



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

FRANCISCA BRUNA STEFANY AIRES DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA HIDRALAZINA FRENTE A
Staphylococcus aureus e *Candida* spp.

FORTALEZA

2024

FRANCISCA BRUNA STEFANY AIRES DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA HIDRALAZINA FRENTE A
Staphylococcus aureus e *Candida* spp.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.
Coorientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

FORTALEZA

2024

FRANCISCA BRUNA STEFANY AIRES DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA HIDRALAZINA FRENTE A.
Staphylococcus aureus e *Candida* spp

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em 20/05/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Solange de Oliveira Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dra. Ana Cristina de Oliveira M. Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Alexandre Magno R. Teixeira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dra. Cecília Rocha da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)
(Orientadora)

A Deus.
A minha família.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, por seu infinito amor, sua misericórdia que se renova a cada manhã e por me permitir viver os seus planos de prosperidade e paz.

À Universidade Federal do Ceará.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, em especial a todos os professores por compartilhar tanto conhecimento em excelentes disciplinas.

Ao apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará pelas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura.

À professora Cecília Rocha, por todos os anos de ensinamento, amizade e incentivo. Pelo acolhimento, paciência e bondade. Por ter sido uma excelente orientadora!

Ao professor Hélio Vitoriano, pela coorientação e todos os anos de ensinamentos que foram muito além da microbiologia. Pela oportunidade e confiança.

À banca examinadora, pelo tempo dedicado, pelas colaborações, ensinamentos, correções e sugestões.

A Lívia Gurgel e o João Batista por serem exemplos de determinação, força, resiliência e dedicação. Por serem acolhimento e ajuda, sempre!

Ao professor Bruno Coelho, pelas colaborações, ensinamentos, parceria e experimentos.

Aos colegas do LABIMAN, Lisandra Juvêncio, Rosana Campos, Leticia Serpa, Daiana Barroso, Helaine Queiroz, Amanda Cavalcante, Daniel Sampaio e Vitória Cabral por todos os anos de trabalho compartilhado, pelas colaborações, estudo, TSAs, semeios, biofilmes, esterilizações, dúvidas, incertezas, mas também alegrias, risadas, confraternizações e comemorações.

Aos meus pais, Stenio e Lucia, pela vida, amor, cuidado, dedicação, educação, investimento, incentivo, suporte, carinho, e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu esposo Aristóteles Júnior, por dividir a vida comigo, por ser meu maior incentivador, por toda ajuda, amor e carinho.

Aos meus dois pequenos filhos, Davi e João, por me fazerem crescer e amadurecer, me ensinando o que é amor e darem sentido a vida e todo esforço.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu.”
(Eclesiastes, 3:1).

RESUMO

Estima-se que as doenças infecciosas sejam a principal causa de morte em todo o mundo, responsáveis por aproximadamente 13 milhões de óbitos a cada ano. *Staphylococcus aureus* e *Candida* spp estão dentre os principais patógenos humanos, relacionados a diversas infecções com diferentes níveis de gravidade. Os tratamentos disponíveis estão cada dia mais limitados. *S. aureus* possui diversos fatores de virulência, além de adquirir facilmente mecanismos de resistência. Enquanto *Candida* spp. afeta principalmente pacientes imunocomprometidos, tem um pequeno arsenal farmacológico de tratamento disponível e é afetado pelo fato da toxicidade. O desenvolvimento de novos antimicrobianos é uma urgência mundial e o redirecionamento de fármacos o mecanismo mais rápido, econômico e seguro. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana da hidralazina, *in vitro*, frente a cepas clínicas de *S. aureus* e biofilmes de *Candida* spp, e avaliar, *in silico*, o possível mecanismo de ação. Por microdiluição em caldo foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) da hidralazina, que foi em média 256 µg/ml frente à *S. aureus*. Na avaliação da tolerância a hidralazina mostrou-se bactericida e a associação com oxacilina e vancomicina foi sinérgica em 50 e 25% das cepas de *S. aureus*, respectivamente. A viabilidade celular dos biofilmes formados por *S. aureus* foi avaliada pela redução do Brometo de metiltiazolildifenil tetrazólio (MTT), onde a concentração inibitória mínima séssil (50%) variou de 256 a 2048 µg/ml. A análise da viabilidade celular por exclusão de iodeto de propídio mostrou que a hidralazina provocou aumento na porcentagem de as células não viáveis (58,78%), em relação ao controle. Nos ensaios do Cometa e do TUNEL foi possível detectar quebras e presença de fragmentação nas fitas do DNA de *S. aureus*. *In silico*, a hidralazina demonstrou maior afinidade e possibilidade de formação de complexos de menor energia com os alvos *S. aureus* girase complexado com DNA (-7.6 kcal/mol), *S. aureus* gyrase (-7.3 kcal/mol) e *S. aureus* TyrRS (-7.5 kcal/mol). Biofilmes de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram tratados com hidralazina, itraconazol e a associação desses fármacos. A redução da viabilidade celular foi avaliada pela metabolização do MTT. A hidralazina (10xCIM) reduziu significativamente ($p \leq 0.05$) a viabilidade dos biofilmes formados. A inibição da formação dos biofilmes foi mais efetiva e a CIM da hidralazina para cada cepa foi capaz de reduzir significativamente ($p \leq 0.05$) a viabilidade dos biofilmes. Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura é possível observar as células de *Candida albicans* danificadas pela hidralazina. Nos ensaios *in silico*, a hidralazina demonstra energia de ligação mais favorável com os alvos Exo-B-(1,3) -glucanase (-7,1 kcal/mol) e CYP51 (-7,2 kcal/mol). Portanto, conclui-se que a hidralazina tem potencial no redirecionamento para o

tratamento de infecções causadas por *S. aureus* e *Candida* spp., em associação com os fármacos atuais ou isoladamente, atuando em células planctônicas e também sobre biofilmes.

Palavras-chave: reaproveitamento de fármacos; biofilme; MRSA; DNA girase; antifúngico.

ABSTRACT

It is estimated that infectious diseases are the leading cause of death worldwide, responsible for approximately 13 million deaths each year. *Staphylococcus aureus* and *Candida* spp are among the main human pathogens, related to several infections with different levels of severity. Available treatments are increasingly limited. *S. aureus* has several virulence factors, in addition to easily acquiring resistance mechanisms. While *Candida* spp. mainly affects immunocompromised patients, has a small available pharmacological treatment arsenal and is affected by the toxicity fact. The new antimicrobials development is a global urgency and drugs repurposing is the fastest, most economical and safest mechanism. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of hydralazine, *in vitro*, against clinical strains of *S. aureus* and *Candida* spp biofilms, and to evaluate, *in silico*, the possible action mechanism. By microdilution in broth, the hydralazine minimum inhibitory concentration was determined, which was on average 256 µg/ml against *S. aureus*. In the tolerance assessment, hydralazine proved to be bactericidal and the association with oxacillin and vancomycin was synergistic in 50 and 25% of the strains, respectively. In evaluating the cell viability of biofilms formed by *S. aureus* by reducing Methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide (MTT), the sessile minimum inhibitory concentration (50%) ranged from 256 to 2048 µg/ml. Analysis of cell viability by propidium iodide exclusion showed that hydralazine increased non-viable cells (58.78%). In the Comet and TUNEL assays, it was possible to detect breaks and the fragmentation presence in the *S. aureus* DNA strands. *In silico*, hydralazine demonstrated greater affinity and the possibility of forming lower energy complexes with the targets *S. aureus* gyrase complex with DNA (-7.6 kcal/mol), *S. aureus* gyrase (-7.3 kcal/mol) and *S. aureus* TyrRS (-7.5 kcal/mol). Biofilms of *Candida albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* were treated with hydralazine, itraconazole and a combination of these drugs. Reduction in cell viability was assessed by MTT metabolization. Hydralazine (10xMIC) significantly ($p \leq 0.05$) reduced the biofilms formed viability. The biofilm formation inhibition was more effective and the MIC of hydralazine for each strain was able to significantly ($p \leq 0.05$) reduce biofilm viability. In scanning electron microscopy images, it is possible to see *Candida albicans* cells damaged by hydralazine. In *in silico* assays, hydralazine demonstrates more favorable binding energy with targets Exo-B-(1,3)-glucanase (-7.1 kcal/mol) and CYP51 (-7.2 kcal/mol). Therefore, it is concluded that hydralazine has potential to be redirected to the treatment of infections caused by *S. aureus* and *Candida* spp., in association with current drugs or alone, acting on planktonic cells and also on biofilms.

Keywords: drug repurposing; biofilm; MRSA; DNA gyrase; antifungal.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: PATOGÊNESE MICROBIANA: PROCESSO PELO QUAL OS MICROORGANISMOS CAUSAM DOENÇA.....	21
FIGURA 2: COMPONENTES CELULARES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA.....	22
FIGURA 3: S. AUREUS. A. COCOS GRAM POSITIVOS DISPOSTOS EM CACHOS DE UVA. B. B HEMÓLISE EM ÁGAR SANGUE.	27
FIGURA 4: BIOFILME DE S. AUREUS EM PARARAFUSO ORTOPÉDICO DE TITÂNIO.....	28
FIGURA 5: MORTALIDADE DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.	30
FIGURA 6: IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDA SPP. A: COLÔNIAS DE CANDIDA SP., LISAS, GRANDES, BRANCAS DE REVERSO INCOLOR. B: MICROSCOPIA DE CANDIDA ALBICANS, PSEUDOHIFAS, BLASTOCONÍDIOS E CLAMIDOCONÍDIOS.	32
FIGURA 7: COLÔNIAS DE CANDIDA AURIS NO ÁGAR CHROMAGAR CANDIDA.....	33
FIGURA 8: BIOFILME DE CANDIDA ALBICANS.....	34
FIGURA 9: A) ETAPAS PARA O DESENVOLVIMENTO NOVOS FÁRMACOS. B) ETAPAS QUE UMA MOLÉCULA É SUBMETIDA NO REAPROVEITAMENTO.....	41
FIGURA 10: CLORIDRATO DE HIDRALAZINA.	42
FIGURA 11: FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA.....	46
FIGURA 12: ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR POR EXCLUSÃO DE IODETO DE PROPÍDIO DE S. AUREUS APÓS 24 H DE INCUBAÇÃO COM HIDRALAZINA.....	66
FIGURA 13: ANÁLISE DO ENSAIO TUNEL DE S. AUREUS APÓS 24 H DE INCUBAÇÃO COM HIDRALAZINA.	67
FIGURA 14: ANÁLISE DE DANOS NO DNA DEMONSTRADOS PELO ENSAIO DO COMETA SOBRE S. AUREUS APÓS 24 H DE INCUBAÇÃO COM HIDRALAZINA.....	68
FIGURA 15: COMPLEXO DE INTERAÇÃO ENTRE HIDRALAZINA (EM AZUL) E OS LIGANTES DE S. AUREUS. A) S. AUREUS GYRASE COMPLEX WITH DNA (PDB:2XCT). B) S. AUREUS GYRASE (PDB: 5BS3). C) S. AUREUS TYRRS (PDB: 1JIJ).....	71
FIGURA 16: EFEITO DA HIDRALAZINA E ITRACONAZOL ISOLADOS E ASSOCIADOS SOBRE O BIOFILME DE CANDIDA SPP.	76
FIGURA 17: HIDRALAZINA, ITRACONAZOL E HIDRALAZINA + ITRACONAZOL NA INIBIÇÃO DO BIOFILME DE CANDIDA SPP.	77
FIGURA 18: IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BIOFILMES DE CANDIDA ALBICANS. (1) CONTROLE. (2) BIOFILME TRATADO COM HID 2560 µG/M ^L . (3) BIOFILME TRATADO COM HID 128 µG/M ^L . (4) BIOFILME TRATADO COM ITRA 10 µG/M ^L . (5) BIOFILME	

TRATADO COM ITRA 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (6) BIOFILME TRATADO COM HID 2560 $\mu\text{g/mL}$ E ITRA 10 $\mu\text{g/mL}$ (7). BIOFILME TRATADO COM HID 128 $\mu\text{g/mL}$ E ITRA 0,5 $\mu\text{g/mL}$. IMAGENS AMPLIADAS EM 5.000X (BAR: 20 μM)..... 79

FIGURA 19: IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BIOFILMES EM CRESCIMENTO DE CANDIDA ALBICANS. (1) CONTROLE COM AMPLIAÇÃO DE 3.000X (BARRA: 20 μM). (2) BIOFILME TRATADO COM HID 2560 $\mu\text{g/mL}$; (3) BIOFILME TRATADO COM HID 128 $\mu\text{g/mL}$; (4) BIOFILME TRATADO COM ITRA 10 $\mu\text{g/mL}$; (5) BIOFILME TRATADO COM ITRA 0,5 $\mu\text{g/mL}$; (6) BIOFILME TRATADO COM HID 2560 $\mu\text{g/mL}$ E ITRA 10 $\mu\text{g/mL}$; (7) BIOFILME TRATADO COM HID 128 $\mu\text{g/mL}$ E ITRA 0,5 $\mu\text{g/mL}$. IMAGENS AMPLIADAS EM 5.000X (BAR: 20 μM)..... 81

FIGURA 20: COMPLEXO DE INTERAÇÃO ENTRE A HIDRALAZINA E OS ALVOS: A) EXO-B-(1,3)-GLUCANASE; B) CYP51..... 84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CEPAS CLÍNICAS DE CANDIDA SPP. UTILIZADOS NO ESTUDO.	47
TABELA 2: CONCETRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA, CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA E NÍVEL DE TOLERÂNCIA DE HIDRALAZINA SOBRE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.	60
TABELA 3: PERFIL DE SENSIBILIDADE DAS CEPAS UTILIZADAS NO ESTUDO.....	62
TABELA 4: EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE HIDRALAZINA E OXACILINA SOBRE CEPAS DE S. AUREUS.	63
TABELA 5: EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE HIDRALAZINA E VANCOMICINA SOBRE MRSA E MSSA.	64
TABELA 6: RESULTADOS DA SENSIBILIDADE BACTERIANA DE BIOFILMES DE S. AUREUS.....	65
TABELA 7: ENERGIA DE AFINIDADE E RMSD DAS INTERAÇÕES ENTRE HIDRALAZINA E OS LIGANTES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.	70
TABELA 8: TIPOS DE INTERAÇÕES E AMINOÁCIDOS ENVOLVIDOS NOS COMPLEXOS FORMADOS POR HIDRALAZINA E LIGANTES DE S. AUREUS.	72
TABELA 9: ENERGIA DE AFINIDADE E RMSD DA HIDRALAZINA LIGADA AOS RECEPTORES DE CANDIDA ALBICANS.....	83
TABELA 10: AMINOÁCIDOS E TIPOS DE INTERAÇÕES ENTRE HIDRALAZINA E OS LIGANTES DE C. ALBICANS.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina triposfato
BHI	<i>Brain heart infusion broth</i>
CAMHB	Caldo Mueller Hinton cátion ajustado
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CYP	Citocromo P450
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	Ácido desoxirribonucleico metiltransferase
DO	Densidade óptica
FICI	<i>Fractional inhibitory concentration index</i>
FLU	Fluconazol
GryA	Girase A
GryB	Girase B
HID	Hidralazina
HYD	Hydralazine
HMDS	Hexametildisilazane
ITRA	Itraconazol
Ki	Constante de inibição
LABIMAN	Laboratório de Bioprospeção de Moléculas Antimicrobianas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOPS	ácido morfolinopropanosulfônico
MRSA	<i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>methicillin-susceptible Staphylococcus aureus</i>
MTT	Brometo de metiltiazolildifenil tetrazólio
OXA	Oxacilina
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>

PKi	Logarítimo negativo da constante de inibição
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
SCIM	Concentração Inibitória Mínima Séssil
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
VAN	Vancomicina
VRSA	<i>vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i>
VSSA	<i>vancomycin-sensible Staphylococcus aureus</i>
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Microbiota Normal Humana	18
2.2	Infecções e Fatores de risco	21
2.3	Gênero Staphylococcus	25
2.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.3.2	<i>Fatores de virulência</i>	27
2.3.3	<i>Epidemiologia e Infecções causadas por Staphylococcus aureus</i>	29
2.4	Gênero Candida	31
2.4.1	<i>Patogenia</i>	33
2.4.2	<i>Infecções e epidemiologia</i>	34
2.5	Antimicrobianos	36
2.5.1	<i>Antibióticos</i>	36
2.5.2	<i>S. aureus resistente a meticilina - MRSA</i>	37
2.5.3	<i>Antifúngicos</i>	38
2.6	Novas estratégias terapêuticas	40
2.7	Hidralazina	41
3	HIPÓTESES	44
4	OBJETIVOS	45
4.1	Objetivo Geral	45
4.2	Objetivos Específicos	45
5	MATERIAIS E MÉTODOS	46
5.1	Microorganismos	46
5.2	Fármacos	47
5.3	Ensaio com Staphylococcus aureus	48
5.3.1	<i>Avaliação da atividade antibacteriana da hidralazina</i>	48
5.3.1.1	<i>Determinação da CIM</i>	48
5.3.1.2	<i>Determinação da CBM</i>	49
5.3.1.3	<i>Teste de Tolerância</i>	49
5.3.1.4	<i>Avaliação do sinergismo</i>	49
5.3.1.5	<i>Avaliação da atividade da hidralazina sobre biofilmes de Staphylococcus aureus</i> .	50
5.3.1.6	<i>Análise de dados</i>	51

5.3.2	<i>Avaliação do mecanismo de ação</i>	51
5.3.2.1	<i>Avaliação de viabilidade celular</i>	51
5.3.2.2	<i>Análise de fragmentação do DNA</i>	51
5.3.2.3	<i>Ensaio do cometa</i>	52
5.3.2.4	<i>Análise estatística</i>	52
5.3.3	<i>Ensaios in silico da interação da hidralazina com alvos celulares de S. aureus.</i>	53
5.3.3.1	<i>Preparação dos ligantes</i>	53
5.3.3.2	<i>Simulação do docking molecular e obtenção dos dados</i>	53
5.3.3.3	<i>Análise de dados</i>	54
5.4	<i>Ensaios com Candida spp.</i>	54
5.4.1	<i>Avaliação da atividade da hidralazina sobre biofilmes de Candida spp.</i>	54
5.4.1.1	<i>Formação dos biofilmes de Candida spp. e quantificação da biomassa</i>	55
5.4.1.2	<i>Análise da atividade antimicrobiana da hidralazina sobre biofilmes formados de Candida spp.</i>	56
5.4.1.3	<i>Análise da capacidade da hidralazina em inibir a formação de biofilmes de Candida spp.</i>	56
5.4.1.4	<i>Análise dos dados</i>	57
5.4.2	<i>Análise morfológica do biofilme de C. albicans</i>	57
5.4.3	<i>Análise in silico da interação de hidralazina com alvos moleculares de Candida</i>	58
6	<i>RESULTADOS</i>	59
6.1	<i>Ensaios com Staphylococcus aureus</i>	59
6.1.1	<i>Avaliação da atividade antibacteriana da hidralazina sobre S. aureus.</i>	59
6.1.1.1	<i>Determinação de CIM, CBM e nível de tolerância de hidralazina sobre MRSA e MSSA.</i>	59
6.1.1.2	<i>Avaliação da atividade sinérgica de hidralazina sobre S. aureus</i>	60
6.1.1.3	<i>Efeito da hidralazina sobre biofilmes formados de MRSA e MSSA</i>	65
6.1.2	<i>Avaliação do possível mecanismo de morte celular</i>	66
6.1.2.1	<i>Viabilidade celular de S. aureus após o tratamento com hidralazina</i>	66
6.1.2.2	<i>Análise de fragmentação de DNA</i>	67
6.1.2.3	<i>Ensaio do Cometa</i>	68
6.1.3	<i>Interação da hidralazina com alvos moleculares de S. aureus</i>	69
6.2	<i>Ensaios com Candida spp.</i>	75
6.2.1	<i>Análise da atividade da hidralazina sobre biofilme de Candida</i>	75
6.2.1.1	<i>Biofilme formado de Candida spp.</i>	75

6.2.1.2	<i>Inibição da formação do biofilme por HID e ITRA sozinhos e combinados.....</i>	76
6.2.2	<i>Avaliação de biofilmes de Candida albicans por microscopia eletrônica de varredura.....</i>	78
6.2.3	<i>Análise da simulação do docking entre hidralazina e alvos moleculares de Candida sp.</i>	82
7	DISCUSSÃO	88
8	CONCLUSÃO.....	94
	REFERÊNCIAS	96
	APÊNDICE A – Parâmetros de simulação dos receptores de MRSA.....	108
	APÊNDICE B – Viabilidade celular (%) dos biofilmes de Candida spp. tratados com hidralazina e itraconazol isolados e em associação. * p < 0.05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.....	109
	APÊNDICE C – Viabilidade celular (%) dos biofilmes de Candida spp. tratados com hidralazina e itraconazol isolados e em associação. * p < 0.05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.....	110
	APÊNDICE D – Parâmetro de simulação de ligantes de Candida albicans	111
	ANEXO A – Artigo científico publicado na revista Future Microbiology.....	112
	ANEXO B – Artigo científico publicado na revista Future Microbiology.....	113

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um dos principais patógenos humanos, agente de infecções de pele, tecidos moles, bacteremia, endocardite e pneumonia, responsável por elevadas taxas de mortalidade (IKUTA *et al.*, 2022). Um levantamento de Kourtis e colaboradores (2020) mostrou que *S. aureus* foi responsável por aproximadamente 120 mil infecções de corrente sanguínea e cerca de 20 mil mortes nos EUA, em 2017.

Staphylococcus aureus são cocos Gram positivos, residentes da microbiota humana normal encontrados principalmente nas narinas e na pele. Cepas desta espécie podem expressar diversos fatores de virulência, como capsula, proteína A, hemolisinas, coagulase, hialuronidase, proteínase, toxinas esfoliativas, leucocidina de Panton Valentine e a toxina da síndrome do choque tóxico, podendo tornar-se extremamente patogênicas (TURNER *et al.*, 2020).

As leveduras do gênero *Candida*, fazem parte da microbiota humana e são fungos oportunistas causadores de infecções de corrente sanguínea, trato urinário, pele e mucosas que acometem principalmente pacientes imunocomprometidos (BOURASSA-BLANCHETTE *et al.*, 2023). As principais espécies de importância médica são *C. albicans*, *C. parasilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis* (MEYAHNWI; SIRAW; REINGOLD, 2022). Nas infecções de corrente sanguínea, *Candida* spp. são os fungos mais prevalentes, encontrados em infecções mono ou polimicrobianas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021; IKUTA *et al.*, 2022). Medeiros e colaboradores (2019) apontam taxas de mortalidade de até 61% em pacientes acometidos por candidemias.

Um importante fator nas infecções causadas por *S. aureus* e *Candida* spp. é a capacidade de formação de biofilmes. Essas estruturas amplamente encontradas em cateteres, válvulas cardíacas, sondas urinárias e próteses estão associadas a infecções crônicas, prolongadas, onde os tratamentos são mais difíceis ou ineficazes. Outra preocupação é o aumento das infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes à metilina de origem comunitária (BLOOMFIELD *et al.*, 2020). Além disso, estudos apontam o aumento de infecções de corrente sanguínea causadas por cepas sensíveis à metilina (RENGLI *et al.*, 2023). Em relação a *Candida* spp. há um aumento nas infecções causadas por cepas de *C. não albicans*, onde há um aumento de resistência ao fluconazol. Ademais, os tratamentos com antifúngicos são limitados pela toxicidade dos fármacos, possibilitadas pela semelhança entre as células fúngicas e humanas.

Tratamentos adequados dependem de uma ampla abordagem, relacionados ao diagnóstico, ao hospedeiro e as características dos patógenos. Sendo assim, os tratamentos

atuais estão cada dia mais limitados, e há uma necessidade urgente no desenvolvimento de novos antimicrobianos, capazes de superar a resistência aos diferentes mecanismos sem ser tóxico. Diante desse cenário, o redirecionamento de fármacos como estratégia para o desenvolvimento de novos antimicrobianos tem ganhado destaque. Reaproveitar uma molécula que já tem dados de farmacocinética, toxicidade conhecida, aprovação em agências sanitárias torna o processo mais rápido, econômico, seguro e aumenta a chance de sucesso (BOYD; TENG; FREI, 2021).

A hidralazina é um antihipertensivo da classe dos vasodilatadores aprovados para uso no Brasil desde a década de 1950. Atualmente, esse fármaco tem sido redirecionado e estudado sobre seu potencial antitumoral e seus dados são animadores.

Nesse contexto, os dados na literatura sobre o potencial antimicrobiano da hidralazina são escassos, então esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade da hidralazina frente a cepas *S. aureus* e biofilmes de *Candida* spp.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota Normal Humana

A microbiota normal é definida como a população de microorganismos vivos que habitam a pele e as mucosas dos indivíduos, são cerca de 100 trilhões de células ($\sim 10^{12}$), superando a quantidade de células humanas. A microbiota vive uma relação simbiótica com o homem, desempenhando diversas funções no organismo humano, como defesa contra patógenos, auxílio na digestão, produção de vitaminas, degradação de toxinas e maturação do sistema imunológico (BROOKS *et al.*, 2014).

O corpo humano pode ser dividido em sítios anatômicos que podem ser colonizados por microorganismos ou não. Pele, nasofaringe, trato intestinal, reto, genitália e boca são sítios colonizados, enquanto cérebro, coração, útero, rins e sangue são locais que em condições de normalidade não possuem microorganismos, sendo, portanto, estéreis (BROOKS *et al.*, 2014). O crescimento de microorganismos e colonização dos diferentes sítios anatômicos depende das condições nutricionais, já que os indivíduos fornecem substratos, e ambientais, como nível de oxigênio, umidade, pH, temperatura e pressão osmótica. Cada região tem características químicas e físicas diferentes, se tornando um ambiente naturalmente seletivo (HOU *et al.*, 2022; MADIGAN, 2016).

A microbiota normal pode ser classificada em residente ou transitória. A microbiota residente é aquela que não causa doença, e é encontrada em determinado sítio anatômico com regularidade, sendo capaz de se restabelecer e exercer suas funções após a exposição à diferentes estresses e perturbações (LLOYD-PRICE; ABU-ALI; HUTTENHOWER, 2016). Já a microbiota transitória permanece apenas por um período em um local, podendo ser patogênica ou não, dependendo do reestabelecimento da microbiota residente (BROOKS *et al.*, 2014).

Os estudos acerca dos microbiomas, ou seja, a caracterização genômica dos microorganismos do ambiente, mostram que existe uma ampla diversidade na ecologia dos indivíduos saudáveis, e isso não caracteriza disbiose. O estabelecimento da microbiota normal humana é influenciado pela placenta, tipo de parto pelo qual o indivíduo nasce e o leite materno. Além disso, essas populações são resilientes, se adaptam à mudança de idade, diferentes padrões dietéticos e uso de medicamentos (LLOYD-PRICE; ABU-ALI; HUTTENHOWER, 2016) Tendo menor influência pelas variações fenotípicas humanas (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

A microbiota normal é constituída por diferentes gêneros de Bacteria, Archaea, fungos e vírus, que podem interagir entre si colaborando na manutenção do ecossistema saudável e do equilíbrio imunológico (LLOYD-PRICE; ABU-ALI; HUTTENHOWER, 2016). A alteração dessa diversidade, seja aumento ou redução, está associada a doenças. Por exemplo, a redução da diversidade no intestino tem sido associada a doença inflamatória intestinal, diabetes tipo 1 e 2, e na pele à dermatite atópica e psoríase. Enquanto o aumento na diversidade na vagina está associado a vaginose bacteriana (LLOYD-PRICE; ABU-ALI; HUTTENHOWER, 2016).

Dois grandes estudos têm sido os principais responsáveis pelos dados sobre os microbiomas normais humanos nas populações ao redor do mundo, são eles: O Projeto de Microbioma Humano (HMP), que é um grande estudo americano e teve início em 2007, visando caracterizar os microbiomas humanos saudáveis através do metagenoma, em diversos sítios anatômicos. Outro grande estudo é o METAgenômica do Trato Intestinal Humano (MetaHIT), um projeto europeu, que visa caracterizar e catalogar o microbioma intestinal correlacionando a doenças.

No intestino está a maior e mais diversa comunidade microbiana do corpo humano. Enquanto a caracterização da microbiota se baseava no cultivo de microorganismos, acreditava-se que a *Escherichia coli* era dominante, agora sabe-se representa menos de 1% dessa população (BROOKS *et al.*, 2014). A comunidade microbiana intestinal é composta principalmente pelos integrantes dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia e Fusobacteria (HOU *et al.*, 2022; MADIGAN, 2016).

Estômago, duodeno, jejuno, íleo e colon têm diferentes características, como pH e aporte de oxigênio, o que seleciona e distribui os gêneros ao longo do trato gastrointestinal. O pH 2 no estômago permite a colonização de *Helicobacter pylori*, enquanto o baixo teor de oxigênio no colo favorece o crescimento dos anaeróbios, como *bacteroides* (MADIGAN, 2016).

Por volta dos 3 anos de idade, os indivíduos já têm a microbiota intestinal estabelecida, a maioria tem dominância de Firmicutes, que pode alternar com Bacteroidetes (HOU *et al.*, 2022). As principais famílias encontradas no intestino são Bacteroidaceae, Clostridiaceae, Prevotellaceae, Eubacteriaceae, Ruminococcaceae, Bifidobacteriaceae, Lactobacillaceae, Enterobacteriaceae e Saccharomycetaceae (HUTTENHOWER *et al.*, 2012; LLOYD-PRICE; ABU-ALI; HUTTENHOWER, 2016). As leveduras *Candida*, *Saccharomyces* e *Malassezia*, a Archaea *Methanobrevibacter smithii* e o protozoário *Blastocystis* também são descritos como componentes normais da microbiota intestinal humana (HOU *et al.*, 2022; LLOYD-PRICE; ABU-ALI; HUTTENHOWER, 2016). No intestino saudável também há um

viroma, composto principalmente por bacteriófagos que são responsáveis pela transferência de genes entre as bactérias (LLOYD-PRICE; ABU-ALI; HUTTENHOWER, 2016).

A microbiota intestinal desempenha funções essenciais para o homem, como a produção de enzimas que atuam na metabolização de polissacarídeos e algumas proteínas, a proteção contra patógenos através da produção de bacteriocinas e colonização de mucosas, a estimulação da resposta imunológica e a produção de vitaminas K, tiamina (B1) e riboflavina (B2) (HOU *et al.*, 2022).

A pele é colonizada por membros dos filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Cianobacteria, Firmicutes e Proteobacteria. Por ser o maior órgão humano possui uma grande quantidade de microorganismos, que sofrem variação e se adaptam ao clima, as mudanças de idade e as diferentes propriedades da pele (seca, úmida e presença de sebo). Os principais componentes da microbiota são *Propionibacterium*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* e *Corynebacterium* (HOU *et al.*, 2022; HUTTENHOWER *et al.*, 2012) Espécies da levedura *Malassezia* também são encontradas na pele saudável (MADIGAN, 2016).

