* (SOD2) e *thioredoxin reductase* (TRR1). Foi observado um aumento nas expressões de todos os genes após o tratamento com haloperidol, sendo este aumento significativo (p < 0,01) apenas no SOD2, em relação ao controle negativo (Figura 15b). Para o controle positivo (H₂O₂ por 4 horas) apenas a expressão de SOD2 não foi significativa. Todas as demais expressões foram significativas em relação ao controle (p<0,01).

Figura 15 - Expressão gênica de genes associados a resposta do estresse oxidativo causado por haloperidol



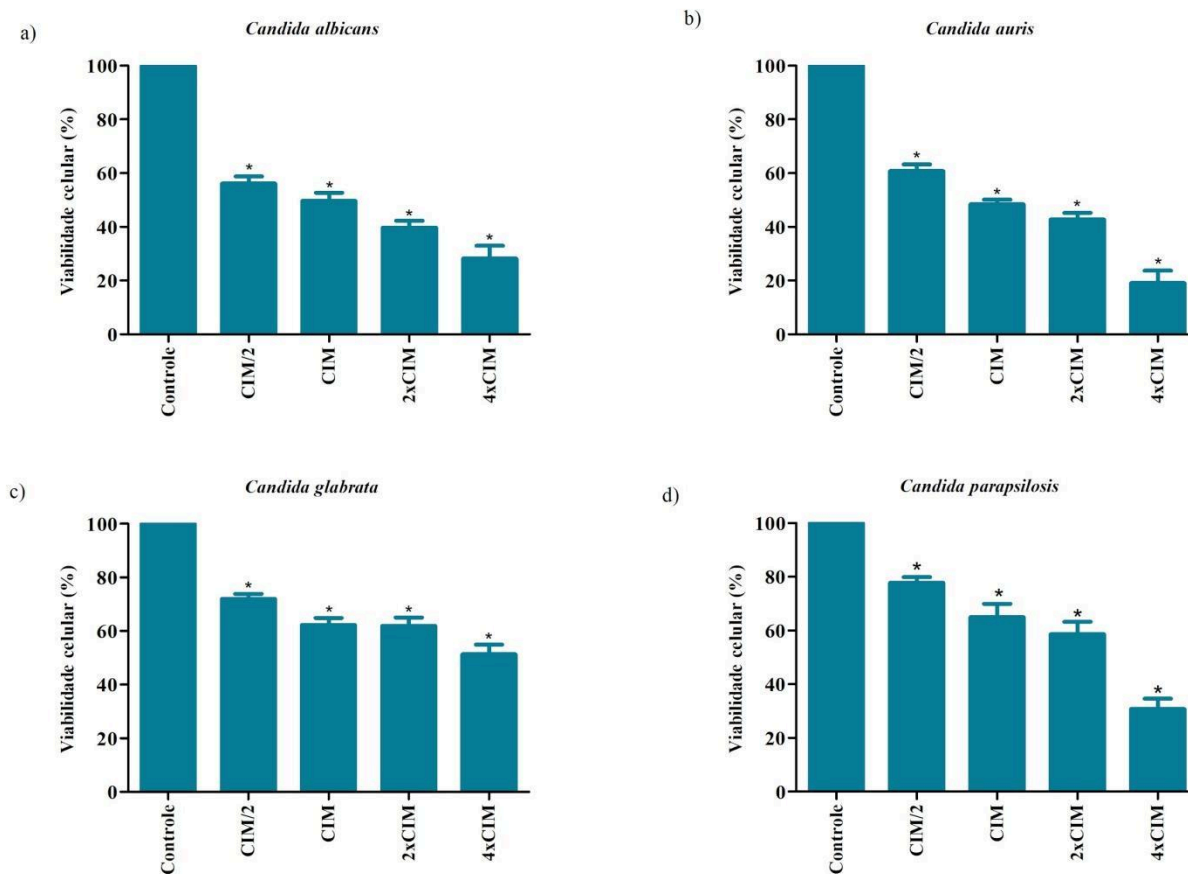
15a. como controle foi utilizada a wild type (WT) (controle negativo); 15b. cap1 Δ : cepa com deleção do gene CAP1; gpx3 Δ : cepa com deleção do gpx3; CAP1: adenylate cyclase-associated protein; GLR1: glutathione reductase, SOD2: manganese-seperoxide dismutase; TRR1: thioredoxin reductase; *(p<0,01) significância em relação ao controle

6.6 Atividade do haloperidol frente aos biofilmes de *Candida* spp.

6.6.1 Células tratadas com haloperidol têm redução da viabilidade dos biofilmes pré-formados de *Candida* spp.

O haloperidol apresentou redução significativa ($p < 0,01$) da viabilidade do biofilme em relação ao controle (não tratado) desde concentração subinibitória (CIM/2) para todas as cepas avaliadas. Ao observar a CIM em todas as cepas, o haloperidol inibiu, pelo menos, 35% da viabilidade, chegando a reduzir mais de 50% nas espécies de *C. albicans* e *C. auris* (Figura 16a e 16b). Na maior concentração avaliada (4xCIM) o haloperidol foi capaz de reduzir mais de 70% a viabilidade em *C. albicans* e *C. auris*, chegando ultrapassar os 80% nesta última, demonstrando uma inibição significativa da viabilidade celular ($p < 0,01$). Nesta mesma concentração, foi capaz de reduzir mais de 50% a viabilidade em *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Figura 16c e 16d).

Figura 16 – Efeito inibitório do haloperidol sobre viabilidade de biofilmes maduros em cepas de *Candida* spp. em diferentes concentrações



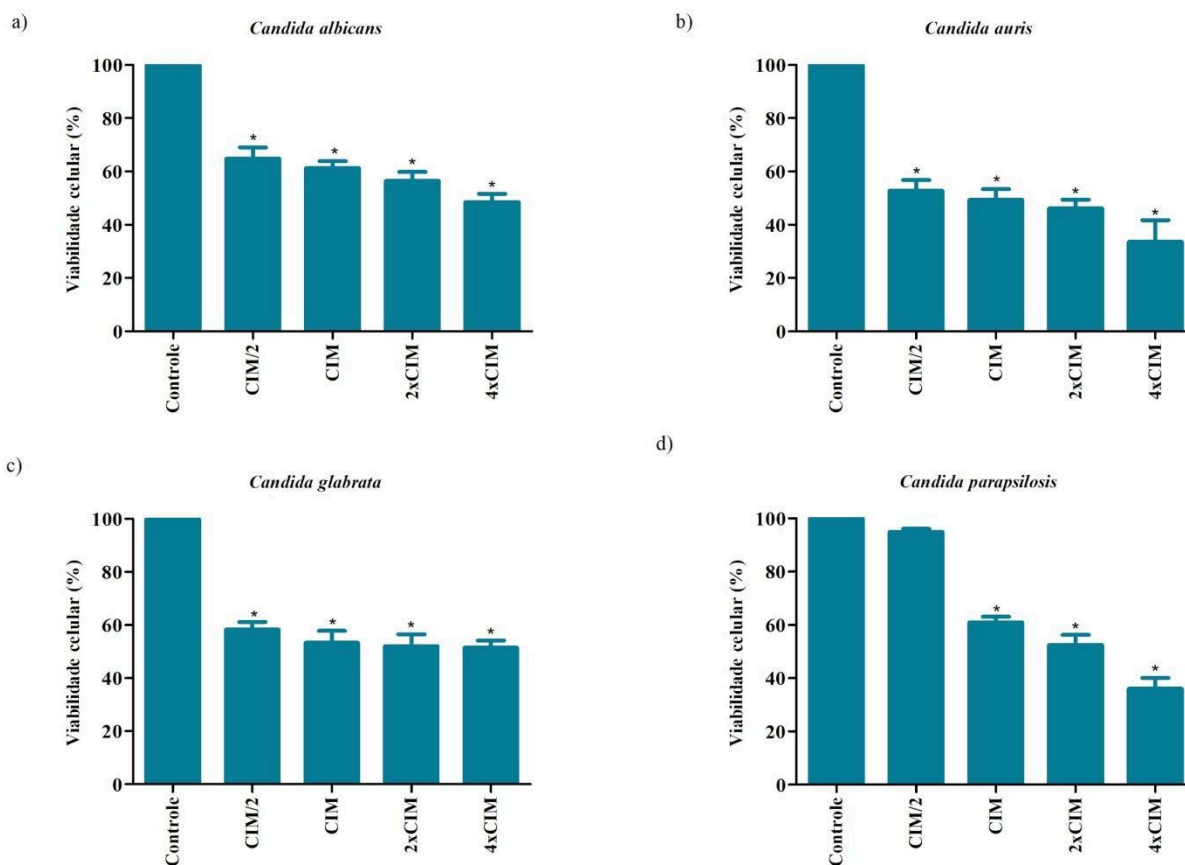
Fonte: autor

*($p < 0,01$) de significância em relação ao controle negativo.

