



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

**ROSE ANNY COSTA SILVA**

**ATIVIDADE ANTI-*CANDIDA IN VITRO* DOS INIBIDORES SELETIVOS DA  
RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA FRENTE ÀS CEPAS RESISTENTES AO  
FLUCONAZOL E SUA ATIVIDADE EM ISOLADOS FORMADORES DE  
BIOFILME**

**FORTALEZA**

**2016**

**ROSE ANNY COSTA SILVA**

**ATIVIDADE ANTI-*CANDIDA IN VITRO* DOS INIBIDORES SELETIVOS DA  
RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA FRENTE ÀS CEPAS RESISTENTES AO  
FLUCONAZOL E SUA ATIVIDADE EM ISOLADOS FORMADORES DE  
BIOFILME**

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

**FORTALEZA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S583a Silva, Rose Anny Costa.  
Atividade anti-Candida in vitro dos Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina frente às Cepas Resistentes ao Fluconazol e sua Atividade em Isolados formadores de Biofilme / Rose Anny Costa Silva. – 2016.  
65 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

1. Candida spp.. 2. Biofilme. 3. Fluoxetina. 4. Paroxetina. 5. Sertralina. I. Título.

CDD 616.9

---

**ROSE ANNY COSTA SILVA**

**ATIVIDADE ANTI-CANDIDA *IN VITRO* DOS INIBIDORES SELETIVOS DA  
RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA FRENTE ÀS CEPAS RESISTENTES AO  
FLUCONAZOL E SUA ATIVIDADE EM ISOLADOS FORMADORES DE  
BIOFILME**

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

Aprovada em: 14/01/2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior (Orientador)**

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

**Prof. Dr. Bruno Coelho Cavalcanti (Examinador)**

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

**Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro (Examinador)**

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite (Examinadora)**

Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus.

Aos meus pais, Henrique e Ana Rosa.

Ao meu marido, Bruno.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, pela graça de mais essa conquista, por ter iluminado meu caminho com pessoas maravilhosas e por incomensurável amor e misericórdia.

Aos meus primeiros e eternos mestres, Henrique e Ana Rosa, que são os responsáveis por tudo que sou hoje e não mediram esforços para a realização deste sonho. Pelo amor e confiança que me fortalece todos os dias, mesmo à distância.

Ao meu marido, Bruno Ripardo, pelo companheirismo e paciência, por fazer meus dias mais leves e felizes, por toda a dedicação e amor.

Aos meus irmãos, Rose Heidy e Paulo Henrique, que me acompanharam nessa caminhada com todo carinho, amor e confiança.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helio Vitoriano Nobre Junior, por toda a dedicação, disponibilidade e confiança. Pelos incentivos e ensinamentos que colaboram de forma efetiva em meu crescimento profissional.

Ao prof. Dr. Said Gonçalves, da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio em ceder as moléculas utilizadas no presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro e a Ms. Marina Duarte Pinto Lobo pela dedicação e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos colegas do LABEL, Anderson Ramos, Maria Aparecida, Cecília Rocha, João Batista, Bruna Nascimento, Rosana Campos, Leticia Serpa e Daniel Domingues pela ajuda nos experimentos, incentivo e por deixarem o ambiente de trabalho mais leve.

Ao Grupo de Oração Mãe da Misericórdia, que me levam para mais perto de Deus, intercedem por mim e intercederam por esses anos de estudo. Por serem esse canal tão bonito para Deus e por me ensinarem que temos sempre o que aprender com o nosso próximo.

A Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM) pelas oportunidades adquiridas durante essa pós-graduação.

A todos os professores do Mestrado em Microbiologia Médica – UFC, que contribuíram para minha formação acadêmica e aquisição de conhecimentos.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta realização profissional e pessoal.

“Dai-me, Senhor, agudeza para entender,  
capacidade para reter, método e faculdade  
para aprender, sutileza para interpretar,  
graça e abundância para falar.

Dai-me, Senhor, acerto ao começar, direção  
ao progredir e perfeição ao concluir.”

— São Tomás de Aquino

## RESUMO

Dentre as infecções fúngicas oportunistas, a candidíase tem sido aquela mais documentada nos diferentes grupos de pacientes portadores de imunodeficiências. Muitas vezes essas infecções estão associadas à formação de biofilme, tanto em biomateriais implantados no paciente, como na própria superfície do hospedeiro. No entanto, as drogas antifúngicas disponíveis no mercado são restritas a um pequeno número quando comparadas às antibacterianas. Este fato unido ao aumento da frequência de resistência do gênero *Candida* ao principal tratamento da atualidade, fluconazol, demonstram a necessidade da busca por novas estratégias terapêuticas, que vão desde a descoberta de novas moléculas, até o uso não clássico de medicamentos já disponíveis no mercado. Trabalhos recentes têm demonstrado uma ampla atividade antifúngica dos inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRSs), antidepressivos clássicos. Dentro desse contexto, o objetivo foi avaliar o potencial antifúngico da fluoxetina, sertralina e paroxetina frente às células planctônicas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, bem como seu o mecanismo de ação, e ainda a viabilidade de biofilmes tratados com fluoxetina. A avaliação do efeito antifúngico dos ISRSs em 13 cepas de *Candida* spp. foi determinada pelo método de microdiluição em caldo (M27-A3). Para a avaliação da sensibilidade do biofilme fúngico de *Candida* spp. 24h a fluoxetina, utilizou-se o ensaio colorimétrico com o sal de tetrazólio (MTT) em placas de 96 poços, determinando a viabilidade das células sésseis após o tratamento. Por meio de análises de citometria de fluxo e teste do cometa, foram avaliados danos na membrana, mitocôndria e DNA, que contribuíram para elucidação do provável mecanismo de ação dos ISRSs em cepa representativa de *C. albicans*. As cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol após 24h apresentaram a Concentração Inibitória Mínima (CIM) que variou de 20 – 160 µg/mL para fluoxetina, 10 – 20 µg/mL para sertralina e 10 – 100.8 µg/mL para paroxetina, demonstrando assim, possuírem atividade antifúngica dentro da faixa testada. De acordo com os dados encontrados, os ISRSs causam morte fúngica após danos na membrana plasmática e mitocondrial, que ativam vias de sinalização apoptótica, causando a perda de viabilidade celular de forma dose-dependente em cada uma das drogas testadas. Em relação aos isolados formadores de biofilme, *Candida parapsilosis* apresentou CIM de aproximadamente 40 µg/mL, *C. albicans* de 80 µg/mL, *C. tropicalis* e *C. glabrata* de 160 µg/mL ao serem expostos a fluoxetina, sendo a redução considerada estatisticamente significativa na atividade celular do biofilme ( $P < 0,05$ ). Diante desses resultados, conclui-se que os ISRSs são capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *Candida* spp., tanto na forma planctônica, quanto de biofilme, causando morte celular por apoptose, sendo dados de grande importância na escolha clínica de antidepressivos para pacientes que se enquadram nos grupos de risco para infecções fúngicas.

Palavras chave: *Candida* spp., biofilme, fluoxetina, paroxetina, sertralina, fluconazol, citometria de fluxo



## ABSTRACT

It is known that candidiasis has been the most documented disease in different groups of patients with immunodeficiency, among all the opportunistic fungal infections diseases. Oftentimes, these infections are related to a biofilm formation, that can be originated from implanted biomaterials or reveal on the host surface. However, antifungal drugs available on the market are restricted and limited to a low number compared to antibacterial drugs. Adding this fact to the increase resistance of the genre *Candida* regarding the main treatment today, fluconazole, the need for a research on new therapeutic strategies is evident, from the learning of other molecules to non-classic use of already available medicine. Recent researches have revealed a wide antifungal activity of selective serotonin reuptake inhibitor (SSRIs), classic antidepressants. Aware of this context, the main goal is to evaluate antifungal potential of fluoxetine, sertraline, and paroxetine facing *Candida* spp. planktonic cells resistant to fluconazole, as well as its action mechanism and the viability of biofilms treated with fluoxetine. The evaluation of the antifungal effect on the SSRIs on 13 strains of *Candida* spp. was determined using broth microdilution technique (M27-A3). A sensibility evaluation of *Candida* spp. fungal biofilm within 24h of fluoxetine was made the colorimetric assay with the tetrazolium salt (MTT) assay in 96-well plates, defining then, the viability of sessile cells after treatment. By means of flow cytometry and comet assay analysis, damages on membrane, mitochondria and DNA, that contributed to the elucidation of the probable action mechanism of SSRIs on *C. albicans* representative strains were studied. All strains of *Candida* spp. resistant to fluconazole showed, after 24h, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), which varied between 20 – 160 µg/mL for fluoxetine, 10 – 20 µg/mL for sertraline, and 10 – 100,8 µg/mL for paroxetine, concluding then, that all of them present antifungal activity within the tested range. According the data found, the SSRIs cause fungal death after plasmatic membrane and mitochondrial damages, which activate apoptotic-signalling pathways, resulting loss of cellular viability on dose-dependent form in each one of the tested drugs. Regarding the isolated biofilm formers, *Candida parapsilosis* presented MIC of approximately 40 µg/mL, *C. albicans* with 80 µg/mL, *C. tropicalis* and *C. glabrata* with 160 µg/mL when exposed to fluoxetine, this reduction was considered statistically significant at the cellular activity of the biofilm ( $P < 0.05$ ). Therefore, it is concluded that SSRIs are capable of inhibit the growth *in vitro* of *Candida* spp., both in planktonic form, as biofilm, inducing cellular death by apoptosis, this set of data acknowledge the great importance of antidepressant options for patients that compose risk groups for fungal infections.

Key-words: *Candida* spp., biofilm, fluoxetine, paroxetine, sertraline, fluconazole, flow cytometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular dos ISRSs.....	31
Figura 2 - Redução do número de células viáveis em cepa de <i>C. albicans</i> resistente ao FLC tratadas com SER, FLX, PAR.....	41
Figura 3 - Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial em cepa de <i>C. albicans</i> resistente ao FLC tratadas com SER, FLX, PAR.....	42
Figura 4 - Marcação da fosfatidilserina com anexina V em cepas de <i>C. albicans</i> resistentes ao FLC tratadas com SER, FLX, PAR.....	43
Figura 5 - Avaliação do índice de dano ao DNA em células de <i>C. albicans</i> resistente ao FLC tratadas com SER, FLX, PAR.....	44
Figura 6 - Atividade da fluoxetina frente ao biofilme de <i>Candida</i> spp.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito antifúngico da FLX, PAR, SER frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol.....	37
Tabela 2 - Atividade citotóxica da SER, FLX, PAR.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\psi_m$  – Potencial transmembrana mitocondrial

5-HT - Serotonina

AIDS - *Adquired immunodeficiency syndrome* (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

AnfoB – Anfotericina B

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

CDR – *Candida drug resistance*

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CN – Controle negativo

CVV – Candidíase vulvo-vaginal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNAr – DNA ribossômico

EPS – Substância extracelular polimérica

FITC- Fluoresceína

FLC – Fluconazol

FLX - Fluoxetina

HEPES - [N - (2-Hidroxietil) piperazina-N' - (ácido 2-etanosulfônico)]

IC – Intervalo de confiança

IFI – Infecções fúngicas invasivas

ISRSs – Inibidores seletivos de recaptção da serotonina

ITS – *Interspace regions* (Regiões espaçadoras)

LABEL – Laboratório de Bioprospecção Experimental em Leveduras

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

MDR – *Multidrug resistance*

MOPS – Ácido morfolinopropanosulfônico

MTT - Brometo de difeniltetrazólio – [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo]

NE – Sem efeito

PAR - Paroxetina

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – Reação de cadeia de polimerase

PI – Iodeto de propídio

PPB – Tampão fosfato de potássio

R – Resistente

Rh123 – Rodamina 123

RNA – Ácido ribonucleico

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

S – Sensível

SDD – Sensível dose-dependente

SER – Sertralina

TACTH – Transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas

XTT - Hidróxido de tetrazólio – [2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil)-5-[(Fenilamino) carbonil]-2H-tetrazolio-hidroxido]

YPD – *Yeast Peptone Dextrose*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1 Infecções fúngicas	16
2.2 Histórico do gênero <i>Candida</i>	18
2.3 Identificação do patógeno	19
2.4 Fatores de virulência do gênero <i>Candida</i>	21
2.5 Arsenal farmacológico	24
2.6 Resistência aos azólicos	25
2.7 Sensibilidade aos antifúngicos de células suspensas e de biofilmes	27
2.8 Importância de novas estratégias terapêuticas	29
2.9 Inibidores seletivos da recaptação da serotonina	29
<b>3. HIPÓTESES</b>	<b>32</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
4.1 Objetivo Geral	32
4.2. Objetivos Específicos	32
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
5.1 Drogas e micro-organismos	33
5.2 Identificação molecular	33
5.3 Testes de sensibilidade antifúngica	34
5.4 Preparação da suspensão	34
5.5 Tratamento das células de <i>C. albicans</i>	34
5.6 Determinação da viabilidade celular das células de <i>C. albicans</i>	35
5.7 Avaliação do potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ) das células de <i>C. albicans</i>	35
5.8 Marcação por anexinaV	36
5.9 Ensaio do cometa versão alcalina	36
5.10 Formação e teste de sensibilidade de biofilme	37
5.11 Cultivo de fibroblastos L929	38
5.12 Atividade antiproliferativa em células L929	38

5.13	Análise Estatística	38
6.	<b>RESULTADOS</b>	39
6.1	Identificação molecular	39
6.2	Efeito antifúngico do FLC, FLX, PAR e SER frente às cepas de <i>Candida</i> spp.	39
6.3	Viabilidade celular em estirpe de <i>C. albicans</i>	41
6.4	Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )	42
6.5	Marcação de anexina V em células de <i>C. albicans</i>	43
6.6	Danos ao DNA	44
6.7	Atividade da fluoxetina em biofilme em crescimento de <i>Candida</i> spp.	45
6.8	Atividade citotóxica	46
7.	<b>DISCUSSÃO</b>	47
8.	<b>CONCLUSÃO</b>	52
9.	<b>REFERÊNCIAS</b>	53

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções causadas por espécies de *Candida* são essencialmente oportunistas e denominadas candidíases. Fungos desse gênero são encontrados na forma comensal em vários sítios anatômicos como áreas de pele flexoras, trato gastrointestinal e urogenital (LIM *et al.*, 2012). No entanto, o desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro permite que essas leveduras causem infecção (VAN DER VELDEN *et al.*, 2010).