O gênero *Streptococcus* é o principal colonizador da microbiota oral, apresentando grande variação de espécies e cepas da mesma espécie, já que semelhantemente ao intestino, a microbiota oral tem grande diversidade de microorganismos. Os integrantes dos filos Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Fusobacteria compõe esse habitat, especialmente os gêneros *Haemophilus*, *Prevotella*, *Rothia*, *Neisseria*, *Candida*, *Veillonella* e *Actinomyces* (HOU *et al.*, 2022; HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

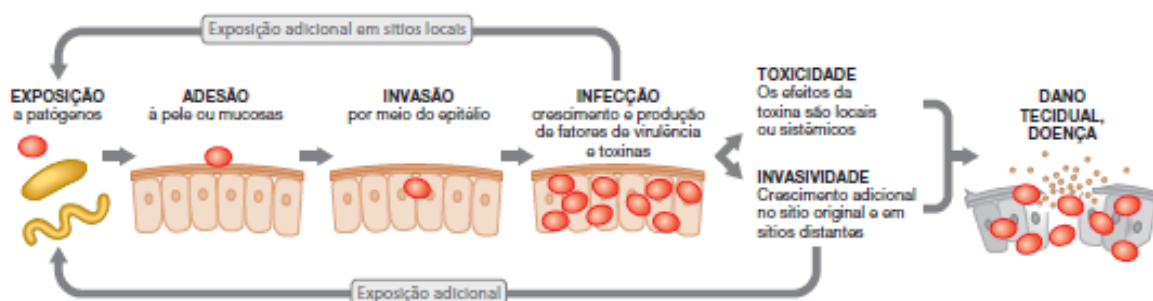
A microbiota da vagina apresenta uma comunidade mais simples, com menor diversidade de microorganismos, mas têm grande diversidade nas espécies de *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*), e é influenciada por fatores como pH, raça, etnia e gravidez (HUTTENHOWER *et al.*, 2012). Os *Lactobacillus* são responsáveis pela produção de ácido láctico e bacteriocinas, que fornecem proteção contra infecções (HOU *et al.*, 2022). *Gardnerella*, *Mycoplasma/Ureaplasma* também podem colonizar a vagina sem causar infecção (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

O trato respiratório é colonizado por microorganismos que pertencem aos filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacterias. *Staphylococcus epidermidis* é principal colonizador nasal (HUTTENHOWER *et al.*, 2012). Os pulmões não são mais considerados estéreis, sabe-se que eles possuem uma pequena microbiota, e isso vai depender da capacidade de imigração microbiana (HOU *et al.*, 2022).

2.2 Infecções e Fatores de risco

O desenvolvimento de uma infecção (Figura 1) depende de fatores relacionados ao ambiente, ao hospedeiro e a patogenicidade do microorganismo. Uma infecção se estabelece a partir da entrada do microorganismo no hospedeiro ou quando um microorganismo que compõe a microbiota normal é um patógeno oportunista e encontra condições ambientais ideais para aderir, invadir e se multiplicar. A infecção pode ser local ou disseminada produzindo uma resposta que pode ser inflamatória causando danos teciduais e até mesmo falência de órgãos.

Figura 1: Patogênese microbiana: processo pelo qual os microorganismos causam doença.



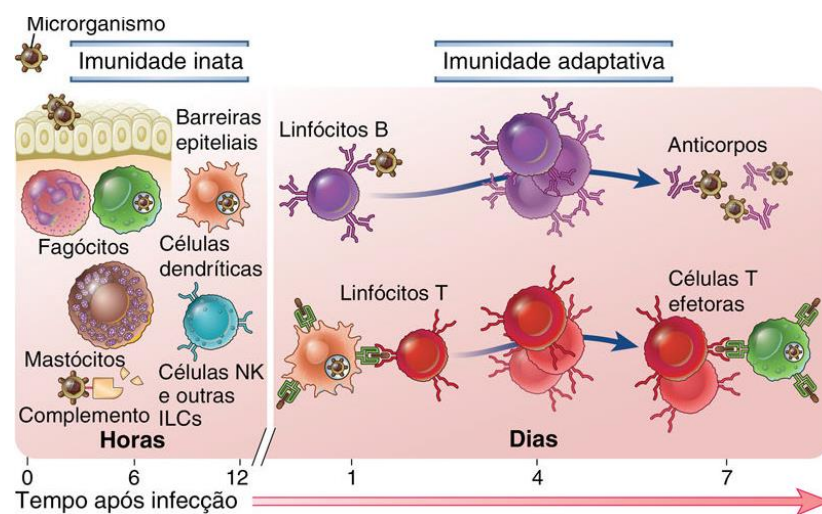
Fonte: MADIGAN, 2016.

Os indivíduos contam com barreiras naturais contra infecções. A pele íntegra é a primeira importante barreira física que pode ser recoberta por ácidos graxos e ácido láctico impedindo a adesão e colonização de patógenos. Outra barreira importante são as membranas mucosas que contam com um arsenal diverso de fatores protetores. Nos olhos há produção contínua de lágrimas que tem a lisozima, enzima com ação antimicrobiana. A lisozima também está presente na saliva, além de lactoferrina, peroxidases, cistatina, histatina, mucinas e glicoproteínas que combatem bactérias, fungos e vírus na mucosa oral. A mucosa da nasofaringe a traqueia são recobertas por células ciliadas e muco atuando como uma barreira na entrada de patógenos por via aérea, que aderem ao muco e são impelidos para fora pelo movimento dos cílios. No estômago a pepsina e o pH ácido tornam o ambiente inóspito para a maioria dos microorganismos. A proteção da mucosa intestinal é garantida pela integridade do epitélio, presença de muco, enzimas pancreáticas, bile e movimento peristáltico (GERMANO *et al.*, 2018; MADIGAN, 2016)

Além das barreiras físicas e químicas, o sistema imune é responsável por produzir uma resposta contra a entrada de microorganismos para inibir as infecções. De forma resumida, a imunidade é dividida em inata e adaptativa (Figura 2). Os componentes celulares da

imunidade inata são responsáveis por respostas rápidas e inespecíficas, culminando em fagocitose e inflamação. A imunidade adaptativa é estimulada pela imunidade inata e desencadeada pela ativação de linfócitos, levando a respostas específicas. Os linfócitos B geram memória através da produção de anticorpos e colaboram na fagocitose. Através de citocinas os linfócitos T ativam macrófagos, produzem inflamação e matam células infectadas, além de estimular a ativação de mais linfócitos T e B ou suprimi-los (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2023).

Figura 2: Componentes celulares da imunidade inata e adaptativa.



Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2023.

A microbiota normal não causa infecção e atua como uma barreira de resistência, estabelece uma competição por nutrientes e receptores nas células do hospedeiro, além de produzir bacteriocinas que inibem o crescimento de microorganismo externos. Entretanto, a destruição da microbiota normal, alterações das características do microambiente e nutricionais podem favorecer o crescimento de espécies oportunistas (BROOKS *et al.*, 2014; MADIGAN, 2016).

O pH é um fator extremamente seletivo, na vagina e na porção distal da uretra a microbiota é mantida pelo pH ácido, quando o pH aumenta permite que patógenos oportunistas como *Candida*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* provoquem infecções no trato urogenital (MADIGAN, 2016). Outra infecção provocada pela alteração do microambiente é a cárie. A sacarose proveniente da alimentação é metabolizada por espécies da microbiota oral produzindo ácidos orgânicos, o que resulta na redução do pH e desmineralização do esmalte dental, dando início a doença. A sacarose também nutre o biofilme da placa dental e é substrato de

poliglucanos que colaboram da adesão de *Streptococcus mutans*, principal responsável pela cárie (BROOKS *et al.*, 2014).

O envelhecimento do sistema imunológico é conhecido como imunossenescência, processo que torna os idosos mais susceptíveis a infecções. A senescência celular é multifatorial e afeta vários tecidos e sistemas, o aumento de fatores pró inflamatórios leva o sistema imunológico ao declínio de suas funções, reduzindo a capacidade de resposta à patógenos. Nos idosos a imunossenescência também aumenta a incidência de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, somado a isso têm-se doenças crônicas, diabetes mellitus e tabagismo que tornam esses indivíduos mais vulneráveis (WANG *et al.*, 2022).

Além disso, alguns patógenos podem induzir uma resposta inflamatória persistente e senescência celular, como *Pseudomonas aeruginosa*, que pode reduzir a capacidade fagocítica de macrófagos, induzindo a senescência dessas células (REYES *et al.*, 2023). Alonso *et al.*, (2021) descreveu os idosos (> 60 anos) como sendo os principais acometidos por pneumonia adquirida na comunidade, aproximadamente 71% dos casos investigados, e os principais agentes bacterianos foram *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Stenotrophomonas maltophilia*.

Outro grupo que apresenta maior susceptibilidade a infecções são os pacientes imunocomprometidos, formado pelo imunodeprimidos e imunossuprimidos. A deficiência na resposta imune inata aumenta o risco para infecções bacterianas invasivas e fúngicas disseminadas, enquanto a deficiência na resposta adaptativa facilita o acometimento de infecções causadas por vírus, *Mycobacterium* spp. e *Cryptococcus* spp. (MCCREERY; FLORESCU; KALIL, 2020; TORRES; PICKKERS; POLL, 2022). Indivíduos portadores de doenças autoimunes, como Lúpus e artrite reumatóide, indivíduos que vivem com HIV/AIDS, portadores de doença renal crônica em hemodiálise, transplantados que fazem uso de imunossupressores e pacientes com câncer submetidos a quimioterapia ou aqueles submetidos a procedimentos médicos invasivos são frequentemente acometidos por infecções de maior gravidade causadas por bactérias, vírus, fungos ou parasitas.

Pneumonia grave é a principal infecção que acomete os pacientes imunocomprometidos. *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus* são agentes bacterianos comumente associados e a multirresistência está presente na maioria dos casos. *Pneumocystis jirovecii*, *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus* spp., *Mucorales* spp., *Fusarium* spp, são os agentes responsáveis por infecções fúngicas invasivas pulmonares (AZOULAY *et al.*, 2020).

As infecções de pele e tecidos moles são potencialmente fatais em pacientes com HIV. Além da deficiência na resposta imune, esses indivíduos têm maior predisposição a infecções de pele causadas por microorganismos comensais da pele e ambientais, graças ao maior número de procedimentos médicos cutâneos que provocam ruptura do tegumento da pele. *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. causam à maioria dessas infecções. Outros patógenos são menos incidentes, mas responsáveis por infecções de alta gravidade, como *Pseudomonas aeruginosa* associada a altas taxas de mortalidade, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Nocardia* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e os fungos *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Cryptococcus* spp. (SHAH; SHELBURNE, 2021).

A sepse é uma disfunção orgânica causada por uma resposta imune desregulada à infecção, sendo uma das principais causas de morte em pacientes imunocomprometidos, pelo alto risco de choque séptico. Uma infecção desencadeia uma resposta que pode ser hiperinflamatória associada a uma resposta anti-inflamatória. Esse perfil é caracterizado pela redução de células T e B, que podem estar disfuncionais ou serem reduzidas pelo aumento de apoptose. Também ocorre a reprogramação de monócitos e macrófagos, redução da resposta inflamatória e fagocitose. A manutenção desse perfil sustenta a imunossupressão, favorecendo infecções secundárias e aumentando a mortalidade desses pacientes (MCCREERY; FLORESCU; KALIL, 2020; TORRES; PICKKERS; POLL, 2022).

Os fatores ambientais também estão relacionados ao desenvolvimento de infecções. Hospitalização, internações prolongadas, cirurgias de grande porte, procedimentos invasivos repetidos, ventilação mecânica, permanência de Unidades de Terapia Intensiva (UTI) aumentam a predisposição a infecções nasocomiais, que são aquelas relacionadas a cuidados de saúde. *Acinetobacter baumannii* é um importante patógeno associado a infecções nasocomiais adquiridas em UTIs, responsável por altas taxas de mortalidade (BORAL *et al.*, 2019). *Stenotrophomonas maltophilia* também está associado a UTIs, especialmente a ventilação mecânica, causando pneumonia com 75% de taxa de mortalidade (HAFIZ *et al.*, 2022). A utilização de dispositivos médicos, como sondas uriárias, facilitam a passagem de microorganismo pela uretra alcançando a bexiga. Acesso vascular prolongado utilizado em nutrição parenteral total, hemodiálise, cateter vascular permite a entrada de patógenos e disseminação hematogênica (MCCREERY; FLORESCU; KALIL, 2020).

O uso de antimicrobianos é um fator de risco extremamente importante para o desenvolvimento de infecções, por dois mecanismos: destruição da microbiota normal, gerando um desequilíbrio que facilita o crescimento de espécies oportunistas (HOU *et al.*, 2022) e a seleção de espécies resistentes.

Alguns patógenos são pontencialmente patogênicos e causam infecção independente de fatores relacionados ao hospedeiro ou ambientais. A virulência da cepa e a resposta imune vão mediar o grau de acometimento do paciente. Por exemplo, *Clostridium tetani* quando inoculado na pele, *Salmonella* e *Shigella* no intestino, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o fungo *Paracoccidioides* spp., a *Borrelia burgdorferi*, causadora da doença de Lyme, *Yersinia pestis* agente da peste bubônica e o *Mycobacterium tuberculosis* (BROOKS *et al.*, 2014; MADIGAN, 2016).

2.3 Gênero *Staphylococcus*

Staphylococcus é um gênero que pertence a Família *Staphylococcaceae*, Ordem *Bacillales*, Classe *Bacilli*, Filo *Firmicutes*, Domínio Bactéria (LUDWIG; SCHLEIFER; WHITMAN, 2009). Várias espécies compõem este gênero, algumas fazem parte da microbiota humana normal e podem ser patogênicos oportunistas como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. massiliensis*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri*, *S. xylosus* e *S. lugdunensis*. Além dessas, outras espécies foram isoladas de amostras biológicas sendo agentes de infecções associados ao homem, são; *S. pasteurii*, *S. petrasii*, *S. pettenkoferi*, *S. pseudolugdunensis* e *S. schleiferi* (PROCOP *et al.*, 2018).

S. agnetis, *S. arlettae*, *S. chromogenes*, *S. delphini*, *S. devriesei*, *S. equorum*, *S. felis*, *S. gallinarum*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. klooseii*, *S. lentus*, *S. lutrae*, *S. microti*, *S. muscae*, *S. nepalensis*, *S. pseudintermedius*, *S. rostri*, *S. sciuri*, *S. simeae*, *S. stepanovicii* e *S. vitulinus* são espécies que tem importância veterinária, podem colonizar e causar infecções em bovinos, equinos, aves, suínos, caprinos, cães, gatos, ratos, golfinhos e lontras marinhas (PROCOP *et al.*, 2018).

Staphylococcus também têm importância industrial, *S. carnosus* é utilizado no processamento de carnes e *S. equorum* subs *linens* utilizado na maturação de queijos (PROCOP *et al.*, 2018).

Este trabalho será direcionado à *S. aureus*, a espécie com maior importância clínica para o homem.

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

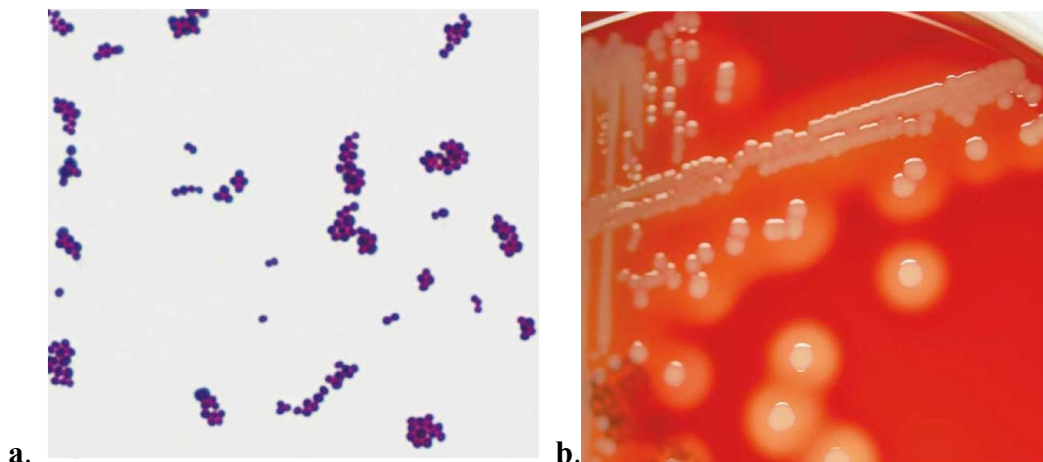
No laboratório de microbiologia clínica a identificação não automatizada de bactérias e leveduras se baseia nas características morfológicas das células, na coloração, características de crescimento e das colônias nos meios seletivos e diferenciais, além dos testes bioquímicos e enzimáticos.

As células de *Staphylococcus aureus* têm formato de cocos, com diâmetro que varia de 0,5 a 1,5 μm , dispostos em pequenos grupos de células ou em formato de cachos de uvas. Na colocação de Gram são cocos gram positivos (Figura 3.a). São imóveis e não esporularadas. Esta bactéria é anaeróbia facultativa, mesófila, com temperatura ideal de crescimento à 35 °C, e tolera altas concentrações de sal (7,5% de NaCl). Em meios de cultura não seletivos *S. aureus* cresce bem em até 24 horas, apresentando colônias de forma circular, elevação convexas e borda uniforme, brilhosas e com pigmento amarelado que pode levar até 72 h para se desenvolver (PROCOP *et al.*, 2018).

Em ágar sangue de carneiro (5%) as colônias de *S. aureus* são grandes, circulares, brancas ou amareladas envoltas por um halo transparente característico do padrão β -hemolítico (Figura 3.b). Esse meio não é seletivo e permite o crescimento de outros gêneros gram +, através do padrão de hemólise é possível diferenciar de *Enterococcus* (não hemolítico) e *Streptococcus pneumoniae* (α hemolítico). O ágar Sal manitol tem alta concentração de NaCl, por isso é seletivo permitindo o crescimento de *Streptococcus* e *S. aureus*, que cresce apresentando colônias grandes, circulares e amarelas. A fermentação de manitol distingue estes gêneros, já que somente *S. aureus* é capaz de fazê-lo, tornando o meio amarelado. Em ágar MacConkey *S. aureus* não deve crescer, pois esse meio é seletivo para bactérias gram negativas.

No teste da Catalase *Staphylococcus* produz bolhas, proveniente da presença da enzima catalase que converte peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, diferenciando este gênero de *Streptococcus*, que não consegue realizar essa reação. Após o teste da catalase, pode-se realizar o teste da Coagulase, que permite diferenciar *S. aureus* das demais espécies. Neste ensaio *S. aureus* coagula o plasma através da produção da enzima coagulase que converte fibrinogênio em fibrina (BROOKS *et al.*, 2014).

Figura 3: *S. aureus*. **a.** Cocos gram positivos dispostos em cachos de uva. **b.** β hemólise em ágar sangue.



Fonte: Brooks *et al.*, 2014.

2.3.2 Fatores de virulência

A patogenicidade de *S. aureus* é sustentada por diversos fatores de virulência que garantem a adesão, invasão dos tecidos e a evasão do sistema imune.

A adesão de *S. aureus* as células do hospedeiro é medeada por componentes da superfície microbiana que reconhecem as moléculas de adesão da matriz (MSCRAMM), uma família de mais de 20 adesinas, que são pequenas proteínas ancoradas ao peptidoglicano da parede celular e aderem a fibronectina, fibrinogênio, elastina e outros lipídios celulares (PROCOP *et al.*, 2018). Outro mecanismo de entrada a célula do hospedeiro é através da produção de α -toxina que ativa metaloproteinases para promover a quebra de moléculas de E-caderinas levando a ruptura de células.

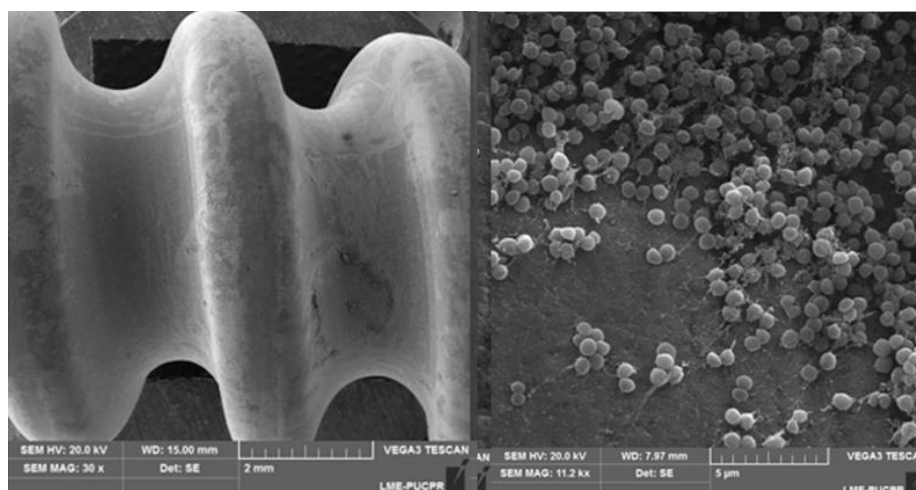
Na corrente sanguínea, *S. aureus* utiliza diversos mecanismos para se evadir do sistema imune. As hemolisinas α , β , γ , δ são toxinas responsáveis pela formação de poros e lise de monócitos, macrófagos, linfócitos e hemácias no hospedeiro. A inibição da ativação e quimiotaxia de neutrófilos ocorre através da eliminação de lipoproteínas por lipases, que atuam como padrão molecular associado a patógenos (PAMPs) e das proteínas superantigênicas (SSL5) e SelX que se ligam a glicoproteínas P-selectina ligante 1 (PSGL-1) em leucócitos, ancorando neutrófilos a células endoteliais. Além disso, proteínas de superfície da célula bacteriana inibem a ancoragem de imunoglobulinas ou camuflam o reconhecimento se ligando a regiões inespecíficas de IgG, como a proteína SSL 10, e a proteína A (SpA), que além de inibir a fagocitose, atua como superantígeno de células B. *S. aureus* também inibe o sistema complemento, através da produção do inibidor de complemento estafilocócico (SCIN), da proteína de ligação ao fibrinogênio (Efb), adesina de colágeno, SdrE, proteína de adesão

extracelular, SSL7 e as proteases serina, cisteína, metaloproteinase e estafopaina (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

S. aureus consegue inibir a fagocitose mesmo quando já está no interior dos neutrófilos. Enquanto os neutrófilos produzem mieloperoxidase, espécies reativas de oxigênio (superóxido e peróxido de hidrogênio), ácido hipocloro, defensinas e lisozima, *S. aureus* dispõe de moléculas antioxidantes, como estafiloxantina, superóxido desmutase, catalase, alquil hidroperóxido redutase C e lactato desidrogenase para neutralizar e eliminar essa ameaça. Outro mecanismo de evasão do sistema imune é a formação de coágulos. *S. aureus* forma um complexo de estafilotrombina, formado pela coagulase, fator de Von Willebrand e protrombina, promovendo a quebra de fibrinogênio em fibrina. *S. aureus* se liga aos coágulos de fibrina através do fator de agregação A (ClfA), formando agregados celulares que inibem a fagocitose e a ativação do sistema complemento (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

A formação de biofilmes é um dos principais mecanismos para manutenção da infecção, escape da fagocitose e dos antimicrobianos, além de ser uma condição ambiental favorável para as células. A adesão de *S. aureus* e formação de biofilmes pode ocorrer nos tecidos do hospedeiro e em dispositivos médicos (Figura 4), estando correlacionados a infecções crônicas de difícil tratamento. As células aderem a uma superfície, formam microcolônias e produzem matriz exopolimérica extracelular. O aumento da densidade celular ativa o sistema quorum sensing, que é o sistema de comunicação entre as células agregadas. A partir do biofilme maduro ocorre o destacamento de células que vão formar biofilmes em outros locais (TUON *et al.*, 2023).

Figura 4: Biofilme de *S. aureus* em pararafuso ortopédico de titânio.



Fonte: Tuon *et al.*, 2023.

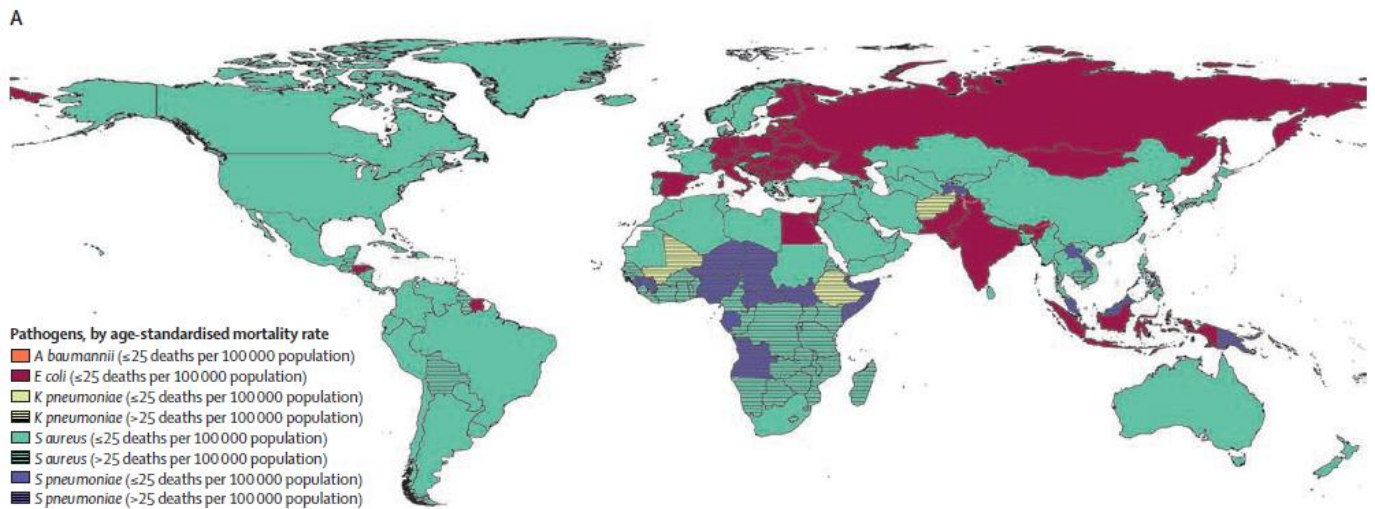
S. aureus também utiliza enzimas para facilitar a sua disseminação pelos tecidos, como a fibrinolisinase é utilizada para quebrar os coágulos de fibrina, a hialuronidase que degrada mucopolissacarídeos ácidos nos tecidos e lipases para destruir tecidos cutâneos e subcutâneos (PROCOP *et al.*, 2018).

As toxinas esfoliativas ETA, ETB e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), são responsáveis por infecções mais graves causadas por *S. aureus*. ETA e ETB atuam como serina protease resultando no rompimento do epitélio causando síndromes esfoliativas. A TSST-1 é uma toxina superantigênica que induz uma resposta imunológica exacerbada responsável pela febre e erupção na síndrome do choque tóxico. A leucocidina de Paton-Valentine (PVL) induz resposta pró-inflamatória e apoptose de neutrófilos, estando relacionada a necrose tecidual (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021; PROCOP *et al.*, 2018).

2.3.3 Epidemiologia e Infecções causadas por Staphylococcus aureus

Um grande estudo “*Global Burden of Diseases, injuries and risk Factors Study*” (GBD) avaliou as mortes associadas a bactérias e suas manifestações clínicas em todo o mundo no ano de 2019. De todas as mortes, 13,6 % foram causadas por 33 bactérias, sendo *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* os gêneros responsáveis por mais da metade (54,9 %) das infecções e mortes. Dentre estes, *S. aureus* foi o principal responsável por mortes relacionadas a infecções, em pessoas maiores de 15 anos, em todo o mundo. Estão atribuídas a este patógeno mais de 1 milhão de mortes em 137 países (Figura 5) por infecções respiratórias, de corrente sanguínea, intra-abdominal e peritoneal, de pele e subcutânea, de trato urinário, cardíaca e de ossos (IKUTA *et al.*, 2022).

Figura 5: Mortalidade de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: Adaptado de Ikuta *et al.*, 2022.

Mezimir; Olayemi; Dessie (2023), descreveram *S. aureus* como principal agente de infecções de sítio cirúrgico após cesariana em mulheres na Etiópia. *S. aureus* esteve presente em 21,2% das culturas, associados a consultas de pré-natal atrasadas, ruptura de membranas, muitos exames vaginais e hospitais públicos como principais fatores de risco. Essas infecções aumentam tempo de hospitalização, despesas médicas e mortalidade materna.

Endocardite é a inflamação do endocárdio que pode acometer importantes válvulas cardíacas. É uma doença grave e está associada a elevadas taxas de mortalidade. Shahini *et al.*, (2023) relatou *S. aureus* como o principal agente de endocardite infecciosa de 2012 a 2020 em Mashhad, Irã. Acometido principalmente pacientes com prótese valvar e dispositivos intracardíacos, a taxa de mortalidade foi de 33%. Lemos *et al.*, (2021) descreveu endocardite infecciosa em idosos, no Brasil, adquirida na comunidade, nosocomial e em cuidados relacionados à saúde. *S. aureus* foi o terceiro agente de endocardite, causador de 12% dos casos, depois de *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus coagulase negativo*. Os autores relatam que 83,3% das cepas de *S. aureus* eram resistentes a meticilina e a taxa de mortalidade foi de 39,1%. Um estudo retrospectivo realizado em um hospital de atendimento terciário em Nova Iorque, EUA, coletou dados de 2010 a 2020 e relatou *S. aureus* sendo o principal agente de endocardite infecciosa (45,1%). A taxa de mortalidade foi 18,1% e a resistência (MRSA) associada ao óbito hospitalar (LIAQAT *et al.*, 2022).

A fascíte necrosante é uma infecção aguda grave que causa necrose do tecido subcutâneo, exigindo diagnóstico rápido, intervenção cirúrgica e antibioticoterapia para

possibilitar um desfecho clínico positivo. Tsai *et al.*, (2021) identificou *S. aureus* como segundo agente causador de fasciíte necrosante (16,8%) em pacientes na China. A taxa de mortalidade desse patógeno foi de 6,5%, estando envolvidos MRSA e MSSA. Um estudo retrospectivo realizado por Vella *et al.*, (2021) relatou dados de infecções de pele e tecidos moles coletados em 3 hospitais nos EUA. Ao todo foram analisadas 14.061 infecções, onde *S. aureus* foi isolado em 959 (6,8%) dos casos. Foi associado a este patógeno a recorrência desse tipo de infecção e algumas comorbidades, como diabetes complicada, HIV/Aids e neoplasias.

2.4 Gênero *Candida*

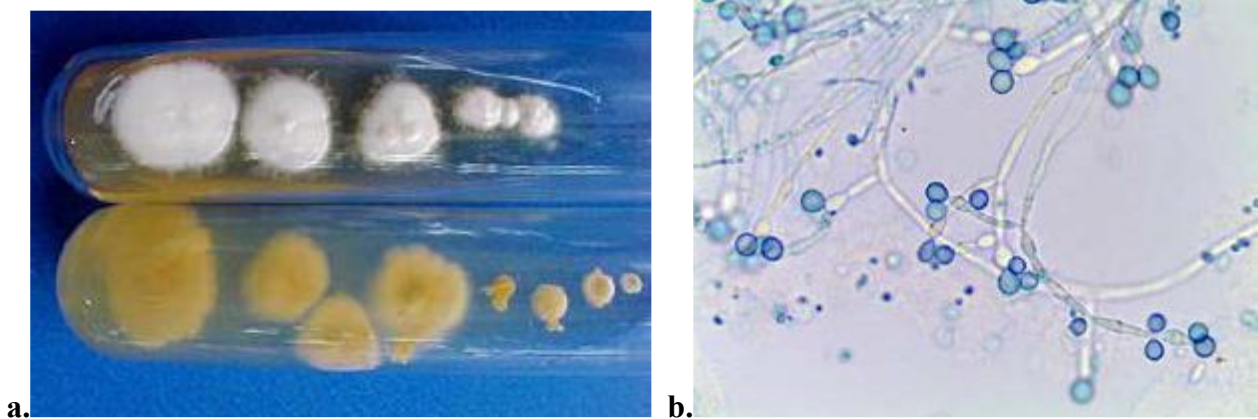
As leveduras do gênero *Candida* pertencem a Família *Debaryomycetaceae*, Ordem *Saccharomycetales*, Classe *Saccharomycetes*, Filo *Ascomycota*, Reino *Fungi*, Domínio *Eukaryota*. Mais de 200 espécies compõem este gênero, a maioria encontra-se no ambiente, especialmente no solo, sendo considerado sapróbio. Algumas espécies são encontradas em primatas, caprinos, equinos, aves, golfinhos e tartarugas marinhas. Uma pequena minoria pode colonizar o homem na pele, cavidade oral, nasofaringe, intestino grosso, porção final da uretra e genitália sem causar danos ou doenças (LIMA *et al.*, 2022; SIDRIM, 2004). As espécies de importância médica são as responsáveis por infecções oportunistas, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kfy*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* e mais recentemente a *C. auris* (PAPPAS *et al.*, 2016).