6.6.2 O haloperidol pode auxiliar na prevenção na formação de biofilme de *Candida spp.*

O tratamento com haloperidol apresentou redução significativa ($p < 0,01$) da viabilidade do biofilme em formação em relação ao controle nas concentrações de CIM/2 a 4xCIM para as cepas de *C. albicans*, *C. auris* e *C. glabrata*. Para a cepa de *C. parapsilosis* houve redução significativa a partir da concentração CIM ($p < 0,01$). Em *C. auris* a maior concentração testada reduziu 66,44% da viabilidade, como demonstrado na Figura 17.

Figura 17 - Efeito do haloperidol sobre biofilmes em formação de *Candida spp.*



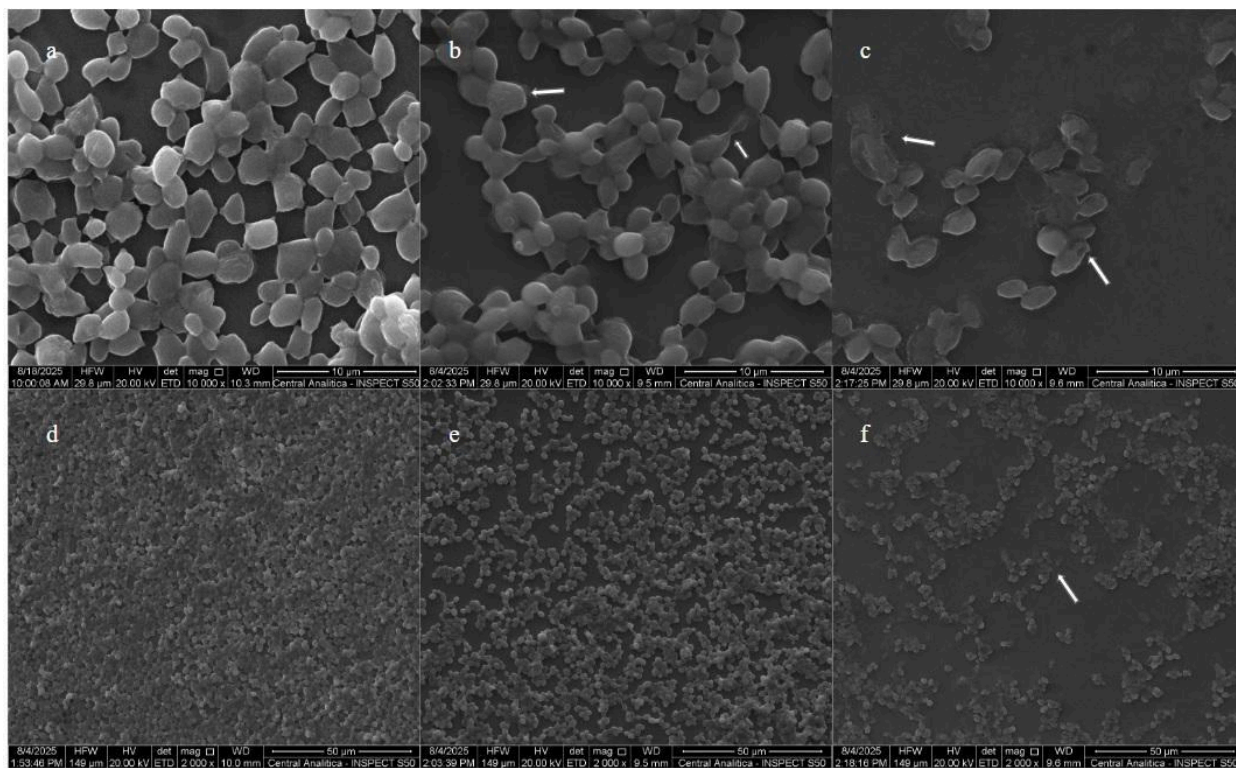
Fonte: Autor.

*($p < 0,01$) em relação ao controle.

6.6.3 O haloperidol causa danos estruturais à arquitetura do biofilme de *Candida auris*

Por meio do MEV foi possível observar as alterações morfológicas causadas pela exposição ao haloperidol no biofilme de *C. auris*, foram observados que o fármaco causa danos estruturais ao microrganismo. No biofilme formado, células do controle com superfície em geral regular e homogênea e intactas de *C. auris* (Figura 18a e 18e) em conformação 3D característica do biofilme. Nos tratamentos, a Figura 18b e 18c demonstra alterações celulares em relação ao controle, no entanto parte das células ainda se mantém íntegras (Figura 18b). Na maior concentração (4xCIM), observam-se deformações na estrutura externa das células, tamanhos irregulares e extravasamento de material intracelular (Figura 18c), mas com grande redução da densidade populacional do biofilme e do seu aspecto anterior, o que indicam que estas não se encontram mais viáveis (Figuras 18c e 18f).

Figura 18 – Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) de Biofilmes maduros de *C. auris* tratados e não tratados com haloperidol

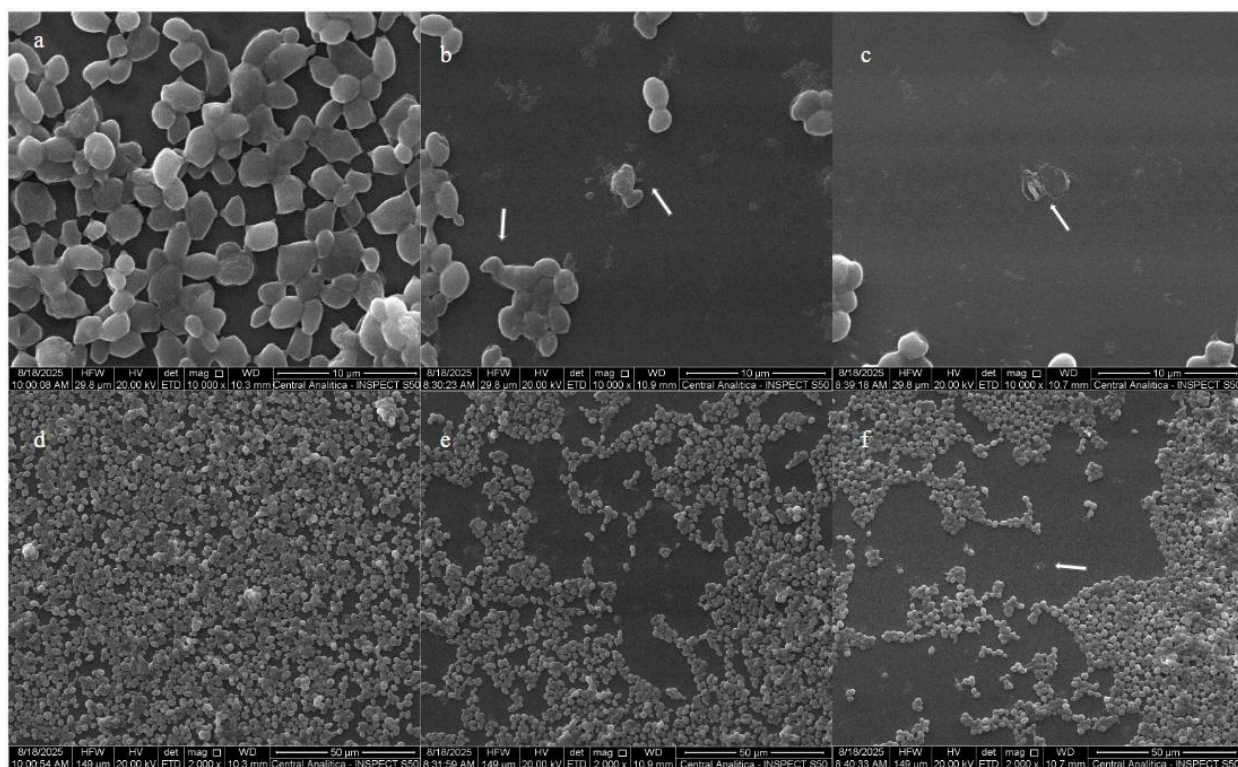


Fonte: Autor. Microscopia eletrônica de varredura em biofilme formado de *Candida auris*. Controles (A e B), tratamento no CIM (53,33 µg/mL) (C e D) e (E e F) Tratamento 4xCIM (128 µg/mL). Ampliação: 10.000×; barra:

10 μm . (a, b, c) Ampliação: 2.000 \times ; barra: 50 μm (d, e, f). Deformações na estrutura externa das células como: células enrugadas, encolhidas, além de extravasamento de material intracelular podem ser observadas (setas brancas), principalmente em 4xCIM (c, f), além de menor densidade populacional em relação ao controle.