A problemática mais atual são as infecções hospitalares associadas à formação de biofilmes. As leveduras de *Candida* são particularmente capazes de formar biofilmes em dispositivos médicos, podendo ocasionar graves infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, sendo que a utilização generalizada de dispositivos médicos como cateteres em hospitais, tem crescido nas últimas décadas (BOO *et al.*, 2005; RAMAGE *et al.*, 2009; SARDI *et al.*, 2013). Contudo, os principais fatores predisponentes para essas infecções relacionados ao hospedeiro incluem o tempo prolongado de permanência hospitalar (RESENDE *et al.*, 2002), medicamentos imunossupressores para o tratamento de câncer e de pacientes transplantados (FORTUN *et al.*, 2012), antibioticoterapia (RUHNKE *et al.*, 2011) e corticoterapia prolongadas (ANIL *et al.*, 2008). Além desses, indivíduos com doença de base, como AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) (NWEZE, OGBONNAYA 2011; CORTI *et al.*, 2013) e diabetes *mellitus* descompensado (KHOSRAVI *et al.*, 2008) e utilização por longo período de dispositivos invasivos, tais como válvulas cardíacas, articulações artificiais, cateter venoso periférico e central também propiciam o desenvolvimento dessas infecções (MAVOR *et al.*, 2005; GIRI, KINDO, 2012; ROSADO *et al.*, 2013).

Fluoxetina, paroxetina e sertralina tem como mecanismo de ação a inibição do transportador de serotonina sódio-dependente. Esses antidepressivos são efetivos na maioria das desordens de humor e ansiedade e o seu uso geralmente substitui o uso de antidepressivos tricíclicos, devido à maior tolerabilidade e segurança. Trabalhos recentes tem demonstrado uma ampla atividade antifúngica desta classe.

Considerando o potencial antifúngico dos ISRSs, este trabalho buscou verificar o efeito antifúngico dos *candidatos* frente a cepas de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* resistentes ao fluconazol, elucidando os possíveis mecanismos envolvidos na ação citotóxica através de procedimentos tais como citometria de fluxo e teste do cometa, e ainda avaliar sua atividade contra biofilmes de diferentes espécies de *Candida*.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Infecções fúngicas

Nas últimas décadas, as infecções fúngicas hospitalares vêm ganhando destaque pelo aumento na prevalência e altas taxas de mortalidade, variando de 40-70% dependendo do fator de risco envolvido. Isso se dá especialmente pelo aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), portadores de câncer e pacientes transplantados (TANG *et al.*, 2015; GUNYAR *et al.*, 2015). Além dessas, outras condições também são consideradas fatores de risco para tais infecções, como: o uso de antibióticos de amplo espectro por períodos prolongados, internação hospitalar por doenças severas ou procedimentos cirúrgicos, nutrição parenteral, uso de cateteres arteriais ou endovenosos, hiperglicemia, dentre outros (DABAR *et al.*, 2015; KATRAGKOU; WALSH; ROILIDES, 2015).

Infecções fúngicas invasivas (IFI) são a maior causa de mortalidade em receptores de transplante alogênico de células-troco hematopoiéticas (TACTH). Um estudo realizado no New York-Presbyterian Hospital, demonstrou uma incidência de 14% de IFI em pacientes após TACTH. Apesar de o principal agente etiológico ter sido o *Aspergillus* spp. (49%), foi o gênero *Candida* (19%) o responsável pela maior taxa de mortalidade, sendo 75% para candidíase invasiva (CORZO-LEÓN *et al.*, 2015). Outro estudo, envolvendo pacientes que receberam transplante de células-tronco hematopoiéticas, demonstrou que a maior incidência de infecções fúngicas ocorre em transplante alogênico, quando comparado ao autólogo (SUN *et al.*, 2015).

As IFI também são preocupantes em diversos outros tipos de pacientes transplantados, como os receptores de órgãos sólidos: pulmão, rins, fígado, pâncreas. *Candida* spp. é o agente mais freqüente de IFI nesse tipo de transplante: 2-4%. Esta levedura causa infecção com maior incidência na fase inicial (0-30 dias após o transplante), na qual a infecção é determinada pela integridade da técnica cirúrgica e pelo uso de dispositivos médicos (CHONG *et al.*, 2015; KATRAGKOU; WALSH; ROILIDES, 2015; SAHIN *et al.*, 2015).

As espécies do gênero *Candida* são responsáveis por 80% das infecções fúngicas humanas (ALANGADEN, 2011; PFALLER *et al.*, 2012). Apesar de *Candida albicans* continuar sendo a principal espécie isolada, o aumento da utilização de procedimentos

médicos invasivos, a profilaxia e uso empírico de drogas antifúngicas, em especial os derivados azólicos, bem como a implementação de novas técnicas moleculares na rotina diagnóstica tem sido responsabilizados pela emergência de espécies de *Candida* não *albicans* de relevância clínica (ALANGADEN, 2011; SILVA, *et al.*, 2012).

A epidemiologia da candidemia varia entre as regiões, características dos pacientes e o período de estudo. Pfaller *et al.* (2014) reuniram dados dos registros da *Prospective Antifungal Therapy* envolvendo 23 centros médicos dos Estados Unidos da América e dois do Canadá. No período de 2004 a 2008 foram relatados 6.845 pacientes com infecção fúngica invasiva, onde o gênero *Candida* foi responsável por 73,6% dos casos. A principal espécie isolada foi *C. albicans* (50,4%), seguido por *C. glabrata* (23%), *C. parapsilosis* (12,1%), *C. tropicalis* (6,9%) e outras espécies (7,6%).

Um grupo relatou a infecção na corrente sanguínea de três Unidades de Terapia Intensiva do Hospital Universitário de Messina, na Itália. Durante o período do estudo, de 2008 a 2012, um total de 761 episódios de bacteremias e fungemias foram documentados, 20% destas infecções foi causado por diferentes espécies de *Candida*. *Candida parapsilosis* foi o mais freqüente isolado dentre as demais espécies (59,7%), seguido por *C. albicans* (22,1%), *C. glabrata* (4,7%), *C. tropicalis* (4%), *C. lambica* (3,3%), *C. lusitaniae* (3,3%) e *C. krusei* (2,7%) (DELFINO *et al.*, 2014).

Um estudo conduzido de novembro de 2008 a outubro de 2010 documentou 672 episódios de candidemia em 20 centros de sete países da América Latina. Os países apresentaram grande variação, sendo observada maior incidência na Colômbia (1,96 episódios por 1.000 admissões) e menor no Chile (0,33 episódios por 1000 admissões). O Brasil ficou em quarto lugar com 1,38 casos / 1.000 admissões. Quase 90% de todos os casos no Brasil foram causados por 4 principais espécies, *C. albicans* (40,5%), *C. parapsilosis* (25,8%), *C. tropicalis* (13,2%) e *C. glabrata* (10,0%) (NUCCI *et al.*, 2013).

Em estudo realizado por Da Costa *et al.* (2014), no período de Janeiro de 2006 a Dezembro de 2007 e Janeiro de 2010 para Dezembro de 2011, foram avaliadas todas as amostras de sangue obtidas de pacientes com candidemia internados no Hospital Universitário de Londrina. Foi concluído que de 108 episódios de candidemia, 71,3% foram causadas por *Candida não-albicans*. As duas espécies mais frequentes foram *C. tropicalis* (30,5%) e *C. albicans* (28,7%), seguidas por *C. parapsilosis* (24,1%), *C.*

*glabrata* (8,3%), *C.krusei* (1,8%) e outras espécies (6,6%). O quadro abaixo relata a distribuição das espécies de *Candida* na América.

**Quadro 1.** Distribuição de frequência das cinco espécies de *Candida* mais prevalentes em estudos epidemiológicos de candidemia.

Local do Estudo	Nº de Isolados	Proporção das Espécies (%)						Referência
		CA	CP	CT	CG	CK	OEC	
<b>Brasil</b>	108	28,7	24,1	30,5	8,3	1,8	6,6	Da Costa <i>et al.</i> 2014
<b>Brasil</b>	313	44	14,4	21,7	11,2	3,5	5,2	Moretti <i>et al.</i> 2013
<b>Brasil</b>	248	41	15	20	12	3	9	Bergamasco <i>et al.</i> 2013
<b>EUA e Canadá</b>	3648	42,1	15,9	8,7	26,7	3,4	3,2	Pfaller <i>et al.</i> 2012
<b>Iowa (EUA)</b>	108	47	12	6	29	0	6	Diekema <i>et al.</i> , 2012

CA: *Candida albicans*; CP: *Candida parapsilosis*; CT: *Candida tropicalis*; CG: *Candida glabrata*; CK: *Candida krusei*; OEC: outras espécies de *Candida*.

A levedura dimórfica *Candida albicans* habita o trato genital e gastrointestinal como microrganismo comensal. Entretanto, em certas circunstâncias pode causar infecções que vão desde candidíase vaginal até candidíase orofaríngea e infecções sistêmicas disseminadas. A candidíase vulvo-vaginal (CVV) é um dos diagnósticos mais freqüentes na ginecologia. Estima-se que 75% das mulheres adultas apresentaram, pelo menos uma vez na vida, algum episódio dessa infecção. A grande taxa de recorrência, que se caracteriza por pelo menos três infecções anuais, e presença de mecanismos de resistência tem feito o tratamento de CVV um desafio crescente (De MEDEIROS *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

## 2.2 Histórico do gênero *Candida*

Segundo Sidrim e Rocha (2004), a primeira documentação de leveduras do gênero *Candida* como patógeno é atribuída a Langebeck, que em 1839 observou e isolou de uma cavidade oral de um paciente com afta bucal um microrganismo que atualmente é a mais importante levedura patogênica do homem, a *Candida albicans*. Apenas em 1842, com David Gruby, foi definida a patogenia da candidíase oral e seu agente

etiológico como do gênero *Sporotrichum*. Posteriormente várias denominações foram dadas ao microrganismo, como *Oidium albicans* e *Monilia albicans*. Em 1954, durante o VIII Congresso Europeu de Botânica, o gênero foi definitivamente descrito e aceito como *Candida*, com base nos estudos de Robin (1853), Zopf (1890) e Berkhout (1923) (ODDS, 1988).

Atualmente as leveduras do gênero *Candida* são classificadas como pertencentes ao reino Fungi, filo Ascomycota, com base no tipo de estrutura reprodutiva, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales, família Debaryomycetaceae (NCBI, 2015). O gênero foi originalmente empregado para denominar leveduras sem ciclo sexual, ele é constituído por mais de 300 espécies, sendo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* as mais frequentemente encontradas em amostras clínicas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Os fungos do gênero *Candida* são comensais que podem estar presente na microbiota humana em diversos sítios anatômicos como pele, mucosa bucal, trato gastrointestinal e genitourinário. Em condições normais, a maioria não causa danos ao seu hospedeiro, mas pode apresentar características patogênicas quando os mecanismos de defesa do hospedeiro estão debilitados, favorecendo a invasão de tecidos e a produção de infecções sistêmicas.

### **2.3 Identificação do patógeno**

O diagnóstico micológico de candidíase consiste basicamente nas características morfológicas e bioquímicas. O primeiro passo é a realização do exame direto, que consiste na confecção de lâminas contendo o espécime clínico clarificadas com hidróxido de potássio. Deve ser analisada a presença de blastoconídios: células únicas e ovais, associadas ou não a pseudo-hifas e pseudomicélios. Posteriormente, as amostras clínicas são repicadas em meios de cultura clássicos, como ágar Sabouraud, ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e de cicloheximida (COSTA *et al.*, 2011).

A morfologia das leveduras não apresenta muita diversidade, o que dificulta este ser o único critério para identificá-las. No entanto, para o gênero *Candida* existem peculiaridades sugestivas, como a presença de hifas ramificadas e hialinas (ANVISA, 2004).

*Candida* spp. são microrganismos que macroscopicamente caracterizam-se pela forma de leveduras, apresentando-se como células globosas, ovais, alongada; de coloração branca ou creme, com o reverso de mesma cor. Microscopicamente em agar corn meal Tween 80, pode-se notar a presença de estruturas características como blastoconídeos e, em algumas espécies, filamentos de crescimento, como hifas verdadeiras ou, mais frequentemente, pseudohifas. Estas estruturas devem estar dispostas em padrões característicos de cada espécie (SIDRIM; ROCHA, 2004; FAROOGI *et al.*, 2012).

A presença de tubo germinativo, que é o estágio inicial da transição entre a forma de leveduras e hifas, pode ser empregada como critério preliminar para diferenciar a *C. albicans* e *C. dubliniensis* das demais espécies (ANVISA, 2004). As cepas também devem ser submetidas às provas bioquímicas: produção de urease, assimilação e fermentação de carboidratos e assimilação de nitrogênio.