Um bom desfecho para os pacientes com infecções fúngicas depende do isolamento e identificação dessas espécies para o direcionamento do tratamento correto. A partir amostras biológicas, o isolamento primário de *Candida* sp. pode ser realizado em meios comuns, como *Brain Heart Infusion* (BHI), ágar sangue de carneiro 5%, ágar cromogênico e no ágar Sabouraud, seletivo para fungos. As leveduras do gênero *Candida* apresentam colônias glabras, de textura cremosas, de cor branca ou bege, superfície lisa, podendo apresentar borda irregular (Figura 6.a). O tempo ideal de crescimento varia de 24 a 48 h, em temperatura entre 25 e 37 °C (SIDRIM, 2004).

A análise microscópica pode ser feita a partir da cultura pura ou diretamente da amostra biológica. Na coloração de gram, que não tem valor na identificação de *Candida*, as células se coram gram positivas. Amostras de pêlos, unhas, pele e tecidos devem ser clarificadas utilizando KOH 20 %. Os blastoconídios de *Candida* spp. têm de 4 a 6 µm, são relativamente grandes em relação a *Staphylococcus* spp., e são ovais. Os clamidoconídios, produzidos por

Candida albicans, são redondos, maiores e tem parede mais espessas. As células podem apresentar brotamento e as hifas ou pseudohifas são hialinas (Figura 6.b) (ANVISA, 2013).

Figura 6: Identificação de *Candida* spp. a: colônias de *Candida* sp., lisas, grandes, brancas de reverso incolor. b: Microscopia de *Candida albicans*, pseudohifas, blastoconídios e clamidoconídios.



Fonte: Oliveira, 2014.

Após o isolamento primário, a prova do tudo germinativo é uma técnica simples que permite o diagnóstico de *Candida albicans*. Depois de 3 h de incubação em soro humano a 35 °C, esta espécie produz hifas verdadeiras. *C. tropicalis* também pode produzir se excedido o tempo de incubação. Para diferenciar *C. albicans* e *C. dubliniensis* é possível utilizar a termotolerância, já que *C. albicans* suporta crescer a 42 °C. O microcultivo em ágar fubá e tween 80 por 48 h é uma excelente técnica para análise das estruturas celulares, inclusive clamidoconídio de *C. albicans*. A produção de blastoconídios sem hifas ou pseudohifas é característico de *C. glabrata* (SIDRIM, 2004).

Adicionado as características macro e micromorfológicas, as provas bioquímicas podem ser utilizadas no diagnóstico. A cultura em ágar ureia de Christensen é utilizada na prova da urease e deve ser negativo pra *Candida* spp. O auxograma e o zimograma avaliam a capacidade de assimilação de carbono, nitrogênio e fermentação de açúcares, e sua interpretação permite diferenciar as principais espécies de *Candida* (ANVISA, 2013). Atualmente, muitos laboratórios de microbiologia utilizam os sistemas manuais, que se baseiam no resultado da assimilação de carboidratos, como por exemplo, as fitas API® (BioMerieux), ou sistemas automatizados, como o VITEK® (BioMerieux), para identificação de leveduras.

A identificação de *C. auris* necessita de atenção especial. De acordo com as recomendações do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) (2022), os sistemas manuais e automatizados podem identificar erroneamente como outras espécies de *Candida*. No

microcultivo *C. auris* não produz hifas ou pseudo hifas. Perculiarmente, *C. auris* cresce bem a 42°C e suas colônias no meio CHROMagar Candida são brancas, rosadas, vermelhas ou roxas (Figura 7). Tecnologias como *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight* (MALDI-TOF), com banco de dados adequado, e o sequenciamento da região D1-D2 do rDNA 28s ou da região interna transcrita (ITS) do rDNA são mais assertivos na identificação de *C. auris*.

Figura 7: Colônias de *Candida auris* no ágar CHROMagar Candida



Fonte: CDC, 2022.

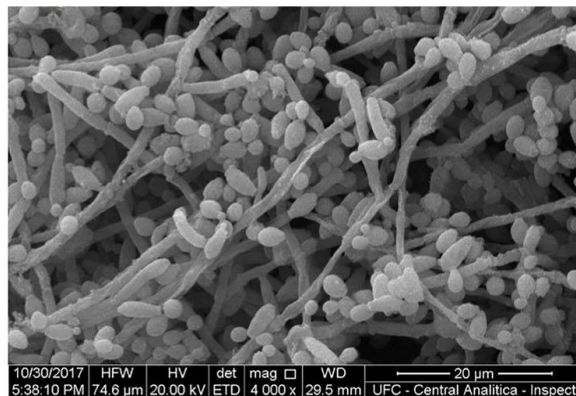
2.4.1 Patogenia

Os fatores de virulência de *Candida* spp. estão relacionados a adesão e invasão tecidual, formação de biofilmes e disseminação da infecção. Fatores relacionados ao hospedeiro, como diabetes mellitus, alterações de pH pele e vagina são prédisponenetes a instalação de candidíases na pele e mucosas, enquanto imunossupressão e antibioticoterapia facilitam a instalação de candidíases sistêmicas (SIDRIM, 2004). A adesão é facilitada pela expressão de adesinas, proteínas de adesão *Agglutinin Like Sequence* 1 a 7, e 9 (ALS), responsáveis por aderir em glicosilfosfatidilinositol (GPI), *Hyphal Wall Protein* (HWP1) e *Epithelial Adhesins* (EPA). A secreção de hemolisinas, proteases, lipases e fosfolipases causam hidrolise e invasão tecidual. Em especial, Als3 e Ssa1p podem induzir endocitose, facilitando a invasão e a candidilina pode causar lise e resposta inflamatória (DAVID; SOLOMON, 2023). O dimorfismo de *Candida* spp., fundamental na patogênese dessa levedura, permite que após a adesão haja a produção de hifas ou pseudohifas para a invasão tecidual, escape da fagocitose e formação de biofilmes. Vários genes estão envolvidos nesse processo, como HWP1, ALS3, *Extent of cell elongation*

protein (ECE1), *Hyphal-regulated protein* (HYR1), *Integrin-like sequence* (INT1), *Epithelial escape and dissemination* (EED1) e ACE2 (DAVID; SOLOMON, 2023; MBA; NWEZE, 2020).

A adesão é também a primeira etapa da formação de biofilmes, que podem se instalar mesmo em ambientes de condições desfavoráveis. *Candida* tem a capacidade de se adaptar a alterações de pH, de oxigênio e nutricionais além de induzir a produção de hifas. As células e hifas se multiplicam em meio a matriz extracelular exopolimérica, o que lhes garante integridade estrutural, proteção contra células fagocíticas, enzimas e antimicrobianos. No biofilme maduro (Figura 8) as células podem se destacar aderindo em outros locais, além de atingir a corrente sanguínea, causando candidemia e disseminação a outros órgãos. Os biofilmes de *Candida* spp. podem ser encontrados em dentaduras e cateteres, além de outros dispositivos médicos, estando associado a reinfecção (MBA; NWEZE, 2020).

Figura 8: Biofilme de *Candida albicans*.



Fonte: Barreto *et al.*, 2021.

2.4.2 Infecções e epidemiologia

A candidíase vulvovaginal é a manifestação clínica mais comum de *Candida* spp. De acordo com o CDC (2021), 75% das mulheres devem ter pelo menos 1 episódio ao longo da vida, e de 40 a 50% deverão ter 2 ou mais episódios. As mulheres que apresentam candidíase vulvovaginal recorrente têm 3 ou mais episódios sintomáticos no período de 1 ano. Prurido e edema vulvar, corrimento espesso e coagulado, disúria externa e dispareunia são sintomas da vaginite provocada por *Candida* spp. Um estudo com pacientes do serviço de ginecologia em Louisiana e Pensilvânia nos EUA descreveu que 77,5% das mulheres relataram 1 ou mais episódios de candidemia vulvovaginal ao longo da vida. Dentre essas, 43,6% relataram > 10 episódios. As mulheres mais acometidas tinham entre 26 e 40 anos (YANO *et al.*, 2019). Outro

estudo americano identificou que 53% das mulheres já foram diagnosticadas com candidíase vulvovaginal pelo menos 1 vez ao longo da vida e 22% tinham diabetes (BENEDICT *et al.*, 2022). Na África a prevalência de candidíase vulvovaginal em mulheres gestantes variou de 45% em Uganda a 16,6% no Sudão. No Kenia a prevalência foi 42,7%, na Nigéria 31,5% e Ethiopia 25% (MOHAMED *et al.*, 2022). No Brasil, Carvalho *et al.*, (2021) descreveram que poucos são os estudos a cerca da epidemiologia de candidíase vulvovaginal no país e a baixa prevalência (18%) pode ser devido a subnotificação e casos assintomáticos. *Candida albicans* é a principal espécie relacionada a candidíase vulvovaginal, responsável por cerca de 85% dos episódios. A principal representante das espécies não *albicans*, é a *C. glabrata* causando aproximadamente 50% dos casos. Essa espécie está associada a candidíase vulvovaginal complicada, pela resistência intrínseca aos azólicos. Outras espécies, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* também são relatadas (KAN, 2023).

A infecção de corrente sanguínea causada por *Candida* spp. é denominada candidemia, uma infecção grave, nosocomial, com elevadas taxas de mortalidade. Um estudo retrospectivo realizado no Brasil mostrou incidência de 2,23 episódios de candidemia para cada 1000 internações. As espécies isoladas foram *Candida albicans* (35,3%), *C. tropicalis* (27,4%) *C. parapsilosis* (21,6%) e *C. glabrata* (11,8%). A taxa de mortalidade foi de 55,9%. Todos pacientes acometidos por *C. glabrata* foram a óbito. Os principais fatores de risco foram antibioticoterapia, uso de catéter venoso central, cirurgias, imunossupressão e nutrição parenteral (DE MEDEIROS *et al.*, 2019). Outro estudo realizado com pacientes em imunossupressão pelo tratamento de doenças malignas hematológica e receptores de transplante de células hematopoéticas, apontou *Candida* spp. como segundo agente (24%) causador de infecções fúngicas invasivas, *Aspergillus* spp. foi o primeiro (SOUZA *et al.*, 2021). Em pacientes oncológicos com leucopenia *Candida tropicalis* teve maior prevalência (36,7%) em relação a *C. albicans* (33,3%) e a outras espécies (30%) nas infecções de corrente sanguínea (EL-MAHALLAWY *et al.*, 2023).

Durante a pandemia de COVID 19, fatores como aumento no tempo de internação, ventilação mecânica, uso de cateteres e sondas, e antibioticoterapia foram pré dispostas as infecções secundárias e co-infecções causadas por fungos, representando aumento de mortalidade nesses pacientes. Ramli e colaboradores (2023) identificaram *Candida albicans* como o principal fungo isolado em pacientes com COVID 19, além de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, estando associados a 2% das infecções respiratórias, 7% das infecções sanguíneas e 36% das infecções urinárias. Ford e colaboradores (2023) observaram que durante a pandemia

de COVID 19, houve aumento das infecções de corrente sanguínea associadas a cateter central por *Candida* spp.

Candida spp. também é responsável por diversas infecções cutâneas. Correia e colaboradores, (2022) descrevam *Candida* spp. como responsável por 9,1% dos episódios de dermatomicoses, de unhas e interdigitoplantares em crianças de 6 a 12 meses em creches no Mato Grosso, Brasil. Um estudo no Irã, identificou em infecções de pele e unhas, *Candida albicans* como a espécie mais prevalente (39,8%). Outras espécies também foram isoladas, *C. parapsilosis* (32,95), *C. tropicalis* (7,9%) e *C. glabrata* (4,5%) (SADEGHI *et al.*, 2019). Além dessas, são descritas: infecção por decúbito sacral causada por *C. tropicalis* (SANCHEZ *et al.*, 2021), pápulas em pé (unilateral) causadas por *C. albicans* (PALESE *et al.*, 2018), dentre outras.

2.5 Antimicrobianos

2.5.1 Antibióticos

A história do tratamento de infecções causadas *S. aureus* teve início por volta de 1940, com o surgimento do primeiro antibiótico, a penicilina (BARBER; ROZWADOWSKA-DOWZENKO, 1948). Esse fármaco deu origem a classe dos β -lactâmicos, composto pelas penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. Os fármacos dessa classe têm em comum a presença do anel β -lactâmico em sua estrutura. O mecanismo de ação dos β -lactâmicos se dá pela inibição da síntese de parede celular bacteriana, causada pela ligação à proteína de ligação à penicilina (PBP) impedindo a transpeptidação, que é a ligação de cadeias peptídicas ao glicano para a formação do peptidoglicano. A parede celular comprometida aponta ao desequilíbrio eletrolítico e morte celular. Os principais β -lactâmicos utilizados no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* são: cefalexina, utilizada no tratamento de infecções cutâneas não complicadas e a oxacilina utilizada no tratamento de infecções graves. A ceftaroline é uma cefalosporina de 5ª geração e possui espectro contra *S. aureus*, podendo ser utilizada em infecções graves causadas por cepas resistentes a oxacilina (MADIGAN, 2016).

Os macrolídeos apresentam anéis lactonas ligados a açúcares e têm como alvo o ribossomo bacteriano, se ligando na subunidade 50S prejudicando a síntese de algumas proteínas e conseqüentemente as funções metabólicas das células. A claritromicina, eritromicina e a azitromicina são os representantes dessa classe que possuem indicação para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, especialmente em pacientes que apresentam alergia as penicilinas. Outra opção é Clindamicina, da classe das lincosaminas. Esse fármaco

tem ação sobre a síntese proteica bacteriana, se ligando ao ribossomo 50S, afetando a tradução bacteriana. Possui indicação para o tratamento de infecções cutâneas e até infecções graves que não sejam causadas por cepas resistentes à meticilina (LEIGH, D., 1981).

A mupirocina é a única opção terapêutica tópica para o tratamento de infecções de pele causadas por *S. aureus*, sendo uma opção para o tratamento de impetigo, foliculite, infecções nasais podendo ser utilizada em curativos. Esse fármaco atua na bloqueando a sintetase de isoleucina, prejudicando a síntese protéica bacteriana (KHOSHNOOD et al., 2019).

Outra classe de antibióticos com importância para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus* são os glicopeptídeos, representada pela vancomicina e a teicoplanina. Esses fármacos também atuam inibindo a síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana e são utilizados especialmente em infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ACHARYA et al., 2022).

As últimas opções terapêuticas para o tratamento de infecções graves causadas por *S. aureus*, são a linezolida e a daptomicina. A linezolida é uma oxazolidinona, que atua inibindo a síntese protéica através da ligação ao ribossomo. Esse fármaco é utilizado quando as cepas são resistentes à oxacilina e vancomicina. A daptomicina é um licopeptídeo que causa despolarização na membrana da célula bacteriana e consequente morte celular. É indicado para o tratamento de infecções de corrente sanguínea, endocardite e infecções de pele e tecidos moles (HASHEMIAN, FARHADI E GANJPANVAR., 2018).

2.5.2 *S. aureus* resistente a meticilina - MRSA

A história do desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antibióticos se desenvolveu paralelamente a história da descoberta dos medicamentos. O primeiro grande marco dessa história ocorreu na década de 1950, poucos anos após a descoberta e início do uso da penicilina. Foi detectada a produção de penicilase por cepas de *S. aureus*, enzima que cliva o anel β -lactâmico e tornou as cepas resistentes a penicilina e a outros antibióticos da mesma classe (ROUNTREE E FREEMAN, 1955). A meticilina foi projetada para superar a presença da penicilase, entretanto, poucos anos após a introdução da meticilina na prática clínica, já na década de 1960 ocorreu o segundo marco da resistência bacteriana com o registro das primeiras cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (JEVONS, COE E PARKER, 1963). Essa resistência ocorre pela presença do gene *MecA*, que codifica uma proteína de ligação a penicilina de baixa afinidade (PBP2a), conferindo resistência também a penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. O gene *MecA* pode ser transferido por conjugação, transformação ou

transdução entre as cepas de *S. aureus*, sendo facilmente disseminado (PULINGAM *et al.*, 2022). Além disso, algumas cepas podem apresentar perfil de multiresistência, sendo resistentes também à clindamicina e eritromicina (OTTO, 2013).

Inicialmente, as infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina eram restritas ao ambiente hospitalar (HA-MRSA), mas na década de 1990 casos de infecções fatais causadas por essas cepas foram relatadas em pacientes que não tinham relação com o ambiente hospitalar (CDC, 2006). Desde então, infecções causadas por *S. aureus* resistentes à meticilina de origem comunitária (CA-MRSA), são responsáveis por infecções graves de pele e tecidos moles. Algumas cepas de CA-MRSA podem ser especialmente mais virulentas pela presença do gene *MecA* e genes que codificam a leucocidina de Panton-Valentine, estando relacionadas também a infecções fulminantes (CHAMBERS; DELEO, 2010).

O aumento de infecções causadas por MRSA promoveu o uso exacerbado de vancomicina e, desde 2002, têm sido identificadas cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA). A aquisição do gene *VanA*, responsável pela resistência de *S. aureus* a vancomicina é associada a conjugação de cepas de *Enterococcus* resistentes à vancomicina durante a coinfeção e promove um espessamento da parede celular bacteriana (VRSA CDC, 2002; CHAMBERS; DELEO, 2010).

2.5.3 Antifúngicos

O tratamento das infecções causadas por *Candida* spp. é realizado utilizando poliênicos, equinocandinas ou azólicos. A Anfotericina B, principal representante dos poliênicos, é utilizado no tratamento de infecções sistêmicas, como candidemias. A anfotericina B atua se ligando ao ergosterol formando poros que vão promover a perda íons e consequentemente morte celular. A anfotericina B foi o primeiro antifúngico sendo utilizado durante décadas, entretanto seus efeitos tóxicos especialmente sobre os rins e problemas relacionados a infusão limitam seu uso. Atualmente, a formulação lipídica da anfotericina B é melhor aceita e mais utilizada (LEE *et al.*, 2020; MURPHY E BICANIC, 2021).

A classe dos azólicos é composta principalmente pelo fluconazol, itraconazol e voriconazol. O fluconazol é o fármaco comumente utilizado no tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., sendo eficaz em micoses superficiais, de membrana mucosas e profundas. Entretanto, *Candida glabrata* é intrinsecamente resistente ao fluconazol, e o aumento de infecções causadas por *Candida* não- *albicans* pode encerrar a vida útil desse fármaco. O voriconazol é um derivado sintético do fluconazol, com boa atividade sobre as cepas

de *C. não-albicans* e é indicado no tratamento de micoses de membrana mucosas, mas deve ser analisado em cada paciente devido as diversas interações medicamentosas que pode provocar. O itraconazol é um azólico lipofílico com baixa atuação sobre infecções urinárias, mas bem aceito no tratamento de micoses cutâneas por atingir boas concentrações nos tecidos, o principal efeito relacionado é a insuficiência cardíaca. Os azólicos atuam inibindo a 14 α lanosterol desmetilase, impedindo a conversão de lanosterol em ergosterol, o que provoca perda de integridade de membrana além de gerar um produto tóxico para a célula fúngica (LEE et al., 2020; MURPHY E BICANIC, 2021).

A classe das equinocandinas é composta pela micafungina, caspofungina e anidulafungina. Esses fármacos atuam inibindo a β -D-glucano sintase, interferindo na produção de β -glucano, um componente da parede celular, produzindo ação fungicida sobre *Candida* spp. com menor toxicidade sobre humanos. Para as equinocandinas apenas formulações intravenosas estão disponíveis e possuem indicação para o tratamento de infecções sistêmicas.

O tratamento das infecções fúngicas é limitado pela toxicidade dos fármacos, causada pela semelhança entre as células eucarióticas humanas e fúngicas. Além disso, poucos fármacos estão disponíveis (LEE et al., 2020; MURPHY E BICANIC, 2021).

Os principais mecanismos de resistências de *Candida* aos antifúngicos são expressos em espécies de *C. albicans* e *não-albicans*. O gene ERG11 é responsável pela produção da enzima alvo dos azólicos, a 14 α lanosterol desmetilase. O aumento na expressão desse gene, promove a regulação da enzima alvo, além disso pode ocorrer a modificação na estrutura da enzima levando a perda no efeito dos azóis. Ademais, a super expressão dos genes CD1, CD2, MDR1 e MDR2 levam a produção de bombas de efluxo, que reduzem as concentrações intracelulares dos fármacos (PERFECT E GHANNOUM, 2020).

A resistência aos poliênicos está relacionada a redução na produção do ergosterol, alvo dessa classe promovida pela mutação nos genes ERG 2, ERG 3, ERG 6 e ERG11. A resistência as equinocandinas ainda é rara, mas no gênero *Candida* pode acontecer pela mutação no gene FKS, responsável por codificar a enzima β -D-glucano sintase com substituição de aminoácidos, promovendo assim, uma modificação no alvo (PERFECT E GHANNOUM, 2020).

É importante ressaltar que *Candida auris* apresenta resistência ao fluconazol, anfotericina B e as equinocandinas.

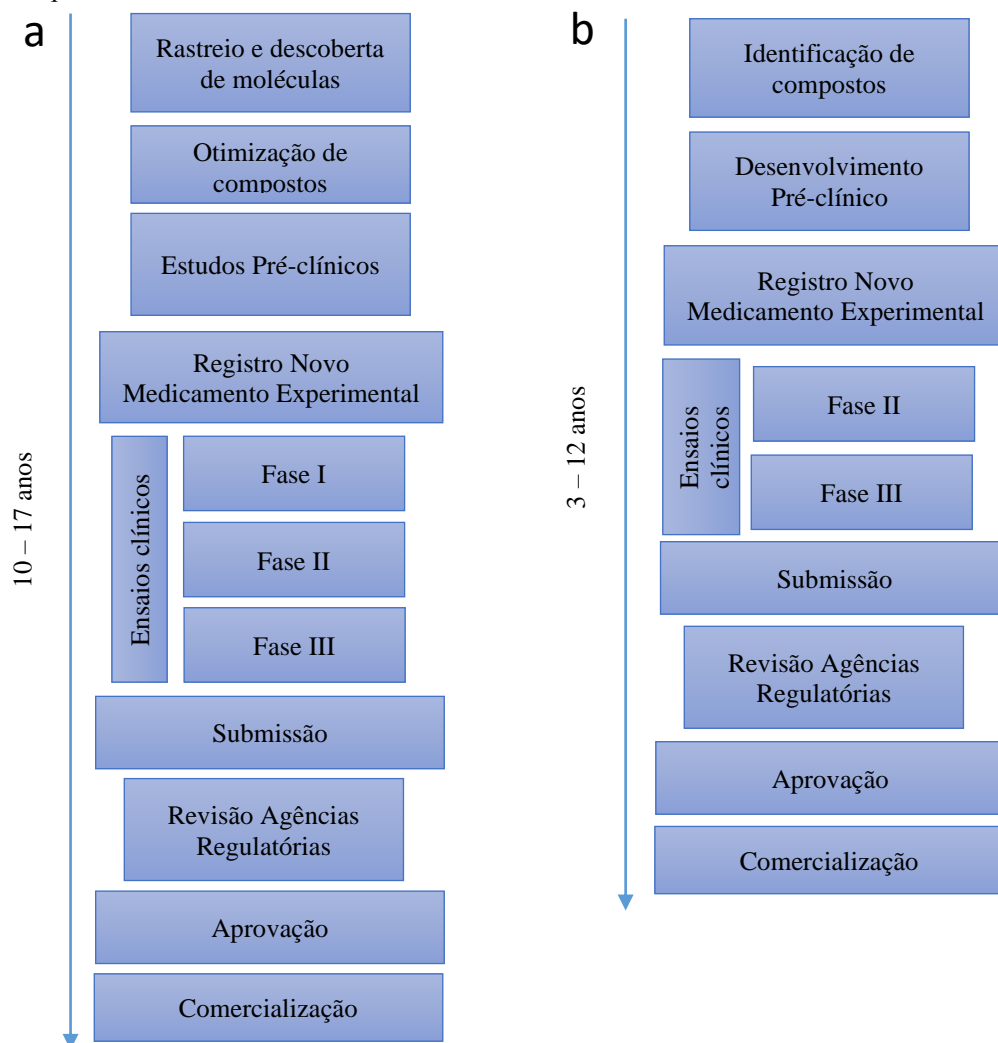
2.6 Novas estratégias terapêuticas

Na última década houve aumento nas taxas de infecções causadas por patógenos resistentes no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), esse registro é associado a patógenos responsáveis por infecções graves, como sepse, e também infecções comuns, como infecções urinárias não complicadas. Além disso, durante a pandemia de COVID 19 houve aumento no uso de antimicrobianos provocado pelas co-infecções e infecções secundárias, e a consequência inevitável é o aumento da resistência (OBEIDAT *et al.*, 2023). Os tratamentos atuais disponíveis estão se tornando limitados e ineficientes, por isso o desenvolvimento de novos antimicrobianos precisa ser acelerado.

Tradicionalmente o desenvolvimento de um novo fármaco demora em torno de 20 anos e demanda um investimento de 1 bilhão de dólares. Após a descoberta da molécula são necessários estudos pré-clínicos, clínicos de fase I, II e III e só após os resultados a molécula é submetida a aprovação nas agências regulatórias. Estima-se que a cada 10 moléculas submetidas, apenas 1 é aprovada (FARHA; BROWN, 2019; PUSHPAKOM *et al.*, 2018).

O reposicionamento ou reaproveitamento de fármacos é um processo que reavalia uma molécula já existente, com resultados de toxicologia, farmacocinética e aprovação nas agências regulatórias. Esses dados reduzem os estudos necessários e aumentam a chance de aprovação quando foram resubmetidas. Além disso, o tempo e os investimentos necessários são reduzidos. A Figura 9 abaixo traz as diferentes etapas no desenvolvimento de novos fármacos. Um exemplo de sucesso é o minoxidil, molécula inicialmente utilizada para hipertensão por suas propriedades vasodilatadoras e posteriormente foi reaproveitada e reformulada para calvície. Atualmente, a sertralina, um antidepressivo da classe dos inibidores da recaptação de serotonina, está em processo de estudos de fase clínica no reaproveitamento como antifúngico (FARHA; BROWN, 2019; PUSHPAKOM *et al.*, 2019).

Figura 9: a) Etapas para o desenvolvimento novos fármacos. b) Etapas que uma molécula é submetida no reaproveitamento.

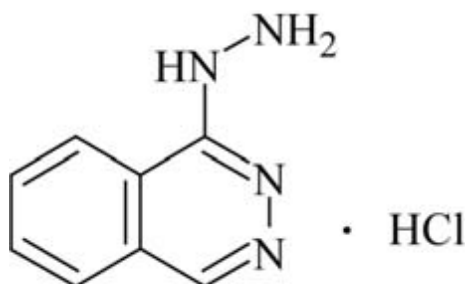


Adaptado de Farha e Bronw, 2019.

2.7 Hidralazina

A hidralazina foi lançada em 1949 pela indústria farmacêutica Suíça Ciba, um dos primeiros anti-hipertensivos no mundo (WONGTSCHOWSKI, 2002). Atualmente, faz parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022) do componente básico da assistência farmacêutica do Brasil. É comercializada na forma de sal, associada ao cloridrato. Possui nome químico cloridrato de 1-hidrazinilftalazina ou cloridrato de hidralazina (Figura 10) e fórmula $C_8H_8N_4 \cdot HCl$.

Figura 10: Cloridrato de hidralazina.



Fonte: BRASIL, 2010.

A hidralazina é um antihipertensivo da classe vasodilatadores de ação direta indicado para o tratamento de insuficiência cardíaca, hipertensão arterial resistente, hipertensão gestacional e emergência hipertensiva em gestantes. De acordo com as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, pode ser utilizada em combinação com outros fármacos de primeira linha ou em monoterapia nos casos de emergência gestacional. Seu uso também é seguro durante a amamentação. A dose terapêutica varia entre 50 e 200mg/ dia via oral ou de 5 a 40mg intravenoso/ intramuscular (BARROSO *et al.*, 2021).

Os vasodilatadores de ação direta promovem o relaxamento da musculatura lisa arterial, diminuindo a resistência vascular periférica e pulmonar, com redução da pós carga ventricular e aumento do volume sistólico, levando a um equilíbrio na hemodinâmica e consequentemente a redução da pressão arterial (OLIVERI, 1999). O mecanismo de ação da hidralazina não está claro, alguns autores descrevem que o relaxamento da musculatura lisa pode ocorrer pelo bloqueio dos canais de cálcio da membrana e no retículo sacoplasmático reduzindo o aporte de cálcio necessário para a contração (LARINI, 2008). Outros autores sugerem que o relaxamento da musculatura lisa se da por ação semelhante à dos nitratos, que liberam óxido nítrico promovendo ativação da guanilatociclase responsável pelo aumento de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), e pela abertura de canais de potássio, tornando a célula hiperpolarizada (OLIVERI, 1999).

Além da atividade clássica anti-hipertensiva, a hidralazina tem sido estudada acerca de seu potencial antitumoral. Bauman e colaboradores (2014) conduziram um estudo clínico Fase I, utilizando hidralazina associada ao ácido valproico para o tratamento de tumores sólidos e obtiveram resultados positivos, determinando a dose máxima tolerada de 300 mg e alcançando a estabilidade dos pacientes. Outro estudo, de Fase II, avaliou a toxicidade e a resposta do

tratamento de pacientes com tumores sólidos tratados com hidralazina e valproato de magnésio. Também obtiveram resultados positivos, alcançando benefícios clínicos, com respostas totais, parciais ou estabilização da doença. A hidralazina foi bem tolerada apresentando efeitos tóxicos hematológicos, mas nenhuma morte foi relacionada (CANDELARIA *et al.*, 2007). O medicamento TRANSKRIP®, associação de hidralazina e valproato de magnésio, foi aprovado no México em 2010 para o tratamento de câncer cervical avançado. Resultados preliminares do estudo randomizado de fase III, mostram aumento na sobrevida livre de progressão de câncer cervical em pacientes tratadas com hidralazina e valproato (CORONEL *et al.*, 2011). Em 2018, a autoridade sanitária mexicana (COFEPRIS) aprovou a nova indicação terapêutica do TRANSKRIP para o tratamento de síndrome mielodisplásica. Candelaria e colaboradores (2017), relataram que pacientes com síndrome mielodisplásica obtiveram bons resultados, a maioria com resposta completa (35,7%).

Os benefícios da hidralazina no tratamento de câncer se dá graças ao seu potencial em inibir a enzima DNA metiltransferase 1 (iDNMT1). Essa enzima é responsável por adicionar um radical metila no carbono 5 da citosina (CpG), promovendo a metilação do DNA. Tem preferência pelo DNA hemimetilado e atua predominantemente nos processos de divisão celular, fazendo cópias do padrão de metilação do DNA já existente. O desenvolvimento de tumores está associado a hipermetilação de genes promotores e silenciamento de genes supressores tumorais. A inibição da DNMT1, realizada pela hidralazina, desmetila genes promotores e reativa a transcrição de genes de supressão tumoral (ARCE *et al.*, 2006; CORONEL *et al.*, 2014).