As mesmas alterações celulares puderam ser encontradas para o biofilme em formação (Figura 19), no entanto, quando comparadas ao biofilme formado com redução visualmente menor da densidade populacional do microrganismo na maior concentração (4 e 8xCIM) e o controle, mesmo comportamento observado nos ensaios de biofilme formado e formação.

Figura 19 – Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) de Biofilmes em formação de *C. auris* tratados e não tratados com haloperidol

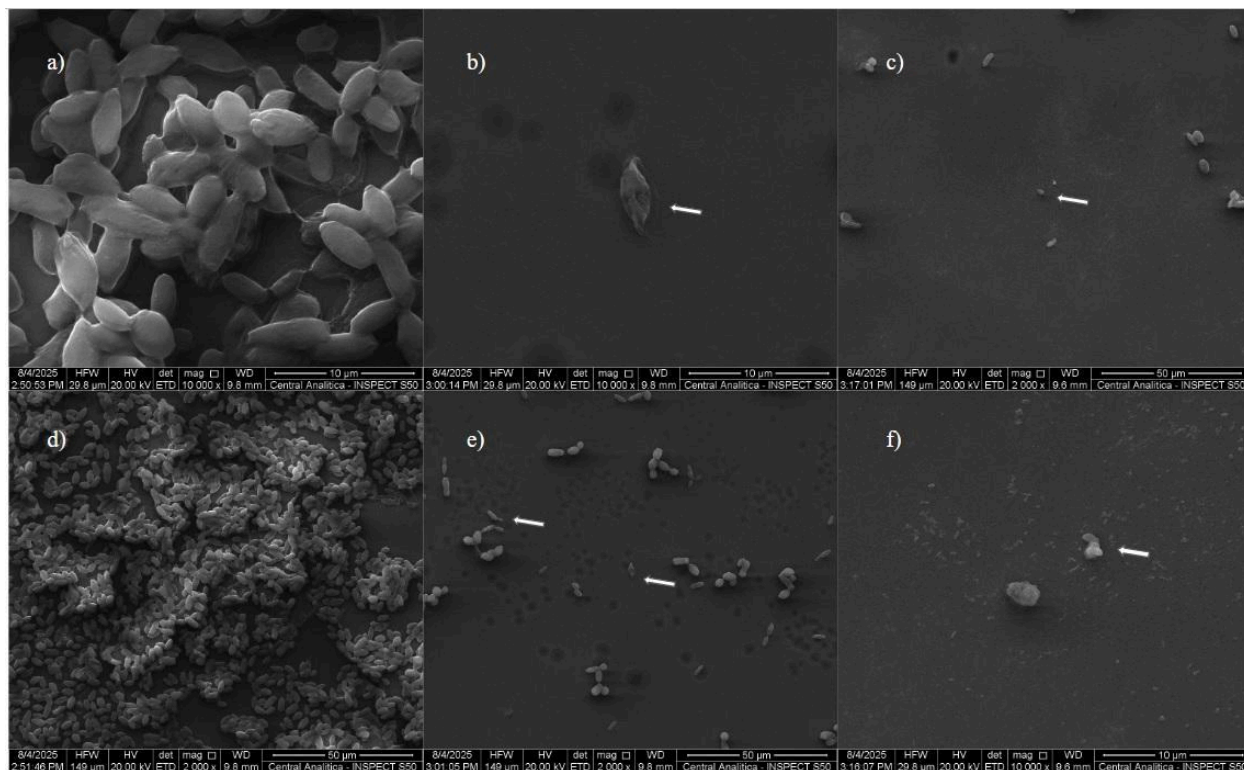


Fonte: Autor. Microscopia eletrônica de varredura em biofilme em formação de *Candida auris*. Controles (A e B), tratamento no CIM (53,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (C e D) e (E e F) Tratamento 4xCIM (213,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ampliação: 10.000 \times ; barra: 10 μm . (a, b, c) Ampliação: 2.000 \times ; barra: 50 μm (d, e, f). Deformações na estrutura externa das células como: células enrugadas, encolhidas, além de extravasamento de material intracelular podem ser observadas (setas brancas), principalmente em 4xCIM (c, f), além de menor densidade populacional em relação ao controle.

6.6.4 O haloperidol causa danos estruturais à arquitetura do biofilme de *Candida albicans*

No biofilme formado (Figura 19), as células de controle apresentaram superfície em regular em geral e homogênea e intactas (Figura 20a e 20e), a conformação 3D está bem evidente o que caracteriza o biofilme. Em relação aos tratamentos, a Figura 20b e 20c demonstraram alta redução da densidade, com alterações celulares em relação ao controle, quando comparado ao biofilme de *C. auris* (Figura 20b) é possível verificar um maior impacto sofrido pela *C. albicans* quando exposta ao haloperidol. Na maior concentração (4xCIM), visualmente é parecido com o tratamento no CIM, observam-se deformações na estrutura externa das células (Figura 20c), tamanhos não regular e extravasamento de material intracelular, impactando diretamente na viabilidade do mesmo (Figuras 20c e 20f).

Figura 20 – Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) de Biofilmes formado de *C. albicans* tratados e não tratados com haloperidol

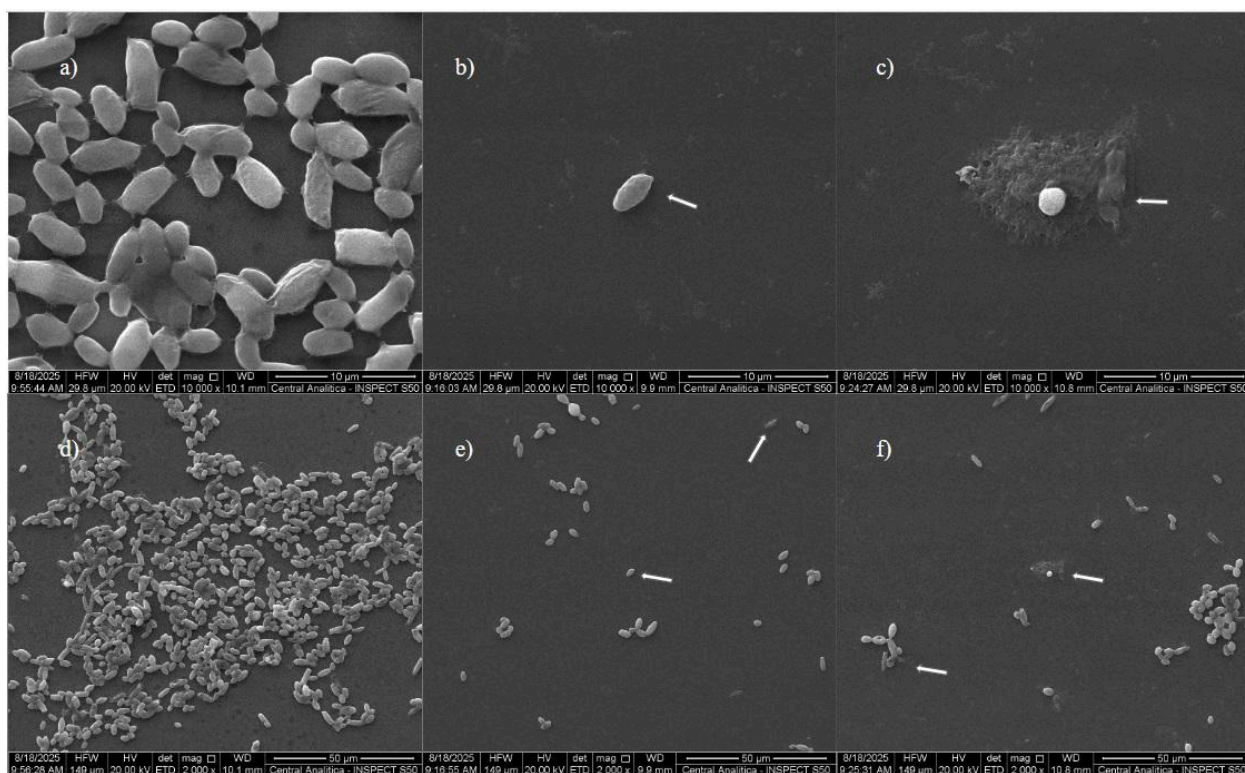


Fonte: Autor. Microscopia eletrônica de varredura em biofilme formado de *Candida albicans*. Controles (A e B), tratamento no CIM (32 µg/mL) (C e D) e (E e F) Tratamento 4xCIM (128 µg/mL). Ampliação: 10.000×; barra: 10 µm. (a, b, c) Ampliação: 2.000×; barra: 50 µm (d, e, f). Deformações na estrutura externa das células como: células

enrugadas, não regulares, encolhidas, além de extravasamento de material intracelular podem ser observadas (setas brancas)

No biofilme em formação de *C. albicans* (Figura 21), mostrou-se visualmente semelhante ao formando nos tratamentos com haloperidol. Alterações celulares puderam ser encontradas no biofilme em formação, bem como extravasamento, rugosidade, deformações de parede e tamanhos irregulares (Figura 20b e 20c).