Além desses, outros métodos podem ser utilizados para a identificação de espécies de *Candida*. O meio de cultura CHROMagar tem sido utilizado para isolar e identificar presuntivamente as espécies *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* pela alteração na cor da colônia (SILVA *et al.*, 2012).

O diagnóstico sorológico para pesquisa de anticorpos específicos anti-manana, principal antígeno da parede celular do gênero *Candida*, é limitado pela ocorrência de resultados falso-negativos, apesar de sua boa sensibilidade (ALEXANDER, PFALLER; 2006).

O uso de marcadores moleculares já avançou bastante, mas a tecnologia molecular que teve maior impacto no diagnóstico clínico de infecções fúngicas pelo gênero *Candida* foi a reação de cadeia de polimerase (PCR). A principal característica dessa metodologia é que os *primers* utilizados diretamente na amostra clínica são específicos, não amplificando o DNA do hospedeiro ou de outros microrganismos (SILVA *et al.*, 2012).

A maior parte do genoma haplóide dos fungos consiste de DNA mitocondrial e DNA ribossômico (DNAr), onde, nesse último, são encontrados genes conhecidos por acumularem mutação em um tempo constante e lento. O principal alvo para as ampliações para a realização de PCR são as regiões de sequências variáveis denominadas regiões espaçadoras (*interspace regions* - ITS) localizadas entre as porções codificadoras relativamente conservadas 18S, 5.8S e 28S do DNA ribossômico

de fungos (IWEN, 2003). A organização do complexo genômico dos fungos é a seguinte: a região 18S, com cerca de 1.800 pares de base; uma região espaçadora (ITS1); a região 5.8S, altamente conservada, com cerca e 160 pares de base; outra região espaçadora (ITS2); e a região 28S, com cerca de 3.400 pares de base (IWEN; HINRICHS; RUPP, 2002).

Uma vez que mutações no interior das regiões separadoras de DNAr ocorre com frequência, a heterogeneidade desta sequência tem sido útil para separação tanto de gênero como de espécie. A homologia de sequência dentro do DNAr e as diferenças dentro das regiões espaçadoras são a base genética para a organização dos fungos nos grupos taxonômicos (BASTOLA, 2004).

A sequência de nucleotídeos completa de *Candida albicans* da região 5.8S do DNAr foi relatada por Mercure *et al.* (1993). Posteriormente, trabalhos demonstraram a região ITS2, realizando a identificação de espécies de *Candida* baseada nas variações desta sequência (LOTT *et al.*, 1993). A análise de ambas as regiões espaçadoras também foi realizada, mostrando que elas continham diversidade de sequências suficientes para serem utilizadas como alvos específicos para a identificação de *C. albicans* (BOTELHO; PLANTA, 1994).

Apesar do aumento de novas abordagens moleculares, a maioria do diagnóstico clínico das candidíases é baseada nas metodologias não moleculares devido à reduzida quantidade de equipamento de PCR em laboratórios hospitalares, aos problemas com preparação de amostra e contaminação ambiental, falta de protocolos e de profissionais qualificados.

## **2.4 Fatores de virulência do gênero *Candida***

### **2.4.1 Adesão**

O evento inicial na patogênese das doenças infecciosas é a adesão microbiana ao tecido. Essa ligação é promovida com base na interação de moléculas da superfície abiótica ou celular do hospedeiro (polissacarídeos, glicoproteínas e lipídeos) com um conjunto especializado de proteínas (adesinas) presentes no fungo. A hidrofobicidade na superfície mucosa, a presença de açúcar no meio e formação de tubo germinativo parecem também interferir no processo de adesão (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

A adesão representa o primeiro passo para a colonização, podendo evoluir para invasão tecidual ou formação de biofilme, que será discutido adiante (TSAI *et al.*, 2013).

#### 2.4.2 Enzimas hidrolíticas

Outro importante fator de virulência é a secreção de enzimas hidrolíticas por espécies de *Candida*. Estas são libertadas no meio, podendo causar a destruição dos tecidos do hospedeiro. Aspartil proteinases, fosfolipases, lipases e hemolisinas são as principais enzimas relacionadas com a patogenicidade deste gênero (LIM *et al.*, 2012).

As proteinases são responsáveis por toda a atividade proteolítica extracelular, com o objetivo de fornecer nutrição, auxiliar no processo de invasão tecidual, escape das respostas imunológicas do hospedeiro, formação de hifas, adesão às células e mudanças fenotípicas (NAGLIK *et al.*, 2003).

O grupo das fosfolipases é constituído de enzimas capazes de hidrolisar ligações ésteres nos glicerofosfolípídeos das membranas e estão relacionadas com lesão, aderência e invasão do microrganismo ao tecido do hospedeiro (GHANNOUM, 2000).

Outra importante enzima é a hemolisina. Os microrganismos patogênicos podem crescer no hospedeiro utilizando heme como uma fonte de ferro. Hemolisinas degradam a hemoglobina e facilitam a recuperação do ferro elementar de células hospedeiras. Assim, as hemolisinas são consideradas como fator de virulência chave que permite a sobrevivência do patógeno e persistência no hospedeiro (SILVA *et al.*, 2012).

#### 2.4.3 Polimorfismo

O polimorfismo, processo de alternância entre levedura, pseudohifa e hifa, é observado nas espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis* e em algumas cepas de *C. tropicalis*. Essa mudança ocorre em resposta a estímulos ambientais como disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH, CO<sub>2</sub> e contato com soro e representa um importante traço patogênico (ZNAID *et al.*, 2013).

As formas filamentosas pseudo-hifa e hifa são diferenciadas com base na observação do local de alongação. Na formação da hifa verdadeira não existe constrição entre a célula-mãe e o filamento, enquanto que as pseudo-hifas possuem a constrição nesse local (SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004).

O mecanismo de virulência relacionado à formação de formas filamentosas está relacionado à lesão tecidual por força mecânica, lesão de células endoteliais com

disseminação sistêmica, lise de macrófagos e neutrófilos após fagocitose (THOMPSON *et al.*, 2011).

#### 2.4.4 Biofilme

Um dos principais e mais patogênicos fatores de virulência do gênero *Candida* é a capacidade de formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas. Biofilme é uma comunidade sésil caracterizada por células que formam microcolônias e material extracelular aderido a um substrato. A presença de hifas ou pseudohifas são importantes na estabilidade do biofilme (COSTA, 2009).

Biofilmes possuem características estruturais e propriedades fenotípicas distintas de seus homólogos planctônicos, sendo que a mais relevante característica é o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos, as concentrações inibitórias mínimas podem ser até 1.000 vezes maior que de células planctônicas (NETT *et al.*, 2007). Isso pode ocorrer devido à composição da matriz extracelular, aumento da regulação de genes de bomba de efluxo, complexidade estrutural do biofilme e heterogeneidade metabólica intrínseca (FINKEL; MITCHELL, 2011; AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006).

Todos os biofilmes possuem pelo menos uma propriedade em comum: a presença de uma matriz, denominada substância extracelular polimérica (EPS). Essa envolve as células e facilita a adesão às superfícies bióticas ou abióticas, além de promover a coesão do próprio biofilme, formando estruturas multicelulares que se ligam firmemente à superfície e comunicam-se entre si (XIAO *et al.*, 2012). A composição e a estrutura da EPS do biofilme são variáveis, contendo uma grande variedade de proteínas, lipídios, ácidos nucleicos extracelulares, polissacarídeos e outros biopolímeros de origem microbiana. Todos os componentes da EPS são altamente hidratados, formando uma matriz que mantém as células do biofilme juntas. Essa capacidade de imobilizar as células e mantê-las em estreita proximidade permite interações intensas, incluindo a comunicação célula-célula, e a formação de sinergismo microbiano. A matriz também atua como um centro de reciclagem, mantendo todos os componentes das células lisadas disponíveis, além de proteger os microrganismos contra dessecação, biocidas oxidantes, antibióticos, cátions metálicos, radiação ultravioleta e protozoários herbívoros (FLEMING; WINGENDER, 2010).



As células presentes em biofilmes de bactérias ou fungos são capazes de coordenar suas atividades pela secreção de fatores de sinalização e responder a estes fatores (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006). Esse fenômeno é conhecido como *quorum-sensing* e é definido como a habilidade do microrganismo em comunicar e coordenar seu comportamento via secreção de moléculas de sinalização na população (RAMAGE *et al.*, 2009). Sua função é prevenir a superpopulação desnecessária e controlar a competição por nutrientes, além de possuir importantes implicações no processo infeccioso. Em biofilmes de *Candida albicans* são descritos dois principais sinalizadores com efeitos contrários, o farnesol que inibe a filamentação de *C. albicans* e o tirosol que favorece o crescimento e estimula a filamentação sob condições favoráveis para formação de tubo germinativo. Outros genes diferencialmente expressos nos biofilmes em geral são relativos a resistência aos medicamentos, bem como proteínas de manutenção da parede celular (quitinases), de transporte de ferro, e de estresse. (RAMAGE *et al.*, 2005).

Em biofilmes de bactérias já foram relatadas a presença de células “persistentes” que representam uma menor população e são resistentes aos tratamentos com antibióticos. Estas células são protegidas das defesas do hospedeiro pela matriz extracelular e após a exposição ao antibiótico podem repovoar o biofilme, representando outro mecanismo de resistência que também já foi descrito em biofilmes de *C. albicans* (D’ENFERT, 2009).

## 2.5 Arsenal farmacológico

O tratamento das infecções causadas por *Candida spp.* é limitado, tanto pelo pequeno número de agentes antifúngicos, quanto pelos problemas de segurança dos medicamentos, da resistência e dos perfis de eficácia (TOBUDIC; KRATZER; PRESTERL, 2012). Os principais antifúngicos disponíveis no mercado compreendem classes de produtos naturais (griseofulvina, polienos e equinocandinas) e de produtos sintéticos (alilaminas, azóis e flucitosina) (RANG; DALE, 2007).

Os principais representantes dos polienos são anfotericina B e nistatina. A anfotericina B foi, por cinco décadas, o fármaco de escolha em infecções fúngicas sistêmicas resistentes, no entanto, os efeitos tóxicos as células do hospedeiro limitaram seu uso (ORTEGA *et al.*, 2010). Equinocandinas possuem um espectro de ação limitado

quando comparado aos azólicos. No entanto, são excelentes agentes para o tratamento da candidíase. Os principais constituintes deste grupo são: caspofungina, micafungina e anidulafungina (BAL, 2010; PFALLER *et al.*, 2011).

Os compostos azólicos (p.ex. fluconazol, itraconazol, cetoconazol) têm como mecanismo de ação o bloqueio do sítio ativo de uma enzima conhecida como 14- $\alpha$ -demetilase do lanosterol ou citocromo-desmetilase P450DM. Estes estão envolvidos na conversão de lanosterol em ergosterol. Dessa forma, há a depleção conseguinte de ergosterol, acumulação de precursores e perda da integridade da membrana (PFALLER, 2012).

Um estudo em Barcelona, de janeiro de 1994 a dezembro de 2008, quantificou o uso de antifúngicos em infecções na corrente sanguínea. Os mais utilizados foram fluconazol (66,4%), voriconazol (7,9%), equinocandinas (19,7%), triazóis + equinocandinas (5,9%). A anfotericina B só foi utilizada como tratamento durante os anos 1994 a 2003 da pesquisa (ORTEGA *et al.*, 2010).

## 2.6 Resistência aos azólicos

A resistência a antifúngicos ocorre quando os isolados não são inibidos pela concentração normalmente utilizada no esquema terapêutico ou quando eles demonstram CIM que se encaixam em intervalos suscetíveis aos mecanismos de resistência, e onde não foi comprovada a confiabilidade em estudos de tratamento (PFALLER, 2012).

O uso dos triazólicos na profilaxia em pacientes de risco tem crescido, pois estes compostos são menos tóxicos que os polienos. Essa profilaxia tem sido preditora para candidemias com patógenos resistentes aos triazólicos, em especial o fluconazol (KOTHAVADE *et al.*, 2010).

A resistência primária do gênero *Candida* para com os azóis não é tão comum, as principais espécies relacionadas a este fato são *C. krusei* e *C. glabrata*, que possuem baixa sensibilidade intrínseca ao fluconazol. A resistência secundária ocorre quando cepas suscetíveis tornam-se resistentes devido ao contato prévio com o antifúngico. Com isso, podem ocorrer alterações na rota de biossíntese dos esteróis, aumento da expressão do gene ERG 11, envolvido na síntese da enzima 14- $\alpha$ -demetilase, diminuindo a afinidade da enzima pelo fluconazol, ou alteração no efluxo da droga, o

que leva a diminuição da concentração do fármaco dentro da célula fúngica (DEMITTO *et al.*, 2012; PERES *et al.*, 2010).

O primeiro e mais comum mecanismo consiste no desenvolvimento de bombas de efluxo ativo, que são codificadas pelos genes *CDR1* e *CDR2* (*Candida Drug Resistance*), relacionados a tradução de proteínas pertencentes à superfamília *ATP binding cassette*, e pelo gene *MDR1* (*Multidrug Resistance*), que codifica uma proteína pertencente à classe *major facilitators*. A superexpressão desses genes estão diretamente relacionadas ao aumento da atividade das bombas, impedindo o acúmulo da droga no interior da célula. A regulação de *CDR1* e *CDR2* confere resistência quase todos os azólicos, enquanto que *MDR1* confere resistência específica para o fluconazol (TOBUDIC; KRATZER; PRESTERL, 2012; KANAFANI; PERFECT, 2008).