A hidralazina é um fármaco seguro, e suas propriedades epigenéticas e anti-hipertensivas estão claras e bem descritas, mas não há estudos sobre seu potencial antimicrobiano. Então, diante da necessidade no desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, avaliamos a atividade da hidralazina frente a cepas clínicas de *S. aureus* e biofilmes de *Candida spp.*

3 HIPÓTESES

- 3.1 A hidralazina possui atividade antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *in vitro*.
- 3.2 A hidralazina inibe biofilmes de *Candida spp.*, *in vitro*.
- 3.3 A hidralazina não possui atividade antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *in vitro*.
- 3.4 A hidralazina não inibe biofilmes de *Candida spp.*, *in vitro*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

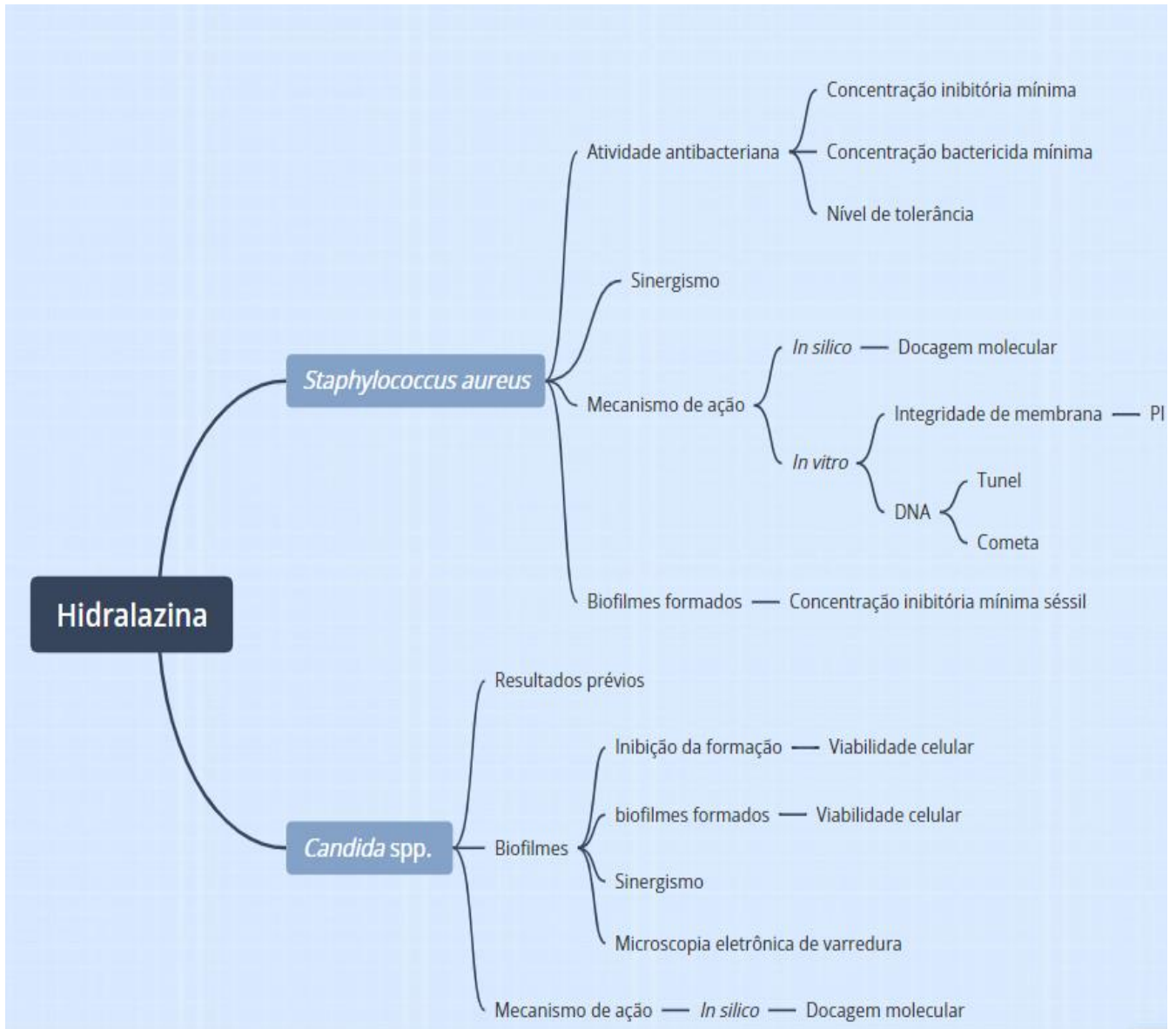
Avaliar a atividade do cloridrato de hidralazina sobre células planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *in vivo* e *in silico*, e sobre biofilmes de *Candida* spp. formados e em formação.

4.2 Objetivos Específicos

- 4.2.1. Avaliar a atividade antibacteriana do cloridrato de hidralazina sobre células planctônicas de *S. aureus*.
- 4.2.2. Avaliar a atividade antibacteriana do cloridrato de hidralazina sobre biofilme formado de *S. aureus*.
- 4.2.3. Avaliar o possível mecanismo de ação *in vitro* do cloridrato de hidralazina sobre *S. aureus*.
- 4.2.4. Avaliar o possível mecanismo de ação *in silico* do cloridrato de hidralazina sobre *S. aureus*.
- 4.2.5. Avaliar a atividade antifúngica do cloridrato de hidralazina sobre biofilmes de *Candida* spp.
- 4.2.6. Avaliar o possível mecanismo de ação *in silico* do cloridrato de hidralazina sobre *Candida* spp.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 11: Fluxograma da metodologia.



Fonte: Autora.

5.1 Microorganismos

As cepas utilizadas no estudo foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN e pertencem a coleção do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN), da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde são mantidas em criopreservação à -20 °C.

Foram utilizadas quatorze cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e duas cepas *American Type Culture Collection* (ATCC), *Staphylococcus aureus* 6539P e *Staphylococcus aureus* 65398, utilizadas como controle. Os isolados clínicos foram identificados utilizando a automação Phoenix™ (BD).

Para os ensaios fúngicos foram utilizadas uma cepa clínica de cada espécie: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. As cepas possuem identificação molecular realizada através da amplificação do DNA por reação de cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers ITS4 e ITS5, com número depositado no GenBank. As origens, número de GenBank e perfil de sensibilidade estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Cepas clínicas de *Candida* spp. utilizados no estudo.

Cepas	Origem	Nº Genbank	CIM (µg/ml)		
			Fluconazol	Itraconazol	Hidralazina
<i>C. albicans</i>	Sangue	KJ740179	32	0,5	128
<i>C. parapsilosis</i>	Sangue	AB861487	32	0,25	32
<i>C. tropicalis</i>	Sangue	KJ740185	32	0,5	128

5.2 Fármacos

Nos ensaios foram utilizados os antibióticos oxacilina (OXA) (Sigma-Aldrich, USA) e vancomicina (VAN) (Sigma-Aldrich, USA), preparados de acordo com a recomendação do protocolo M100S (2016) do CLSI. Diluídos em água destilada estéril e estocados à -20 °C em concentrações 10x mais altas do que a concentração utilizada nos testes.

Para o preparo dos antifúngicos fluconazol (FLC) (Sigma-Aldrich, USA) e itraconazol (ITRA) (Sigma-Aldrich, USA) foram seguidas as recomendações do protocolo M27-A3 do CLSI (2008). Fluconazol foi diluído em água destilada estéril e o itraconazol foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) (Êxodo científica, Brasil), as soluções foram estocadas à -2 °C.

O cloridrato de hidralazina (HID) (Sigma-Aldrich, USA) (CAS número 304-20-1), foi pesado e diluído em água destilada estéril nos dias dos ensaios para melhor reprodutibilidade.

5.3 Ensaio com *Staphylococcus aureus*

5.3.1 Avaliação da atividade antibacteriana da hidralazina

5.3.1.1 Determinação da CIM

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com o protocolo M07-A10 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2015). As cepas foram recuperadas transferindo 20 µL do meio de conservação para eppendorfs contendo 1 mL do caldo Brain Harth Broth (BHI) (Kasvi, Brasil) e incubando em estufa à 37 °C/ 24 h. Após esse período, as cepas foram repicadas em placas de ágar Muller-Hinton (HiMedia, Índia) e novamente incubadas à 37 °C/ 24 h.

O inóculo foi preparado a partir das culturas frescas. As cepas clínicas e ATCCs foram ressuspensas em 5 mL salina 0,9% e as suspensões ajustadas para atingir 1×10^8 UFC/mL, de acordo com a escala 0,5 de McFarland (Probac do Brasil, Brasil). Posteriormente, 100 µL das suspensões celulares foram transferidas para 900 µL de meio caldo Mueller hinton (HiMedia, Índia) com ajuste de cátions (CAMHB).

Para os ensaios de microdiluição em caldo foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços. Foi adicionado 95 µL de CAMHB em todos os poços da placa, exceto na coluna 2. Os fármacos foram preparados e 190 µL adicionados nos poços da coluna 2. Foi então realizada a diluição seriada com 95 µL do fármaco da coluna 2 até a coluna 11. O inóculo contendo as células de *S. aureus* foi adicionado em toda a placa, exceto na coluna 1 que foi o controle de esterilidade. A concentração final do inóculo atingiu 10^5 UFC/mL. A coluna 12 foi o controle de crescimento bacteriano, sem tratamento. As placas foram incubadas por 24 h a 35 °C.

A HID foi testada na faixa de concentração de 2048 - 8 µg/mL, oxacilina 1024 - 0,125 µg/mL e vancomicina 64 - 0,125 µg/mL. Para os ensaios com OXA foi adicionado 2 % de NaCl ao CAMHB. A leitura das placas foi realizada visualmente. A CIM foi considerada aquela que atingiu 99% do crescimento bacteriano, após 24 de incubação.

Os pontos de corte foram determinados de acordo com protocolo M100S (CLSI, 2016). Para OXA ≤ 2 µg/mL sensível e ≥ 4 µg/mL resistente; VAN ≤ 2 µg/mL sensível, e $4 - 8$ µg/mL intermediário e ≥ 16 µg/mL resistente.

5.3.1.2 Determinação da CBM

A determinação da concentração bactericida mínima foi realizada a partir dos testes de sensibilidade. Após a leitura das microplacas, foi retirado 8 µL do primeiro poço aonde não se visualizou crescimento bacteriano, de um poço anterior e um posterior e repicados em ágar Mueller hinton. Dessa forma foram avaliadas pelo menos 3 concentrações de cada fármaco sobre cada cepa. A CBM foi definida como a menor concentração que causou inibição de 99% do crescimento bacteriano após 24 h incubação (DAS *et al.*, 2016).

5.3.1.3 Teste de Tolerância

A partir dos resultados de MIC e MBC foi calculado o nível de tolerância, que é a capacidade bactericida da droga. Nível de tolerância é MBC_{HID}/MIC_{HID} . HID foi considerada bactericida quando ≤ 4 e bacteristático quando ≥ 16 (DAS *et al.*, 2016).

5.3.1.4 Avaliação do sinergismo

A partir da determinação do CIM de HID, OXA e VAN isoladamente foi então avaliado a combinação entre esses fármacos utilizando a técnica do *checkerboard*. Para tal, foi realizado o ensaio da microdiluição em caldo, foram preparadas as placas de 96 poços e no poço 2, referente ao fármaco, foi adicionado 190 µL, sendo 80 µL de cada fármaco. O restante do ensaio ocorreu como descrito no item 5.3.1., foi adicionado o inóculo e as placas incubadas a 35 °C por 24 h. A leitura foi feita visualmente e foi considerada a CIM da combinação aquela que inibiu 99% do crescimento bacteriano.

Assim, foi avaliado o sinergismo entre HID + OXA e HID + VAN e a interpretação foi feita utilizando o cálculo do FICI (*fractional inhibitory combination index*) (ODDS, 2003) mostrado nas equações 1 e 2 abaixo:

$$FICI = \frac{CIM_{HID \text{ combinado}}}{CIM_{HID \text{ isolado}}} + \frac{CIM_{OXA \text{ combinado}}}{CIM_{OXA \text{ isolado}}} \quad (1)$$

$$FICI = \frac{CIM_{HID \text{ combinado}}}{CIM_{HID \text{ isolado}}} + \frac{CIM_{VAN \text{ combinado}}}{CIM_{VAN \text{ isolado}}} \quad (2)$$

Foi considerado, $FICI \leq 0.5$: sinergismo (S); $0.5 < FICI \leq 1$: aditivo (Ad); $1 < FICI \leq 4$: indiferente (I) e $FICI > 4$: antagonismo (A) (JORGE *et al.*, 2017).

5.3.1.5 Avaliação da atividade da hidralazina sobre biofilmes de *Staphylococcus aureus*

Para a análise da atividade de HID sobre biofilme formado de *S. aureus* foram utilizadas 14 cepas clínicas e as cepas padrão (*S. aureus* ATCC 6538P e *S. aureus* ATCC 65398).

Inicialmente, as cepas foram semeadas em ágar Mueller hinton e incubadas a 35°C por 24h. Após esse período, pequenas colônias foram resuspensas em caldo Triptona de soja (TSB) suplementado com glicose 2% e incubadas nas mesmas condições. Os tubos contendo os inóculos foram centrifugados por 2500 rpm/ 5min e o concentrado celular lavado 3x com *Phosphate-buffered saline* (PSB). As células foram ressuspensas em caldo TSB com glicose 2% e o inóculo final ajustado de acordo com a escala de 0,5 McFarland.

Foi avaliada a capacidade das cepas formarem biofilme utilizando o protocolo de Stepanović e colaboradores (2000) com pequenas modificações. Os biofilmes foram formados adicionando 200 µL do inóculo em placas de 96 poços, que foram incubadas por 48 h/35 °C sob rotação 15 rpm (Boekel Orbitron). As placas foram lavadas com PBS e fixadas com 100 µL metanol 99% por 10 min. Depois, as placas foram coradas com 100 µL cristal violeta 2% por 20min, lavadas com água destilada estéril e resolubilizadas com ácido acético glacial 33% (v/v). Para leitura 100 µL da solução foi transferida para uma nova microplaca. A densidade óptica (OD) foi mensurada a 570nm no leitor de microplaca (Accuris).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana de HID, os biofilmes foram formados nas mesmas condições descritas acima. Após 24 h as placas foram lavadas com PBS e adicionadas 6 concentrações de HID (2048, 1536, 1024, 512, 256 e 128µg/mL), 6 concentrações de OXA (1024, 512, 256, 128 e 64µg/mL) e caldo TSB nos poços utilizados como controle. As placas foram incubadas por 24h a 35°C sob rotação 15 rpm (Boekel Orbitron).

Após os tratamentos, as placas foram lavadas com PBS e a atividade metabólica das células sésseis foi mensurada utilizando 100 µL de brometo de metiltiazollildifenil tetrazólio (MTT)(1mg/mL) por 2h /35 °C no escuro. O MTT foi retirado e adicionado 100 µL de DMSO. A solução de cada poço foi transferida para uma nova placa de 96 poços, que então foram lidas a 570nm no leitor de microplaca (Accuris) (COSTA *et al.*, 2014; QUEIROZ *et al.*, 2021).

5.3.1.6 *Análise de dados*

Os testes de sensibilidade *in vitro* para determinação de CIM, CBM, nível de tolerância, sinergismo e inibição de biofilme foram realizados em triplicata, em diferentes dias. As médias geométricas foram usadas estatisticamente para avaliar os resultados.

5.3.2 *Avaliação do mecanismo de ação*

Para compreender o mecanismo de ação da hidralazina sobre *Staphylococcus aureus* foi analisado a integridade da membrana, fragmentação e ruptura do DNA, de acordo com Andrade Neto e colaboradores (2015); Dwyer e colaboradores (2012) e Miloshev, Mihaylov, Anachkova (2002). Para isto foi selecionado uma cepa representativa, a cepa de *S. aureus* 5.

A cepa foi semeada em ágar mueller hinton e incubada por 24h a 35 °C. Depois, foi ressuspensa em 5 mL de caldo BHI e incubada novamente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas 3500rpm/ 5 min e lavadas 3x com PBS. A partir do concentrado celular foi preparado o inóculo de acordo com a escala de 0,5 de McFarland em salina 0,9%. O inóculo foi utilizado para preparar a suspensão celular de 10⁶ células/ mL em caldo BHI com os tratamentos: HID CIM (128 µg/ml) e 2x CIM (256 µg/ml) por 24h e os controles: OXA CIM (1 µg/ml) e VAN CIM (2 µg/ml). Foi utilizado caldo BHI como controle negativo (ANDRADE NETO *et al.*, 2015).

5.3.2.1 *Avaliação de viabilidade celular*

A integridade da membrana celular bacteriana foi avaliada pela exclusão de iodeto do propídio (IP) 2 mg/mL após os tratamentos com HID, OXA e VAN por 24 h. Foram analisados 10.000 eventos em cada ensaio e os detritos omitidos da análise. A fluorescência celular foi determinada pelo citômetro de fluxo *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS) e analisada utilizado o software *CytoSortf 4.1*. (ANDRADE NETO *et al.*, 2015).

5.3.2.2 *Análise de fragmentação do DNA*

A fragmentação do DNA foi analisada pelo ensaio *Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL). Para isto, foi utilizado o kit de ensaio

TUNEL (Roche, Suíça). Após os tratamentos com HID, OXA e VAN as células foram fixadas com paraformaldeído 7% e penetradas com Triton X-100 1% por 10 min em gelo e depois incubadas com a mistura reacional TUNEL por 1 h a 37 °C. A porcentagem de células positivas foi determinada pela análise de 200 células/amostra utilizando microscópio de fluorescência (Olympus, Tokyo, Japan) (CAVALCANTI *et al.*, 2009; DWYER *et al.*, 2012).

5.3.2.3 *Ensaio do cometa*

Inicialmente, as lâminas foram preparadas com 200 µL de agarose 0,5% e secas em temperatura ambiente. Após 24 h de tratamentos com os fármacos, as células foram centrifugadas 5min, lavadas com água destilada estéril e ressuspensas em tampão S (sorbitol 1 M, fosfato monopotássico 24 mM). Alíquotas celulares de aproximadamente 5×10^4 células, foram adicionadas à mistura de agarose de baixo ponto de fusão (37 °C) com Zymolyase 20T 2mg/ mL e dispostas sobre as lâminas previamente preparadas, cobertas com lamínulas e incubadas por 20 min a 30 °C. Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução de lise (NaOH 30 mM, 1M de NaCl, 0,1% laurilsarcosina, 50 mM EDTA, pH 12,3) por 1 h, e depois lavadas com tampão de NaOH 30 mM e EDTA 10mM 3x para o desenrolamento do DNA. Após, as lâminas foram submetidas a eletroforese por 20 min a 0,5 V/ cm e amperagem ajustada para 24 mA. Depois, foi realizada a neutralização dos géis, incubando as lâminas por 10 min em tris HCl (pH 7,5) seguido por incubação de 10min em etanol 76% e 96%. As lâminas secas foram coradas com brometo de etídio 1mg/ mL e lidas no microscópio de fluorescência. Estes ensaios foram realizados em condições que evitasse atividade celular enzimática e danos adicionais ao DNA, 8 °C/ escuro.

Foram analisadas 100 células de cada grupo (HID CIM, HID 2x CIM, OXA CIM e VAN CIM) e classificadas de acordo com o tamanho da cauda (de 0: não danificado, a 4: dano máximo), e o valor de índice de dano foi calculado para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de zero (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (CAVALCANTI *et al.*, 2009; MILOSHEV; MIHAYLOV; ANACHKOVA, 2002).

5.3.2.4 *Análise estatística*

Todo os ensaios foram realizados em triplicata em dias diferentes. Os dados de citometria foram submetidos ao Mann–Whitney U-test, com significância de $p \leq 0.05$. Toda análise estatística foi feita utilizando o software GraphPad Prism (versão 6.0. San Diego, USA)

5.3.3 Ensaio *in silico* da interação da hidralazina com alvos celulares de *S. aureus*

5.3.3.1 Preparação dos ligantes

Inicialmente, a estrutura química da hidralazina (CID3637) foi obtida no repositório PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), o confômero de menor energia foi salvo em pH fisiológico utilizando o código MarvinSketch (CSIZMADIA, 2019) otimizado pelo código Avogadro (HANWELL *et al.*, 2012), configurado para utilizar algoritmo *steepest descente* com ciclos de 50 interações, aplicando o campo de força MMFF94 (*Merck Molecular Force Field*) (BATISTA DE ANDRADE NETO *et al.*, 2021; HALGREN, 1996).

As estruturas dos ligantes alvo foram obtidas no repositório Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) e removidos os resíduos, adicionados os hidrogênios polares e calculadas as cargas Gasteiger (YAN *et al.*, 2014) (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012). Foram selecionados para análise as estruturas cristalinas dos alvos; *S. aureus* FtsA (PDB ID: 3WQU) (FUJITA *et al.*, 2014), Wild-type *S. aureus* DHFR (PDB ID: 2W9G) (HEASLET *et al.*, 2009), *S. aureus* gyrase complex with DNA (PDB ID: 2XCT) (BAX *et al.*, 2010), *S. aureus* gyrase (PDB ID: 5BS3) (SINGH *et al.*, 2015), DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') (PDB ID: 453D) (NEIDLE *et al.*, 1999), C (30) carotenoid deHIDrosqualene synthase (PDB ID: 2ZCQ) (LIU *et al.*, 2008), MtlD (PDB ID: 5JNM) (NGUYEN *et al.*, 2019), Panton-Valentine Leucocidin S Component (PDB ID: 1T5R) (GUILLET *et al.*, 2004), *S. aureus* alpha hemolysin (PDB ID: 4IDJ) (FOLETTI *et al.*, 2013), acyl-PBP2a (PDB ID: 3ZFZ) (OTERO *et al.*, 2013) e *S. aureus* TyrRS (PDB ID: 1JIJ) (QIU *et al.*, 2001).

5.3.3.2 Simulação do docking molecular e obtenção dos dados

As simulações de docking molecular entre HID e os alvos celulares foram realizadas utilizando o código AutodockVina (TROTT; OLSON, 2010), *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA), *Exhaustiveness* 64 (MARINHO *et al.*, 2020). O espaço de simulação envolvendo toda a estrutura proteicas dos alvos através dos eixos (x, y, z) e *size* (x, y, z) está descrito no Apêndice A. Foram realizadas 50 simulações independentes, gerando 20 poses por simulação e a *best pose* foi selecionada utilizando o parâmetro estatístico RMSD (*Root Mean*

Square Deviation) com valores até 2.0 Å (YUSUF *et al.*, 2008) e energia de afinidade inferior a -6.0 kcal/mol (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014; SILVA *et al.*, 2021).

5.3.3.3 Análise de dados

A análise dos dados foi realizada utilizando os códigos UCSF Chimera TM (PETTERSEN *et al.*, 2004), *Discovery studio visualizer* TM viewer (BIOVIA DASSAULT SYSTÈMES, 2016) e *Pymol* (DELANO, 2020). Foram calculadas as interações moleculares e ligações de hidrogênio utilizando o código *Discovery studio visualizer* TM viewer (BIOVIA DASSAULT SYSTÈMES, 2016).

Utilizando a energia de afinidade de cada complexo formado determinamos os valores das constantes de inibição (K_i) através da equação 3 (KADELA-TOMANEK *et al.*, 2021). Avaliamos a força das *H-bonds*, utilizando os valores das distancias entre os átomos doadores e receptores, sendo consideradas ligações *Strong* quando apresentam distâncias entre 2.5-3.1 Å, *Average* entre 3.1-3.55 Å e *Weak* quando apresentam distâncias superiores a 3.55 Å (IMBERTY *et al.*, 1991).

$$K_i = e^{\left(\frac{\Delta G}{RT}\right)} \quad (3)$$

5.4 Ensaio com *Candida* spp.

5.4.1 Avaliação da atividade da hidralazina sobre biofilmes de *Candida* spp.

Foram realizados ensaios para avaliar o potencial deste fármaco sobre biofilmes de *Candida* spp., em microplaca, sob duas diferentes apresentações. No primeiro formato desse ensaio foi avaliado o potencial dos fármacos na inibição da formação do biofilme e o segundo foi a avaliação sobre o biofilme já formado. Também foi avaliado o sinergismo entre hidralazina e itraconazol sobre os biofilmes propostos.

5.4.1.1 Formação dos biofilmes de *Candida spp.* e quantificação da biomassa

Para este ensaio foram selecionadas cepas clínicas de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Inicialmente, foi realizado o ensaio para avaliar a capacidade das cepas em formarem biofilmes através da quantificação da biomassa.

A formação do biofilme foi realizada sobre microplacas de poliestireno de 96 poços, de acordo com a metodologia de Pierce e colaboradores (2008) com pequenas modificações. As cepas de *Candida spp.* foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 35 °C por 24 h. Em seguida, as leveduras foram suspensas em 5 mL de meio caldo *Yeast nitrogen base* (YNB) (Sigma, USA) e incubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e lavadas com PBS por três vezes. Os inóculos foram ajustados de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) (pH 7,0 ± 0,1) tamponado com 0,165 M ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA) obtendo 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/ mL. Posteriormente, foram dispensados 200 µL da suspensão celular na placa de fundo chato. No poço 12 adicionou-se somente RPMI como controle de esterilidade. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após esse período, o sobrenadante foi aspirado e a placa foi lavada delicadamente com PBS por três vezes para remoção das células não aderentes.

Posteriormente foi realizada a quantificação da biomassa, onde foram adicionados 200 µL de metanol puro para fixar as células, após 10 min o metanol foi retirado e adicionado 200 µL de cristal violeta 0,3%, depois de 20 min o cristal violeta foi retirado e adicionado 200 µL de etanol puro. Para leitura da densidade óptica (DO) foram transferidos 100 µL dessa solução para uma nova placa e a leitura foi realizada no leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. Foi considerado controle negativo os poços sem adição de inóculo de levedura.

As leveduras foram classificadas de acordo com a DO em não produtoras de biofilme (DO isolado ≤ DO controle), fracas produtoras de biofilme (DO controle < DO isolado ≤ 2x DO controle), moderadas produtoras de biofilme (2x DO controle < DO isolado ≤ DO controle) e fortemente produtoras (2x DO controle < DO isolado ≤ 4x DO controle) (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000).

5.4.1.2 *Análise da atividade antimicrobiana da hidralazina sobre biofilmes formados de Candida spp.*

Após a análise da capacidade de formação de biofilme pelas cepas de *Candida* spp. foi avaliado a atividade antimicrobiana da hidralazina. As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 35 °C por 24 h. Em seguida, as colônias foram transferidas para caldo YNB e reincubadas sob as mesmas condições. As células foram centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas três vezes com tampão PBS. Os pellets foram ressuspensos e o inóculo foi preparado em caldo RPMI de acordo com a escala de 0,5 de McFarland. Foi adicionado às placas de 96 poços 200 µL do inóculo de cada cepa. As placas foram incubadas por 35 °C por 24 h para formação dos biofilmes.

Depois, as placas foram lavadas para retirada das células não aderentes e foi avaliado a atividade de cada fármaco isolado e associado nas concentrações equivalentes a CIM, 2x CIM, 10x CIM, 20x CIM e 50x CIM de cada cepa.

Para tal, foram adicionados 200 µL de cada fármaco (HID e ITRA) nas concentrações a serem testadas, e para a avaliação do efeito sinérgico foram adicionados 100 µL de cada fármaco (HID + ITRA) em cada poço, totalizando 200 µL. O inóculo em RPMI sem tratamento foi utilizado como controle de crescimento fúngico e o RPMI sem inóculo foi utilizado para controle de esterilidade. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h.

5.4.1.3 *Análise da capacidade da hidralazina em inibir a formação de biofilmes de Candida spp.*

Para avaliar se a hidralazina é capaz de inibir a instalação dos biofilmes de *Candida* spp. o inóculo foi adicionado às placas junto com a hidralazina. Como descrito no item anterior, o inóculo foi preparado e foi então adicionado 100 µL à placa e 100 µL de HID e ITRA isoladamente nas concentrações a serem testadas CIM, 2x CIM, 10x CIM, 20x CIM e 50x CIM. Para a avaliação do efeito sinérgico foi adicionada a placa 100 µL do inóculo, juntamente com 50 µL de cada droga (HID + ITRA) nas concentrações a serem testadas. Para cada cepa foram utilizados controles como descrito anteriormente. A placa foi incubada a 35 °C por 24 h.

Após o período de incubação com os tratamentos, foi realizada a análise de viabilidade celular utilizando a solução de MTT (1 mg/ mL em PBS) / menadiona (1 mM em acetona; Sigma, Alemanha). Para tal, foi adicionado 150 µL em cada poço, e as placas foram incubadas por 35 °C por 18 h, protegidas da luz. Após o período de incubação o corante foi

removido, os poços lavados 3x com PBS e adicionado 200 μ L de DMSO. Após 10 a 15 min, retirou-se 100 μ L de cada poço e transferiu-se para uma nova placa. A leitura foi realizada no leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. A redução de crescimento foi comparada ao poço que corresponde a 100% de crescimento, livre de fármaco (PIERCE *et al.*, 2008). A concentração de HID variou de 32 a 6400 μ g/ mL e a de ITRA de 0,25 a 250 μ g/ mL. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.4.1.4 Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados a partir da média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelos testes de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa *GraphPad prism* versão 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.4.2 Análise morfológica do biofilme de *C. albicans*

Para a visualização dos diferentes aspectos morfológicos dos biofilmes após a exposição aos tratamentos com hidralazina, itraconazol e a associação entre esses fármacos foram feitas imagens utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para a formação do biofilme foi selecionada a cepa de *C. albicans* e o biofilme foi formado em lamínulas de vidro redondas em placas de 6 poços. A cepa foi semeada em ágar Sabouraud dextrose e incubada por 24 h à 35 °C, depois as colônias foram passadas para caldo YNB e incubadas novamente por 24 h. Após esse período os tubos foram centrifugados à 3000 rpm por 5 min e as células lavadas três vezes com tampão PBS. O inóculo foi preparado utilizando o concentrado celular, que foi adicionado ao caldo RPMI até atingir a escala 0,5 de McFarland.

Para avaliação do biofilme formado foi adicionado 1mL de inóculo sobre as lamínulas de vidro, as placas foram incubadas por 48 h a 35 °C. Depois os poços foram lavados 3x com PBS e os fármacos foram adicionados. Para inibição da formação do biofilme 500 μ L do inóculo foi adicionado junto com 500 μ L de cada fármaco e as placas foram incubadas por 48 h a 35 °C.

Após os tratamentos foi realizada a fixação utilizando em cada poço 1 mL da solução de Tampão Cacodilato (Sigma, USA) 0,032 g/mL e Glutaraldeído (Sigma, USA) 2,5%,

as placas foram incubadas *overnight* a 4 °C. Em seguida, foi feita a lavagem com tampão cacodilato 2x e realizado a desidratação com álcool 50%, 70%, 80%, 90% e 100% por 10 minutos, 2x cada. As placas foram levadas a estufa por 20 min para completa secagem e posteriormente foi adicionado hexametildisilazane (HMDS) (Thermo Fisher Scientific, USA) por 30 min, após a retirada as lamínulas foram transferidas para placas limpas e deixadas em dessecador. Para cada lamínula foi realizada a montagem sobre *stubs* e a metalização com ouro (Emitech Q150T). As imagens foram feitas pelo Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG (FEI), na Central Analítica da UFC.

5.4.3 Análise *in silico* da interação de hidralazina com alvos moleculares de *Candida*

A preparação dos ligantes, simulação do *docking*, obtenção e análise de dados foram realizadas como descrito anteriormente no Item 5.3.3.

Para análise do possível mecanismo de ação da hidralazina sobre *Candida* foram selecionadas as estruturas cristalinas dos ligantes: Yeast DNA Polymerase ETA (PDB ID:1JIH) (TRINCAO *et al.*, 2001); J4/5 Loop Group I Introns (PDB ID:1TUT) (ZNOSKO *et al.*, 2004); Yeast telomere protein Cdc13 OB4 (PDB ID: 3RMH) (YU *et al.*, 2012), Superoxide Dismutase 5 (SOD5) (PDB ID: 4N3T) (GLEASON *et al.*, 2014), Exo-B-(1,3)-glucanase (PDB ID: 1EQP) (CUTFIELD; SULLIVAN; CUTFIELD, 2000), Mep2 (PDB ID: 5AEZ) (VAN DEN BERG *et al.*, 2016), CYP51 (PDB ID: 5TZ1) (HARGROVE *et al.*, 2017), Thymidylate Kinase (PDB ID: 5UIV) (SINHA; RULE, 2017) e Yeast Cytochrome BC1 Complex (PDB ID: 1KB9) (LANGE, 2001).

O espaço de simulação do *docking* envolvendo toda a estrutura proteica através dos eixos (x, y, z) e *size* (x, y, z) estão descritos no Apêndice D. As forças de ligações *H-bond* foram consideradas *Strong* quando apresentam distâncias entre 2.5-3.1 Å, *Average* entre 3.1-3.55 Å e *Weak* quando apresentam distâncias superiores a 3.55 Å.

6 RESULTADOS

6.1 Ensaio com *Staphylococcus aureus*

6.1.1 Avaliação da atividade antibacteriana da hidralazina sobre *S. aureus*.

6.1.1.1 Determinação de CIM, CBM e nível de tolerância de hidralazina sobre MRSA e MSSA.

Através dos ensaios de microdiluição em caldo, utilizados para definir a concentração inibitória mínima, foi possível verificar que todas as cepas clínicas de *S. aureus* e ATCCs foram susceptíveis a hidralazina na faixa testada (8 a 2048 µg/mL). A CIM variou de 128 à 1024 µg/mL, sendo que em 75% das cepas a CIM foi 256 µg/mL. Após a microdiluição em caldo, foram realizados os testes para definir a concentração bactericida mínima, onde não há crescimento bacteriano após o cultivo em meio ágar. A CBM variou de 128 à 2048 µg/mL.