Figura 21 – Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) de Biofilmes em formação de *C. albicans* tratados e não tratados com haloperidol



Fonte: Autor. Microscopia eletrônica de varredura em biofilme em formação de *Candida albicans*. Controles (A e B), tratamento no CIM (32 µg/mL) (C e D) e (E e F) Tratamento 4xCIM (128 µg/mL). Ampliação: 10.000×; barra: 10 µm. (a, b, c) Ampliação: 2.000×; barra: 50 µm (d, e, f). Deformações na estrutura externa das células como: células enrugadas, não regulares, encolhidas, além de extravasamento de material intracelular podem ser observadas (setas brancas)

7. Discussão

A crescente preocupação com alternativas que sejam eficazes no tratamento de infecções fúngicas têm se intensificado desde que o surgimento de cepas de *Candida* spp. resistentes aos tratamentos antifúngicos tradicionais aumentou, levando ao surgimento de espécies multirresistentes. Este cenário torna-se um desafio ainda maior considerando que alguns tratamentos convencionais possuem limitações de uso devido ao risco considerável de reações adversas, limitando seu uso (Costa-de-Oliveira & Rodrigues, 2020; Fisher et al., 2022; Lee et al., 2021).

A existência de cepas resistentes que não respondem eficientemente aos tratamentos padrões implicam no aumento da morbidade e mortalidade, impactando diretamente nos custos com saúde pública. A busca por soluções e alternativas que venham a suprir a necessidade é uma das preocupações da WHO (2022). Diante disso, o reposicionamento de fármacos tem sido uma importante ferramenta nos estudos de novas alternativas que venham a auxiliar neste complexo desafio, por meio de moléculas já conhecidas, redirecionando este conhecimento a esta seara (Ksiezopolska & Gabaldón, 2018; Kulkarni et al., 2023; Sanyaolu et al., 2022).

Os resultados de suscetibilidade indicaram que a faixa da CIM variou de 32 a 256 $\mu\text{g/mL}$, no qual 66,67% dos isolados permaneceram em concentração $\leq 128 \mu\text{g/mL}$. Concordando com nossos achados, os estudos de Ji *et al.* (2020) verificaram CIMs de 64 $\mu\text{g/mL}$ para *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, com CIMs $>128 \mu\text{g/mL}$ para *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Em nosso estudo, das treze cepas clínicas avaliadas 53,84%(7) apresentaram resistência ao FLC, 57,14%(4) destas cepas apresentaram CIM para o haloperidol $\leq 64 \mu\text{g/mL}$. No entanto, ao avaliar a interação aos diferentes antifúngicos utilizados na clínica médica, não foi observado uma melhora significativa na inibição, não melhorando a atividade, mas também não traz prejuízos, pois não é antagonista. Isso significa que podem ser utilizados os dois sem que haja interferência na atividade. Foram observadas interações sinérgicas em 23,07% (HAL+FLC), 38,46% (HAL+ITRA) e 15,38% (HAL+ANFO) das cepas clínicas do estudo. Na associação HAL+FLC, 69,23% são de interações do tipo indiferente, achado semelhante ao de Galvis-Marín *et al.* (2025) ao avaliar a mesma associação frente a *Malassezia furfur*, obtendo

66,67% de interações indiferentes e 33,33% antagônicas, de acordo com a classificação de Odds (2003).

Nossos resultados nos auxiliaram a investigar o possível mecanismo de ação do haloperidol contra cepas de *C. albicans* e *C. auris*. A viabilidade celular do microrganismo foi reduzida após serem tratadas com o fármaco do estudo através da absorção de iodeto de propídio (PI). A entrada do PI nas células ocorre após aumento da permeabilidade da membrana, levando a uma maior absorção celular (de Andrade Neto et al., 2020). Com base nisto, este achado corrobora a possibilidade de danos causados na membrana celular fúngica, ocasionando perda de sua função, o que ocasionou vazamento de fluido e perda do potencial eletroquímico celular, levando inevitavelmente à morte celular (Sun et al., 2013). A significativa perda da função mitocondrial após exposição ao haloperidol pode ser indicativo de que as células fúngicas iniciaram o processo de apoptose após o tratamento.

A apoptose em eucariotos superiores se assemelha a morte não necrótica em leveduras, sendo um dos parâmetros avaliados para tal constatação a exposição da fosfatidilserina (marcação fluorescente com Anexina V), a qual ocorre na camada externa da membrana (Grosfeld et al., 2021). Em nossos achados, após serem tratadas com o fármaco de estudo em ambas as espécies foi verificado um aumento significativo ($p < 0,01$) de células positivas para anexina V o que conversa com redução da viabilidade celular e perda de função mitocondrial pelo fato da célula está entrando em processo de apoptose.

A sinalização de Ca^{2+} possui uma alta importância no processo de apoptose em eucariotos superiores, especialmente relacionados ao reparo da membrana (Cheng et al., 2015). Alguns estudos apontam que o acúmulo de Ca^{2+} mitocondrial e o estresse oxidativo, podem favorecer a abertura de um poro que possui uma alta condutância na membrana mitocondrial interna, causando uma transição de permeabilidade mitocondrial, essa abertura de poro é um processo dependente de Ca^{2+} , mas fatores como estresse oxidativo e depleção de ATP podem corroborar neste processo (Crompton, 1999; Orrenius; Gogvadze; Zhivotovsky, 2015;).

As etapas seguintes da abertura do poro são inchaço osmótico das mitocôndrias e ruptura da membrana mitocondrial, com isso ocorre a liberação de proteínas mitocondriais no citosol, incluindo o citocromo c (Orrenius; Gogvadze; Zhivotovsky, 2015). Nossos resultados demonstram um aumento significativo de Ca^{2+} mitocondrial em relação às células não tratadas com haloperidol, assim como um aumento do Ca^{2+} no citosol e um aumento significativo de

citocromo c no citosol em células de *C. auris*, demonstrando que o tratamento foi capaz de causar perturbações na homeostase do Ca^{2+} , o que pode ter ocasionado abertura de poros, seguida da ruptura da membrana.

Em nossos achados, verificou-se aumento dos níveis Ca^{2+} no citosol, normalmente associado à desregulação osmótica ou danos à membrana, pode atuar induzindo a expressão de alguns genes associados aos processos metabólicos essenciais e na resposta ao estresse. Nesta perspectiva estudos indicam que o influxo de Ca^{2+} atua na sinalização e trabalha na tentativa de recuperação da homeostase a danos causados na membrana em cepas de *C. albicans* (Giuraniuc et al., 2023; Szymański et al., 2022).

Mustafa et al. (2024) relataram sobre o papel desempenhado pelo citocromo c, um fator crucial na respiração celular e no processo de apoptose, onde o evento de sua saída da mitocôndria para o citoplasma é um importante passo na apoptose, o qual está ligado à redução da atividade do citocromo c oxidase e aumento da geração de espécies reativas de oxigênio. Nossos resultados apontam que o haloperidol causa um aumento do citocromo c à nível mitocondrial em ambas as espécies e citosólico apenas em *C. auris* ($p < 0,01$), bem como uma intensa despolarização da membrana mitocondrial e aumento significativo de células anexina V positivas, sendo importantes indicadores pró-apoptóticos o que corrobora com o aumento da ativação da metacaspase em células tratadas com haloperidol.