O ergosterol é essencial para manter a integridade e função da membrana plasmática dos fungos e, por esse motivo a sua biossíntese é alvo para muitos antifúngicos, inclusive o fluconazol. O alvo primário dos azólicos é a enzima 14- $\alpha$ -demetilase, que tem por função converter o lanosterol em ergosterol. A inibição desta enzima não resulta somente na redução do ergosterol, mas também no acúmulo de seu precursor, o lanosterol. Este é convertido em 14- $\alpha$ -metilfecosterol e, subsequentemente, catalisado pela D5,6-desaturase (codificada pelo *ERG3*), para um esterol intermediário tóxico que inibe o crescimento celular (TOBUDIC; KRATZER; PRESTERL, 2012).

O segundo mecanismo consiste na alteração da enzima lanosterol C14- $\alpha$ -demetilase, molécula-alvo dos derivados azólicos, codificada pelo gene *ERG11*. A ocorrência de superexpressão ou de mutações nesse gene resulta na redução de sensibilidade ou resistência a esse grupo de antifúngicos (TOBUDIC; KRATZER; PRESTERL, 2012).

Um estudo mostra que o itraconazol obteve o maior índice de resistência quando comparado a outros antifúngicos pela técnica de disco de difusão, uma vez que 10,5% de *C. albicans*, 52,2% de *C. tropicalis* e 30% de *C. parapsilosis* foram sensíveis dose dependente (SDD), e 25% de *C. krusei* e 68,8% de *C. glabrata* foram resistentes. As esquinocandinas consistiram em uma boa opção de tratamento, pois teve excelente atividade antifúngica ante as principais espécies de *Candida* responsáveis por infecções fúngicas (DEMITTO *et al.*, 2012).

Ao analisar a capacidade de formação de biofilme de isolados de *Candida* spp. a partir da água utilizada em hemodiálise, um estudo em Araraquara-SP fez testes

comparativos da resistência à antifúngicos entre células sésseis e células planctônicas. Foram testados fluconazol, voriconazol e anfotericina B. Enquanto que para as células planctônicas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fluconazol foi de no máximo 4 µg/mL, em biofilme, as mesmas cepas apresentaram uma CIM maior que 512 µg/mL. Voriconazol e anfotericina B também obtiveram um aumento substancial nos valores de CIM para células sésseis (PIRES, 2010).

Como consequência da presença de cepas resistentes aos antifúngicos durante a prática clínica, nota-se que os isolados com CIM elevada, obtidos de pacientes com infecções por *Candida*, estão associados a uma baixa taxa de sucesso no tratamento e alto índice de mortalidade quando comparado com aqueles que possuem um baixo valor de CIM, demonstrando sensibilidade (PFALLER, 2012).

### **2.7 Sensibilidade aos antifúngicos de células suspensas e de biofilmes**

A avaliação da sensibilidade a antifúngicos é feita recorrendo-se à determinação da viabilidade, atividade ou crescimento de células de levedura quando em contacto com o agente. Devido ao elevado número de métodos utilizados na determinação da sensibilidade de leveduras, o *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) estabeleceu um conjunto de procedimentos com o intuito de normalizar as metodologias utilizadas. A introdução do documento inicial M27-A, em 1997, definiu o conceito de concentração inibitória mínima (CIM) como sendo a mais baixa concentração de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo em meio sólido ou numa diluição feita em meio líquido (BARRY, 2002).

O ensaio de microdiluição para avaliação do perfil de sensibilidade para leveduras preconizado pelo NCCLS (atualmente CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*) revisto para M27-A3 tornou possível a reprodutibilidade e comparação do perfil de sensibilidade aos agentes antifúngicos de leveduras patogênicas, sendo utilizado como método de referência, para determinação da CIM para o modo planctônico de crescimento de leveduras (CLSI, 2008).

Na microbiologia a técnica de citometria de fluxo vem sendo reconhecida no estudo da sensibilidade a antimicrobianos. É uma técnica que permite contagem, análise e classificação de células suspensas num fluido onde realiza, simultaneamente, uma

análise multiparamétrica de características físicas e químicas célula a célula, através de aparelhos de detecção óptica e/ou eletrônica (DOS SANTOS, 2010).

Além dos estudos de biologia de leveduras revelarem a resistência, eles podem ser úteis na elucidação dos mecanismos celulares e moleculares de resposta a agentes citotóxicos (MITCHELL; HUDSPETH; WRIGHT, 2005).

A primeira abordagem para estudos *in vitro* de adesão inclui ensaios estáticos, quer adesão ao fundo dos poços de microplacas ou de materiais representante das superfícies. Enumeração das células aderidas tem sido realizada através de vários métodos diferentes, quer direta ou indiretamente.

A determinação da atividade celular pode ser feita recorrendo-se a testes bioquímicos que medem a atividade de determinadas enzimas, ou a concentração de determinados produtos de metabolismo microbiano. Outra forma de avaliar atividade celular é medir a quantidade de substrato consumido num determinado período de tempo. A determinação do consumo de glicose como forma de avaliar a atividade metabólica de leveduras tem sido descrita na literatura. A quantificação da glicose existente no meio de crescimento pode ser feita por métodos enzimáticos ou através de métodos que envolvem a quantificação dos açúcares redutores (RIESELMAN; HAZEN; CUTLER, 2000).

Além disso, os métodos colorimétricos são popularmente utilizados na avaliação da viabilidade celular e o uso de sais de tetrazólio (hidróxido de tetrazólio – XTT - 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfenyl)-5-[(Phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide e brometo de difeniltetrazólio – MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] representam uma das metodologias mais difundidas. Os sais de tetrazólio são compostos orgânicos heterocíclicos que substituem o aceitador normal de elétrons (O<sub>2</sub>) nos processos biológicos de redução. Estes sais são reduzidos à derivados do formazano através da aceitação de elétrons por ação enzimática (de substâncias do sistema de transporte de hidrogênio), ou por ação química (de transportadores de elétrons artificiais). Os transportadores de elétrons artificiais utilizados comumente são a menadiona ou metassulfato de fenazina e têm como função promover a reação entre as células e o sal utilizado (HAWSER *et al.*, 1998). Os sais de tetrazólio, de cor amarela, penetram rapidamente nas células intactas e, através da atividade de succinato desidrogenase mitocondrial são convertidos a derivados de formazano de cor púrpura que é quantificado fotometricamente e relacionado com o

número de células viáveis (HAWSER, 1996; RAMAGE *et al.*, 2001). Ao contrário do MTT, o formazano produto do XTT é solúvel em água. Dessa forma, o ensaio XTT não necessita do processo de solubilização, o que permite a obtenção dos resultados em aproximadamente 3h (dependendo da duração da incubação). O MTT necessita de uma incubação adicional *overnight*. Esses métodos têm sido útil no estudo de biofilmes, pois permitem efetuar estudos de sensibilidade e de viabilidade celular, sem que para tal seja necessário haver destruição da sua estrutura (DE LOGU *et al.*, 2005; KROM *et al.*, 2007).

## 2.8 Importância de novas estratégias terapêuticas

Logo, percebe-se a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, como por exemplo, o uso de combinações de fármacos com atividade antifúngica juntamente com fármacos não antifúngicos (TOBUDIC; KRATZER; PRESTERL, 2012). Alguns autores confirmaram que alguns não antibióticos são compostos auxiliares que podem aumentar a atividade *in vitro* de certos antimicrobianos (GUO *et al.*, 2008; KRUSZEWSKA; ZAREBA; TYSKI, 2010).

Nesse contexto, estudos mostraram que, em combinação com o fluconazol, fármacos não antifúngicos obtiveram atividade promissora, mesmo em estirpes resistentes ao fluconazol (DA SILVA *et al.*, 2013; PINA-VAZ *et al.*, 2005) Uma variedade de compostos, tais como antiarrítmicos, antiparasitários,  $\beta$ -bloqueadores, imunossuppressores, antipsicóticos, que são relacionados ao tratamento de doenças com etiologia não infecciosa, tem demonstrado certa atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias e outros microorganismos (AFELTRA *et al.*, 2004; DA SILVA, *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2008; KRUSZEWSKA; ZAREBA; TYSKI, 2010).

## 2.9 Inibidores seletivos da recaptação da serotonina

Há alguns anos, a atividade antimicrobiana foi descrita para alguns fármacos psicotrópicos, desde então várias substâncias desta classe vem sendo avaliadas para este fim. Um estudo relatou a ausência de episódios de candidíase vulvo-vaginal (CVV) em pacientes que estavam recebendo tratamento com sertralina oral (50mg por dia durante 5-8 ciclos menstruais). Após a suspensão do tratamento, houve recorrência de CVV. Dessa forma, surgiu a hipótese da interação dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) com o gênero *Candida* (LASS-FLÖRL *et al.*, 2001a).

Os ISRSs tem como mecanismo de ação a inibição do transportador de serotonina sódio-dependente. Um de seus principais representantes é a fluoxetina, fármaco que também possui relatos de promissora atividade antifúngica. A fluoxetina apresentou atividade isolada contra *Trichomonas* sp., *Aspergillus* spp., *Candida parapsilosis* e demonstrou reverter parcialmente os efeitos de estresse na candidíase oral em ratos, como diminuição em número dos microorganismos, da área lesionada e de papilas anormais (LASS-FLÖRL *et al.*, 2001b; NÚÑEZ *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2008).

Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina têm sido considerados os primeiros antidepressivos altamente seletivos para o neurotransmissor monoamino serotonina (5-HT). Esses antidepressivos são efetivos na maioria das desordens de humor e ansiedade e o seu uso geralmente substitui o uso de antidepressivos tricíclicos, devido à maior tolerabilidade e segurança. Entretanto, esses não são desprovidos de efeitos adversos; por exemplo, a fluoxetina, representante desta classe, tem atividade antagonista ao neurotransmissor monoamino serotonina 2c, podendo causar dor de cabeça, agitação e perda de apetite.

Os ISRSs podem interagir com outros fármacos em especial os inibidores da monoamino oxidase, que pode resultar na letal síndrome serotônica, ou apresentar os seguintes efeitos adversos: inquietude, irritabilidade, tremor, sudorese e hiper-reflexia. Os principais representantes são fluoxetina, sertralina e paroxetina (Figura 1).

Esta classe é rapidamente absorvida, ligam-se as proteínas plasmáticas (alta porcentagem), todos deslocam outros fármacos da ligação proteica, aumentando seu nível plasmático. Metabolizados primariamente pelo fígado, todos os ISRSs afetam as enzimas metabolizadoras do citocromo P-450 (em menor proporção a sertralina) e podem comprometer o metabolismo de outros fármacos metabolizados por esse sistema. As concentrações plasmáticas da sertralina são proporcionais as doses administradas (farmacocinética linear), o que não ocorre com fluoxetina e paroxetina (RANG; DALE, 2007).

As concentrações plasmáticas terapêuticas recomendadas têm sido de 100 a 500 ng/mL para fluoxetina, de 25 a 50 ng/mL para sertralina e de 30 a 100 ng/mL para paroxetina. No entanto, esses intervalos terapêuticos não se encontram claramente definidos (GOODNICK, GOLDSTEIN, 1994).

Os ISRS, como fluoxetina, sertralina e paroxetina, têm as mesmas indicações clínicas: quadros depressivos; ansiedade; síndrome do pânico; distúrbios fóbicos e obsessivos; obesidade; bulimia; fibromiosite; entre outros (KAPLAN; SADOCK, 1998; SANDERS-JUSH; MAYER, 2003; RANG; DALE, 2007).

Os raros efeitos colaterais associados a sua fácil administração e boa aceitação fizeram estas substâncias serem de amplo uso.

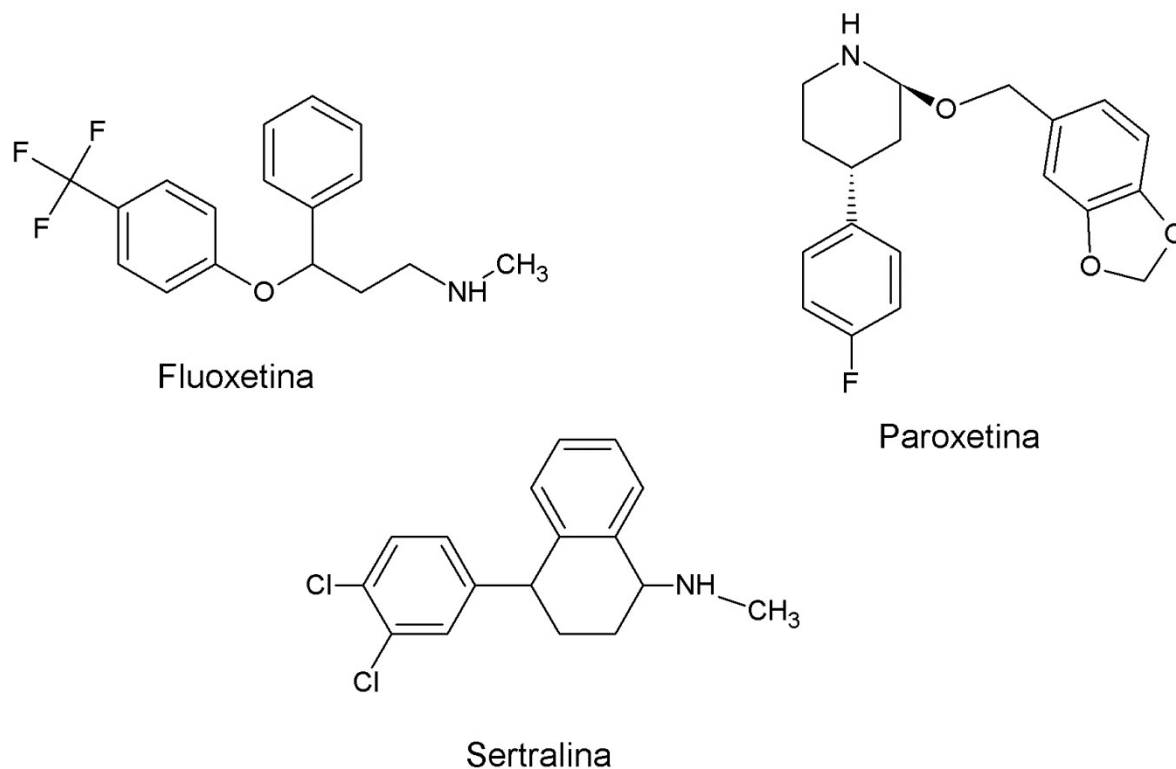


Figura 1: Estrutura molecular dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina: fluoxetina, paroxetina e sertralina.