A relação entre a CIM e a CBM foi utilizada para avaliar o nível de tolerância e definir o tipo de atividade que a hidralazina exerce sobre as cepas de *S. aureus*. Verificou-se então, que o cálculo do nível de tolerância resultou em valores ≤ 2 para todas as cepas, demonstrando que a HID tem atividade bactericida sobre esses isolados clínicos. Esses dados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima e nível de tolerância de hidralazina sobre *Staphylococcus aureus*.

Isolado	Origem	HIDRALAZINA			
		CIM	CBM	Nível de tolerância	
				CBM/CIM	Interpretação
<i>S. aureus</i> 1	ATCC 6538P	512	512	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 2	ATCC 65398	1024	2048	2	Bactericida
<i>S. aureus</i> 3	Vesícula de pele	256	256	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 4	Sangue	256	256	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 5*	Aspirado traqueal	128	128	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 6	Fluido broncoalvelar	256	512	2	Bactericida
<i>S. aureus</i> 7	Sangue	256	256	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 8	Sangue	256	512	2	Bactericida
<i>S. aureus</i> 9	Cateter	256	256	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 10	Sangue	256	512	2	Bactericida
<i>S. aureus</i> 11	Urina	256	256	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 12	Sangue	256	256	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 13	Aspirado traqueal	256	256	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 14	Sangue	128	128	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 15	Sangue	256	256	1	Bactericida
<i>S. aureus</i> 16	Sangue	256	256	1	Bactericida

*: Cepa usada na investigação do mecanismo de ação

Resultados em µg/ mL

Os valores de CIM e MBC são médias geométricas de experimentos realizados em triplicata

CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima

6.1.1.2 Avaliação da atividade sinérgica de hidralazina sobre *S. aureus*

Inicialmente, foi definido através dos ensaios de microdiluição em caldo as CIM da oxacilina e vancomicina para então avaliar o sinergismo desses fármacos com a hidralazina. A CIM da oxacilina variou de 0,125 a 1024 µg/mL. De acordo com CLSI (2016), é considerado MSSA quando o CIM de OXA ≤ 2 e MRSA quando OXA ≥ 4 . No presente estudo, as cepas padrão foram: *S. aureus* 1: sensível e *S. aureus* 2: resistente. As cepas clínicas *S. aureus* 3 a 8 são MSSA e *S. aureus* 9 a 16 são MRSA.

Para vancomicina é definido VSSA quando a CIM de VAN ≤ 2 , intermeriário entre 4 e 8 e VRSA quando VAN ≥ 4 . As cepas clínicas em estudo foram sensíveis para vancomicina, sendo classificadas como VSSA e apenas uma cepa padrão, *S. aureus* 2, foi classificada como intermerdiária, nenhuma cepa apresentou resistência a vancomicina. O perfil de sensibilidade e a interpretação estão na Tabela 3 a seguir.

A associação entre HID e OXA foi sinérgica em 50% (8) dos isolados, aditiva em 37,5% (6), indiferente em 12,5% (2), e não apresentou efeito antagônico em nenhuma cepa. Na associação entre HID e VAN houve sinergismo em 25% (4) dos isolados e efeito aditivo em 50% (8), indiferente em 25% (4) e não houve antagonismo. A CIM de oxacilina, vancomicina e o FICI das combinações com a hidralazina estão mostrados nas Tabelas 4 e 5 a seguir. Os valores de CIM e FICI são médias geométricas de experimentos realizados em triplicata.

Tabela 3: Perfil de sensibilidade das cepas utilizadas no estudo.

Isolado	Hidralazina	Oxacilina		Vancomicina	
	CIM	CIM	Interpretação	CIM	Interpretação
<i>S. aureus</i> 1	512	0,125	Sensível	1	Sensível
<i>S. aureus</i> 2	1024	8	Resistente	4	Intermediário
<i>S. aureus</i> 3	256	2	Sensível	2	Sensível
<i>S. aureus</i> 4	256	2	Sensível	2	Sensível
<i>S. aureus</i> 5	128	1	Sensível	2	Sensível
<i>S. aureus</i> 6	256	0,5	Sensível	2	Sensível
<i>S. aureus</i> 7	256	2	Sensível	1	Sensível
<i>S. aureus</i> 8	256	2	Sensível	1	Sensível
<i>S. aureus</i> 9	256	256	Resistente	2	Sensível
<i>S. aureus</i> 10	256	64	Resistente	1	Sensível
<i>S. aureus</i> 11	256	256	Resistente	2	Sensível
<i>S. aureus</i> 12	256	64	Resistente	1	Sensível
<i>S. aureus</i> 13	256	128	Resistente	2	Sensível
<i>S. aureus</i> 14	128	256	Resistente	2	Sensível
<i>S. aureus</i> 15	256	64	Resistente	2	Sensível
<i>S. aureus</i> 16	256	1024	Resistente	1	Sensível

CIM: Concentração Inibitória Mínima.
 Resultados em µg/ mL

Tabela 4: Efeitos da associação de hidralazina e oxacilina sobre cepas de *S. aureus*.

Cepas <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	CIM					
	Isolado		Associação			
	HID	OXA	HID	OXA	FICI	Efeito
<i>S. aureus</i> 1	512	0,125	512	0,125	2	Indiferente
<i>S. aureus</i> 2	1024	8	512	4	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 3	256	2	32	0,25	0,25	Sinérgico
<i>S. aureus</i> 4	256	2	32	0,25	0,25	Sinérgico
<i>S. aureus</i> 5	128	1	64	0,5	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 6	256	0,5	128	0,25	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 7	256	2	64	0,5	0,5	Sinérgico
<i>S. aureus</i> 8	256	2	32	0,25	0,25	Sinérgico
<i>S. aureus</i> 9	256	256	64	64	0,5	Sinérgico
<i>S. aureus</i> 10	256	64	128	32	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 11	256	256	128	128	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 12	256	64	64	16	0,5	Sinérgico
<i>S. aureus</i> 13	256	128	128	64	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 14	128	256	128	256	2	Indiferente
<i>S. aureus</i> 15	256	64	64	16	0,5	Sinérgico
<i>S. aureus</i> 16	256	1024	64	256	0,5	Sinérgico

*: Resultados em µg/mL
HID: hidralazina; OXA: oxacilina
CIM: concentração inibitória mínima; FICI: *fractional inhibitory concentration index*

Tabela 5: Efeito da associação de hidralazina e vancomicina sobre MRSA e MSSA.

Cepas <i>Staphylococcus aureus</i>	CIM					
	Isolado		Associação			
	HID	VAN	HID	VAN	FICI	Efeito
<i>S. aureus</i> 1	512	1	256	0,5	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 2	1024	4	512	2	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 3	256	2	256	2	2	Indiferente
<i>S. aureus</i> 4	256	2	64	0,5	0,5	Sinérgico
<i>S. aureus</i> 5	128	2	32	0,5	0,5	Sinérgico
<i>S. aureus</i> 6	256	2	128	1	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 7	256	1	256	1	2	Indiferente
<i>S. aureus</i> 8	256	1	128	0,5	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 9	256	2	256	2	2	Indiferente
<i>S. aureus</i> 10	256	1	128	0,5	1	Sinérgico
<i>S. aureus</i> 11	256	2	128	1	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 12	256	1	256	1	2	Indiferente
<i>S. aureus</i> 13	256	2	64	0,5	0,5	Sinérgico
<i>S. aureus</i> 14	128	2	64	1	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 15	256	2	128	1	1	Aditivo
<i>S. aureus</i> 16	256	1	128	0,5	1	Aditivo

*: Resultados em µg/mL

Os valores de CIM e FICI são médias geométricas de experimentos realizados em triplicata.

HID: hidralazina; VAN: vancomicina

CIM: concentração inibitória mínima; FICI: *fractional inhibitory concentration index*

6.1.1.3 Efeito da hidralazina sobre biofilmes formados de MRSA e MSSA

De acordo com o protocolo de Stepanovic *et al.*, (2000) todas as cepas foram classificadas como aderentes. Na Tabela 6, estão apresentados os resultados da atividade antibacteriana de HID sobre biofilmes, expressos em porcentagem de inibição; SCIM50 e SCIM90. As concentrações de HID utilizadas provocaram redução de 50% da atividade metabólica dos biofilmes de todas as cepas, mas não foram capazes de provocar redução de 90% ou mais. Para OXA os resultados foram semelhantes, as concentrações testadas foram capazes de reduzir 50% da atividade metabólica no biofilme da maioria das cepas, mas não apresentou redução de 90% em nenhuma cepa.

Tabela 6: Resultados da sensibilidade bacteriana de biofilmes de *S. aureus*.

Cepa	HID		OXA	
	SCIM50	SCIM90	SCIM50	SCIM90
<i>S. aureus</i> 1	2048	>2048	64	>1024
<i>S. aureus</i> 2	1024	>2048	64	>1024
<i>S. aureus</i> 3	1024	>2048	64	>1024
<i>S. aureus</i> 4	256	>2048	64	>1024
<i>S. aureus</i> 5	1536	>2048	256	>1024
<i>S. aureus</i> 6	256	>2048	1024	>1024
<i>S. aureus</i> 7	512	>2048	1024	>1024
<i>S. aureus</i> 8	256	>2048	>1024	>1024
<i>S. aureus</i> 9	512	>2048	256	>1024
<i>S. aureus</i> 10	256	>2048	>1024	>1024
<i>S. aureus</i> 11	256	>2048	512	>1024
<i>S. aureus</i> 12	512	>2048	>1024	>1024
<i>S. aureus</i> 13	256	>2048	512	>1024
<i>S. aureus</i> 14	128	>2048	>1024	>1024
<i>S. aureus</i> 15	512	>2048	64	>1024
<i>S. aureus</i> 16	256	>2048	128	>1024

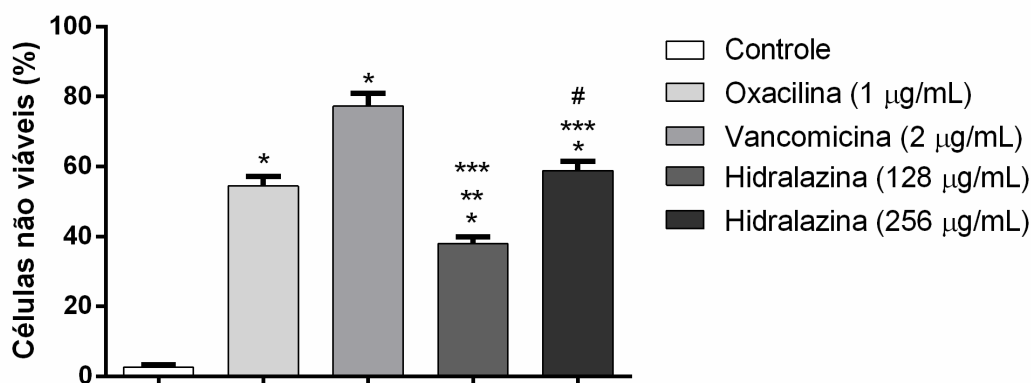
*SCIM: concentração inibitória mínima séssil
HID: hidralazina; OXA: oxacilina
Valores em µg/mL.

6.1.2 Avaliação do possível mecanismo de morte celular

6.1.2.1 Viabilidade celular de *S. aureus* após o tratamento com hidralazina

A análise da integridade de membrana foi realizada após 24 h de tratamento, apresentada na Figura 11, a seguir. Os antibióticos oxacilina e vancomicina provocaram aumentos significativos ($p \leq 0.05$) na porcentagem de células não viáveis (OXA CIM 54,49% e VAN CIM 77,28%), em relação ao controle. Os tratamentos com hidralazina em concentrações referentes a CIM (128 $\mu\text{g/mL}$) e 2x CIM (256 $\mu\text{g/mL}$) provocaram aumento significativo ($p \leq 0.05$) na porcentagem de células não viáveis (HID CIM 37,8%; HID 2x CIM 58,78%), em relação ao controle. Também foi significativo ($p \leq 0.05$) o tratamento de hidralazina 128 $\mu\text{g/mL}$ em relação à oxacilina. Ambos tratamentos com hidralazina foram significativos ($p \leq 0.05$) em relação à vancomicina. Quando comparado as concentrações de hidralazina, também houve diferença significativa ($p \leq 0.05$) na redução de viabilidade celular.

Figura 12: Análise de viabilidade celular por exclusão de iodeto de propídio de *S. aureus* após 24 h de incubação com hidralazina



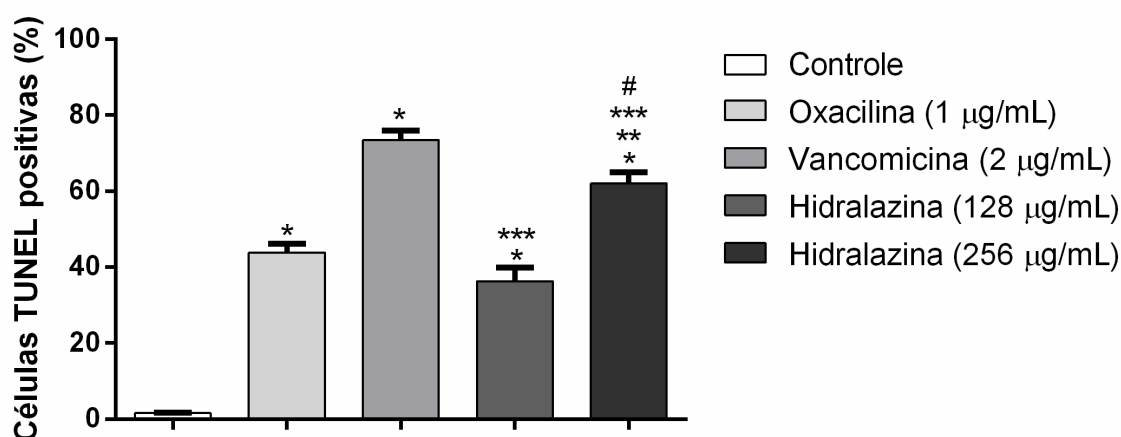
* $p < 0.05$ quando comparado ao controle (caldo BHI) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. ** $p < 0.05$ comparado com o OXA por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. *** $p < 0.05$ comparado com o VAN por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. # $p < 0.05$ comparado com o HID CIM por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

6.1.2.2 Análise de fragmentação de DNA

Os efeitos da hidralzina sobre a quebra do DNA de células de *S. aureus* foram evidenciados pelo ensaio do TUNEL, demonstrado na Figura 12, a seguir. Após 24 h de tratamento, a oxacilina 1 µg/mL e vancomicina 2 µg/mL causaram aumentos significativos ($p < 0.05$) em células TUNEL positivas, 43,91% e 73,48%, respectivamente, em relação ao controle.

O tratamento com a hidralzina nas concentrações 128 µg/mL (CIM) e 256 µg/mL (2x CIM), provocaram aumentos significativos ($p \leq 0,05$) em células TUNEL positivas, 36,25% e 62,07%, respectivamente, em relação ao caldo BHI, utilizado como controle. O aumento de células TUNEL positivas causado pela hidralzina 256 µg/mL foi significativo ($p \leq 0.05$) quando comparado com oxacilina CIM. Quando comparados com vancomicina, os tratamentos realizados com hidralzina também foram significativos ($p \leq 0.05$). Os dois tratamentos realizados com hidralzina foram eficazes, mas 256 µg/mL foi superior e significativamente ($p \leq 0.05$) mais eficaz quando comparado com 128 µg/mL, provocando mais fragmentação ao DNA.

Figura 13: Análise do ensaio TUNEL de *S. aureus* após 24 h de incubação com hidralzina.



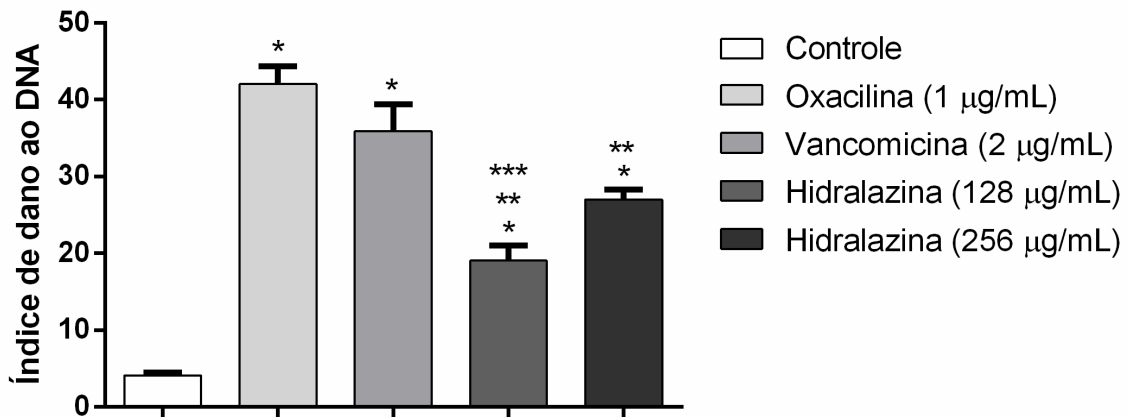
* $p < 0.05$ quando comparado ao controle (caldo BHI) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. ** $p < 0.05$ comparado com o OXA por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. *** $p < 0.05$ comparado com o VAN por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. # $p < 0.05$ comparado com o HID CIM por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

6.1.2.3 Ensaio do Cometa

Através do ensaio do cometa é possível detectar a presença de quebras de fita de DNA, medido pelo índice de dano em unidades arbitrárias (0 - 400). Os antibióticos oxacilina e vancimicina, utilizados no ensaio para comparação, em concentrações referentes a CIM provocaram os maiores índices de dano do DNA, 42,05 e 35,88, respectivamente.

Os tratamentos com hidralazina 128 $\mu\text{g/mL}$ e 256 $\mu\text{g/mL}$ provocaram índices de dano ao DNA crescentes, 19,05 e 27,03, respectivamente, em relação ao controle negativo (caldo BHI). Quando comparados com o tratamento de oxacilina, os tratamentos realizados com hidralazina também foram significativos ($p \leq 0.05$). Em relação ao tratamento com vancomicina, somente hidralazina 128 $\mu\text{g/mL}$ foi significativo ($p < 0.05$). Em análise a quebra total nas fitas de DNA provocado por hidralazina, a diferença entre as concentrações não foi significativa. Todos os resultados estão na Figura 13, a seguir.

Figura 14: Análise de danos no DNA demonstrados pelo ensaio do cometa sobre *S. aureus* após 24 h de incubação com hidralazina.



* $p < 0.05$ quando comparado ao controle (caldo BHI) por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. ** $p < 0.05$ comparado com o OXA por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. *** $p < 0.05$ comparado com o VAN por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

6.1.3 Interação da hidralazina com alvos moleculares de *S. aureus*

Para compreender o possível mecanismo de ação antibacteriano da hidralazina sobre cepas de *S. aureus* foram realizadas simulações da interação entre a molécula de hidralazina e os ligantes celulares de MRSA considerando a RMSD, energia de afinidade e as forças de ligação pelas distâncias entre os átomos. Os ensaios *in silico* demonstraram a formação de complexos entre hidralazina e os ligantes de *S. aureus*, apresentados na Tabela 7, com RMSD na ordem de 0.836 Å a 1.889 Å, energia de afinidade na ordem de -7.6 kcal/mol a -5.8 kcal/mol, Ki na ordem de 2.69×10^{-6} a 5.61×10^{-5} e pKi na ordem de 4.25 a 5.57.

A hidralazina formou complexos de menor energia com os alvos *S. aureus* gyrase complex with DNA (-7.6 kcal/mol), *S. aureus* gyrase (-7.3 kcal/mol) e *S. aureus* TyrRS (-7.5 kcal/mol). Os menores valores de Ki e maiores pKi foram calculados a partir dos complexos formados entre hidralazina e os ligantes *S. aureus* gyrase complex with DNA (Ki 2.69×10^{-6} , pKi 5.57), *S. aureus* gyrase (Ki 4.46×10^{-6} , pKi 5.35) e *S. aureus* TyrRS (Ki 3.18×10^{-6} , pKi 5.49)

A hidralazina interagiu com *S. aureus* gyrase with DNA através de ligações do tipo Hydrophobic com o resíduo Ala 1180D, H-bonds Strong com os resíduos de cadeia lateral polar não carregada Ser 1173D, Gly 1174D, Thr 1181D, Cyt 4F e H-Bond Weak com Gua 18G (Figura 14.a). Com *S. aureus* gyrase, a hidralazina apresentou interações Hydrophobic com o resíduo Met 1113D e Gln 1267D, quatro H-Bonds Strong, com Met 1113D, Val 1268D, Ser 1112. O complexo também apresentou interações π - π T-shaped com Phe 1097D e uma Unfavorable Donor-Donor com Gly 1115D (Figura 14.b). A interação de hidralazina com *S. aureus* TyrRS, ou tyrosyl-tRNA synthetase, ocorreu através de ligações do tipo H-bonds Strong envolvendo Asp 40A e Asp 177A, H-Bond Average com Gln 196A (Figura 14.c).

É importante considerar outras interações de baixa energia apontadas no estudo, como o complexo entre hidralazina e o receptor *S. aureus* FtsA (-6,9 kcal/mol) que também tem baixos valores de Ki (8.77×10^{-6}) e pKi (5.05). Todos os tipos de interações e aminoácidos envolvidos estão apresentados na Tabela 8, a seguir.

Tabela 7: Energia de afinidade e RMSD das interações entre hidralazina e os ligantes de *Staphylococcus aureus*.

Receptor - Hidralazina	Score (kcal/mol)	Ki	pKi	RMSD (Å)
<i>S. aureus</i> FtsA ^a	-6.9	8.77 x 10 ⁻⁶	5.05	0.836
Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR ^b	-6.5	1.72 x 10 ⁻⁵	4.76	0.928
<i>S. aureus</i> gyrase complex with DNA ^c	-7.6	2.69 x 10 ⁻⁶	5.57	1.595
<i>S. aureus</i> gyrase ^d	-7.3	4.46 x 10 ⁻⁶	5.35	0.945
DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*P*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') ^e	-6.2	2.86 x 10 ⁻⁵	4.54	1.229
C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase ^f	-6.8	1.04 x 10 ⁻⁵	4.98	1.007
MtlD ^g	-6.5	1.72 x 10 ⁻⁵	4.76	1.834
Panton-Valentine Leucocidin S Component ^h	-5.8	5.61 x 10 ⁻⁵	4.25	1.751
<i>S. aureus</i> alpha hemolysin ⁱ	-6.0	4.00 x 10 ⁻⁵	4.40	1.263
Acyl-PBP2a ^j	-6.8	1.04 x 10 ⁻⁵	4.98	1.889
<i>S. aureus</i> TyrRS ^k	-7.5	3.18 x 10 ⁻⁶	5.49	0.862

a. Estrutura cristalina de *S. aureus* FtsA - PDB ID: 3WQU.

b. Estrutura cristalina de Wild-type *S. aureus* DHFR - PDB ID: 2W9G

c. Estrutura cristalina de *S. aureus* gyrase complex with DNA - PDB ID: 2XCT

d. Estrutura cristalina de *S. aureus* gyrase - PDB ID: 5BS3

e. Estrutura cristalina de DNA (5'- D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') - PDB ID: 453D

f. Estrutura cristalina de C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase - PDB ID: 2ZCQ

g. Estrutura cristalina de MtlD - PDB ID: 5JNM

h. Estrutura cristalina de Panton-Valentine Leucocidin S Component - PDB ID: 1T5R

i. Estrutura cristalina de *S. aureus* alpha hemolysin - PDB ID: 4IDJ

j. Estrutura cristalina de acyl-PBP2a - PDB ID: 3ZFZ

k. Estrutura cristalina de *S. aureus* TyrRS - PDB ID: 1JIJ

RMSD: Root mean square deviation.

Figura 15: Complexo de interação entre hidralazina (em azul) e os ligantes de *S. aureus*. **a)** *S. aureus* gyrase complex with DNA (PDB:2XCT). **b)** *S. aureus* gyrase (PDB: 5BS3). **c)** *S. aureus* TyrRS (PDB: 1JJJ).

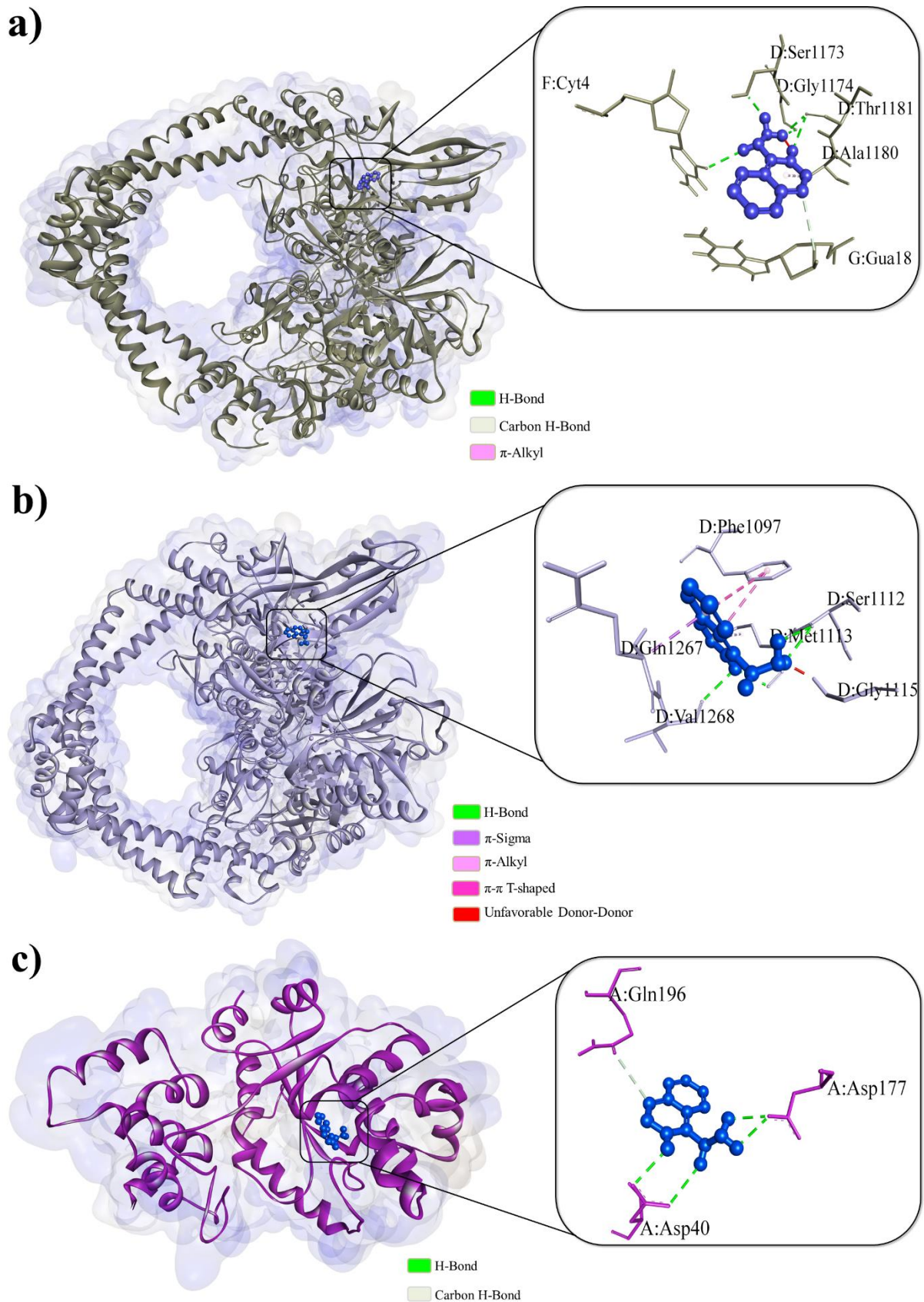


Tabela 8: Tipos de interações e aminoácidos envolvidos nos complexos formados por hidralazina e ligantes de *S. aureus*.