Uma pesquisa avaliou derivados triazólicos frente *C. auris*, foi verificado o aumento do citocromo c citosólico, juntamente a uma redução mitocondrial, o que pode indicar uma interrupção da cadeia transportadora de elétrons. Essa liberação de citocromo c mitocondrial pode ser o possível responsável pelo processo de apoptose em muitos organismos, inclusive leveduras, pela ativação de proteases de caspase (Younus Wani et al., 2023).

Em organismos eucariotos, estudos apontam que o estresse oxidativo mitocondrial causa danos ao mtDNA, impactando a cadeia de transporte de elétrons, como consequência afeta negativamente a produção de ATP e o equilíbrio osmótico do cálcio, o que gera ao final um aumento do estresse oxidativo (Kowalczyk et al., 2021). Sendo assim, a redução de glutathione e ATP possivelmente resultam do estresse causado pelo HAL, levando o microrganismo à apoptose. Calaf et al. (2018), ao estudar célula hospedeira de HPV, observou que elevados níveis de GSH podem conferir um sistema desintoxicante ao dano oxidativo aprimorado.

A respeito da glutathiona (GSH) foi observado que o haloperidol reduz significativamente ($p < 0,05$) os níveis dessa proteína por ambas espécies (*C. auris* e *C. albicans*), o que pode ir de encontro ao aspecto de não possuir diferença significativa ao controle em relação a expressão do gene GLR1 (glutathiona redutase), uma vez que o GSH é fundamental para sua síntese. Para a defesa ao estresse oxidativo, as mitocôndrias desenvolveram um sistema antioxidante, que atua neutralizando o acúmulo de espécies oxidativas de oxigênio (ROS), neste contexto um dos mecanismos antioxidantes mitocondriais é o sistema da glutathiona (GSH) (Ribas; García-Ruiz; Fernandez-Checa, 2014).

Os impactos causados pelo estresse oxidativo em organismos também causou alteração nas fases do ciclo celular em ambas espécies de *Candida* se mostram semelhantes quando tratadas com haloperidol, apresentando uma significativa mudança na fase G1 e S, onde na primeira foi observado uma diminuição de células em G1 e acúmulo na fase S. Este dado está possivelmente associado ao estresse sofrido pelo tratamento, consequentemente, indica dano ao DNA (fragmentação) e retardamento do ciclo. Associado a isso, o aumento da fase Sub-G1 pode indicar estágios iniciais de apoptose, onde este aumento pode estar correlacionado a detecção de DNA hipodiplóide e pode ser interpretado como uma fragmentação do DNA sofrido pelo estresse causado pelo tratamento, o que é reforçado nos teste de cometa e TUNEL (De Andrade Neto et al., 2018; Jun; Choi; Shin, 2006).

Papadopoulos et al. (2020), ao avaliar a ação do haloperidol em células tumorais, células eucariotas, observou que não houve indução de células Sub-G1, mas houve uma parada de G2/M. Com o auxílio dos resultados de coloração de iodeto de propídeo/anexina V foi constatado que o HAL aumentou significativamente ($p < 0,01$) a porcentagem de células sofrendo apoptose, que corrobora com o aumento significativo de células anexina V positivas do nosso estudo.

Em situações de estresse intenso, danos ao DNA também podem ser evidenciados, a morte do microrganismo por apoptose e necrose, pode ser julgada pelo aumento da população de células TUNEL positivas, bem como com células coradas com Anexina V e pela avaliação da viabilidade celular (células PI positivas). (Grosfeld et al., 2021). Os resultados vistos em nosso estudo apontam justamente para isto, uma vez que nossos resultados de células TUNEL positivas aumentaram em relação ao controle ($p < 0,01$), como este teste verifica a fragmentação do DNA,

principalmente associado ao processo de apoptose, juntamente com os dois dois parâmetros acima citados, também corroboram com este evento.

Seguindo este raciocínio, foi estudado o efeito do haloperidol sob a metilação global do DNA em espécies de *Candida* spp., uma vez que este processo pode estar associada a proteção de danos sofridos, mas que também podem levar a distúrbios epigenéticos impactando negativamente organismo (Gryzinska et al., 2023). Em nossos resultados, o haloperidol causou um aumento significativo ($p < 0,01$) e intenso na metilação global do DNA de ambas as espécies avaliadas neste estudo.

Modificações como a metilação são pós-traducionais na epigenética, ocorrendo em proteomas específicos (Gupta et al., 2020). A metilação do DNA pode influenciar no silenciamento ou ativação de genes, estando envolvida em processos de desenvolvimento de resistência, adaptação e sobrevivência, logo a exposição a molécula de estudo pode ter causado a metilação do DNA como um mecanismo para tentar sobreviver ao intenso estresse oxidativo.

Segundo Zhang et al., (2025) ao avaliar a exposição e perfil epigenético de *C. auris* a diferentes antifúngicos, foi verificado uma trimetilação na histona H3K36 ao ser tratada com caspofungina (CAF), o que poderia ser uma potencial via de mecanismo de epigenético para o surgimento de perfil de resistência a medicamentos por esta espécie. No estudo de Patra et al. (2022), é apontado que esse processo de regulação epigenética, como metilação e acetilação de histonas, podem contribuir para o controle de resistência fúngica a medicamentos antifúngicos. Com base nisto, as células fúngicas de *Candida* tratadas com o haloperidol podem está sofrendo intensa metilação do DNA como uma alternativa para sobreviver aos impactos causados ou mesmo resistir à ação do mesmo, uma vez que em ambas as espécies foi observado este comportamento.

Pelos achados acima, as células tratadas com haloperidol demonstram estar sob estresse oxidativo, logo é importante investigar quais mecanismo de defesa estão envolvidos. Nossos resultados apontam um aumento em relação ao controle ($p < 0,01$) da expressão de SOD2, constatando que a exposição ao haloperidol e o estresse causado induzem sua ativação, gene que codifica a superóxido dismutase mitocondrial, mostrando uma diferente alternativa ao estresse causado por H_2O_2 . Quando microrganismos ou células estão sob estresse oxidativo, a SOD2 age exercendo funções antioxidantes em resposta a situação a qual se encontra (Hu et al., 2025).

Os genes relacionados ao estresse oxidativo foram expressos em cepas mutantes de *C. albicans* ao serem tratadas com haloperidol. A cepa mutante Cap1 Δ não foi capaz de expressar significativamente ($p > 0,01$) os genes que foram expressos pela cepas WT e gpx3 Δ , neste contexto pode indicar o papel da CAP1 na resposta ao estresse em questão. Nos estudo de Wang et al. (2006), foi demonstrados pelos pesquisadores a proteína Cap1p tem papel importante na resposta ao estresse oxidativo em *C. albicans*, por meio de múltiplas vias, das quais inclui o sistema de defesa antioxidante celular, a exemplo glutaciona redutase, glutaciona S-transferase, tiorredoxina redutase, comprovando o observado no tratamento com haloperidol na cepa mutante Cap1 Δ . Pesquisas indicam que Cap1 está envolvido em funções celulares essenciais, sugerindo que a inibição de Cap1 pode cessar processos fundamentais, sendo expresso em distintos estágios de *C. albicans*: planctônico, hifal e biofilme (Jaiswal & Kumar, 2025).

Os pesquisadores Kos et al. (2016) demonstraram em seu estudo com *C. albicans* que em altos níveis de ROS intracelulares aprisionam o Cap1 em uma forma oxidada intermediária (Cap1 OX⁻¹), nesta forma não é possível induzir os genes-alvo que codificam genes antioxidantes. Nas células de *C. albicans* tratadas com haloperidol, não foi verificada diferença significativa com o controle ($p < 0.01$) para o Cap1, o que pode indicar que o HAL causou intenso estresse oxidativo sofrido durante a exposição da droga.

Os biofilme tem papel importante na resposta ao tratamento da infecção, trabalhos na literatura a respeito que abordam a candidíase sistêmica, causada por *C. albicans*, relatam que este tipo de infecção é uma das principais causas de óbitos em infecções fúngicas nosocomiais e oportunistas graves em pacientes, tamanha gravidade está relacionada à sua capacidade de formar biofilme, o que diminui a suscetibilidade às adversidades do ambiente e aumenta a resistência das células fúngicas ao tratamento antifúngicos. É estimado que a candidíase sistêmica possa ter uma letalidade de até 50% dos pacientes adultos, sendo aproximadamente 30% da população jovem possam vir a morrer anualmente devido à candidíase associada a biofilmes. Além disso, existem estudos que estimam que infecções iniciadas após a formação de biofilmes causadas por *Candida* possam agravar mais ainda o quadro clínico, causando 100 mil mortes (Gulati e Nobile, 2016 ; Silva et al., 2017).