### 3. HIPÓTESES

3.1 Existe efeito antifúngico dos ISRS fluoxetina, paroxetina e sertralina com cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

3.2 A fluoxetina apresenta atividade *in vitro* contra biofilme de cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

3.3 Os ISRSs promovem danos na membrana e no DNA de cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antifúngico dos ISRSs fluoxetina (FLX), paroxetina (PAR) e sertralina (SER) contra cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* resistentes ao fluconazol.

#### 4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Identificar as cepas de *Candida* pertencentes à micoteca do Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras da Universidade Federal do Ceará;

4.2.2. Determinar a concentração inibitória mínima da FLX, PAR e SER contra cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* resistentes ao fluconazol;

4.2.3. Determinar o potencial antifúngico *in vitro* da fluoxetina contra biofilme de *Candida* spp.;

4.2.4. Investigar o possível mecanismo de ação dos ISRSs através de citometria de fluxo e o teste do cometa – versão alcalina.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Drogas e micro-organismos

Fluconazol e Anfotericina B foram obtidos comercialmente (Sigma Chemical Co, USA). Fluoxetina, paroxetina e sertralina foram cedidas da Farmácia Prophormula (Galena Química e Farmacêutica, Brasil) pelo Dr. Ernesto da Rocha Tomé e pelo Prof. Said Gonçalves Fonseca. Os demais reagentes foram de grau analítico. Para este estudo, foram utilizadas 13 cepas, quatro cepas de *C. albicans*, quatro de *C. parapsilosis*, quatro de *C. tropicalis* e uma de *C. glabrata* (Tabela 1). As cepas foram isoladas de sangue, disponibilizadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Ceará (LACEN), as quais fazem parte da Coleção de Leveduras do Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras (LABEL/UFC). As cepas foram inoculadas em ágar Sabouraud dextrose (Himedia Mumbai-India) e incubadas a 37°C/24 h. Em seguida foram semeadas em CHROMagar *Candida* (Himedia Mumbai-India) para avaliar a pureza (DA SILVA *et al.*, 2013; ANDRADE NETO *et al.*, 2014).

### 5.2. Identificação molecular

O DNA genômico das 13 cepas foi purificado utilizando um protocolo baseado no método CTAB, tal como descrito anteriormente por Warner *et al.* (1996). A região de DNA nuclear foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers ITS4 e ITS5, tal como sugerido por White *et al.* (1990). Uma vez que a especificidade das amplificações for confirmada, os produtos da PCR foram purificados utilizando-se kits de purificação (SAMBROOK, 1989). O sequenciamento do DNA foi realizado utilizando o DYEnamic ET terminators cycle sequencing kit (GE Health care Bio-Sciences) e as cadeias foram sequenciadas utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5. As reações de sequenciamento foram analisadas no sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE HealthcareBio-Sciences). As sequências de bases foram deduzidas a partir dos eletroferogramas e as sequências completas foram montadas utilizando o software Cap3 (HUANG *et al.*, 1999). As sequências determinadas foram comparadas com aquelas previamente depositadas na base de dados GenBank utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

### 5.3. Testes de sensibilidade antifúngica

Para o teste sensibilidade aos antifúngicos de microdiluição em caldo foram utilizadas com as 13 cepas de diferentes espécies de *Candida*. O teste foi realizado de acordo com documento M27-A3 (CLSI, 2008) utilizando RPMI (pH 7,0) tamponado com 0,165 M ácido morfolinopropano sulfônico (MOPS; Sigma Chemical Co). O fluconazol (FLC) foi dissolvido em água destilada e fluoxetina (FLX), paroxetina (PAR) e sertralina (SER) foram dissolvidos em etanol 95% P.A. (Vetec Química Fina). FLC foi testado na faixa de 64 - 0.125  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que FLX, PAR e SER foram testados de 600 – 4,68  $\mu\text{g/mL}$ . As placas foram incubadas por 24 h, e os resultados foram avaliados visualmente, tal como recomendado pelo CLSI. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada como a concentração que inibe 50% do crescimento de fungos. Os pontos de corte usados para o fluconazol foram: as cepas com  $\text{CIM} \leq 2\mu\text{g/mL}$  são sensíveis (S), 4  $\mu\text{g/mL}$  sensível dose-dependente (SDD), e  $\geq 8\mu\text{g/mL}$  resistentes (R). As cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram usados como controle (CLSI, 2012).

### 5.4 Preparação da suspensão

Uma única e representativa cepa de *C. albicans*, foi utilizada para os ensaios posteriores. As suspensões celulares foram preparadas a partir de culturas em fase de crescimento exponencial. As células foram colhidas, centrifugadas (1600g por 10 min a 4°C) e lavadas duas vezes com uma solução salina 0.85% (1200g por 5 min a 4°C), e então ressuspensas ( $\sim 10^6$  células/mL) com tampão HEPES [N - (2-Hydroxyethyl) piperazine-N' - (2-ethanesulfonic acid)] suplementado com glicose 2%, pH 7.2 pureza (DA SILVA *et al.*, 2013; ANDRADE NETO *et al.*, 2014).

### 5.5 Tratamento das células de *C. albicans*

Uma única cepa representativa da espécie mais frequente do gênero em trabalho, *Candida albicans*, foi escolhida aleatoriamente para a determinação da integridade da membrana, avaliação do potencial transmembrana mitocondrial, marcação por anexina V e danos ao DNA. A cepa de *C. albicans* resistentes ao fluconazol foi exposta ao FLC (64  $\mu\text{g/mL}$ ), anfotericina B (Anfo B) (4  $\mu\text{g/mL}$ ), concentrações variadas de FLX, PAR e SER (CIM, 2x CIM e 4x CIM) e em meio RPMI que foi utilizado como controle

negativo. As células tratadas foram incubadas a 37° C durante 24 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (DA SILVA *et al.*, 2013; ANDRADE NETO *et al.*, 2014).

### **5.6 Determinação da viabilidade celular das células de *C. albicans***

A integridade de membrana de cepas de *C. albicans* foi avaliada pelo método de exclusão com iodeto de propídio (PI) (2 µg/mL). O PI é um marcador nuclear que penetra exclusivamente nas células que têm a membrana celular danificada e por isso, é adicionado às células alvo, permitindo a identificação das células mortas. Para cada experimento 10.000 eventos foram avaliados e os detritos celulares omitidos na análise. A fluorescência celular foi então determinada usando o citômetro de fluxo GuavaEasyCyte™ Mini System (Guava Technologies, Inc., Industrial Blvd. Hayward, CA, USA) e o software CytoSoft 4.1 pureza (DA SILVA *et al.*, 2013; ANDRADE NETO *et al.*, 2014).

### **5.7 Avaliação do potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ) das células de *C. albicans***

O potencial transmembrana mitocondrial foi determinado pela retenção do marcador rodamina 123 pelas células de leveduras após a exposição aos tratamentos descritos anteriormente (**item 5.4 e 5.5**), por 24 h. As células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), incubadas com rodamina 123 (5 µg/mL) a 37 ° C durante 15 min, na ausência de luz. Após esse tempo, lavou-se duas vezes com solução de PBS. As células foram então incubadas novamente em PBS a 37 ° C durante 30 min, no escuro, e a fluorescência foi então medida utilizando o citômetro de fluxo (GuavaEasyCyte™ Mini System). Dez mil eventos foram avaliados por experimento (n = 3) e os detritos de células foram omitidos da análise pureza (DA SILVA *et al.*, 2013; ANDRADE NETO *et al.*, 2014).

### 5.8 Marcação por anexinaV

As células de *C. albicans* tratadas e não tratadas foram coletadas por centrifugação e digeridas com 2 mg/mL Zymolyase 20T (Seikagaku Corporation, Japão) em tampão de fosfato de potássio (PPB, 1 M pH, sorbitol 6,0) durante 2 horas a 30 ° C. Os protoplastos de *C. albicans* foram marcados com Anexina V e PI utilizando um kit de detecção de apoptose (Guava Nexin Kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA). Subsequentemente, as células foram lavadas com PPB e incubadas em tampão de ligação contendo 5µL de FITC-anexina V e 5 µL de PI por 20 min. As células foram depois analisadas no citômetro de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). Para cada experimento (n = 3), 10.000 eventos foram avaliados, e os restos celulares foram omitidos da análise pureza (DA SILVA *et al.*, 2013; ANDRADE NETO *et al.*, 2014).

### 5.9 Ensaio do cometa versão alcalina

O ensaio do cometa alcalino foi realizado conforme descrito por Miloshev e colaboradores (2002). Cerca de 200 µl de agarose 0,5% (ponto de fusão normal) foram distribuídos sobre cada lâmina. Estas camadas de suporte de agarose foram, antes da aplicação da suspensão de células, secas ao ar. As células de levedura em suspensão (item 5.4 e 5.5) foram centrifugadas em uma microcentrífuga Eppendorf durante 5 min. As células foram lavadas com água destilada estéril e ressuspensas em tampão S (1M sorbitol, 25 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,5). Alíquotas de aproximadamente 5 x 10<sup>4</sup> células foram misturadas com de agarose 0,7 % (baixo ponto de fusão) contendo 2 mg / mL de Zymolyase 20T (Seikagaku Corp., Japão) e foram espalhados sobre a camada de agarose. As lâminas foram então cobertas com lamínulas e foram incubadas durante 20 min a 30 ° C. Para minimizar a atividade de enzimas endógenas celulares, todos os procedimentos foram realizados em um ambiente com temperatura de 8-10 ° C. As lamínulas foram removidas e as lâminas foram incubadas em NaOH a 30 mM, NaCl 1 M, 0,1% laurilsarcosina, EDTA 50 mM (pH 12,3) durante 1 h. As lâminas foram lavadas três vezes com NaOH 30 mM e EDTA 10 mM (pH 12,4) por 20 minutos e depois foram submetidas a eletroforese (0,5 V / cm e 24 mA) durante 20 minutos no mesmo tampão. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas, submergindo-os

em 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5) durante 10 min, seguido de 10 min consecutivos incubações em etanol 76% e etanol a 96%, respectivamente. As lâminas foram deixadas a secar ao ar e foram então coradas com 1 mg / mL de brometo de etídio e visualizadas por microscopia de fluorescência. Todas as etapas acima foram realizadas no escuro, para evitar danos adicionais ao DNA. Foram analisadas as imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas) de cada grupo experimental. As células foram inspecionadas visualmente e classificadas em cinco classes (0-4) de acordo com os respectivos tamanhos das caudas (desde 0 = nenhum a 4 = danos extensos danos de DNA) e um valor de índice de dano foi calculada para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de 0 (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (DA SILVA *et al.*, 2013, ANDRADE NETO *et al.*, 2014).

#### **5.10 Formação e teste de sensibilidade de biofilme**

A formação do biofilme foi realizada utilizando placas de microtitulação segundo a metodologia de Pierce *et al.* (2009), com modificações. Para este teste foi utilizada uma estirpe de cada espécie de *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (tabela 1) incubadas em YPD a 35°C por 20-24h. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 3.000g por 5 min e lavadas duas vezes com tampão PBS. Os *pellets* foram ressuspensos, a densidade celular ajustada para  $1,0 \times 10^6$  células/mL em RPMI 1640 (Cultilab São Paulo – Brazil) e foram incubadas em placas de 96 poços a 35°C por 24 h. Os poços foram lavados três vezes com PBS. A concentração da fluoxetina foi testada na faixa de 4,68 – 600 µg/mL. Uma alíquota de 200 µL da solução da droga foi adicionada em cada poço contendo biofilme viável de 24h. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24h. A medida da atividade metabólica das células do biofilme formado foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico MTT (1mg/mL) (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difenil tetrazolio). A leitura foi realizada em um leitor de microplacas a 540nm (HAWSER e DOUGLAS, 1994; RAJPUT e KARUPPAYIL, 2013).

### 5.11 Cultivo de fibroblastos L929

A linhagem de células L929 de fibroblastos de camundongo foi cultivada nas condições padrão (a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>) em MEM (*minimal essential medium*) contendo sais de Earle. Todo o meio de cultura foi suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Para avaliação do efeito citotóxico, as células cresceram por 2 dias dentro das condições padrão, após isso, o meio foi trocado contendo as drogas testadas (SER, FLX e PAR) e o veículo de diluição das drogas (etanol P.A.) (NETO *et al.*, 2014, CAVALCANTI, *et al.*, 2009).