Receptor	Resíduo	Interação	Distância (Å)
<i>S. aureus</i> FtsA ^j	Leu 109B	Hydrophobic	5.13
	Ile 124B	H-Bond	3.46
	Asp 181B	H-Bond	2.16
	Tyr 183B	H-Bond	2.52
	Arg 113B	π -Cation	4.58
	Arg 113B	π -Cation	4.90
	Phe 372B	π - π Stacked	3.92
	Phe 372B	π - π Stacked	4.48
Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR ^k	Leu 20A	Hydrophobic	4.29
	Leu 20A	Hydrophobic	4.49
	Ile 50A	Hydrophobic	4.44
	Ile 50A	Hydrophobic	5.03
	NDP 1160A	Hydrophobic	5.07
	Thr 46A	H-Bond	2.66
	Phe 92A	π - π Stacked	5.30
<i>S. aureus</i> gyrase complex with DNA ^l	Ala 1180D	Hydrophobic	4.59
	Ser 1173D	H-Bond	2.03
	Gly 1174D	H-Bond	2.66
	Thr 1181D	H-Bond	2.25
	Thr 1181D	H-Bond	2.45
	Cyt 4F	H-Bond	2.72
	Gua 18G	H-Bond	3.73
	<i>S. aureus</i> gyrase ^m	Met 1113D	Hydrophobic
Gln 1267D		Hydrophobic	3.65
Ser 1112D		H-Bond	2.53
Ser 1112D		H-Bond	2.84
Met 1113D		H-Bond	2.30
Val 1268D		H-Bond	2.64
Phe 1097D		π - π T-shaped	4.90
Phe 1097D		π - π T-shaped	5.37
Gly 1115D		Unfavorable Donor-Donor	1.84

DNA (5'-D(*CP*GP*CP*G P*AP*AP*TP*TP*CP*GP* CP*G)-3') ⁿ	Cyt 9A	H-Bond	2.54
	Gua 16B	Unfavorable Donor-Donor	3.05
	Gua 16B	Unfavorable Donor-Donor	3.16
C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase ^o	Lys 113A	Hydrophobic	4.14
	Phe 120A	π - π T-shaped	5.03
	Phe 120A	π - π T-shaped	5.43
	Lys 113A	H-Bond	3.04
	Asp 114A	H-Bond	3.22
	Lys 113A	π - Cation	4.24
	Thr 118A	Unfavorable Donor-Donor	1.93
	MtlD ^p	Ile 121A	Hydrophobic
Ala 148A		Hydrophobic	4.45
Ile 197A		Hydrophobic	4.60
Ile 197A		Hydrophobic	5.12
Lys 200A		Hydrophobic	4.67
Leu 201A		Hydrophobic	5.38
Ala 120A		H-Bond	2.30
Ala 120A		H-Bond	2.37
Ser 147A		H-Bond	2.90
Ser 147A		H-Bond	3.10
Ile 197A		H-Bond	3.50
Lys 200A		Pi-Cation	4.96
Val 149A		Unfavorable Donor-Donor	1.92
Panton-Valentine Leucocidin S Component ^q		Ile 100B	Hydrophobic
	Ile 100B	Hydrophobic	5.15
	Lys 99B	H-Bond	2.16
	Ser 132D	H-Bond	2.63
	Ser 132D	Unfavorable Donor-Donor	2.29
<i>S. aureus</i> alpha hemolysin ^r	Ala 62A	Hydrophobic	4.27
	Gln 64A	Hydrophobic	3.47
	Tyr 65A	H-Bond	2.03
	Tyr 65A	H-Bond	2.55
	Tyr 65A	H-Bond	2.70
Acyl-PBP2a ^s	Thr 600A	Hydrophobic	3.90
	Ser 461A	H-Bond	2.60
	Ser 462A	H-Bond	2.29
	Ser 462A	H-Bond	2.79

	Asn 464A	H-Bond	1.97
	Tyr 446A	π - π Stacked	4.03
	Tyr 446A	π - π Stacked	4.75
	Met 641A	π - Sulfur	5.00
<i>S. aureus</i> TyrRS †	Asp 40A	H-Bond	2.54
	Asp 40A	H-Bond	2.83
	Asp 177A	H-Bond	2.34
	Asp 177A	H-Bond	2.41
	Gln 196A	H-Bond	3.40

- j. Estrutura cristalina de *S. aureus* FtsA - PDB ID: 3WQU.
- k. Estrutura cristalina de Wild-type *S. aureus* DHFR - PDB ID: 2W9G
- l. Estrutura cristalina de *S. aureus* gyrase complex with DNA - PDB ID: 2XCT
- m. Estrutura cristalina de *S. aureus* gyrase - PDB ID: 5BS3
- n. Estrutura cristalina de DNA (5'- D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') - PDB ID: 453D
- o. Estrutura cristalina de C (30) carotenoid dehydrosqualene synthase - PDB ID: 2ZCQ
- p. Estrutura cristalina de MtlD - PDB ID: 5JNM
- q. Estrutura cristalina de Panton-Valentine Leucocidin S Component - PDB ID: 1T5R
- r. Estrutura cristalina de *S. aureus* alpha hemolysin - PDB ID: 4IDJ
- s. Estrutura cristalina de acyl-PBP2a - PDB ID: 3ZFZ
- t. Estrutura cristalina de *S. aureus* TyrRS - PDB ID: 1JIJ

6.2 Ensaio com *Candida* spp.

6.2.1 Análise da atividade da hidralazina sobre biofilme de *Candida*

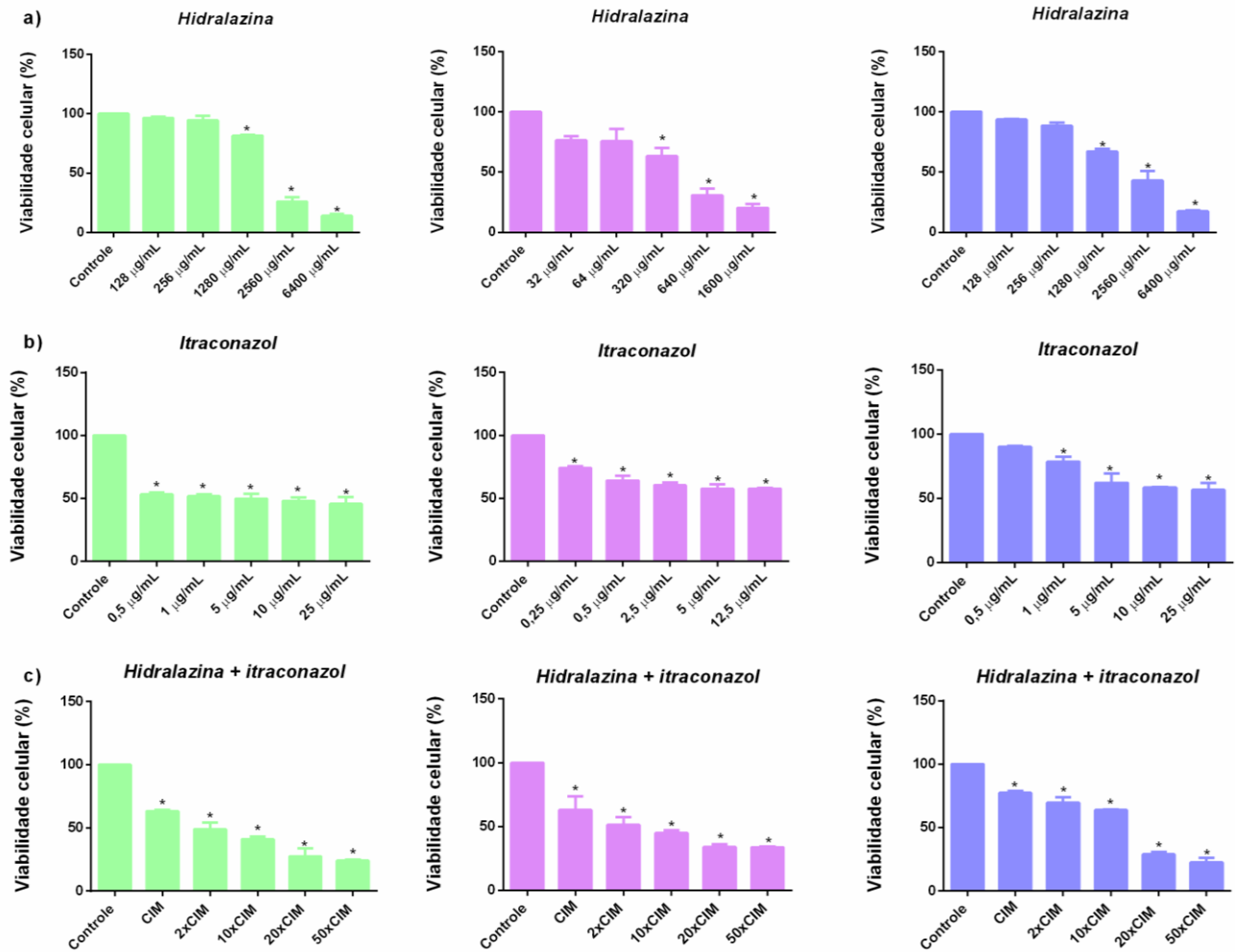
6.2.1.1 Biofilme formado de *Candida* spp.

Os biofilmes formados em microplacas foram tratados com hidralazina, itraconazol e a associação desses fármacos. O tratamento de 24 h com hidralazina 1280 µg/mL, 320 µg/mL e 1280 µg/mL reduziu significativamente ($p < 0.05$) a viabilidade celular dos biofilmes de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, respectivamente, em relação ao controle. Estas concentrações são referentes a 10x CIM e nota-se um efeito dose dependente, mostrado na Figura 15.a, a seguir.

O tratamento com itraconazol, mostrado na Figura 15.b, causou redução significativa ($p < 0.05$) na viabilidade dos biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* em todas as concentrações testadas, enquanto o tratamento de *C. tropicalis* foi significativo ($p < 0.05$) a partir de 1 µg/mL (2x CIM). A atividade antibiofilme do itraconazol se manteve constante apesar do aumento da concentração. A viabilidade dos biofilmes se manteve em torno de 50% em 50x CIM.

As associações de HID e ITRA, apresentadas na Figura 15.c abaixo, mostrou-se eficaz, causando redução significativa da viabilidade em relação ao controle ($p < 0.05$), em todas as concentrações testadas para *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Entretanto, quando comparado aos tratamentos individuais, a associação nem sempre foi benéfica. Para *C. albicans*, houve sinergismo no tratamento com 2x CIM e 10x CIM. Os valores de viabilidade celular, em porcentagem, estão disponíveis no Apêndice B.

Figura 16: Efeito da hidralazina e itraconazol isolados e associados sobre o biofilme de *Candida* spp.

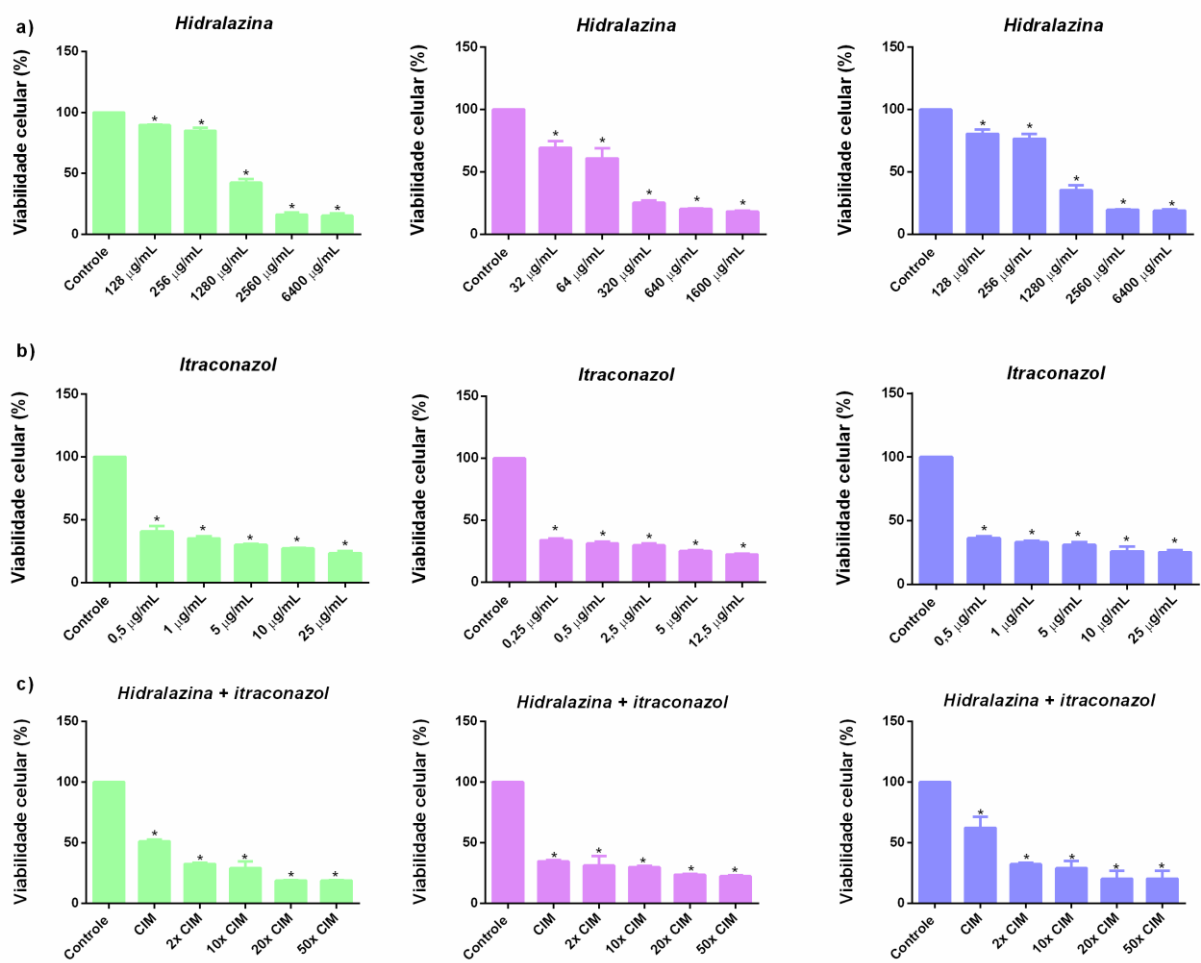


(■) *Candida albicans*; (■) *Candida parapsilosis*; (■) *Candida tropicalis*.

6.2.1.2 Inibição da formação do biofilme por HID e ITRA sozinhos e combinados

O tratamento com HID sobre os filmes em formação provocou redução da viabilidade celular ($p < 0.05$) em todas as concentrações testadas. Em 10xCIM, a redução na viabilidade celular foi superior a 50% nas três espécies de *Candida* (Figura 16.a). O tratamento com ITRA foi muito eficaz, com redução de viabilidade significativa ($p < 0.05$) superiores a 50% em todas as concentrações testadas (Figura 16.b). A associação de HID e ITRA (Figura 16.c) também foi significativa ($p < 0.05$). Os valores de viabilidade celular, em porcentagem, estão disponíveis no Apêndice C.

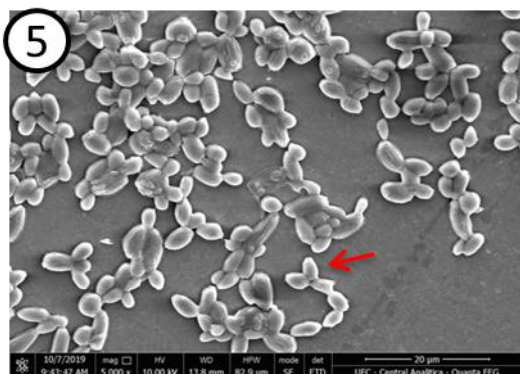
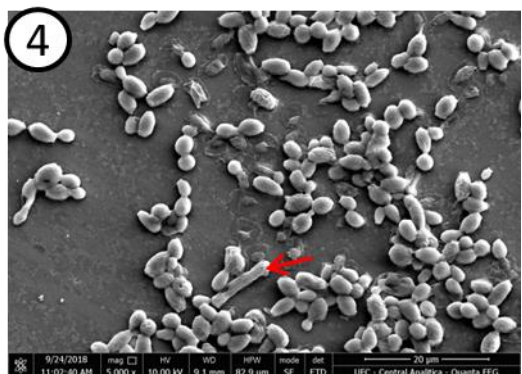
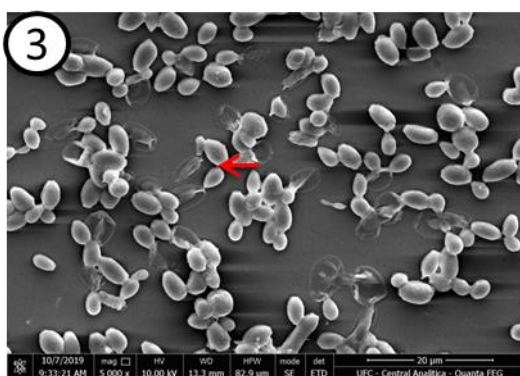
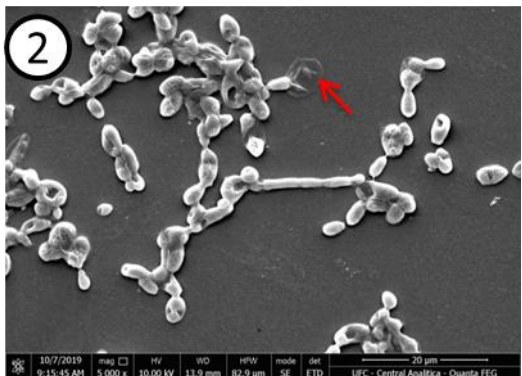
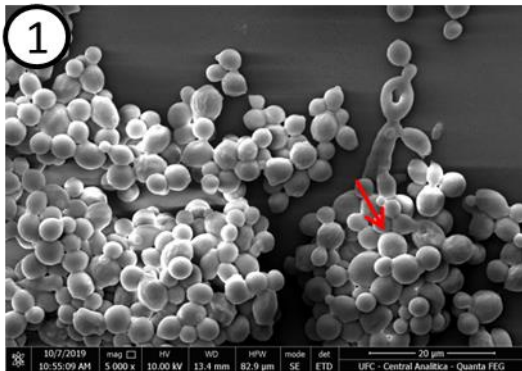
Figura 17: Hidralazina, itraconazol e hidralazina + itraconazol na inibição do biofilme de *Candida* spp.



(■) *Candida albicans*; (■) *Candida parapsilosis*; (■) *Candida tropicalis*.

6.2.2 Avaliação de biofilmes de *Candida albicans* por microscopia eletrônica de varredura

Nas imagens obtidas por MEV dos biofilmes maduros (Figura 18), observamos no controle um biofilme bem estruturado, com muitos blastoconídeos em brotamento. Os tratamentos com hidralazina 20xCIM e CIM provocaram redução no número de células e desestruturação do biofilme. Também é possível visualizar células que perderam o citoplasma, restando apenas a membrana. Os tratamentos com itraconazol 20xCIM e CIM também desestruturaram os biofilmes. Em maior concentração o itraconazol causou redução no tamanho das células. As associações de hidralazina e itraconazol 20xCIM e CIM provocaram a combinação dos danos visualizados nos tratamentos individuais, desestruturação dos biofilmes, redução no número e tamanho das células e muitas sem citoplasma.



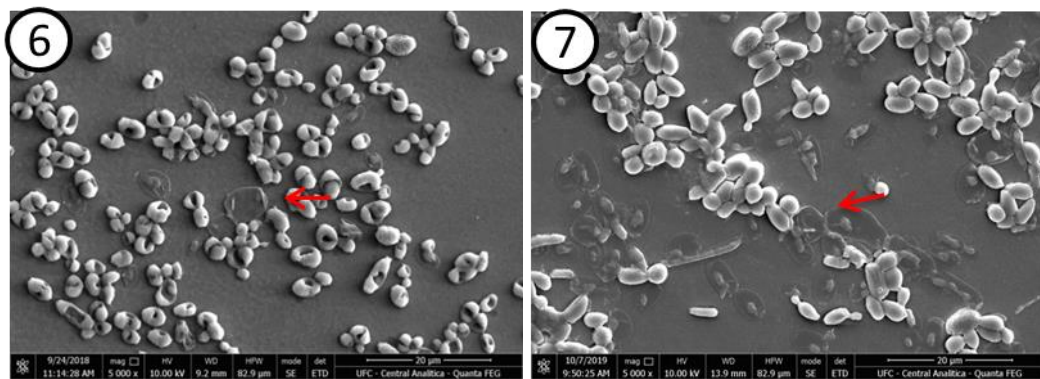
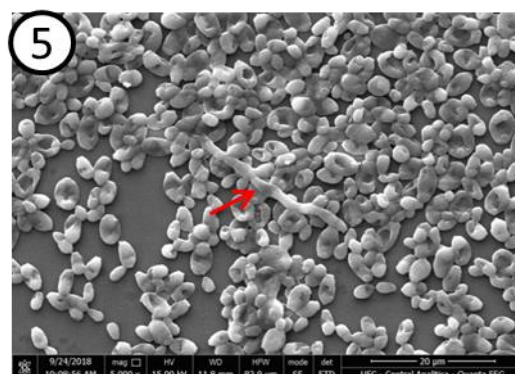
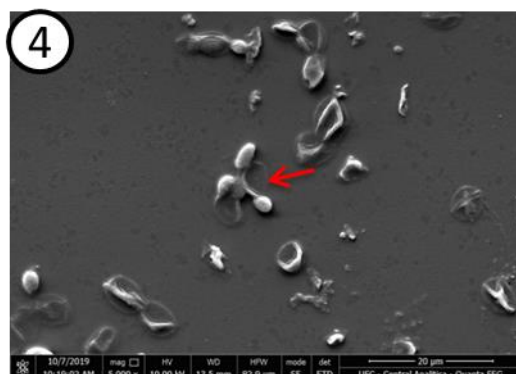
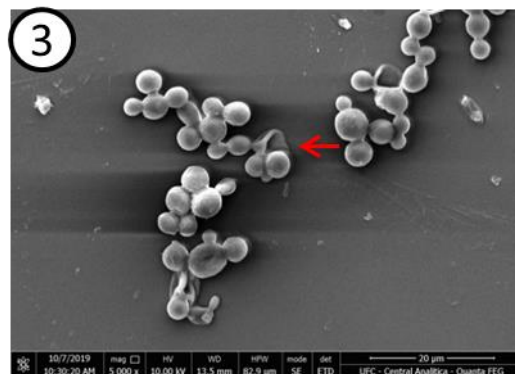
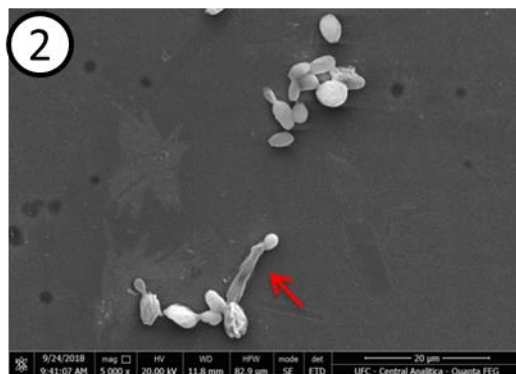
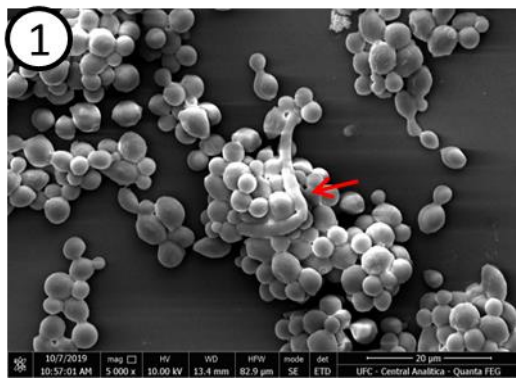


Figura 18: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *Candida albicans*. (1) Controle. (2) Biofilme tratado com HID 2560 µg/mL. (3) Biofilme tratado com HID 128 µg/mL. (4) Biofilme tratado com ITRA 10 µg/mL. (5) Biofilme tratado com ITRA 0,5 µg/mL (6) Biofilme tratado com HID 2560 µg/mL e ITRA 10 µg/mL (7). Biofilme tratado com HID 128 µg/mL e ITRA 0,5 µg/mL. Imagens ampliadas em 5.000x (bar: 20 µm).

Na análise morfológica dos biofilmes em formação (Figura 19), foi possível observar no controle a presença de muitas células organizadas em biofilmes, blastoconídios em brotamento e presença de hifa. A hidralazina em diferentes concentrações (20xCIM e CIM) impediu a formação do biofilme, reduzindo a quantidade de células aderidas em relação ao controle. O itraconazol causou melhor ação anti biofilme em 20xCIM, onde é possível observar que não há células integras. A associação de hidralazina e itraconazol impediu a formação dos biofilmes, causando alterações morfológicas, retração celular e perda de citoplasma. Há também fragmentos celulares.



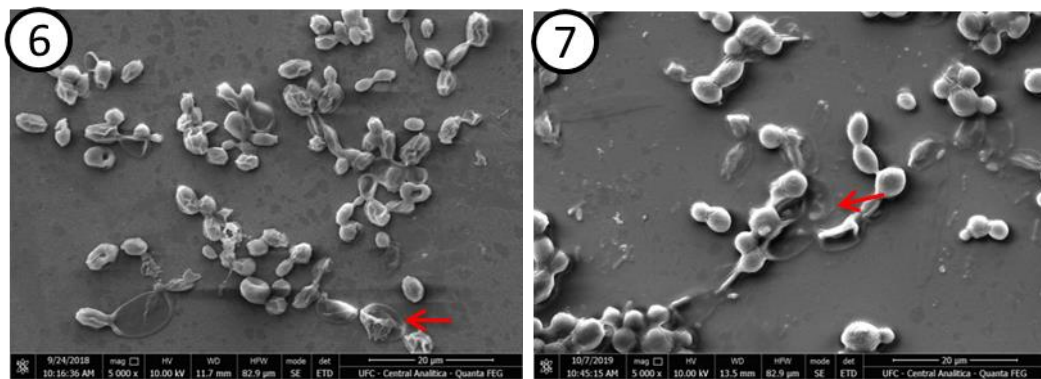


Figura 19: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes em crescimento de *Candida albicans*. (1) Controle com ampliação de 3.000x (barra: 20 µm). (2) Biofilme tratado com HID 2560 µg/mL; (3) Biofilme tratado com HID 128 µg/mL; (4) Biofilme tratado com ITRA 10 µg/mL; (5) Biofilme tratado com ITRA 0,5 µg/mL; (6) Biofilme tratado com HID 2560 µg/mL e ITRA 10 µg/mL; (7) Biofilme tratado com HID 128 µg/mL e ITRA 0,5 µg/mL. Imagens ampliadas em 5.000x (bar: 20 µm).

6.2.3 Análise da simulação do docking entre hidralazina e alvos moleculares de *Candida sp.*

Os complexos formados com os ligantes *C. albicans* apresentaram RMSD na ordem de 0.746 Å a 1.947 Å, energia de afinidade na ordem de -7.2 kcal/mol a -5.1 kcal/mol, Ki na ordem de 5.29×10^{-6} a 1.83×10^{-4} e pKi na ordem de 3.74 a 5.27, mostrados na Tabela 8, a seguir. A análise dos padrões de interação da hidralazina frente a *C. albicans* mostrou que o complexo hidralazina/ *Yeast DNA Polymerase ETA* é formado por quatro interações π - π *Stacked* com os resíduos Trp 306B, uma *H-Bond Strong* envolvendo o resíduo Glu 150B (2.46 Å), uma π - π *T-shaped* com Phe 158B, uma π - *Anion* com o resíduo Glu 150B e uma π - *Cation* com Lys 268B. O complexo hydralazine/J4/5 Loop Group I Introns é formado predominantemente por *H-Bonds Strong* envolvendo os resíduos Gua 7A (1.90 e 2.37 Å), Gua 8A (2.86 Å), Urd 14B (2.00 Å), Urd 15B (2.38 Å), uma interação π - π *T-shaped* e uma *Unfavorable Donor-Donor* com Gua 8A, uma interação *Unfavorable Donor-Donor* com Urd 15B. O complexo hydralazine/Yeast telomere protein Cdc13 OB4 é formado por duas interações hidrofóbicas com o resíduo Pro 668B, quatro *H-Bonds Strong* com os resíduos Pro 668A (1.93 Å), Ile 671A (2.33 e 2.55 Å), Asn 624A (2.56 Å), duas interações π -*Anion* com Glu 673A e uma *Unfavorable Donor-Donor* com Asn 624A. O complexo hidralazina/ Superoxide Dismutase 5 (SOD5) é formado por cinco interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Val 81A, Lys 85A, Ala 163A e três *H-Bonds Strong* envolvendo os resíduos Val 81A (2.01 Å), Pro 82A (2.91 Å) e Asn 164A (2.98 Å). O complexo hidralazina/ Exo-B-(1,3)-glucanase é formado por uma *H-Bond Strong* com o resíduo Glu 27A (2.45 Å), duas interações π - π *T-shaped* com Tyr 29A e uma *Unfavorable Donor-Donor* com His 135A. O complexo hidralazina/ Mep2 é formado por uma interação hidrofóbica com Pro 441A, duas interações π - π *T-shaped* e duas π -*Cation* com His 220A, uma interação *Unfavorable Donor-Donor* com Ser 221A. O complexo hidralazina/ CYP51 é formado por uma interação hidrofóbica, quatro interações π - π *Stacked* e uma interação π -*Cation* com o resíduo HEM 601A. O complexo hidralazina/ Thymidylate Kinase é formado por duas interações π -*Cation* envolvendo o resíduo Arg 92A, duas interações *Salt Bridge; Attractive Charge* com o resíduo Asp 13A, uma interação π - π *T-shaped* com Tyr 100A, quatro interações *Attractive Charge* com os resíduos Glu 159A, Glu 162A, uma *Unfavorable Donor-Donor* com Gln 167A e duas *Unfavorable Metal-Donor* envolvendo o resíduo Mg 304A. O complexo hidralazina/ Yeast Cytochrome BC1 Complex é formado predominantemente por interações hidrofóbicas com os resíduos Leu 198C, Leu 201C, Met 221C e HEM 502C, além de três *H-Bonds Strong* envolvendo os resíduos Gln 22C (2.49 e 2.76

Å), Ser 206C (2.12 Å), duas interações *Unfavorable Donor-Donor*, sendo uma com Gln 22C, uma com Ser 20C e uma interação *Unfavorable Positive-Positive* com Arg 218C.

A hidralazina apresentou energia de ligação mais favorável com os alvos Exo-B-(1,3)-glucanase (-7,1 kcal/mol) e CYP51 (-7,2 kcal/mol), mostrados na Tabela 9. Além disso, apresentam os menores valores de Ki e os maiores valores de pKi (Exo-B-(1,3)-glucanase: Ki $6,26 \times 10^{-6}$ e pKi 5,20; CYP51: Ki $5,29 \times 10^{-6}$ e pKi 5,27).

Tabela 9: Energia de afinidade e RMSD da hidralazina ligada aos receptores de *Candida albicans*.

Ligantes - hidralazina	RMSD (Å)	Score (kcal/mol)	Ki	pKi
<i>Yeast DNA Polymerase ETA</i> ^a	0.746	-6.5	1.72×10^{-5}	4.76
<i>J4/5 Loop Group I Introns</i> ^b	1.152	-5.5	9.31×10^{-5}	4.03
<i>Yeast telomere protein Cdc13 OB4</i> ^c	1.297	-6.9	8.77×10^{-6}	5.05
<i>Superoxide Dismutase 5 (SOD5)</i> ^d	1.021	-5.1	1.83×10^{-4}	3.74
<i>Exo-B-(1,3)-glucanase</i> ^e	1.811	-7.1	6.26×10^{-6}	5.20
<i>Mep2</i> ^f	1.947	-5.9	4.74×10^{-5}	4.32
<i>CYP51</i> ^g	1.754	-7.2	5.29×10^{-6}	5.27
<i>Thymidylate Kinase</i> ^h	1.146	-6.3	2.41×10^{-5}	4.62
<i>Yeast Cytochrome BC1 Complex</i> ⁱ	1.417	-6.8	1.04×10^{-5}	4.98

a. Estrutura Cristalina da Yeast DNA Polymerase ETA - PDB ID: 1JIH.

b. Estrutura Cristalina da J4/5 Loop Group I Introns - PDB ID: 1TUT.

c. Estrutura Cristalina da Yeast telomere protein Cdc13 OB4 - PDB ID: 3RMH.

d. Estrutura Cristalina da Superoxide Dismutase 5 (SOD5) - PDB ID: 4N3T.

e. Estrutura Cristalina da Exo-B-(1,3)-glucanase - PDB ID: 1EQP.

f. Estrutura Cristalina da Mep2 - PDB ID: 5AEZ.

g. Estrutura Cristalina da CYP51 - PDB ID: 5TZ1.

h. Estrutura Cristalina da Thymidylate Kinase - PDB ID: 5UIV.

i. Estrutura Cristalina da Yeast Cytochrome BC1 Complex - PDB ID: 1KB9.

RMSD: Parametro estatístico *Root mean square deviation*.

A hidralazina se ligou a Exo-B-(1,3)-glucanase (Figura 19.a) formando uma forte ligação H com o átomo de oxigênio OE1 208 do resíduo ácido da cadeia lateral Glu 27A (H...OE1-; 2,45 Å), juntamente com duas interações π - Π em forma de T com a cadeia lateral polar

não carregada do resíduo Tyr 29A e uma interação doadora-doadora desfavorável com o resíduo básico da cadeia lateral His 135A. Para CYP51 (Figura 19.b), foram detectadas uma interação hidrofóbica, quatro interações empilhadas π - π e uma interação π -cátion com o grupo prostético HEM 601A.

É importante notar que a hidralazina também apresentou interações relevantes com os alvos da polimerase de levedura ETA (-6,5 kcal/mol); proteína de telômero de levedura Cdc13 OB4 (-6,9 kcal/mol); timidilato quinase (-6,3 kcal/mol); e complexo de citocromo BC1 de levedura (-6,8 kcal/mol). Todos os tipos de aminoácidos e interações são mostrados na Tabela 10, a seguir.

Figura 20: Complexo de interação entre a hidralazina e os alvos: a) Exo-B-(1,3)-glucanase; b) CYP51.