Em nossos estudos foi verificado que o tratamento com haloperidol reduziu os biofilmes formados e em formação das diferentes cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol avaliadas. Em biofilme pré-formado, foi observado a redução de, pelo menos, 35% da

viabilidade em todas as cepas avaliadas e em *C. auris* e *C. albicans* a redução mínima observada foi de 56%. Dentre os fatores de virulência do gênero *Candida* spp., a formação de biofilme possui papel importante em fungos patogênicos, pelo o fato de contribuir para o desenvolvimento de resistência a medicamentos, podendo ser formados tanto em tecidos do hospedeiro quanto em dispositivos médicos, como em cateteres (Talapko et al., 2021; Wuyts; Van Dijck; Holtappels, 2018).

Foi possível verificar que o haloperidol foi mais eficiente em reduzir a viabilidade em biofilmes maduros do que biofilmes em formação em todas as cepas avaliadas, segundo estudo de Allen et al. (2016) uma das possíveis explicações para tal fato seria a capacidade do haloperidol se comportar como uma piperidina, um composto orgânico que tem a capacidade de dispersar biofilmes, esse comportamento foi observado em bactérias.

Halbrook et al. (2017) avaliou compostos derivados do bromperidol, constatou-se que um dos compostos com adição de um grupo Flúor (F) obteve ação frente a biofilmes de *Candida* spp. Com doses $>128 \mu\text{g/mL}$, as cepas testadas eram altamente resistentes a todos os fármacos testados no estudo, incluindo antifúngicos posaconazol e voriconazol com valores de CIM sésses (CIM-S) $>32 \mu\text{g/mL}$ em ambos os antifúngicos. Em nossos resultados, a concentração de $128 \mu\text{g/mL}$ em *C. albicans* reduziu 71,9% da viabilidade celular de biofilme formado, nas demais cepas em essa faixa de concentração inibiu observou-se um redução da viabilidade de 34,91 a 48,74%.

Segundo Ji et al. (2020) avaliou derivados da molécula do haloperidol e os resultados revelaram que um dos compostos (B10) conseguiu inibir de forma significativa e dose-dependente a formação de biofilme *C. albicans*, o mesmo também apresentou atividade antibiofilme em *Cryptococcus neoformans*. Além disso, o derivado exibiu inibição da transição da fase leveduriforme para hifal em cepas resistentes de *C. albicans*, quando associado ao fluconazol (FLC). Os nossos resultados também indicaram uma maior redução da viabilidade celular com aumento da dose utilizada, principalmente nas espécies *C. albicans*, *C. auris* e *C. parapsilosis* tanto em biofilme maduro quanto em formação.

Conclusão

Os nossos resultados, com bases nos diferentes aspectos, apontam que haloperidol causa estresse oxidativo em cepas de *C. albicans* e *C. auris*, induzindo o microrganismo a morte por meio de apoptose, como consequência do intenso impacto causado na homeostase, que num primeiro momento faz uso dos sua maquinaria para tentar reduzir os danos sofridos. Testes como Anexina V e TUNEL são importantes na confirmação da apoptose, bem como do ciclo celular que apontou uma fragmentação do DNA. Acredita-se que o haloperidol cause intenso estresse oxidativo, gerando danos ao DNA e, possivelmente, alterações epigenéticas, atuando também na despolarização da membrana mitocondrial, queda do ATP intracelular, e desequilíbrios em diversos sistemas, como do Ca^{2+} , citocromo c e GSH. A célula, no intuito de conter os danos, aumenta a expressão dos genes SOD2, porém o dano causado excede a capacidade de defesa do microrganismo, levando a morte tipo apoptose em *Candida* spp.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, Herbert B. Alzheimer's disease: Assessing the role of spirochetes, biofilms, the immune system, and amyloid- β with regard to potential treatment and prevention. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 53, n. 4, p. 1271–1276, 2016.
- ARENDRUP, Maiken Cavling; PATTERSON, Thomas F. Multidrug-resistant *Candida*: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **The journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl_3, p. S445–S451, 2017.
- ARZANLOU, Mohsen; CHAI, Wern Chern; VENTER, Henrietta. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays in biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 49–59, 2017.
- BADIEE, Parisa; HASHEMIZADEH, Zahra. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. **The Indian journal of medical research**, v. 139, n. 2, p. 195–204, 2014.
- BAHRAM, Mohammad; NETHERWAY, Tarquin. Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. **FEMS microbiology reviews**, v. 46, n. 2, 2022.
- BATISTA DE ANDRADE NETO, João *et al.* A mechanistic approach to the in-vitro resistance modulating effects of fluoxetine against meticillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial pathogenesis**, v. 127, p. 335–340, 2019
- BENEDICT, Kaitlin *et al.* Estimation of direct healthcare costs of fungal diseases in the United States. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 68, n. 11, p. 1791–1797, 2019.
- BENEDICT, Kaitlin *et al.* Economic burden of fungal diseases in the United States. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 63, n. 6, 2025.
- BOLOGNESI, Andrea *et al.* Ribosome-inactivating proteins from plants: A historical overview. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 12, p. 1627, 2016.
- BONGOMIN, Felix *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 4, 2017.
- BORGHI, Elisa *et al.* New strategic insights into managing fungal biofilms. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1077, 2015,
- BORMAN, Andrew M.; JOHNSON, Elizabeth M. Name changes for fungi of medical importance, 2018 to 2019. **Journal of clinical microbiology**, v. 59, n. 2, 2021.

BRASIL. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único De Saúde (CONITEC). **Relatório para a sociedade informações sobre recomendações de incorporação de medicamentos e outras tecnologias no SUS: anidulafungina para tratamento de pacientes com candidíase invasiva** Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

BRUNKE, Sascha *et al.* Virulence factors in fungal pathogens of man. **Current opinion in microbiology**, v. 32, p. 89–95, 2016.

CABRERA-GUERRERO, Juan Pablo *et al.* Candidemia: An update on epidemiology, risk factors, diagnosis, susceptibility, and treatment. **Pathogens**, v. 14, n. 8, p. 806, 2025.

CALAF, Gloria M. *et al.* Oxidative stress in female cancers. **Oncotarget**, v. 9, n. 34, p. 23824–23842, 2018.

CAVALCANTI, Bruno Coêlho *et al.* Evaluation of genotoxicity and mutagenicity of ketamine on human peripheral blood leukocytes and in *Salmonella typhimurium*. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 62, n. 104718, p. 104718, 2020.

CAVALHEIRO, Mafalda; TEIXEIRA, Miguel Cacho. *Candida* biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 28, 2018.

CIUREA, Cristina Nicoleta *et al.* *Candida* and candidiasis-opportunism versus pathogenicity: A review of the virulence traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 857, 2020.

CHANG, Ya-Lin *et al.* New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 222–236, 2017.

CHEN, Junzhu *et al.* Molecular epidemiology, antifungal susceptibility, and virulence evaluation of *Candida* isolates causing invasive infection in a tertiary care teaching hospital. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 721439, 2021.

CHENG, Xiping *et al.* Calcium signaling in membrane repair. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 45, p. 24–31, 2015.

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard. CLSI Document M27-A3**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. CLSI document M27-S4**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

COLOMBO, Arnaldo L.; JÚNIOR, João N. de Almeida; GUINEA, Jesus. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. **Current opinion in infectious diseases**, v. 30, n. 6, p. 528–538, 2017.

COLOMBO, Arnaldo Lopes *et al.* Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.

COLLINS, Andrew R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249–261, 2004.

CORTÉS, Juan Carlos G. *et al.* The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 6, p. 107352, 2019.

COSTA, Inês *et al.* Disclosing the Antifungal Mechanisms of the Cyclam Salt H₄[H₂(4-CF₃PhCH₂)₂Cyclam]Cl₄ against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 10, p. 5209, 2024.

COSTA-DE-OLIVEIRA, Sofia; RODRIGUES, Acácio G. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: The triad yeast-host-antifungal. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 154, 2020.

COSTA SILVA, Rose Anny *et al.* In vitro anti-*Candida* activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 341–348, 2017.

CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **The Biochemical Journal**, v. 341 (Pt 2), n. 2, p. 233–249, 1999.

DAMASCENO, Lisandra Serra *et al.* Trends and patterns of mortality arising from fungal infections in Brazil in a period of 11 years. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1, 2021.

DA MATTA, Daniel Archimedes; SOUZA, Ana Carolina Remondi; COLOMBO, Arnaldo Lopes. Revisiting species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from Latin American medical centers. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 2, 2017.