### 5.12 Atividade antiproliferativa em células L929

A avaliação do potencial antiproliferativo dos compostos sobre as células L929 foi realizada através do método colorimétrico MTT. As células L929 foram distribuídas em multiplacas de 96 poços (0,3 x 10<sup>6</sup> células/poço) e os compostos foram adicionados (0,156 a 100 µg/mL) dissolvidos em etanol, seguido de incubação por 72h, dentro das condições padrão de cultivo. Depois disso, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 µL da solução 10% de MTT e foi reincubada por 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período as placas foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado ressuspensionado em DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células metabolicamente viáveis, as absorbâncias foram lidas com auxílio do espectrofotômetro de placa (Packard Spectra Count, Canada), no comprimento de onda de 550nm (NETO *et al.*, 2014, CAVALCANTI, *et al.*, 2009).

### 5.13 Análise Estatística

Os testes de sensibilidade *in vitro* e os valores médios obtidos pela leitura do sobrenadante relativo à formação de biofilmes de *Candida spp.*, foram realizados em triplicata em diferentes dias. Logo, as médias geométricas foram usadas estatisticamente para comparar os resultados do MIC. Os dados obtidos pelos experimentos de citometria de fluxo e ensaio do cometa alcalino foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) seguidos pelos testes do Newman-Keuls (p <0,05).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Identificação molecular

Para confirmar a identidade das espécies utilizadas no presente trabalho, a região completa ITS/5.8S (ITS1, 5.8S e ITS2) do DNA ribossomal nuclear foi amplificado, sequenciado e comparado com as sequências depositadas no GenBank. Pesquisas BLAST revelou que as sequências dos quatro isolados de cada espécie de *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e um de *C. glabrata* eram idênticos as sequências ITS/5.8S de diversos isolados e estirpes dos mesmos em estudo como observado na tabela 1.

### 6.2 Efeito antifúngico do FLC, FLX, PAR e SER frente às cepas de *Candida* spp.

A sensibilidade das 13 estirpes trabalhadas foi avaliada usando o método de microdiluição em caldo. Após 24 horas de exposição ao fluconazol todas as estirpes testadas apresentaram Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs)  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$  frente à *Candida* spp. caracterizando assim sua resistência. A CIM da FLX variou de 20 - 160  $\mu\text{g/mL}$ , PAR variou de 10 – 100.8  $\mu\text{g/mL}$  e SER de 10 – 20  $\mu\text{g/mL}$  (tabela 1). Os resultados demonstraram ser promissores, portanto, decidimos investigar o possível mecanismo de ação destas moléculas em uma única cepa representativa da espécie mais frequente do gênero em trabalho, *Candida albicans*, escolhida aleatoriamente, utilizando técnicas de citometria de fluxo e teste do cometa.



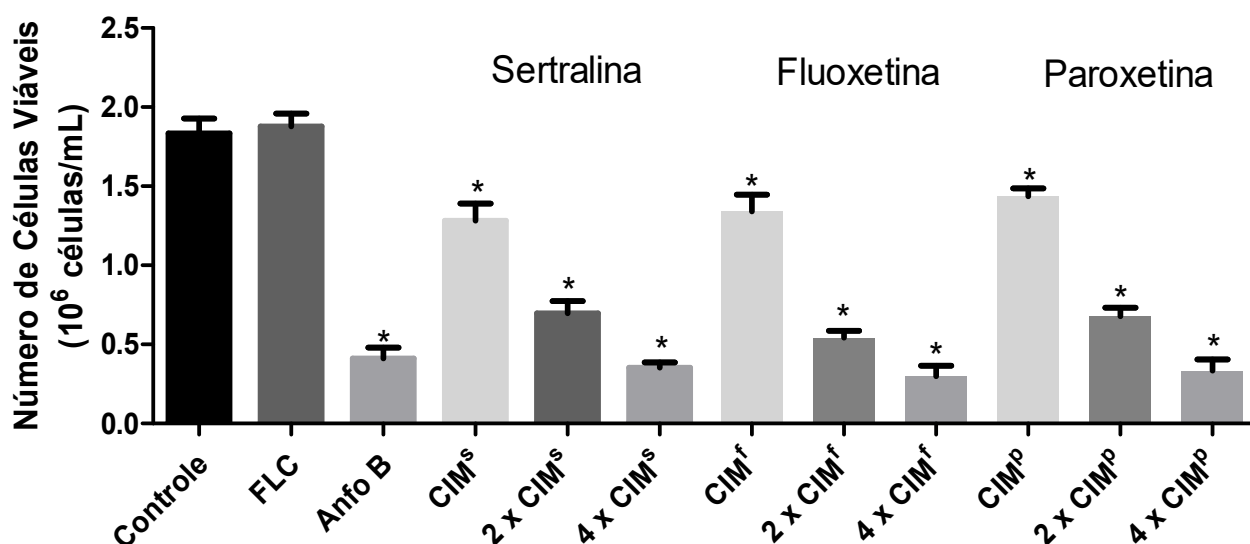
Tabela 1. Efeito antifúngico da FLX, PAR, SER frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

Cepas <sup>a</sup>	Número GenBank	Valores CIM <sup>b</sup> (µg/mL)			
		FLC	Fluoxetina	Paroxetina	Sertralina
<i>Candida albicans</i> 1	AB861478	≥ 8	40	63.5	20
<i>Candida albicans</i> 2* <sup>#</sup>	AB861479	≥ 8	127	80	20
<i>Candida albicans</i> 3	KJ740174	≥ 8	63.5	80	20
<i>Candida albicans</i> 4	KJ740175	≥ 8	100.8	80	20
<i>Candida tropicalis</i> 1*	KJ740184	≥ 8	160	80	20
<i>Candida tropicalis</i> 2	AB861491	≥ 8	50.4	100.8	20
<i>Candida tropicalis</i> 3	AB861493	≥ 8	40	80	20
<i>Candida tropicalis</i> 4	AB861490	≥ 8	80	80	20
<i>Candida parapsilosis</i> 1	AB861486	≥ 8	80	40	20
<i>Candida parapsilosis</i> 2*	AB861487	≥ 8	160	63.5	20
<i>Candida parapsilosis</i> 3	AB861488	≥ 8	80	80	10
<i>Candida parapsilosis</i> 4	AB861485	≥ 8	20	10	10
<i>Candida glabrata</i> 1*	AB861484	≥ 8	80	63.5	15.9

<sup>a</sup> Cepas de leveduras isoladas de amostras biológicas pertencentes ao Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras ( LABEL). <sup>b</sup> A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a mais baixa concentração que produziu 50% de redução do crescimento das células fúngicas, após 24h de incubação para *Candida* spp. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27- A3 do CLSI 2008. FLC – fluconazol. O intervalo de fluconazol e dos inibidores seletivos da recaptção da serotonina variou de 0.125-64 µg/mL e 4.68-600 µg/mL, respectivamente. \*Isolados utilizados no teste do biofilme. <sup>#</sup>Isolado utilizado para o método de citometria de fluxo e teste do cometa alcalino.

### 6.3 Viabilidade celular em estirpe de *C. albicans*

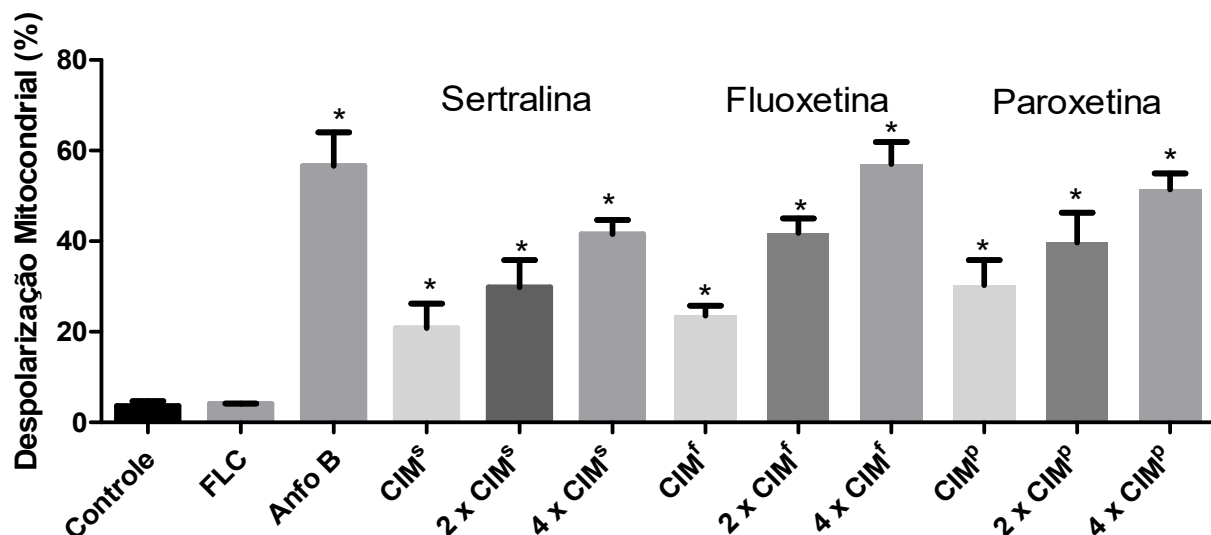
A figura 2 demonstra que não houve redução significativa no número de células quando as mesmas foram tratadas com o FLC ( $1,87 \pm 0,03$ ), o que evidencia a resistência do tratamento com o azólico. A análise por citometria de fluxo demonstrado pelo ensaio de exclusão do Iodeto de Propídio mostrou que a estirpe apresentou redução significativa da viabilidade celular após 24 horas quando tratada com: SER (CIM  $1,28 \pm 0,04$ ; 2xCIM  $0,70 \pm 0,03$ ; 4xCIM  $0,35 \pm 0,01$ ), FLX (CIM  $1,34 \pm 0,04$ ; 2xCIM  $0,54 \pm 0,02$ ; 4xCIM  $0,30 \pm 0,03$ ), PAR (CIM  $1,44 \pm 0,02$ ; 2xCIM  $0,68 \pm 0,02$ ; 4xCIM  $0,33 \pm 0,03$ ), comparada ao controle ( $1,83 \pm 0,04$ ). A anfotericina B (Anfo B) foi o tratamento comparativo de morte celular ( $0,41 \pm 0,03$ ). Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2: Redução do número de células viáveis em cepa de *C. albicans* resistente ao FLC tratadas com SER, FLX, PAR.** Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo de células tratadas com FLC ( $64 \mu\text{g/mL}$ ), Anfo B ( $4 \mu\text{g/mL}$ ), Controle, apenas o meio RPMI e com os compostos Sertralina (CIM<sup>s</sup> ( $20 \mu\text{g/mL}$ ), 2x CIM<sup>s</sup> ( $40 \mu\text{g/mL}$ ), 4x CIM<sup>s</sup> ( $80 \mu\text{g/mL}$ )); Fluoxetina (CIM<sup>f</sup> ( $127 \mu\text{g/mL}$ ), 2x CIM<sup>f</sup> ( $254 \mu\text{g/mL}$ ), 4x CIM<sup>f</sup> ( $508 \mu\text{g/mL}$ )); Paroxetina (CIM<sup>p</sup> ( $80 \mu\text{g/mL}$ ), 2x CIM<sup>p</sup> ( $160 \mu\text{g/mL}$ ), 4x CIM<sup>p</sup> ( $320 \mu\text{g/mL}$ )); em uma única cepa representativa, *C. albicans* 2<sup>#</sup> (tabela 1), resistente ao FLC, após 24 h de exposição.  $p < 0,05$  comparado com o controle por ANOVA seguido de Newman-Keuls.

#### 6.4 Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )

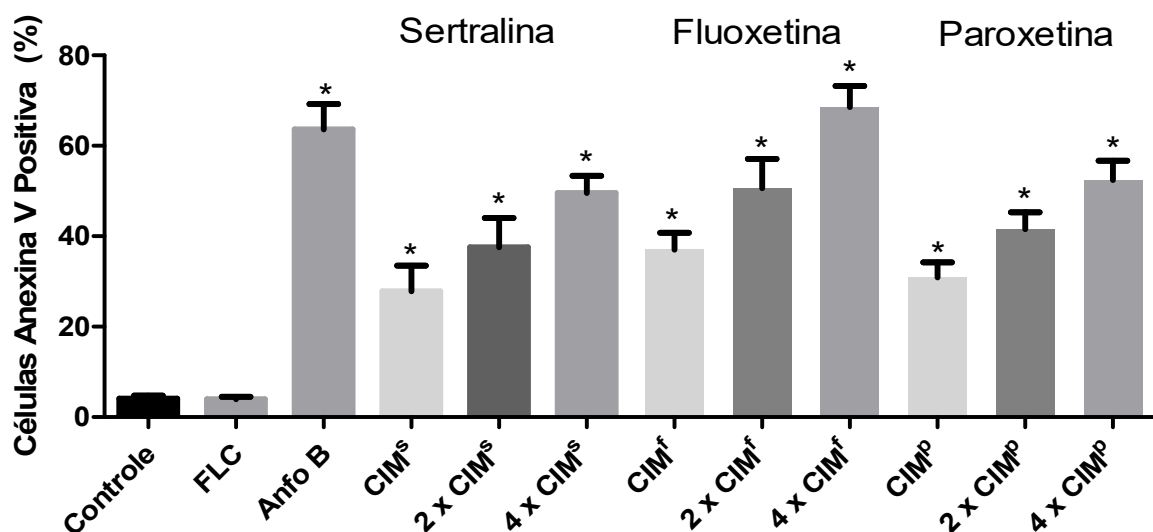
Os tratamentos demonstraram alterações significativas no  $\Delta\psi_m$  de *C. albicans* resistente ao fluconazol quando tratada após 24 horas com: SER (CIM 20,82±2,20; 2xCIM 29,80±2,45; 4xCIM 41,54±1,30), FLX (CIM 23,55±0,90; 2xCIM 41,82±1,32; 4xCIM 57,01±1,99), PAR (CIM 30,33±2,26; 2xCIM 39,70±2,70; 4xCIM 51,41±1,45), comparada ao controle (3,64±0,42). A anfotericina B (Anfo B) foi o tratamento comparativo de despolarização mitocondrial (56,64±3,00). Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo ( $p < 0,05$ ). Os resultados sugerem que este composto pode afetar a função respiratória mitocondrial, causando um colapso no  $\Delta\psi_m$ , fazendo com que a Rh 123 não se acumule nas mitocôndrias, efeito dose-dependente (figura 3).