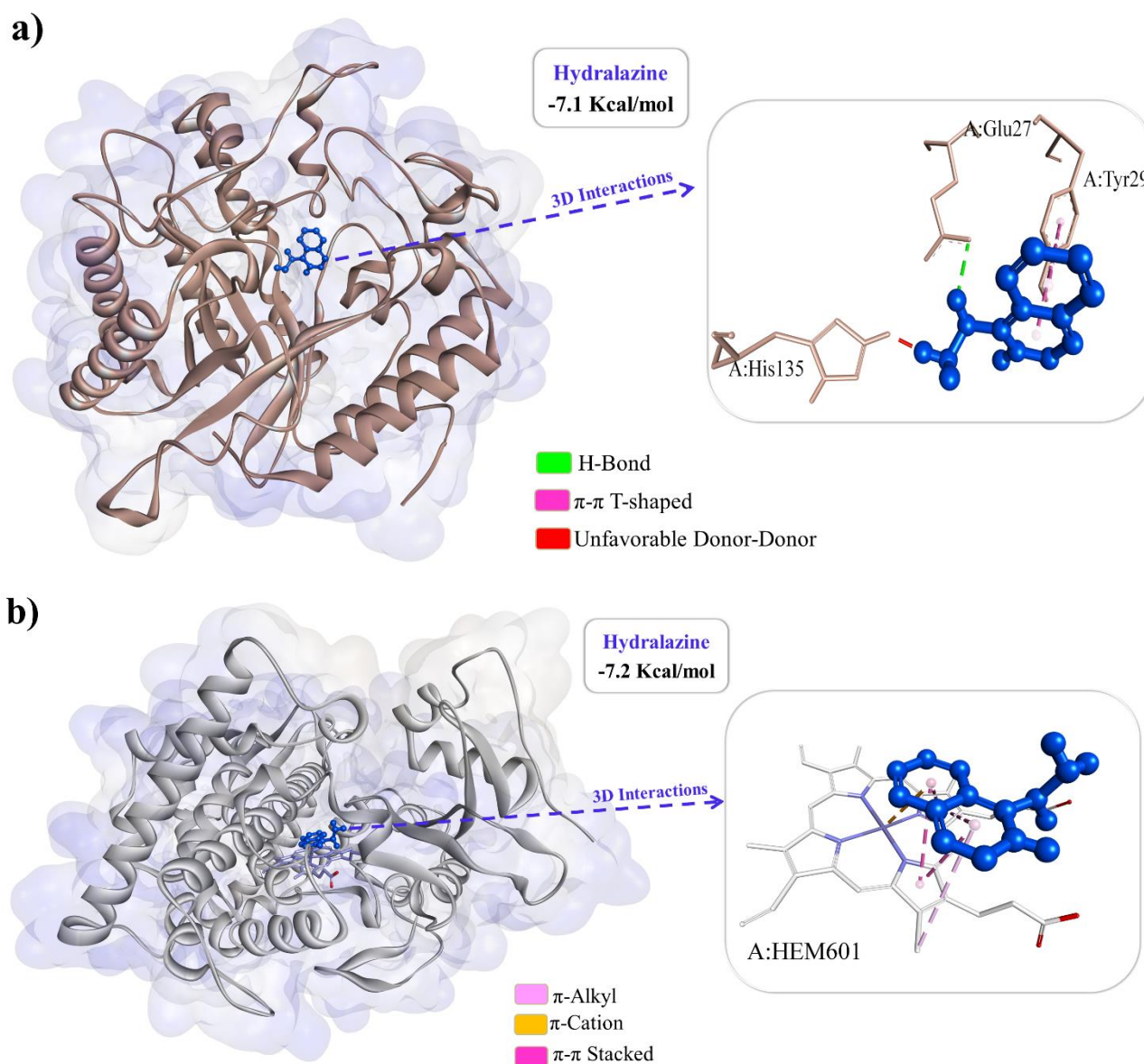


Tabela 10: Aminoácidos e tipos de interações entre hidralazina e os ligantes de *C. albicans*

Receptor-hidralazina	Residuo	Interação	Distancia Å
Yeast DNA Polymerase ETA ^a	Glu 150B	H-Bond	2.46
	Trp 306B	π - π Stacked	3.88
	Trp 306B	π - π Stacked	3.89
	Trp 306B	π - π Stacked	4.21
	Trp 306B	π - π Stacked	4.76
	Phe 158B	π - π T-shaped	5.19
	Glu 150B	π - Anion	4.94
	Lys 268B	π - Cation	3.47
J4/5 Loop Group I Introns ^b	Gua 7A	H-Bond	1.90
	Gua 7A	H-Bond	2.37
	Gua 8A	H-Bond	2.86
	Urd 14B	H-Bond	2.00
	Urd 15B	H-Bond	2.38
	Gua 8A	π - π T-shaped	5.57
	Gua 8A	Unfavorable Donor-Donor	2.07
	Urd 15B	Unfavorable Donor-Donor	2.16
Yeast telomere protein Cdc13 OB4 ^c	Pro 668B	Hydrophobic	4.06
	Pro 668B	Hydrophobic	4.99
	Pro 668A	H-Bond	1.93
	Ile 671A	H-Bond	2.33
	Ile 671A	H-Bond	2.55
	Asn 624A	H-Bond	2.56
	Glu 673A	π -Anion	3.63
	Glu 673A	π -Anion	4.64
Asn 624A	Unfavorable Donor-Donor	2.35	
Superoxide Dismutase 5 (SOD5) ^d	Val 81A	Hydrophobic	4.75
	Val 81A	Hydrophobic	5.48
	Lys 85A	Hydrophobic	4.78
	Ala 163A	Hydrophobic	4.78
	Ala 163A	Hydrophobic	4.92
	Val 81A	H-Bond	2.01
	Pro 82A	H-Bond	2.91

	Asn 164A	H-Bond	2.98
Exo-B-(1,3)-glucanase ^e	Glu 27A	H-Bond	2.45
	Tyr 29A	π - π T-shaped	5.23
	Tyr 29A	π - π T-shaped	5.33
	His 135A	Unfavorable Donor-Donor	1.60
Mep2 ^f	Pro 441A	Hydrophobic	4.83
	His 220A	π - π T-shaped	4.76
	His 220A	π - π T-shaped	5.09
	His 220A	π -Cation	2.93
	His 220A	π -Cation	3.79
	Ser 221A	Unfavorable Donor-Donor	1.71
CYP51 ^g	HEM 601A	Hydrophobic	4.92
	HEM 601A	π - π Stacked	3.94
	HEM 601A	π - π Stacked	4.15
	HEM 601A	π - π Stacked	4.23
	HEM 601A	π - π Stacked	5.55
	HEM 601A	π -Cation	3.64
Thymidylate Kinase ^h	Tyr 100A	π - π T-shaped	4.94
	Arg 92A	π -Cation	3.98
	Arg 92A	π -Cation	4.01
	Asp 13A	Salt Bridge; Attractive Charge	2.44
	Asp 13A	Salt Bridge; Attractive Charge	2.77
	Glu 159A	Attractive Charge	3.97
	Glu 159A	Attractive Charge	4.30
	Glu 162A	Attractive Charge	3.37
	Glu 162A	Attractive Charge	4.50
	Gln 167A	Unfavorable Donor-Donor	2.44
	Mg 304A	Unfavorable Metal-Donor	1.75
	Mg 304A	Unfavorable Metal-Donor	2.18
Yeast Cytochrome BC1 Complex ⁱ	Leu 198C	Hydrophobic	5.25
	Leu 201C	Hydrophobic	3.67
	Leu 201C	Hydrophobic	3.80
	Met 221C	Hydrophobic	3.54
	HEM 502C	Hydrophobic	4.65
	HEM 502C	Hydrophobic	5.03
	Gln 22C	H-Bond	2.49

Gln 22C	H-Bond	2.76
Ser 206C	H-Bond	2.12
Gln 22C	Unfavorable Donor-Donor	1.64
Ser 20C	Unfavorable Donor-Donor	2.38
Arg 218C	Unfavorable Positive-Positive	5.26

- a. Estrutura cristalina da Yeast DNA Polymerase ETA - PDB ID: 1JIH.
- b. Estrutura cristalina da J4/5 Loop Group I Introns - PDB ID: 1TUT.
- c. Estrutura cristalina da Yeast telomere protein Cdc13 OB4 - PDB ID: 3RMH.
- d. Estrutura cristalina da Superoxide Dismutase 5 (SOD5) - PDB ID: 4N3T.
- e. Estrutura cristalina da Exo-B-(1,3)-glucanase - PDB ID: 1EQP.
- f. Estrutura cristalina da Mep2 - PDB ID: 5AEZ.
- g. Estrutura cristalina da CYP51 - PDB ID: 5TZ1.
- h. Estrutura cristalina da Thymidylate Kinase - PDB ID: 5UIV.
- i. Estrutura cristalina da Yeast Cytochrome BC1 Complex - PDB ID: 1KB9.

7 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de mecanismos de resistência acompanha o desenvolvimento de novos antimicrobianos, tornando o tratamento de infecções um desafio global constante. As infecções causadas por patógenos resistentes implicam em aumento mortalidade, tempo de hospitalização e custos em saúde (CASSOL; FALCI; RAMIREZ, 2023). *Staphylococcus aureus* e *Candida* spp. estão dentre os principais patógenos humanos, responsáveis por infecções importantes e elevadas taxas de mortalidade (MAESTRO DE LA CALLE, *et al.*, 2024).

A hidralazina é um fármaco seguro e atualmente estudos de fase I, II e III têm sido conduzidos a cerca reposicionamento da hidralazina como droga epigenética para o tratamento de câncer. Seu potencial sobre células tumorais é devido a capacidade em inibir a metilação do DNA carregado pela DNA metiltransferase (DNMT) (BAUMAN *et al.*, 2014; CANDELARIA *et al.*, 2007, CANDELARIA *et al.*, 2017). Estudos apontam que fármacos inibidores de DNMT tem potencial como antimicrobianos, sendo importantes também na modulação da resposta inflamatória causada por patógenos (MICHKI *et al.*, 2023; VARANASI; REDDY; BHELA, 2017).

No presente estudo a hidralazina mostrou atividade antibacteriana sobre cepas clínicas de *S. aureus*, apresentando CIMs que variaram de 128 a 1028 µg/mL, sendo o CIM para a maioria das cepas 256 µg/mL (75%). Após a avaliação da CBM, foi demonstrado efeito bactericida sobre essas cepas. Foram utilizadas no estudo cepas sensíveis e resistentes a oxacilina (SASM e SARM) e não houve diferença de CIMs, o que pode indicar que a atividade da hidralazina não é afetada pelo mecanismo de resistência. Compostos com atividade antibacteriana que apresentam CIMs de 100 µg/mL a 500 µg/mL podem ser considerados moderados (MORALES *et al.*, 2008). Além disso, na avaliação da citotoxicidade da hidralazina não houve interferência na proliferação celular de fibroblastos murinos L929 após a exposição à hidralazina 1.020 µM (200 µg/mL) (DO NASCIMENTO *et al.*, 2023). Outros autores mostram CIM semelhante no reposicionamento frente a cepas SARM; fluoxetina 255 µg/mL (JOSINO *et al.*, 2021), diclofenaco sódico 156,25 – 1250 µg/mL (QUEIROZ *et al.*, 2021), e etomidato 500– 1000 µg/mL (DO AV SÁ *et al.*, 2020).

A hidralazina tem sido utilizada para síntese química de outros compostos, como hidrazonas esteroidais (MISTRY; SINGH, 2022) e bases de schiff (AWANTU *et al.*, 2020). Esses derivados têm atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenus*, *Candida albicans*, *Streptococcus*

pneumoniae e *Haemophilus influenzae*. Outros estudos apontam a atividade antimicrobiana da hidralazina, *in silico*, frente a SARS-coV-2 (SAHA; GHOSH; PLEWCZYNSKI, 2022) e, *in vitro*, frente a *Cryptococcus neoformans* e *C. gatii* (RANJAN *et al.*, 2021). Mas não identificamos estudos semelhantes que tenham relatado a atividade da hidralazina sobre *S. aureus*.

Nossos resultados sugerem que a associação da hidralazina com outros antibióticos clássicos, como oxacilina e vancomicina, pode ser benéfica. Os β -lactâmicos e os glicopeptídeos atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana, o que pode favorecer a entrada da hidralazina na célula. A hidralazina tem tido sucesso na associação com valproato de magnésio para o tratamento de câncer cervical (CORONEL *et al.*, 2011), mas os dados sobre a associação com antimicrobianos são escassos.

Em relação aos biofilmes maduros de SARM e SASM, concentrações mais altas de hidralazina são necessárias para efeitos mais promissores, já que as concentrações referentes ao range de CIM reduziram a viabilidade, mas não erradicaram completamente. As células sésses estão associadas a infecções crônicas e são de difícil tratamento (LI *et al.*, 2023; OYAMA *et al.*, 2016). Mahdally *et al.*, (2021) mostraram que Squartosin, um composto obtido a partir da síntese química utilizando hidralazina inibe a dispersão do biofilme de *S. aureus* sem afetar a viabilidade, podendo diminuir a frequência de desenvolvimento de resistência.

Em nossos ensaios para compreender o possível mecanismo de ação, verificamos a hidralazina aumentou o número de células não viáveis pelo aumento da exclusão de iodeto de próidio, o que ocorre quando a célula perde a integridade de membrana. O dano a membrana pode ser um evento celular inicial, que acarretaria em alteração na permeabilidade afetando o transporte de íons e do composto ou pode ser um evento secundário e ocorrer durante o processo de morte levando ao vazamento de material celular, consequência de outros danos (BATISTA DE ANDRADE NETO *et al.*, 2019; MARUTESCU, 2023). Essa avaliação é reforçada pela CBM, sugerindo que as células devem estar sob stress ou danificadas, perdendo assim, a capacidade de replicação.

Quando avaliamos a possibilidade de danos ao DNA, verificamos que a hidralazina aumentou o número de células túnel positivas, indicando a presença de finos fragmentos de DNA, observados em células apoptóticas (BAYLES, 2014). Outro achado importante foi a quebra do DNA causado pela hidralazina, identificada no ensaio do cometa. Melton *et al.* (2014) constatou que a hidralazina é capaz de se ligar covalentemente em sítio abásicos do DNA, conferindo propriedades genotóxicas.

Os ensaios *in silico* são uma importante ferramenta que ajudam racionalizar a atividade antimicrobiana e subsidiar o desing de novos agentes, que podem superar a resistência bacteriana dos agentes atuais, além disso, servem como direcionamento para estudos *in vitro* (COLLIN; KARKARE; MAXWELL, 2011).

Na avaliação de interações moleculares entre hidralazina e alvos de *S. aureus* verificamos ligações mais estáveis, ou seja, de menor energia, com *S. aureus gyrase* e *S. aureus gyrase complex with DNA*. Hidralazina forma *H-bonds strong* nos resíduos S1112, M1113, S1173, G1174, T1181 e V1268 de GryA (formada por resíduos 1033 – 1474) (BAX *et al.*, 2010; CHAN *et al.*, 2015) em uma região próxima ao sítio de ligação e clivagem do DNA (Try123), mas não em GryB (HEDDLE; MAXWELL, 2002).

A DNA girase é uma topoisomerase II, composta pelas subunidades A e B (GyrA e GryB) que tem como função clivar e depois religar a fita de DNA durante a replicação bacteriana, resultando em superenrolamentos negativos. A região catalítica da enzima é composta por N terminal de Gyr A e TROPIM de Gyr B que se associam para clivar o segmento G do DNA, formando fosfotirosina, através de ligação covalente com extremidade 5' do DNA (COLLIN; KARKARE; MAXWELL, 2011).

Fármacos que atuam inibindo o ciclo da gyrase são promissores antimicrobianos, pela possibilidade de estabilizar o complexo de clivagem, como o ciprofloxacino, ou inibir a catalise de ATP, como a novobiocina, eventos que impedem a síntese de DNA culminando em morte celular. A possibilidade da hidralazina se ligar na DNA GyrA é fortalecida pelos ensaios do TUNEL e cometa, que mostram quebra no DNA de *S. aureus* após a exposição ao fármaco. Além disso, a ação da hidralazina é capaz de superar a resistência as flouroquinolonas, que ocorre pela substituição de resíduos em GyrA (S84L, A, V, or K; S85P; E86K, or G; E88V, G or K; G106D) diferentes dos resíduos que a hidralazina interage (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA *et al.*, 2022).

Hidralazina também apresentou interações de baixa energia com a TyrRS, se ligando no domínio N- terminal em uma região próxima a região de ligação da tirosina. Hidralazina interagiu através de *H-bond* com Asp 177A, enquanto a tirosina interage com Asp 176OD1 (BRICK; BLOW, 1987). As *aminoacyl-tRNA* sintetases atuam na síntese de proteínas, catalisando aminoácidos específicos ao tRNA. A *tyrosyl-tRNA* sintetase é responsável pelo reconhecimento e catálise de tirosina durante a síntese (BEDOUELLE, 2013). Esse mecanismo de ação é bastante específico e pode gerar ação antimicrobiana potente (QIU *et al.*, 2001). A mupirocina é um antibiótico que atua de forma semelhante, inibindo a isoleucil-tRNA sintetase e apresenta sucesso no tratamento de infecções de pele por sua ação bactericida. Evidência da

interação da hidralazina com TyrRS foi reforçada pelos ensaios *in vitro* do presente estudo, que demonstraram atividade bactericida da hidralazina sobre *S. aureus*.

Outra importante interação observada *in silico*, foi entre a hidralazina e FtsA de *S. aureus*. Essa proteína, um análogo de actina, tem papel fundamental na divisão celular bacteriana. Sua função está relacionada a ancoragem de FtsZ, proteína do divisoma, á membrana citoplasmática desencadeando a citocinese (FUJITA *et al.*, 2014). A ação da hidralazina sobre FtsA pode ser responsável por um importante mecanismo antibacteriano, comprometer a divisão da célula complicando a viabilidade celular. Os ensaios *in vitro* demonstraram danos na membrana, o que pode ter correção com essa interação.

A hidralazina causou danos a membrana das células de *S. aureus* e agiu diretamente no DNA bacteriano. A evidência de interação da hidralazina com *S. aureus gyrase*, *S. aureus TyrRS* e FtsA sugerida nos ensaios *in silico*, possivelmente resultaria em danos ao DNA e apoptose pela interferência na replicação e inibição da catálise da tirosina em tRNA. Através dos ensaios do TUNEL e COMETA, ficou constatado que a hidralazina causa danos ao DNA das células bacterianas, o que hipoteticamente poderia ser causado por essas interações moleculares ou por outros mecanismos ainda não compreendidos.

Nos ensaios para avaliar a atividade antifúngica da hidralazina, foram utilizadas cepas clínicas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol e avaliado a capacidade de inibir biofilmes maduros e em formação. A falha terapêutica no tratamento de infecções fúngicas está associada ao desenvolvimento de resistência ou tolerância aos agentes antifúngicos e a capacidade de *Candida* spp. formar biofilmes (LOHSE *et al.*, 2018).

A hidralazina mostrou ser capaz de reduzir a viabilidade de forma significativa ($p < 0.05$) dos biofilmes formados, em concentrações 10x maiores que a concentração inibitória mínima. O aumento da concentração necessária para erradicar os biofilmes, em relação as células planctônicas, é esperado, já que os biofilmes são comunidades celulares envoltas por matrix extracelular, o que dificulta a difusão do fármaco até as células. Para o gênero *Candida*, a formação de biofilmes é considerada o principal fator de virulência. A adesão e formação de biofilmes nas superfícies de dispositivos, como cateteres, ou nas células do hospedeiro induzem a formação de hifas facilitando a invasão tecidual. Os biofilmes são responsáveis por infecções persistentes e crônicas (MBA; NWEZE, 2020). Outros autores também relatam aumento da concentração necessária para inibição de biofilmes de *Candida*, em relação a sua forma planctônica (HOLANDA *et al.*, 2021).

Na análise da inibição da formação dos biofilmes de *Candida* spp., a hidralazina mostrou melhor efeito. Todas as concentrações testadas reduziram significativamente a

viabilidade celular. Esse efeito era esperado, já que a prevenção da formação é mais eficaz do que a erradicação do biofilme já bem estabelecido. Outros autores concordam que inibir a adesão e o desenvolvimento é a melhor estratégia contra os biofilmes (BOAHEN *et al.*, 2022). Efeito semelhante na análise de outras moléculas (DA SILVA *et al.*, 2020).

Também foi avaliada a associação da hidralazina ao itraconazol frente aos biofilmes de *Candida* spp. formados e em formação. O efeito dos azólicos sobre biofilmes é limitado, uma vez que esta classe de fármacos atua na membrana da levedura, inibindo a 14 alfa desmetilase, impactando a produção de ergosterol. Nos biofilmes, as células estão no estado ambiental mais favorável e é possível que uma porção apresente inibição ou redução da atividade metabólica, reduzindo assim o efeito dos azólicos. A associação da hidralazina com o itraconazol foi benéfica, reduzindo a concentração necessária da hidralazina. É possível que o itraconazol altere a permeabilidade das células, facilitando a entrada da hidralazina, o que resultaria no efeito sinérgico. Nas células com atividade metabólica reduzida ou inativa, o itraconazol não medeia a entrada da hidralazina, o que poderia explicar o efeito indiferente da associação em algumas concentrações testadas. A análise morfológica realizada por microscopia eletrônica de varredura reforça a atividade antibiofilme da hidralazina analisada pela redução do MTT.

Os resultados do *docking* molecular mostraram que a hidralazina teve energia de ligação maior favorável com os alvos exo-B-(1,3) - glucanase (-7,1 kcal/mol) e CYP51 (-7,2 kcal/mol). Os cálculos da constante de inibição (k_i) e do pK_i mostram que a hidralazina necessitaria de uma concentração menor para inibir os ligantes exo-B-(1,3) - glucanase (K_i 6,26 x10⁻⁶, pK_i 5,20) e CYP51 (K_i 5,29 x 10⁻⁶, pK_i 5,27), pois apresentaram os menores valores de K_i e os maiores valores de pK_i [38]

A hidralazina ligada ao alvo exo-B-(1,3) - glucanase formou uma ligação *H bond Strong* com o átomo de oxigênio OE1 208 do resíduo de cadeia lateral ácida Glu 27A (H... OE1-;2.45 Å), duas interações do tipo $\pi - \pi$ *T-shaped* com a cadeia lateral polar não carregada do resíduo Tyr 29A e uma interação *Unfavorable Donor-Donor* como o resíduo de cadeia lateral básico His 135A. A interação da hidralazina com o alvo CYP51 apresentou uma interação hidrofóbica, quatro interações $\pi - \pi$ *Stacked* e uma interação $\pi - cation$ com o grupo prostético HEM 601A, demonstrando assim a interação favorável de hidralazina com ligantes moleculares de *Candida* spp.

Outros autores mostraram que, apesar do sucesso dos antifúngicos azólicos, há uma necessidade urgente de produzir antifúngicos de próxima geração que tenham como alvo o CYP51 para superar a resistência de fungos patogênicos aos medicamentos azólicos existentes,

toxicidade e reações adversas a medicamentos causadas por metabolizadores de medicamentos CYPs humanos (RUMA *et al.*, 2022). A avaliação *in vitro* de hidralazina na CYP51 utilizando cepas com mutação neste gene seria importante para comprovar este mecanismo de ação.

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular e de *docking* molecular demonstraram que o mecanismo de morte celular ocorre principalmente na membrana celular nos alvos Exo-B-(1,3)-glucanase e CYP51 que foram analisados, indicando uma interação favorável da hidralazina com estes alvos e mostrando assim que seu mecanismo de ação pode ocorrer nesses alvos a partir do momento da exposição da superfície celular, o que pode facilitar o reconhecimento fagocitário. Esses achados são consistentes com a ideia de que a camuflagem b-1,3-glucana contribui para a patogenicidade de *Candida* spp. (DE ASSIS *et al.*, 2022). Esses achados também indicam o efeito sinérgico da hidralazina contra *Candida* spp., aumentando a possibilidade de seu uso na terapia antifúngica.

Hidralazina é uma droga epigenética cujo efeito é inibir a metiltransferase 1 (DNMT 1). Já foi reaproveitado para tratamento de câncer, tendo apresentado resultados clínicos promissores (CANDELARIA *et al.*, 2007, CANDELARIA *et al.*, 2017). Estudos anteriores demonstraram que medicamentos que causam alterações epigenéticas em fungos aumentam sua suscetibilidade aos azóis, indicando que a associação desses medicamentos é altamente promissora (LI *et al.*, 2015; RANJAN *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo extramente complexo, onde vários fatores devem ser levados em consideração. O sucesso na utilização do fármaco na prática clínica é baseado na relação entre farmacocinética e farmacodinâmica. Compreender o mecanismo de ação e o efeito, é sem dúvidas, o primeiro passo para a escolha e investimento em uma molécula. No presente estudo, a hidralazina foi avaliada sozinha e em associação, *in vitro* e *in silico*, frente a importantes patógenos humanos, *Staphylococcus aureus* e *Candida* spp. demonstrando grande potencial. Estudos, *in vivo*, devem ser conduzidos para aplicar esses achados e obter uma maior compreensão dos efeitos da hidralazina, e assim prospectar o desenvolvimento de uma formulação para aplicação clínica.

8 CONCLUSÃO

No presente estudo, a avaliação do potencial antimicrobiano da hidralazina mostrou que esse fármaco, em baixas concentrações, tem efeito bactericida sobre *Staphylococcus aureus*, e a associação com oxacilina e vancomicina pode ser benéfica. Além disso, a hidralazina é capaz de reduzir a viabilidade celular de biofilmes maduros de cepas resistentes à meticilina. A hidralazina atua sobre o DNA das células bacterianas desencadeando fragmentação irreversível do mesmo. O *docking* molecular demonstra afinidade de ligação com a DNA girase, tirosil-tRNA sintetase e FtsA. Na análise da inibição de biofilmes de cepas clínicas de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol, a hidralazina mostrou-se eficaz, especialmente na inibição da formação dos biofilmes. A hidralazina demonstra ter afinidade por exo-B-(1,3) - glucanase e CYP51 de *Candida* spp. O redirecionamento de fármacos é a melhor estratégia para o desenvolvimento de novos antimicrobianos, e a análise da hidralazina realizada aqui, demonstra que esse antihipertensivo, apresenta potencial de ser redirecionado para o tratamento de infecções.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

ACHARYA, Y. *et al.* Emerging Roles of Glycopeptide Antibiotics : Moving beyond Gram-Positive Bacteria. **ACS Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 731-744, 2023.

ANDRADE NETO, João Batista *et al.* Screening of Antimicrobial Metabolite Yeast Isolates Derived Biome Ceará against Pathogenic Bacteria, Including MRSA: Antibacterial Activity and mode of Action Evaluated by Flow Cytometry. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 5, p. 459–472, 2015.

ALONSO, R. *et al.* Neumonía Adquirida en la Comunidad en Pacientes Que Requirieron Hospitalización. **MEDICINA (Buenos Aires)**, v. 81, n. 1, p. 37–46, 2021.

ARCE, C. *et al.* Hydralazine target: From blood vessels to the epigenome. **Journal of Translational Medicine**, v. 4, n. 10, p. 1–12, 2006.

AWANTU, A. F. *et al.* Novel Hydralazine Schiff Base Derivatives and Their Antimicrobial, Antioxidant and Antiplasmodial Properties. **International Journal of Organic Chemistry**, v. 10, n. 01, p. 1-16, 2020.

AZOULAY, E. *et al.* Diagnosis of severe respiratory infections in immunocompromised patients. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 2, p. 298–314, 2020.

BARBER, M.; ROZWADOWSKA-DOWZENKO, M. Infections by penicillin-resistant Staphylococci. **The Lancet**, v. 252, n. 6530, p. 641–644, 1948.

BARRETO, J. O. *et al.* Microbiological evaluation of an experimental denture cleanser containing essential oil of *Lippia sidoides*. **Biofouling**, v. 37, n. 1, p. 117–130, 2021.

BARROSO, W. K. S. *et al.* Brazilian guidelines of hypertension - 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 116, n. 3, p. 516–658, 2021.

BATISTA DE ANDRADE NETO, J. *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.

BATISTA DE ANDRADE NETO, J. *et al.* Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, p.104893, 2021.

BAUMAN, J. *et al.* A Phase I Protocol of Hydralazine and Valproic Acid in Advanced, Previously Treated Solid Cancers. **Translational Oncology**, v. 7, n. 3, p. 349–354, 2014.

BAX, B. D. *et al.* Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. **Nature**, v. 466, n. 7309, p. 935–940, 2010.

BAYLES, K. W. Bacterial programmer cell death: making sense of a paradox. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 63–69, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais Rename 2022**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/relacao-nacional-de-medicamentos-essenciais%0Ahttp://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/17/170407M2018final.pdf>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília, DF: Anvisa, v. 2, 2010.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Brasília: Anvisa, 2013. Disponível em: https://w2.fop.unicamp.br/cibio/downloads/biosseguranca_manutencao_equipamentos_laboratorio_microbiologia.pdf. Acesso em: 20 abr. 2024.

BEDOUELLE, H. Tyrosyl-tRNA Synthetases. In: **Madame Curie Bioscience Database**. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6553/>. Acesso em: 16 maio 2023.

BENEDICT, K. *et al.* Survey of incidence, lifetime prevalence, and treatment of self-reported vulvovaginal candidiasis, United States, 2020. **BMC Women's Health**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 2022.

BIOVIA DASSAULT SYSTEMES. **Discovery Studio Visualizer Version 16.1.0**. San Diego: Accelrys Software Inc., 2016.

BLOOMFIELD, L. E. *et al.* Marked increase in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, Western Australia, 2004–2018. **Epidemiology and Infection**, v. 148, p. 1–8, 2020.

BOAHEN, A. *et al.* The Antibiofilm Role of Biotics Family in Vaginal Fungal Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. May, art. 88089, 2022.

BORAL, B. *et al.* A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units with clinical and environmental features. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2019.

BOURASSA-BLANCHETTE, S. *et al.* Incidence, susceptibility and outcomes of candidemia in adults living in Calgary, Alberta, Canada (2010–2018). **BMC Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–9, 2023.

BOYD, N. K.; TENG, C.; FREI, C. R. Brief Overview of Approaches and Challenges in New Antibiotic Development: A Focus On Drug Repurposing. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1–12, 2021.

BRICK, P.; BLOW, D. M. Crystal Structure of a Deletion Mutant of a Tyrosyl-tRNA Synthetase Complexed with Tyrosine. **Journal of Molecular Biology**, v.194, n. 2, p. 287–297, 1987.

BROOKS, G.; CARROL, K.; BUTEL, J.; MORSE, S.; TIMOTHY, M. **MICROBIOLOGIA MÉDICA de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26^a Ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2014.

CANDELARIA, M. *et al.* A phase II study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 9, p. 1529–1538, 2007.

CANDELARIA, M. *at al.* Encouraging results with the compassionate use of hydralazine/valproate (TRANSKRIP™) as epigenetic treatment for myelodysplastic syndrome (MDS). **Annals of Hematology**, v. 96, n. 11, p. 1825–1832, 2017.

CARVALHO, G. C. *et al.* Prevalence of vulvovaginal candidiasis in Brazil: A systematic review. **Medical Mycology**, v. 59, n. 10, p. 946–957, 2021

CASSOL, R.; FALCI, D. R.; RAMIREZ, M. Epidemiology and risk factors for mortality among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremic patients in Southern Brazil. **Jornal de Pediatria**, p. 1–9, 2023.

CAVALCANTI, B. C. *et al.* Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 7, p. 560–568, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection Among Involuntary Participants in Team Sports**. Atlanta: CDC, 2006. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5512a1.htm>. Acesso em: 14 maio 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Identification of *Candida auris***. Atlanta: CDC, 2024. Disponível em: <https://www.cdc.gov/candida-auris/hcp/laboratories/identification-of-c-auris.html>. Acesso em: 14 maio 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* — Michigan, 2002**. Atlanta: CDC, 2002. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5126a1.htm>. Acesso em: 14 maio 2023.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629–641, 2010.

CHAN, P. F. *et al.* Structural basis of DNA gyrase inhibition by antibacterial compounds targeting the ATPase domain. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–13, 2015.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.

COLLIN, F.; KARKARE, S.; MAXWELL, A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 479–497, 2011.

CORONEL, J. *et al.* Hydralazine -- valproate: a repositioned drug combination for the epigenetic therapy of cancer. **Expert Opinion Drug Metabolism & Toxicology**, v. 10, n. 10, p. 1–12, 2014.

CORONEL, J. *et al.* A double-blind , placebo-controlled , randomized phase III trial of chemotherapy plus epigenetic therapy with hydralazine valproate for advanced cervical cancer . Preliminary results. **Medical Oncology**, p. 540–546, 2011.

CORREIA, N. S. Epidemiology of dermatomycoses in children in Northern Mato Grosso 2015-2020. **Mycoses**, v. 65, n. 5, p. 560–566, 2022.

COSTA, E. M. *et al.* A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 1081–1086, 2014.

CSIZMADIA, P. MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web. **Proceedings**, v. 3, n. 1, p. 1775, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ecsoc-3-01775>

CUTFIELD, J. F.; SULLIVAN, P. A.; CUTFIELD, S. M. Minor structural consequences of alternative CUG codon usage (Ser for Leu) in *Candida albicans* exoglucanase. **Protein Engineering**, v. 13, n. 10, p. 735–738, 2000.

DA SILVA, C. R. *et al.* Antifungal activity of β -lapachone against azole-resistant *Candida* spp. and its aspects upon biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 15, n. 16, p. 1441-1454, 2020.

DAS, B. *et al.* Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage-Associated Antibacterial Activity against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains . **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 9, p. 1- 10, 2016.

DAVID, H.; SOLOMON, A. P. Molecular association of *Candida albicans* and vulvovaginal candidiasis: focusing on a solution. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1-15, 2023.