DA SILVA, Cecília Rocha *et al.* Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691–1700, 2013.

DA SILVA DANTAS, Alessandra *et al.* Thioredoxin regulates multiple hydrogen peroxide-induced signaling pathways in *Candida albicans*. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 19, p. 4550–4563, 2010.

DAVIDSON, Linda; NETEA, Mihai G.; KULLBERG, Bart Jan. Patient susceptibility to candidiasis-A potential for adjunctive immunotherapy. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 1, 2018.

DE ANDRADE NETO, João Batista *et al.* Action mechanism of naphthofuranquinones against fluconazole-resistant *Candida tropicalis* strains evidenced by proteomic analysis: The role of increased endogenous ROS. **Microbial pathogenesis**, v. 117, p. 32–42, 2018.

DE ANDRADE NETO, João Batista *et al.* Synergistic effects of ketamine and azole derivatives on *Candida* spp. resistance to fluconazole. **Future microbiology**, v. 15, n. 3, p. 177–188, 2020.

DENNING, David W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 24, n. 7, p. e428–e438, 2024.

DENNING, David W. The ambitious “95-95 by 2025” roadmap for the diagnosis and management of fungal diseases. **Thorax**, v. 70, n. 7, p. 613–614, 2015.

DIEKEMA, Daniel *et al.* The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 73, n. 1, p. 45–48, 2012.

DUARTE, Rodrigo R. R. *et al.* **Repurposing FDA-approved drugs for COVID-19 using a data-driven approach. 2020.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.26434/chemrxiv.12148764.v1>>. Acessado em: 14 nov. 2025,

ELSHOBARY, Mostafa E. *et al.* Combating antibiotic resistance: Mechanisms, multidrug-resistant pathogens, and novel therapeutic approaches: An updated review. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 3, p. 402, 2025.

FIOL, Fernando de Sá Del; MATTOS FILHO, Thales Rocha De; GROppo, Francisco Carlos. Resistência bacteriana. **RBM rev. bras. med.**, [S. l.], v. 57, n. 10, p. 1129–1129, 2000.

FISHER, Matthew C. *et al.* Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science (New York, N.Y.)**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 2018.

FISHER, Matthew C. *et al.* Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 20, n. 9, p. 557–571, 2022.

FIRACATIVE, Carolina. Invasive fungal disease in humans: are we aware of the real impact? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e200430, 2020.

- FORNARI, Gheniffer *et al.* Susceptibility and molecular characterization of *Candida* species from patients with vulvovaginitis. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 2, p. 373–380, 2016.
- FRĄC, Magdalena *et al.* Fungal biodiversity and their role in soil health. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 707, 2018.
- Fricker, Mark . D., Heaton, Luke. L. M., Jones, Nick. S., & Boddy, Lynne. The Mycelium as a Network. *In: The Fungal Kingdom. [S.l.]*: American Society of Microbiology, 2017. p. 335–367, 2017.
- GALVIS-MARÍN, Juan Camilo *et al.* Characterisation of Antifungal Resistance to Azoles in Colombian Isolates of *Malassezia* spp. **Mycoses**, v. 68, n. 9, p. e70112, 2025.
- GHANNOUM, Mahmoud *et al.* The role of echinocandins in *candida* biofilm-related vascular catheter infections: In vitro and in vivo model systems. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 61 Suppl 6, n. suppl_6, p. S618-21, 2015.
- GHAZI, S. *et al.* The epidemiology of *Candida* species in the Middle East and North Africa. **Journal de mycologie medicale**, v. 29, n. 3, p. 245–252, 2019.
- GIACOMAZZI, Juliana *et al.* The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145–150, 2016.
- GIOLO, Muriel, Padovani; SVIDZINSKI, Terezinha, Inez, Estivalet. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225–234, jun. 2010.
- GIURANIUC, C. V. *et al.* Dynamic calcium-mediated stress response and recovery signatures in the fungal pathogen, *Candida albicans*. **mBio**, v. 14, n. 5, p. e0115723, 2023.
- GÓMEZ-GAVIRIA, Manuela *et al.* Strategies of pharmacological repositioning for the treatment of medically relevant mycoses. **Infection and drug resistance**, v. 17, p. 2641–2658, 2024.
- GROSFELD, Erika V. *et al.* A systematic survey of characteristic features of yeast cell death triggered by external factors. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 11, p. 886, 2021.
- GRYZINSKA, Magdalena *et al.* Changes in the level of DNA methylation in *Candida albicans* under the influence of physical and chemical factors. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 21, p. 15873, 2023.
- GULATI, Megha; NOBILE, Clarissa J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and infection**, v. 18, n. 5, p. 310–321, 2016.

GUPTA, Varsha; DATTA, Priya. Next-generation strategy for treating drug resistant bacteria: Antibiotic hybrids: Antibiotic hybrids. **The Indian journal of medical research**, v. 149, n. 2, p. 97–106, 2019

GUPTA, Shubhpriya *et al.* Epigenetic-based developments in the field of plant endophytic fungi. **Suid-Afrikaanse tydskrif vir plantkunde [South African Journal of Botany]**, v. 134, p. 394–400, 2020.

HEUNG, Lena J. Monocytes and the host response to fungal pathogens. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 34, 2020.

HOLBROOK, Selina Y. L. *et al.* Repurposing antipsychotic drugs into antifungal agents: Synergistic combinations of azoles and bromperidol derivatives in the treatment of various fungal infections. **European journal of medicinal chemistry**, v. 139, p. 12–21, 2017.

HU, Qiao-Ling *et al.* Mitochondrial phosphate carrier plays an important role in virulence of *Candida albicans*. **Mycology**, v. 16, n. 1, p. 369–381, 2025.

HUI, Sui Ting; GIFFORD, Hugh; RHODES, Johanna. Emerging antifungal resistance in fungal pathogens. **Current clinical microbiology reports**, v. 11, n. 2, p. 43–50, 2024.

JAISWAL, Neha; KUMAR, Awanish. Deciphering CAP1 of *Candida albicans* as a key druggable target protein. **Medicine in Microecology**, v. 25, n. 100136, p. 100136, 2025.

JANBON, Guilhem *et al.* Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches. **Microbes and infection**, v. 21, n. 5–6, p. 237–245, 2019.

Ji, Changjin *et al.* Drug repurposing of haloperidol: Discovery of new benzocyclane derivatives as potent antifungal agents against cryptococcosis and candidiasis. **ACS infectious diseases**, v. 6, n. 5, p. 768–786, 2020.

JUN, Soo Young; CHOI, Yung Hyun; SHIN, Heung Mook. *Siegesbeckia glabrescens* induces apoptosis with different pathways in human MCF-7 and MDA-MB-231 breast carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 15, n. 6, p. 1461–1467, 2006.

KÖHLER, Julia, R. *et al.* Fungi that Infect Humans. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, 9 jun. 2017.

KOS, Iaroslava *et al.* Mechanisms underlying the delayed activation of the Cap1 transcription factor in *Candida albicans* following combinatorial oxidative and cationic stress important for phagocytic potency. **mBio**, v. 7, n. 2, p. e00331, 2016.

KOWALCZYK, Paweł *et al.* Mitochondrial oxidative stress-A causative factor and therapeutic target in many diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13384, 2021.

KSIEZOPOLSKA, Ewa; GABALDÓN, Toni. Evolutionary emergence of drug resistance in *Candida* opportunistic pathogens. **Genes**, v. 9, n. 9, p. 461, 2018.

KULKARNI, V. S. et al. Drug repurposing: An effective tool in modern drug discovery. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 157–166, 2023.

LASS-FLÖRL, Cornelia; STEIXNER, Stephan. The changing epidemiology of fungal infections. **Molecular aspects of medicine**, v. 94, n. 101215, p. 101215, 2023.

LEE, Wonjong; LEE, Dong Gun. A novel mechanism of fluconazole: fungicidal activity through dose-dependent apoptotic responses in *Candida albicans*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 164, n. 2, p. 194–204, 2018.

LEE, Yunjin et al. Antifungal drug resistance: Molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390–3411, 2021

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOCKHART, Shawn R.; GUARNER, Jeannette. Emerging and reemerging fungal infections. **Seminars in diagnostic pathology**, v. 36, n. 3, p. 177–181, 2019.

LOPES, José Pedro; LIONAKIS, Michail S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89–121, 2022.

LOHSE, Matthew B. et al. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature reviews. Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19–31, 2018.

LÜCKING, Robert et al. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? **IMA fungus**, v. 11, n. 1, p. 14, 2020.