**Figura 3: Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial em cepa de *C. albicans* resistente ao FLC tratadas com SER, FLX, PAR.** As células foram marcadas com Rh 123 (50nM). O gráfico mostra as cepas tratadas com FLC (64  $\mu\text{g/mL}$ ), Anfo B (4  $\mu\text{g/mL}$ ), Controle, apenas o meio RPMI, e com os compostos: Sertralina (CIM<sup>s</sup> (20  $\mu\text{g/mL}$ ), 2x CIM<sup>s</sup> (40  $\mu\text{g/mL}$ ), 4x CIM<sup>s</sup> (80  $\mu\text{g/mL}$ )); Fluoxetina (CIM<sup>f</sup> (127  $\mu\text{g/mL}$ ), 2x CIM<sup>f</sup> (254  $\mu\text{g/mL}$ ), 4x CIM<sup>f</sup> (508  $\mu\text{g/mL}$ )); Paroxetina (CIM<sup>p</sup> (80  $\mu\text{g/mL}$ ), 2x CIM<sup>p</sup> (160  $\mu\text{g/mL}$ ), 4x CIM<sup>p</sup> (320  $\mu\text{g/mL}$ )), por um período de 24 horas.  $p < 0,05$  comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

### 6.5 Marcação de anexina V em células de *C. albicans*

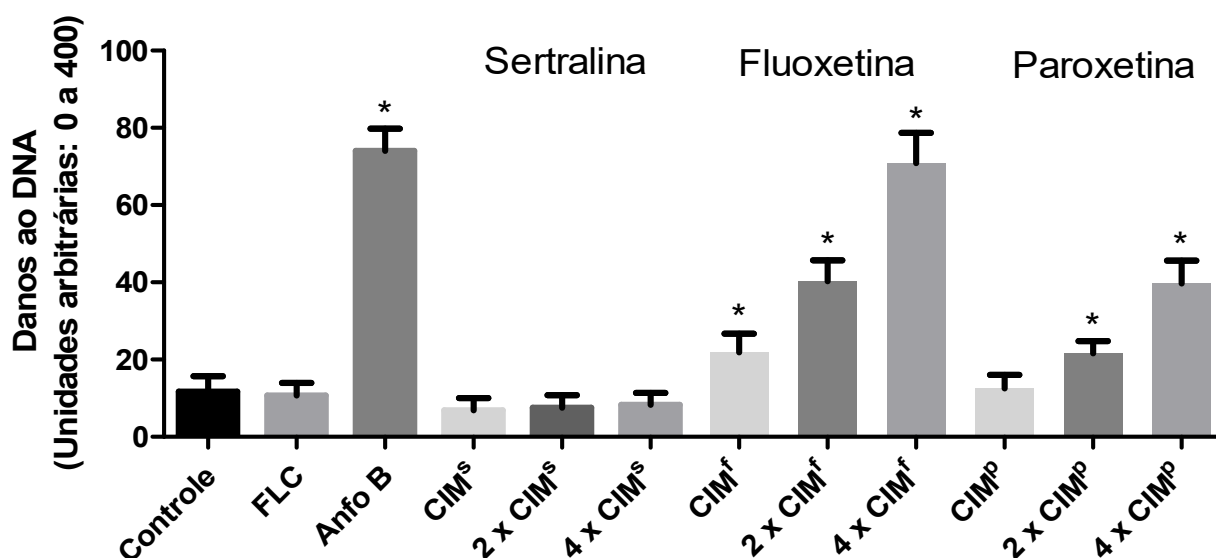
Os tratamentos demonstraram aumento significativo no número de eventos apoptóticos em células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol quando tratadas após 24 horas com: SER (CIM 27,85±2,32; 2xCIM 37,56±2,65; 4xCIM 49,53±1,55), FLX (CIM 37,04±1,53; 2xCIM 50,66±2,62; 4xCIM 68,55±1,92), PAR (CIM 30,93±1,36; 2xCIM 41,5±1,53; 4xCIM 52,45±1,73), comparada ao controle (4,07±0,27). A anfotericina B (Anfo B) foi o tratamento comparativo de externalização da fosfatidilserina (63,63±2,29). Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4: Marcação da fosfatidilserina com anexina V em cepas de *C. albicans* resistentes ao FLC tratadas com SER, FLX, PAR.** A intensidade de fluorescência indica a quantidade de células com externalização da fosfatidilserina quando tratadas com FLC (64 µg/mL), Anfo B (4 µg/mL), Controle, apenas o meio RPMI, e com os compostos: Sertralina (CIM<sup>s</sup> (20 µg/mL), 2x CIM<sup>s</sup> (40 µg/mL), 4x CIM<sup>s</sup> (80 µg/mL)); Fluoxetina (CIM<sup>f</sup> (127 µg/mL), 2x CIM<sup>f</sup> (254 µg/mL), 4x CIM<sup>f</sup> (508 µg/mL)); Paroxetina (CIM<sup>p</sup> (80 µg/mL), 2x CIM<sup>p</sup> (160 µg/mL), 4x CIM<sup>p</sup> (320 µg/mL)).  $p < 0,05$  comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

## 6.6 Danos ao DNA

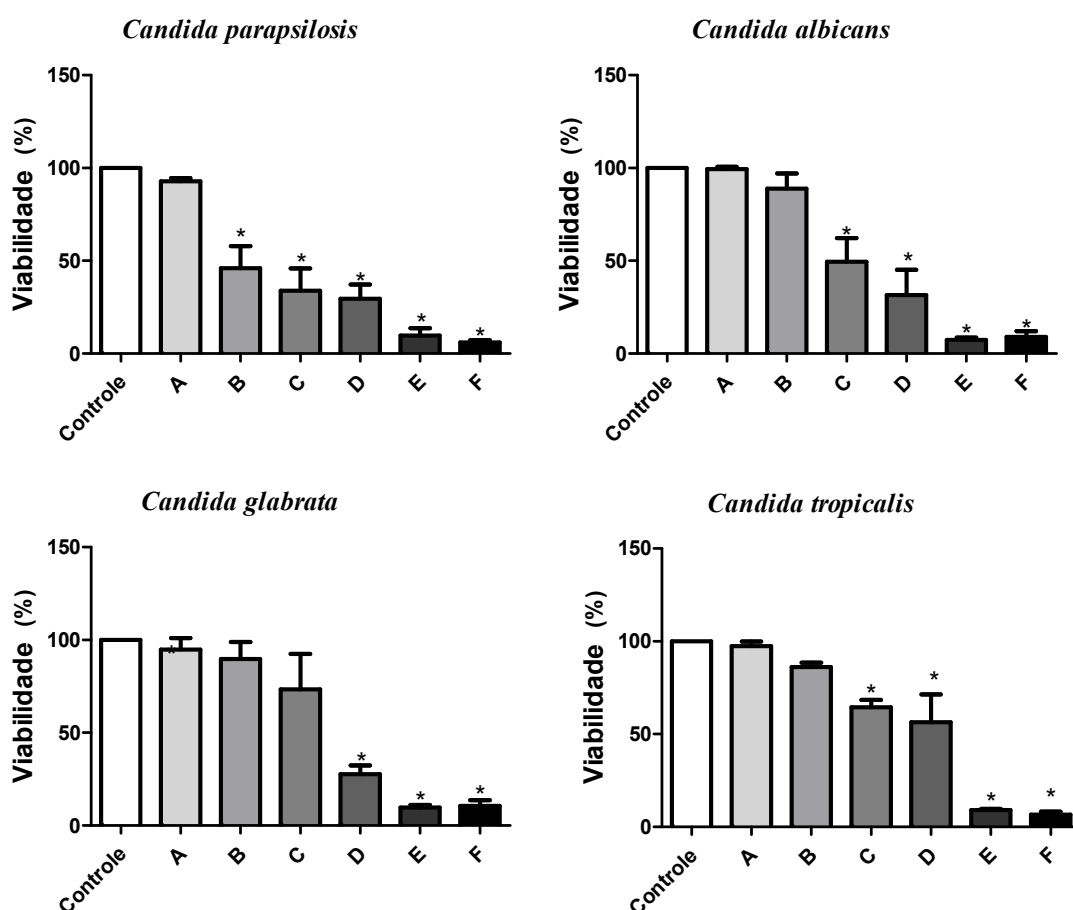
Quebras das cadeias de DNA genômico foram avaliadas pelo ensaio em cometa alcalino e foi possível observar que células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol quando tratadas após 24 horas com SER (CIM 6,83±1,30; 2xCIM 7,50±1,33; 4xCIM 8,33±1,25) não demonstrou dano significativo ao DNA quando comparadas ao controle (11,67±1,67). Já os tratamentos com FLX (CIM 21,83±2,00; 2xCIM 40,33±2,19; 4xCIM 70,83±3,22) e PAR (CIM 12,50±1,43; 2xCIM 21,67±1,28; 4xCIM 39,67±2,44), demonstraram danos ao DNA quando comparadas ao controle (11,67±1,67). A anfotericina B (Anfo B) foi o tratamento comparativo de dano ao DNA (74,00±2,37). Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5: Avaliação do índice de dano ao DNA em células de *C. albicans* resistente ao FLC tratadas com SER, FLX, PAR.** Utilizou-se a versão alcalina do ensaio do cometa em *C. albicans* resistente ao FLC. As leveduras foram expostas ao FLC (64 µg/mL), Anfo B (4 µg/mL), Controle, apenas o meio RPMI, e Sertralina (CIM<sup>s</sup> (20 µg/mL), 2x CIM<sup>s</sup> (40 µg/mL), 4x CIM<sup>s</sup> (80 µg/mL)); Fluoxetina (CIM<sup>f</sup> (127 µg/mL), 2x CIM<sup>f</sup> (254 µg/mL), 4x CIM<sup>f</sup> (508 µg/mL)); Paroxetina (CIM<sup>p</sup> (80 µg/mL), 2x CIM<sup>p</sup> (160 µg/mL), 4x CIM<sup>p</sup> (320 µg/mL)); após 24h de exposição.  $p < 0,05$  comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

### 6.7 Atividade da fluoxetina em biofilme em crescimento de *Candida* spp.

Como podemos observar na Figura 6, os isolados formadores de biofilme ao serem expostos a fluoxetina apresentaram CIM semelhantes entre as espécies (CIM<sub>50</sub>). *Candida parapsilosis* apresentou CIM de aproximadamente 40 µg/mL, *C. albicans* de 80 µg/mL, *C. tropicalis* e *C. glabrata* de 160 µg/mL. Os efeitos antifúngicos da fluoxetina causaram reduções estatisticamente significativas da viabilidade celular do biofilme ( $p < 0,05$ ), apresentando valores de CIM semelhantes aos obtidos com as mesmas células no modo planctônico de crescimento do nosso estudo (Tabela 1). Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6: Atividade da fluoxetina frente ao biofilme de *Candida* spp.** Atividade da fluoxetina frente às células agrupadas em forma de biofilme em crescimento pelo ensaio de redução de MTT. As concentrações testadas estão apresentadas na seguinte ordem: A (20 µg/mL), B (40 µg/mL), C (80 µg/mL), D (160 µg/mL), E (800 µg/mL), F (4000 µg/mL).  $p < 0,05$  comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

### 6.8 Atividade citotóxica

O potencial antiproliferativo dos compostos foi analisado pelo método do MTT. Após 72h de exposição aos compostos SER, FLX e PAR não houve citotoxicidade contra fibroblasto murino (linhagem L929), uma vez que nenhum dos ISRSs interferiu na proliferação das células, assim como o controle de células sem tratamento ( $p < 0.05$ ). A concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ), menor concentração de um agente que inibe 50% do crescimento das células em estudo, foi maior que a do intervalo testado, 100  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 2. Atividade citotóxica da SER, FLX, PAR.**

	IC 95% ( $\mu\text{g/mL}$ )
Compostos	Fibroblastos $CI_{50}$
CN <sup>a</sup>	SE <sup>b</sup>
Sertralina	>100
Fluoxetina	>100
Paroxetina	>100

Experimentos realizados em triplicatas independentes, IC 95%: intervalo de confiança de 95%.  $CI_{50}$ : Concentração inibitória média.

<sup>a</sup> Controle negativo, tratamento com o veículo usado para diluição das drogas testadas. <sup>b</sup> Sem efeito.

## 7. DISCUSSÃO

O gênero *Candida* é o responsável por cerca de 75% das infecções fúngicas hospitalares em todo o mundo (PFALLER *et al.*, 2014). O diagnóstico incorreto, terapia de curta duração, paciente com elevada carga microbiana, estirpes com alto grau de virulência e longa exposição ao medicamento são fatores que podem causar a resistência fúngica, problema correlacionado a falhas terapêuticas (BARCHIESI *et al.*, 2000; TOBUDIC; KRATZER; PRESTERL, 2012).