DE ASSIS, L. J. *et al.* Nature of β -1,3-Glucan-Exposing Features on *Candida albicans* Cell Wall and Their Modulation. **mBio**, v. 13, n. 6, p. 1–19, 2022.

DE MEDEIROS, M. A. P. *et al.* Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, p. 1-15, 2019.

DE OLIVEIRA, C. S. *et al.* Clinical and epidemiological aspects of Candidemia in eight medical centers in the state of Parana, Brazil: Parana Candidemia Network. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. 1, p. 101041, 2021.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3**. New York: Schodinger, LLC, 2019.

DO AV SÁ, L. G. *et al.* Etomidate inhibits the growth of MRSA and exhibits synergism with oxacillin. **Future Microbiology**, v. 15, n. 17, p. 1611–1619, 2020.

DO NASCIMENTO, F. B. S. A. *et al.* Synergistic effect of hydralazine associated with triazoles on *Candida* spp. in planktonic cells. **Future Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 661–672, 2023.

DWYER, D. J. *et al.* Article Antibiotic-Induced Bacterial Cell Death Exhibits Physiological and Biochemical Hallmarks of Apoptosis. **Molecular Cell**, v. 46, n. 5, p. 561–572, 2012.

EL-MAHALLAWY, H. A. *et al.* Alarming Increase of Azole-Resistant *Candida* Causing Blood Stream Infections in Oncology Patients in Egypt. **Current Microbiology**, v. 80, n. 11, p. 1–11, 2023.

FARHA, M. A.; BROWN, E. D. Drug repurposing for antimicrobial discovery. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 565–577, 2019.

FOLETTI, D. *et al.* Mechanism of action and in vivo efficacy of a human-derived antibody against staphylococcus aureus α -hemolysin. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 10, p. 1641–1654, 2013.

FORD, D. Effects of COVID-19 hospitalization rates on the incidence of hospital-acquired *Candida* central line-associated bloodstream infection. **American Journal of Infection Control**, v. 52, n. 4, p. 387–391, 2023.

FUJITA, J. *et al.* Crystal structure of FtsA from *Staphylococcus aureus*. **FEBS Letters**, v. 588, n. 10, p. 1879–1885, 2014.

GERMANO, V. E. *et al.* Microrganismos Habitantes Da Cavidade Oral E Sua Relação Com Patologias Orais E Sistêmicas: Revisão De Literatura. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 16, n. 2, p. 91–99, 2018.

GLEASON, J. E. *et al.* *Candida albicans* SOD5 represents the prototype of an unprecedented class of Cu-only superoxide dismutases required for pathogen defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 16, p. 5866–5871, 2014.

GUILLET, V. *et al.* Crystal structure of leucotoxin S component: New insight into the staphylococcal β -barrel pore-forming toxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 41028–41037, 2004.

HAFIZ, T. A. *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* Epidemiology, Resistance Characteristics, and Clinical Outcomes: Understanding of the Recent Three Years' Trends. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, 2022.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5–6, p. 490–519, 1996.

HANWELL, M. D. *et al.* Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 8, 2012.

HARGROVE, T. Y. *et al.* Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 16, p. 6728–6743, 2017.

HASHEMIAN, S. M.; FARHADI, T.; GANJPARVAR, M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. **Journal of Critical Care**, v. 48, p. 254–263, 2018.

HEASLET, H. *et al.* Structural comparison of chromosomal and exogenous dihydrofolate reductase from *Staphylococcus aureus* in complex with the potent inhibitor trimethoprim. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 76, n. 3, p. 706–717, 2009.

HEDDLE, J.; MAXWELL, A. Quinolone-Binding Pocket of DNA Gyrase : Role of GyrB. v. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46, n. 6, p. 1805–1815, 2002.

HOLANDA, M. A. V. *et al.* Evaluation of the antifungal activity in vitro of midazolam against fluconazole-resistant *Candida* spp. isolates. **Future Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 71–81, 2021.

HOU, K. *et al.* Microbiota in health and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1-28, 2022.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; FORLI, S. Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial. **The Scripps Research Institute Molecular**, n. December, p. 1-32, 2012.

HUTTENHOWER, C. *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207–214, 2012.

IKUTA, K. S. *et al.* Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 400, n. 10369, p. 2221–2248, 2022.

IMBERTY, A. *et al.* Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1991.

JEVONS, M. P.; COE, A. W.; PARKER, M. T. Methicillin Resistance in *Staphylococci*. **The Lancet**, v. 281, n. 7287, p. 904–907, 1963.

JORGE, P. *et al.* Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* single- and double-species biofilms. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–20, 2017.

JOSINO, M. A. A. *et al.* Development and in vitro evaluation of microparticles of fluoxetine in galactomannan against biofilms of *S. aureus* methicillin resistant. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, p. 127903, 2024.

KADELA-TOMANEK, M. *et al.* Lipophilicity, pharmacokinetic properties, and molecular docking study on sars-cov-2 target for betulin triazole derivatives with attached 1,4-quinone. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 1-22, 2021.

KAN, S. *et al.* In Vitro Antifungal Activity of Azoles and Other Antifungal Agents Against Pathogenic Yeasts from Vulvovaginal Candidiasis in China. **Mycopathologia**, v. 188, n. 1, p. 99–109, 2023.

KHOSHNOOD, S. et al. A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104415, out. 2020.

KOURTIS, A. P. et al. Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections — United States. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 68, n. 9, p. 214–219, 2020.

LANGE, C. et al. Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc1 complex structure. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 23, p. 6591–6600, 2001.

LARINI, L. **Farmacos e Medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

LEE, Y. et al. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 9, p. 5690–5732, 2021.

LEIGH, D. A. Antibacterial activity and pharmacokinetics of clindamycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 7, suppl. A, p. 3–9, jun. 1981.

LEMOS, L. H. B. et al. Endocardite Infecçiosa em Idosos: Características Distintas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, n. 4, p. 775–781, 2021.

LI, M. et al. Interactions between macrophages and biofilm during *Staphylococcus aureus*-associated implant infection : difficulties and solutions. **Journal of Innate Immunity**, v. 15, n.1, p. 499-515, 2023.

LI, X. et al. The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 7, p. 1993–2003, 2015.

LIAQAT W. et al. Epidemiologic and clinical characteristics of infective endocarditis: a single-center retrospective study in the Bronx, New York. **Infection**, v. 50, n. 5, p. 1349–1361, 2022.

LIMA, R. et al. The emerging threat antifungal-resistant *Candida tropicalis* in humans, animals, and environment. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 3, n. August, p. 1–11, 2022.

LIU, C.-I. et al. Cholesterol Biosynthesis Inhibitor Blocks *Staphylococcus aureus* Virulence. **Science**, v. 319, n. 5868, p. 1391–1394, 2008.

LLOYD-PRICE, J.; ABU-ALI, G.; HUTTENHOWER, C. The healthy human microbiome. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2016.

LOHSE, M. 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.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H.; WHITMAN, W. B. Taxonomic outline of the phylum Firmicutes. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.3, p. 15–17, 2009.

MAESTRO DE LA CALLE, G. et al. Assessment of risk-adjusted mortality ratio (RAMR) in bloodstream infections using all-patient refined diagnosis-related groups (APR-DRGs). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1-10, 2024.

- MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**. 14^a Ed ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MAHDALLY, N. H. *et al.* Staquorsin : A Novel Staphylococcus aureus Agr-Mediated Quorum Sensing Inhibitor Impairing Virulence in vivo Without Notable Resistance Development. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. July, p. 1–12, 2021.
- MARINHO, E. M. *et al.* Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, n. June, p. 1–6, 2020.
- MARUTESCU, L. G. *et al.* Current and Future Flow Cytometry Applications Contributing to Antimicrobial Resistance Control. **Microorganisms**, v. 11, n. 5, p. 1–17, 2023.
- MEDEIROS, M. A. P. de *et al.* Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0221033, 2019.
- MELTON, D. *et al.* Covalent Adduct Formation between the Antihypertensive Drug Hydralazine and Abasic Sites in Double- and Single-Stranded DNA. **Chemical Research in Toxicology**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 2113–2118, out. 2014.
- MBA, I. E.; NWEZE, E. I. Mechanism of Candida pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1797–1819, 2020.
- MCCREERY, R. J.; FLORESCU, D. F.; KALIL, A. C. Sepsis in immunocompromised patients without human immunodeficiency virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 222, p. S156–S165, 2020.
- MEYAHNWI, D.; SIRAW, B. B.; REINGOLD, A. Epidemiologic features, clinical characteristics, and predictors of mortality in patients with candidemia in Alameda County, California; a 2017–2020 retrospective analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1–10, 2022.
- MEZEMIR, R.; OLAYEMI, O.; DESSIE, Y. Incidence, Bacterial Profile and Predictors of Surgical Site Infection After Cesarean Section in Ethiopia, A Prospective Cohort Study. **International Journal of Women’s Health**, v. 15, n. October, p. 1547–1560, 2023.
- MICHKI, N. S. *et al.* DNA methyltransferase inhibition induces dynamic gene expression changes in lung - CD4 + T cells pneumonia. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2023.
- MILOSHEV, G.; MIHAYLOV, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. **Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 513, p. 69–74, 2002.
- MISTRY, S.; SINGH, A. K. Synthesis and in vitro antimicrobial activity of new steroidal hydrazone derivatives. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2022.
- MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. *et al.* Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Staphylococcus aureus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15. p.1-22, 2022.

- MOHAMED, A. O. *et al.* Prevalence of vulvovaginal candidiasis among pregnant women in Africa: A systematic review and meta-Analysis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 16, n. 8, p. 1243–1251, 2022.
- MURPHY, S. E.; BICANIC, T. Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches in Invasive Candidiasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 759405, 2021.
- MORALES, G. *et al.* Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile. **Molecules**, v. 13, n. 4, p. 790–794, 2008.
- NEIDLE, S. *et al.* Symmetric bis-benzimidazoles: new sequence-selective DNA-binding molecules. **Chemical Communications**, n. 10, p. 929–930, 1999.
- NGUYEN, T. *et al.* Targeting Mannitol Metabolism as an Alternative Antimicrobial Strategy Based on the Structure-Function Study of Mannitol-1-Phosphate Dehydrogenase in *Staphylococcus aureus*. **mBio**, v. 10, n. 4, p. 1-17, 2019.
- OBEIDAT, H.; EL-NASSER, Z. The impact of COVID-19 pandemic on healthcare associated infections: A teaching hospital experience. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 51, n. 6, p. 648–653, jun. 2023.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003.
- OLIVEIRA, J. C. De. **Diagnóstico Micológico por Imagens**. 1ª ed. Rio de Janeiro, 2014.
- OLIVERI, R. **Insuficiencia cardíaca**. Buenos Aires: Editora Medica Panamericana, 1999.
- OTERO, L. H. *et al.* How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 42, p. 16808–16813, 2013.
- OTTO, M. MRSA virulence and spread. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 1513–1521, 2013.
- OYAMA, T. *et al.* *Staphylococcus aureus* Survive in Kupffer Cells and Exhibit High Virulence in Mice. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 198, 2016.
- PALESE, E. *et al.* Cutaneous candidiasis caused by *Candida albicans* in a young non-immunosuppressed patient: an unusual presentation. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 32, p. 1–4, 2018.
- PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2016.
- PERFECT, J. R.; GHANNOUM, M. Emerging Issues in Antifungal Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 34, n. 4, p. 921–943, 2020.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PIERCE, C. 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.

PROCOP, G. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico|texto e atlas**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

PULINGAM, T. *et al.* Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170, p. 106103, 2022.

PUSHPAKOM, S. *et al.* Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2019.

QIU, X. *et al.* Crystal structure of *Staphylococcus aureus* tyrosyl-tRNA synthetase in complex with a class of potent and specific inhibitors. **Protein Science**, v. 10, n. 10, p. 2008–2016, 2001.

QUEIROZ, H. A. *et al.* Synergistic activity of diclofenac sodium with oxacillin against planktonic cells and biofilm of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Future Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 375–387, 2021.

RAMLI, S. R. *et al.* Secondary and Co-Infections in Hospitalized COVID-19 Patients: A Multicenter Cross-Sectional Study in Malaysia. **Antibiotics**, v. 12, n. 10, p. 1–15, 2023.

RANJAN, K. *et al.* The role of *Cryptococcus neoformans* histone deacetylase genes in the response to antifungal drugs, epigenetic modulators and to photodynamic therapy mediated by an aluminium phthalocyanine chloride nanoemulsion in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 216, p. 1121146, 2021.

RENGGLI, L. *et al.* Increase in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections in Switzerland: a nationwide surveillance study (2008–2021). **Infection**, v. 51, n. 4, p. 949–957, 2023.

REYES, A. *et al.* Contribution of viral and bacterial infections to senescence and immunosenescence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1–20, 2023.

ROUNTREE, F. and. Infections caused by a particular phage type of *Staphylococcus aureus*. **The Medical Journal of Australia**, n. 80, p. 157, 1955.

RUMA, Y. N. *et al.* Characterisation of *Candida parapsilosis* CYP51 as a Drug Target Using *Saccharomyces cerevisiae* as Host. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, p. 55, 2022.

SADEGHI, G. *et al.* Cutaneous candidiasis in Tehran-Iran: From epidemiology to multilocus sequence types, virulence factors and antifungal susceptibility of etiologic *Candida* species. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 267–279, 2019.

SAHA, I.; GHOSH, N.; PLEWCZYNSKI, D. Identification of Human miRNA Biomarkers Targeting the SARS-CoV-2 Genome. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 642421, 2022.

SANCHEZ, A. *et al.* A rare case report: Cutaneous *Candida tropicalis* infection disguised as a sacral decubitus rash in an immunocompetent individual. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 8, p. 1018–1020, 2021.

SHAH, S.; SHELBURNE, S. Skin and Soft Tissue Infections in Non-Human Immunodeficiency Virus Immunocompromised Hosts. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 1, p. 199–217, 2021.

SHAHINI, A. *et al.* A. Evaluation of epidemiological and microbiological characteristics, clinical features, and outcomes of adult patients with infective endocarditis in Mashhad, Iran. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 17, n. 9, p. 1330–1336, 2023.

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 23–36, 2014.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M.F. G. **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, J. *et al.* Evaluation of the ADME, toxicological analysis and molecular docking studies of the anacardic acid derivatives with potential antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Analytical & Pharmaceutical research**, v. 10, n. 5, p. 177–194, 2021.

SINGH, S. B. *et al.* Tricyclic 1,5-naphthyridinone oxabicyclooctane-linked novel bacterial topoisomerase inhibitors as broad-spectrum antibacterial agents-SAR of left-hand-side moiety (Part-2). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 9, p. 1831–1835, 2015.

SINHA, K.; RULE, G. S. The Structure of Thymidylate Kinase from *Candida albicans* Reveals a Unique Structural Element. **Biochemistry**, v. 56, n. 33, p. 4360–4370, 2017.

SOUZA, L. *et al.* Epidemiology of invasive fungal disease in haematologic patients. **Mycoses**, v. 64, n. 3, p. 252–256, 2021.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

TORRES, L. K.; PICKKERS, P.; POLL, T. Van Der. Sepsis-Induced Immunosuppression. **Annual Review of Physiology**, v. 84, p. 157-181, 2022.

TRINCAO, J. *et al.* Structure of the Catalytic Core of *S. cerevisiae* DNA Polymerase η . **Molecular Cell**, v. 8, n. 2, p. 417–426, 2001.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

TSAI, Y. H. *et al.* Bacteriology and mortality of necrotizing fasciitis in a tertiary coastal hospital with comparing risk indicators of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Vibrio vulnificus* infections: a prospective study. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 2021.

TUON, F. F. *et al.* Antimicrobial Treatment of *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, p. 1–24, 2023.

TURNER, N. A. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203–218, 2020.

VAN DEN BERG, B. *et al.* Structural basis for Mep2 ammonium transceptor activation by phosphorylation. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–11, 2016.

VARANASI, S. K.; REDDY, P. B. J.; BHELA, S. Azacytidine Treatment Inhibits the Progression of Herpes Stromal Keratitis by Enhancing Regulatory T Cell Function. **Journal of Virology**, v. 91, n. 7, p. 1–16, 2017.

VELLA, V. *et al.* *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infection Recurrence Rates in Outpatients: A Retrospective Database Study at 3 US Medical Centers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 5, p. E1045–E1053, 2021.

WANG, Y. *et al.* Immunosenescence, aging and successful aging. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1–18, 2022.

WONGTSCHOWSKI, P. **Industria Química. Riscos e Oportunidades**. São Paulo: Edgard Blucher, 2002.

YAN, J. *et al.* α -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 213–223, 2014.

YANO, J. *et al.* Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: Incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. **BMC Women's Health**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2019.

YU, E. Y. *et al.* Analyses of *Candida* Cdc13 Orthologues Revealed a Novel OB Fold Dimer Arrangement, Dimerization-Assisted DNA Binding, and Substantial Structural Differences between Cdc13 and RPA70. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 1, p. 186–198, 2012.

YUSUF, D. *et al.* An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 2008.

ZNOSKO, B. M. *et al.* Structural features and thermodynamics of the J4/5 loop from the *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* group I introns. **Biochemistry**, v. 43, n. 50, p. 15822–15837, 2004.

APÊNDICE A – PARÂMETROS DE SIMULAÇÃO DOS RECEPTORES DE MRSA.

Parâmetros <i>grid box</i>	Ciclo Celular	DNA				EROs		Fatores de Virulência		Parede Celular	RNA
	<i>S. aureus</i> FtsA ¹	Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR ^k	<i>S. aureus</i> gyrase complex with DNA ^l	<i>S. aureus</i> gyrase ^m	DNA (5'- D>(*CP* GP*CP*GP*AP* P*TP*TP*CP*GP* CP*G)-3') ⁿ	C (30) carotenoid dehydroqualene synthase ^o	MtID ^p	Panton-Valentine Leucocidin S Component ^q	<i>S. aureus</i> alpha hemolysin ^r	Acyl- PBP2a ^s	<i>S. aureus</i> TyrRS ^t
center_x	14.648	-4.854	17.747	-2.314	14.674	18.375	37.829	23.360	-46.689	1.716	-9.592
center_y	13.801	-27.055	37.969	-28.737	21.536	54.992	35.140	71.056	13.249	38.268	18.099
center_z	-12.706	4.446	24.799	-27.418	9.84	38.404	18.453	23.875	40.756	44.556	93.967
size_x	106	90	126	126	52	108	92	126	76	116	74
size_y	82	90	126	126	52	100	102	126	62	84	114
size_z	126	86	126	126	86	116	126	126	126	126	92

- a. The crystal structure of *S. aureus* FtsA - PDB ID: 3WQU.
- b. The crystal structure of Wild-type *S. aureus* DHFR - PDB ID: 2W9G
- c. The crystal structure of *S. aureus* gyrase complex with DNA - PDB ID: 2XCT
- d. The crystal structure of *S. aureus* gyrase - PDB ID: 5BS3
- e. The crystal structure of DNA (5'- D(*CP*GP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') - PDB ID: 453D
- f. The crystal structure of C (30) carotenoid dehydroqualene synthase - PDB ID: 2ZCQ
- g. The crystal structure of MtID - PDB ID: 5JNM
- h. The crystal structure of Panton-Valentine Leucocidin S Component - PDB ID: 1T5R
- i. The crystal structure of *S. aureus* alpha hemolysin - PDB ID: 4IDJ
- j. The crystal structure of acyl-PBP2a - PDB ID: 3ZFZ
- k. The crystal structure of *S. aureus* TyrRS - PDB ID: 1JII

APÊNDICE B – VIABILIDADE CELULAR (%) DOS BIOFILMES DE *CANDIDA* SPP. TRATADOS COM HIDRALAZINA E ITRACONAZOL ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO. * P < 0.05 COMPARADO COM O CONTROLE POR ANOVA SEGUIDO PELO TESTE DE NEWMAN-KEULS.

<i>Candida albicans</i> - tratamento do biofilme formado			
	hidralazina	itraconazol	Itra + hidra
	VIABILIDADE CELULAR (%)		
CONTROLE	100	100	100
CIM	96,61	53,13*	63,14*
2x CIM	94,60	51,73*	48,81*
10x CIM	81,60*	49,66*	40,97*
20x CIM	26,00*	47,99*	27,62*
50x CIM	13,99*	45,71*	24,10*

<i>Candida tropicalis</i> - tratamento do biofilme formado			
	hidralazina	itraconazol	Itra + hidra
	VIABILIDADE CELULAR (%)		
CONTROLE	100	100	100
CIM	93,63	90,16	77,46*
2x CIM	88,46	78,48*	69,65*
10x CIM	67,04*	62,07*	63,86*
20x CIM	42,98*	58,48*	28,99*
50x CIM	17,38*	56,59*	22,63*

<i>Candida parapsilosis</i> - tratamento do biofilme formado			
	hidralazina	itraconazol	Itra + hidra
	VIABILIDADE CELULAR (%)		
CONTROLE	100	100	100
CIM	76,43	74,17*	63,02*
2x CIM	75,70	64,17*	51,48*
10x CIM	63,29*	60,35*	44,79*
20x CIM	30,66*	57,70*	33,97*
50x CIM	20,30*	57,66*	33,83*

APÊNDICE C – VIABILIDADE CELULAR (%) DOS BIOFILMES DE *CANDIDA* SPP. TRATADOS COM HIDRALAZINA E ITRACONAZOL ISOLADOS E EM ASSOCIAÇÃO. * P < 0.05 COMPARADO COM O CONTROLE POR ANOVA SEGUIDO PELO TESTE DE NEWMAN-KEULS.

<i>Candida albicans</i> - inibição da formação do biofilme			
	hidralazina	itraconazol	Itra + hidra
	VIABILIDADE CELULAR (%)		
CONTROLE	100	100	100
CIM	89,57*	40,63*	51,22*
2x CIM	85,11*	35,10*	32,61*
10x CIM	42,36*	30,00*	29,05*
20x CIM	16,14*	27,23*	18,82*
50x CIM	15,22*	23,48*	-

<i>Candida tropicalis</i> - inibição da formação do biofilme			
	hidralazina	itraconazol	Itra + hidra
	VIABILIDADE CELULAR (%)		
CONTROLE	100	100	100
CIM	80,62*	36,46*	62,28*
2x CIM	76,69*	33,28*	32,14*
10x CIM	35,59*	30,93*	29,01*
20x CIM	19,66*	26,00*	20,32*
50x CIM	18,91*	25,26*	-

<i>Candida parapsilosis</i> - inibição da formação do biofilme			
	hidralazina	itraconazol	Itra + hidra
	VIABILIDADE CELULAR (%)		
CONTROLE	100	100	100
CIM	69,50*	33,78*	34,69*
2x CIM	60,93*	31,35*	31,20*
10x CIM	25,27*	29,84*	29,86*
20x CIM	20,35*	25,14*	23,71*
50x CIM	18,32*	22,40*	22,28*

**APÊNDICE D – PARÂMETRO DE SIMULAÇÃO DE LIGANTES DE *CANDIDA*
*ALBICANS***

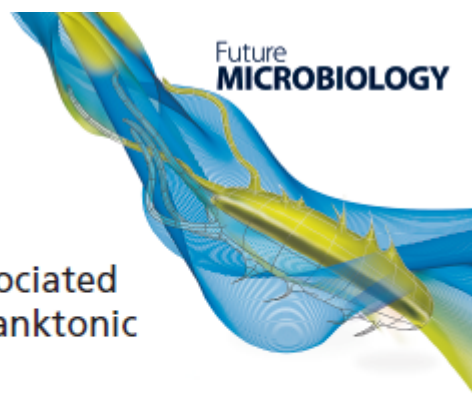
Parâmetros <i>grid</i>	Yeast DNA Polymerase ETA ^a	J4/5 Loop Group I Introns ^b	Yeast telomere protein Cdc13 OB4 ^c	Superoxide Dismutase 5 (SOD5)^d	Exo-B- (1,3)- glucanase ^e	Mep2 ^f	CYP51 ^g	Thymidylate Kinase ^h	Yeast Cytochrome BC1 Complex ⁱ
center_x	58.958	-0.294	-15.264	15.104	35.383	-34.684	55.998	22.808	-16.237
center_y	42.694	-0.318	-7.388	-2.367	33.334	38.813	52.119	17.329	68.306
center_z	23.431	16.758	0.583	-15.281	57.288	-16.304	21.812	8.752	2.345
size_x	102	72	92	102	116	84	72	100	100
size_y	112	74	70	84	112	100	90	106	126
size_z	114	110	126	92	124	126	108	102	112

- a. The crystal structure of Yeast DNA Polymerase ETA - PDB ID: 1JIH.
- b. The crystal structure of J4/5 Loop Group I Introns - PDB ID: 1TUT.
- c. The crystal structure of Yeast telomere protein Cdc13 OB4 - PDB ID: 3RMH.
- d. The crystal structure of Superoxide Dismutase 5 (SOD5) - PDB ID: 4N3T.
- e. The crystal structure of Exo-B-(1,3)-glucanase - PDB ID: 1EQP.
- f. The crystal structure of Mep2 - PDB ID: 5AEZ.
- g. The crystal structure of CYP51 - PDB ID: 5TZ1.
- h. The crystal structure of Thymidylate Kinase - PDB ID: 5UIV.
- i. The crystal structure of Yeast Cytochrome BC1 Complex - PDB ID: 1KB9.

ANEXO A – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NA REVISTA FUTURE MICROBIOLOGY.

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com



Synergistic effect of hydralazine associated with triazoles on *Candida* spp. in planktonic cells

Francisca BSA do Nascimento^{1,2}, Livia GA Valente Sá^{1,2,4}, João B de Andrade Neto^{1,2,4}, Letícia S Sampaio^{1,2}, Helaine A Queiroz^{1,2}, Lisandra J Silva^{1,2}, Vitória PF Cabral^{1,2}, Daniel S Rodrigues^{1,2}, Sidsayde C Pereira⁵, Bruno C Cavalcanti^{2,3}, Jacilene Silva⁶, Emmanuel S Marinho⁶, Helcio S Santos⁶, Manoel O Moraes^{2,3}, Hélio VN Júnior^{1,2} & Cecília R Silva^{*,1,2}

¹School of Pharmacy, Laboratory of Bioprospection of Antimicrobial Molecules (LABIMAN), Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, 60430-160, Brazil

²Drug Research & Development Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, 60430-275, Brazil

³Department of Physiology & Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, 60430-275, Brazil

⁴Christus University Center (LUNICHRISTUS), Fortaleza, Ceará, 60190-180, Brazil

⁵Hospital Dr. Carlos Alberto Studart, Fortaleza, Ceará, 60840-285, Brazil

⁶Department of Chemistry, Group of Theoretical Chemistry & Electrochemistry (GQTE), State University of Ceará, Limoeiro do Norte, Ceará, 62930-000, Brazil

⁷Science & Technology Centre, Course of Chemistry, State University Vale do Acaraú, Sobral, Ceará, 62042-030, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 853 265 8152; cecilia@ufc.br

Objective: To evaluate the antifungal activity of hydralazine hydrochloride alone and in synergy with azoles against *Candida* spp. and the action mechanism. **Methods:** We used broth microdilution assays to determine the MIC, checkerboard assays to investigate synergism, and flow cytometry and molecular docking tests to ascertain action mechanism. **Results:** Hydralazine alone had antifungal activity in the range of 16–128 µg/ml and synergistic effect with itraconazole versus 100% of the fungal isolates, while there was synergy with fluconazole against 11.11% of the isolates. There was molecular interaction with the receptors exo-B(1,3)-glucanase and CYP51, causing reduced cell viability and DNA damage. **Conclusion:** Hydralazine is synergistic with itraconazole and triggers cell death of *Candida* spp. at low concentrations, demonstrating antifungal potential.

Tweetable abstract: We evaluated the effect of hydralazine on *Candida* spp. and observed its fungicidal effect as a consequence of the damage to the fungal DNA, as well as the enhanced effects of association with itraconazole.

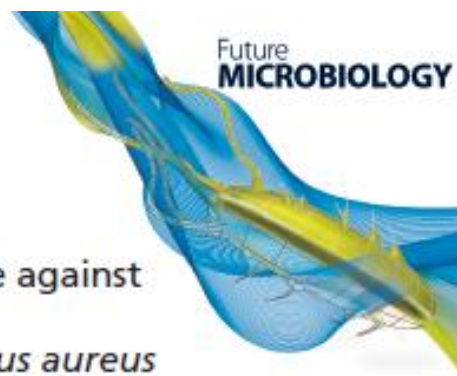
First draft submitted: 17 January 2023; Accepted for publication: 12 May 2023; Published online: 4 August 2023

Keywords: apoptosis • *Candida* spp. • hydralazine hydrochloride • molecular docking • triazoles

ANEXO B – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NA REVISTA FUTURE MICROBIOLOGY.

Preliminary Communication

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com



Antimicrobial activity of hydralazine against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*

Francisca B Stefany Aires do Nascimento^{1,2}, Livia Gurgel do Amaral Valente Sá^{1,2,4}, João B de Andrade Neto^{1,2,4}, Lisandra Juvêncio da Silva^{1,2}, Daniel Sampaio Rodrigues^{1,2}, Vitória P de Farias Cabral^{1,2}, Amanda Dias Barbosa^{1,2}, Lara E Almeida Moreira^{1,2}, Camille R Braga Vasconcelos^{1,2}, Bruno Coelho Cavalcanti^{2,3}, Maria E França Rios^{2,3}, Jacilene Silva¹, Emmanuel Silva Marinho¹, Helcio Silva dos Santos⁵, Jacô RL de Mesquita⁷, Marina Duarte Pinto Lobo⁸, Manoel Odorico de Moraes^{2,3}, Hélio V Nobre Júnior^{1,2} & Cecília Rocha da Silva^{*,1,2}

¹School of Pharmacy, Laboratory of Bioprospection of Antimicrobial Molecules (LABMAN), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60430-372, Brazil

²Drug Research & Development Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60430-275, Brazil

³Department of Physiology & Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60430-275, Brazil

⁴Christus University Center (LINICHRISTUS), Fortaleza, CE, 60190-180, Brazil

⁵Department of Chemistry, Group of Theoretical Chemistry & Electrochemistry (GQTE), State University of Ceará, Limoeiro do Norte, Ceará, 62930-000, Brazil

⁶Science & Technology Centre, Course of Chemistry, State University Vale do Acaraú, Sobral, CE, 62010-560, Brazil

⁷St. Joseph Hospital for Infectious Diseases, Fortaleza, CE, 60455-610, Brazil

⁸Department of Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60440-900, Brazil

*Author for correspondence: Tel: +55 853 265 8152; cecilia@ufc.br

Background: *Staphylococcus aureus* is a human pathogen responsible for high mortality rates. The development of new antimicrobials is urgent. **Materials & methods:** The authors evaluated the activity of hydralazine along with its synergism with other drugs and action on biofilms. With regard to action mechanisms, the authors evaluated cell viability, DNA damage and molecular docking. **Results:** MIC and minimum bactericidal concentration values ranged from 128 to 2048 µg/ml. There was synergism with oxacillin (50%) and vancomycin (25%). Hydralazine reduced the viability of biofilms by 50%. After exposure to hydralazine 2x MIC, 58.78% of the cells were unviable, 62.07% were TUNEL positive and 27.03% presented damage in the comet assay ($p < 0.05$). Hydralazine showed affinity for DNA gyrase and TyrRS. **Conclusion:** Hydralazine is a potential antibacterial.

Plain language summary: *Staphylococcus aureus* is a bacterium that can cause infection. Infections of *S. aureus* are becoming difficult to treat, but developing new drugs is a challenge. Repurposing them may be easier. This study looks at the possibility of using hydralazine, a type of medicine used to treat high blood pressure, against *S. aureus*. The authors found that hydralazine can kill *S. aureus* and can be used with other antibiotics, including oxacillin and vancomycin. Hydralazine interferes with important processes for the multiplication and survival of this bacterium. These results are preliminary but encouraging. Further studies are needed to confirm the use of hydralazine as a new treatment for *S. aureus* infections.

First draft submitted: 18 July 2023; Accepted for publication: 25 September 2023; Published online: 31 January 2024

Keywords: DNA fragmentation • gyrase A • hydralazine • MRSA • MSSA • repurposing • TyrRS