LUDOVICO, Paula et al. Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 8, p. 2598–2606, 2002.

MAYER, François L.; WILSON, Duncan; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013.

MAERTENS, Johan A. Invasive fungal diseases. In: **The EBMT Handbook**. Cham: Springer International Publishing, 2024. p. 321–329.

MAHERALI, Hafiz; KLIRONOMOS, John N. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. **Science (New York, N.Y.)**, v. 316, n. 5832, p. 1746–1748, 2007.

MASCHMEYER, Georg. The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats. **International journal of antimicrobial agents**, v. 27 Suppl 1, p. 3–6, 2006.

MBA, Ifeanyi Elibe; NWEZE, Emeka Innocent. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 1797–1819, 2020.

MILOSHEV, George; MIHAYLOV, Ivailo; ANACHKOVA, Boyka. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. **Mutation research**, v. 513, n. 1–2, p. 69–74, 2002.

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of antibiotic resistance. *In: Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, Fifth Edition. [S.l.]: American Society of Microbiology, 2016. p. 481–511.

MUSTAFA, Mohd et al. Apoptosis: A comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 22, p. 1838, 2024.

PUBCHEM. National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 3559, **Haloperidol**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Haloperidol>>. Acessado em out 2025.

NEHME, Hassan *et al.* Antibacterial activity of antipsychotic agents, their association with lipid nanocapsules and its impact on the properties of the nanocarriers and on antibacterial activity. **PloS one**, v. 13, n. 1, p. e0189950, 2018.

NETO JUNIOR, Jose Moreira *et al.* Clinical and epidemiological aspects of *Candida* yeast infections and rational use of antifungals. **Future microbiology**, v. 19, n. 7, p. 577–584, 2024.

NIKNAFS, Behrooz. Induction of apoptosis and non-apoptosis in human breast cancer cell line (MCF-7) by cisplatin and caffeine. **Iranian Biomedical Journal**, v. 15, n. 4, p. 130–133, 2011.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 1, 2003.

OMS, Organização Mundial de Saúde (2022). WHO fungal priority pathogens list to guide research development and public health action. **World Health Organization**. ISBN 978-92-4-006024-1 (print version), 2022.

OMS, Organização Mundial de Saúde (2025). WHO **Antifungal agents in clinical and preclinical development: overview and analysis**. Genève, Switzerland: World Health Organization, 2025.

ORRENIUS, Sten; GOGVADZE, Vladimir; ZHIVOTOVSKY, Boris. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, n. 1, p. 72–81, 2015.

PAPADOPOULOS, Fotios et al. Haloperidol induced cell cycle arrest and apoptosis in glioblastoma cells. **Biomedicines**, v. 8, n. 12, p. 595, 2020.

PAPON, Nicolas *et al.* Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003550, 2013.

PAPPAS, Peter G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature reviews. Disease primers**, v. 4, n. 1, p. 18026, 2018.

PARSONS, Meredith G.; DIEKEMA, Daniel J. What is new in fungal infections? **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 36, n. 6, p. 100187, 2023.

PEROTTO, S. *et al.* Interactions of fungi with other organisms. **Plant biosystems**, v. 147, n. 1, p. 208–218, 2013.

PATTERSON, Miranda J. *et al.* Ybp1 and Gpx3 signaling in *Candida albicans* govern hydrogen peroxide-induced oxidation of the Cap1 transcription factor and macrophage escape. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 18, p. 2244–2260, 2013.

PATRA, Sandip et al. Epigenetic regulation of antifungal drug resistance. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 8, p. 875, 2022.

PIERCE, Christopher G. *et al.* A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2008.

PFALLER, M. A. *et al.* Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1199–1203, 2012.

PORRO, Danilo; BRANDUARDI, Paola. Production of organic acids by yeasts and filamentous fungi. *In: Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 205–223.

PUSHPAKOM, Sudeep *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2019.

QI, Haiyan *et al.* Inactivation of Cdc13p triggers MEC1-dependent apoptotic signals in yeast. **The journal of biological chemistry**, v. 278, n. 17, p. 15136–15141, 2003

RAHMAN, Sajedur; MARWAHA, Raman. Haloperidol. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.

RANG, Humphrey P. *et al.* **Rang & Dale's Pharmacology**. 8. ed. London, England: Churchill Livingstone, 2015.

R, ARYA N; RAFIQ, Naureen B. Candidiasis. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.

REVIE, Nicole M. *et al.* Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 70–76, 2018.

RIBAS, Vicent; GARCÍA-RUIZ, Carmen; FERNÁNDEZ-CHECA, José C. Glutathione and mitochondria. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 151, 2014.

RHODES, Johanna; FISHER, Matthew C. Global epidemiology of emerging *Candida auris*. **Current opinion in microbiology**, v. 52, p. 84–89, 2019.

ROCHA DA SILVA, Cecília *et al.* Evaluation of the antifungal effect of chlorogenic acid against strains of *Candida* spp. resistant to fluconazole: apoptosis induction and in silico analysis of the possible mechanisms of action. **Journal of medical microbiology**, v. 71, n. 5, 2022.

SANYAOLU, Adekunle *et al.* *Candida auris*: An overview of the emerging drug-resistant fungal infection. **Infection & Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 236–246, 2022.

SHERMAN, Fred. Getting started with yeast. **Methods in enzymology**, v. 350, p. 3–41, 2002.

SILVA, Lisandra J. *et al.* Antifungal activity of dexamethasone against fluconazole-resistant *Candida albicans* and its activity against biofilms. **Future microbiology**, v. 17, n. 8, p. 607–620, 2022.

SILVA, Sónia *et al.* *Candida* species biofilms' antifungal resistance. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 1, 2017.

SINGH, Simranjeet *et al.* Importance and recent aspects of fungi-based food ingredients. *In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. [S.l.]: Elsevier, 2020. p. 245–254.

STEENWYK, Jacob L.; ROKAS, Antonis. Copy number variation in fungi and its implications for wine yeast genetic diversity and adaptation. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 288, 2018.

SUN, Nuo *et al.* Azole susceptibility and transcriptome profiling in *Candida albicans* mitochondrial electron transport chain complex I mutants. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 532–542, 2013.

SZYMAŃSKI, Mateusz *et al.* Echinocandins - structure, mechanism of action and use in antifungal therapy. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 876–894, 2022.

- TACCONELLI, Evelina *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet infectious diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.
- TAMO, S. P. Bouopda. *Candida* infections: Clinical features, diagnosis and treatment. **Infectious Diseases and Clinical Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 91–102, 2020.
- TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiology: An introduction**. Harlow, England: Benjamin Cummings, 2016.
- TSAY, Sharon V. *et al.* Burden of candidemia in the United States, 2017. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 9, p. e449–e453, 2020.
- UDDIN, Tanvir Mahtab *et al.* Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of infection and public health**, v. 14, n. 12, p. 1750–1766, 2021.
- VESES, Verónica; GOW, Neil A. R. Pseudohypha budding patterns of *Candida albicans*. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, v. 47, n. 3, p. 268–275, 2009.
- WANG, Dandan *et al.* Fungal biofilm formation and its regulatory mechanism. **Heliyon**, v. 10, n. 12, p. e32766, 2024.
- WANG, Yan *et al.* Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, n. 7, p. 1201–1209, 2006.
- WIEDERHOLD, Nathan P. Emerging fungal infections: New species, new names, and antifungal resistance. **Clinical chemistry**, v. 68, n. 1, p. 83–90, 2021.
- WUYTS, Jurgen; VAN DIJCK, Patrick; HOLTAPPELS, Michelle. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 10, p. e1007301, 2018.
- YANG, Wanzhen *et al.* Discovery of piperidol derivatives for combinational treatment of azole-resistant candidiasis. **ACS infectious diseases**, v. 7, n. 3, p. 650–660, 2021.
- YOUNUS WANI, Mohmmad *et al.* Click synthesis of pyrrolidine-based 1,2,3-triazole derivatives as antifungal agents causing cell cycle arrest and apoptosis in *Candida auris*. **Bioorganic Chemistry**, v. 136, n. 106562, p. 106562, 2023.
- ZHANG, Yuping *et al.* Targeting epigenetic regulators to overcome drug resistance in the emerging human fungal pathogen *Candida auris*. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 4668, 2025.

ZHOU, Ling-Hong *et al.* Risk-based estimate of human fungal disease burden, China. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 9, p. 2137–2147, 2020.

ZOLOTAREVA, Darya *et al.* Heterocyclic antidepressants with antimicrobial and fungicide activity. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 30, n. 5, p. 1102, 2025.