Na busca por novas estratégias de tratamento para infecções causadas pelo gênero *Candida*, fármacos não antifúngicos obtiveram atividade promissora, mesmo em estirpes resistentes ao fluconazol (OLIVEIRA *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2013). Os ISRSs têm como mecanismo de ação a inibição do transportador de serotonina sódio-dependente, nos quais alguns de seus principais representantes, fluoxetina e setralina, já vêm demonstrando promissora atividade antifúngica isolada e combinada com o fluconazol (LASS-FLÖRL *et al.*, 2001a; OLIVEIRA *et al.*, 2014; SILVESTRI *et al.*, 2004; ZHAI *et al.*, 2012), inclusive em estudos *in vivo* (NÚÑEZ *et al.*, 2010).

O teste de citotoxicidade *in vitro* em modelos celulares tem se mostrado uma maneira fácil, rápida e sensível na triagem de compostos testes (CRAGG; NEWMANN, 2000). No estudo inicial, foi determinada a atividade antiproliferativa dos compostos frente à linhagem de fibroblastos, pelo método colorimétrico do MTT. Essa avaliação revelou que os ISRSs não reduziram a taxa de proliferação celular na linhagem testada.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os três ISRSs utilizados (sertralina, fluoxetina e paroxetina) possuem efeito antifúngico dentro da faixa testada. A fluoxetina foi a droga com maior variação de CIM (20 - 160 µg/mL) em relação à sertralina e paroxetina. Esta variação na sensibilidade não teve relação direta com a espécie de *Candida*, provavelmente ocorreu por variações genotípicas de cada estirpe. A combinação de diferentes modificações genéticas faz com que sofisticados genótipos sejam obtidos após pressão antifúngica, garantindo diferentes sensibilidades mesmo dentro da mesma espécie de *Candida* (COSTE *et al.*, 2007). Silvestri *et al.* (2004) utilizaram mesma metodologia e encontraram resultados semelhantes ao atual trabalho, a CIM da fluoxetina em cepas de *C. albicans* variou de 32-128 µg/mL. Já Oliveira *et al.*



(2014), que também seguiu o protocolo M27-A3, encontraram CIMs mais elevadas (de 19 – 625  $\mu\text{g/mL}$ ), mesmo em cepas de *Candida* spp. sensíveis ao fluconazol.

Diferentemente dos demais candidatos, a paroxetina ainda não havia demonstrado resultados expressivos em relação à atividade antifúngica. Este ISRS apresentou atividade antifúngica (10 – 100.8  $\mu\text{g/ml}$ ), demonstrando melhor resultado que a fluoxetina na maioria das cepas. Lass-Flörl *et al.* (2001b) já relataram concentração fungicida mínima (CFM) para uma única cepa de *Candida parapsilosis* de 500  $\mu\text{g/ml}$  para paroxetina e também pôde-se perceber que a essa droga foi o candidato menos eficiente, quando comparado a sertralina e fluoxetina.

Em relação à sertralina, candidato com melhor resultado (CIM 10-20  $\mu\text{g/mL}$ ), o efeito antifúngico já foi demonstrado *in vitro* contra *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Plasmodium falciparum* e *Candida* spp. (LASS-FLÖRL *et al.*, 2001b; ZHAI *et al.*, 2012; COUTAUX *et al.*, 1994). Os valores de nosso trabalho corroboraram com outros estudos (LASS-FLÖRL *et al.*, 2001a), demonstrando um perfil antifúngico interessante. A faixa de variação de sensibilidade foi pequena em relação a demais drogas, demonstrando maior reprodutibilidade do resultado independente da espécie ou variação genética tratada.

A partir dos resultados promissores da concentração inibitória mínima (CIM) dos ISRSs frente às cepas de *Candida* spp., foi analisada uma única cepa representativa (*Candida albicans* 2<sup>#</sup> - tabela 1), a partir das técnicas citometria de fluxo e teste do cometa, para identificar a relação da morte celular fúngica com o tratamento proposto.

Após a exposição da cepa de *Candida albicans* resistente ao fluconazol aos respectivos compostos, foi observada uma diminuição no número de células viáveis nas concentrações tratadas (MIC, 2xMIC e 4xMIC) quando comparado ao controle, na presença do marcador citofluométrico Iodeto de Propídio (PI), indicando assim danos as membranas celulares com possível comprometimento em suas funções.

Uma das vias de ativação da apoptose, a intrínseca, envolve a participação mitocondrial em resposta a algum dano/estresse celular. Quando os sinais de morte celular alcançam a mitocôndria, há um colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ( $\Delta\psi_m$ ) que conduz a abertura de poros transientes nas membranas mitocondriais e a liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol (GALLUZZI *et al.*, 2010). A alteração no  $\Delta\psi_m$  faz com que a rodamina 123 (Rh123), um corante fluorescente nucleofílico, não se acumule no interior das mitocôndrias. Os nossos resultados

utilizando a Rh123 confirmam uma disfunção mitocondrial, sugerindo que o tratamento de *C. albicans* resistente a fluconazol com ISRSs afeta a função respiratória mitocondrial, culminando na morte celular. Estudos *in vivo* demonstram que o tratamento crônico e com doses bem acima da terapêutica com a fluoxetina altera o metabolismo energético e integridade da mitocôndria do fígado de animais. Essas alterações se deveram ao aumento do estresse oxidativo no interior da célula, identificado pelo aumento dos marcadores proteína carbonil hepática e MDA. O aumento deste marcador de peroxidação lipídica pode também ter levado aos danos de membrana relatados (TODOROVIC *et al.*, 2014; FELDMAN *et al.*, 2006). Rainey *et al.* (2010) identificaram que a sertralina, além de seu alvo proteico convencional, também tem como alvo fosfolípídeos de superfícies citoplasmáticas, como complexo de Golgi, vacúolos, endossomos. Algumas células possuem mecanismos compensatórios para esse estresse adicional, mas quando esse sistema não está expresso, a membrana sofre danos, que é o que provavelmente ocorre com as células de *C. albicans* e outros microrganismos.

Durante o processo apoptótico, a fosfatidilserina (PS), um fosfolípídeo de membrana interna, é externalizada servindo de marcador para que a célula seja fagocitada por macrófagos. Para a detecção da externalização da PS foi utilizada a anexina V, uma proteína capaz de se ligar a este fosfolípídeo (HWANG *et al.*, 2012). Após exposição (24h) aos compostos, foi observado células fúngicas com PS externalizada, que reforça a participação da apoptose sobre a morte celular durante a atividade antifúngica dos ISRSs. Esta morte celular programada já foi relatada com as células do linfoma de Burkitt e em células do neuroblastoma humano, através da ativação das caspases (SERAFEIM *et al.*, 2003; LEVKOVITZ *et al.*, 2005). A apoptose também foi induzida pela fluoxetina em linhagem de carcinoma humano pela alteração do potencial de membrana mitocondrial, levando a ativação de caspases através de espécies reativas de oxigênio (LEE *et al.*, 2009).

Em relação a danos ao DNA, a fragmentação do DNA é uma característica que representa um passo irreversível na condução da morte celular (HWANG *et al.*, 2012). O teste do cometa versão alcalina permite detectar quebras de fitas simples e duplas na molécula de DNA induzidas por substâncias com potencial genotóxico. Lemos *et al.* (2005) concluíram que a fluoxetina é genotóxica para a linhagem de células humanas testada apenas em elevadas concentrações *in vitro* (5.000 µg/mL), mas o mesmo não

ocorre *in vivo*, provavelmente por causa da metabolização. As demais drogas testadas não possuem atividade genotóxica positiva relatada, porém, em ensaios a longo prazo para carcinogênese em ratos, paroxetina e sertralina obtiveram resultados positivos (BRAMBILLA; MATTIOLI; MARTELLI, 2009). Nossos resultados demonstraram que as células fúngicas são mais sensíveis aos 3 candidatos do que as células humanas em relação à integridade do DNA, mas, mesmo assim, percebemos que não existe correlação direta com o mecanismo de ação antifúngico, pois os valores foram proporcionais às concentrações utilizadas. A sertralina, que obteve melhor resultado quanto a CIM, não gerou dano ao DNA nas concentrações testadas (20, 40, 80 µg/mL). O candidato que apresentou maior porcentagem de dano ao DNA foi aquele utilizado em maior concentração (127, 254, 508 µg/mL), a fluoxetina.

De acordo com nossos dados, os ISRSs causam morte fúngica após danos na membrana, que ativa vias de sinalização apoptótica, causando a perda de viabilidade celular de forma dose-dependente em cada uma das drogas testadas.

Sabendo do efeito promissor da sertralina, fluoxetina e paroxetina, e levando em consideração que as leveduras do gênero *Candida* apresentam como importante fator de virulência a formação de biofilme (LIM *et al.*, 2012), analisamos a atividade antifúngica da fluoxetina, principal representante da classe, para biofilme formado 24h de diferentes espécies de *Candida*. Os nossos resultados demonstraram que a concentração da fluoxetina para inibir a viabilidade do biofilme formado é semelhante nas células planctônicas. Houve homogeneidade nos resultados entre as espécies. Wang *et al.* (2015) demonstraram que a substância testada, baicalin, consegue induzir apoptose em biofilme de *C. albicans* da mesma forma que induziu em células planctônicas, demonstrando que algumas substâncias conseguem ter a mesma efetividade nas duas formas. A disfunção de membrana causada pela fluoxetina pode alterar de forma significativa estruturas vitais do biofilme, assim como ocorreu em células livres. Esse achado torna-se relevante, uma vez que a característica frequentemente associada ao biofilme é a sua sensibilidade reduzida aos antifúngicos convencionais comumente utilizados. Lass Flörl *et al.* (2003) demonstrou que a sertralina afeta outros fatores de virulência do gênero *Candida*, como menor formação de hifas, queda na produção de fosfolipases e aspartil proteinases.

A dinâmica de formação de biofilme ocorre em etapas distintas: fase inicial, intermediária e de maturação. Segundo Blankenship e Mitchell (2006), após 24h de

formação o biofilme encontra-se na fase intermediária, na qual as células já aderidas formam microcolônias, começam a produzir a matriz extracelular e mecanismos de comunicação surgem levando a expressão diferencial de genes responsáveis por potencializar os fatores de virulência associados, como adesão e formação de hifas. Esta é a fase de transição em que as células começam a mudar suas características para viver em comunidade. O fato da CIM das células nessa fase de formação de biofilme ter sido muito próximo a CIM de células planctônicas deve-se ao fato de não ter havido a formação completa do biofilme. Além disso, para afirmar em qual fase o biofilme se encontra, necessita-se de técnicas mais descritivas, como microscopia ou bioquímica (RODRIGUES *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015). Em relação à atividade dos ISRSs contra biofilme, os dados iniciais demonstram resultados animadores, mas que necessitam de técnicas mais específicas e diferentes tempos de maturação para confirmação dessa hipótese.

Mesmo sabendo que a concentração comum no plasma é em torno de 200ng/mL (para fluoxetina), valor bem abaixo dos obtidos nas CIM, as concentrações plasmáticas *in vivo* em diversos sítios anatômicos, como o fluido vaginal e líquido cefalorraquidiano, não são bem definidas. Alguns estudos já demonstraram atividade antifúngica *in vivo*, mesmo com a incógnita da concentração no sítio de ação (NÚÑEZ *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Dessa forma, esses resultados devem ser levados em consideração no tratamento de escolha clínica. Se o paciente está dentro dos fatores de risco para infecções por *Candida*: recorrência, resistência ou formação de biofilme, e precisa de tratamento antidepressivo, a droga de escolha pode ser a fluoxetina, sertralina ou paroxetina, levando em conta seu possível efeito adverso contra *Candida* spp. Além disso, o uso tópico deve ser avaliado para identificar se é viável uma nova formulação para tratamento de candidíase vulvovaginal, assim como discutido também por Oliveira *et al.* (2014).

## 8. CONCLUSÃO

Os ISRSs apresentam atividade antifúngica *in vitro* contra as cepas em estudo, promovendo alterações na integridade das membranas plasmática e mitocondrial, levando as células à morte por apoptose. A fluoxetina também demonstrou a capacidade de diminuir a viabilidade do biofilme em crescimento *in vitro* de todas as espécies de *Candida* testadas resistentes ao fluconazol.

## 9. REFERÊNCIAS

- AFELTRA, J *et al.* Potent Synergistic In Vitro Interaction between Nonantimicrobial Membrane-Active Compounds and Itraconazole against Clinical Isolates of *Aspergillus fumigatus* Resistant to Itraconazole. **Antimicrob. Agents Chemother** v. 48, n. 4, p. 1335–1343, 2004.
- ALANGADEN, G J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. **Infectious disease clinics of North America**, v. 25, n. 1, p. 201–25, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21316001>>.
- ALEXANDER BD, PFALLER MA. Contemporary tools for the diagnosis and management os invasive mycosis. **Clin Infect Dis**. 43: S15-41. 2006.
- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol** 215:403– 410. 1990.
- AL-FATTANI, M. A; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. Pt 8, p. 999–1008, 2006.
- ANDRADE NETO, Joao B *et al.* Antifungal Activity of Naphthoquinoidal Compounds In Vitro against Fluconazole-Resistant Strains of Different Candida Species: A Special Emphasis on Mechanisms of Action on *Candida tropicalis*. **Plos One**. v. 9, n. 5, e93698, 2014.
- ANIL KUMAR MS, *et al.*. Comparison of four different immunosuppression protocols without long-term steroid therapy in kidney recipients monitored by surveillance biopsy: five-year outcomes. **Transpl Immunol**, v.20, (1-2), p.32-42, 2008.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2004. **Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Disponível em : <[http://www.anvisa.gov.br/servico\\_saude/microbiologia/mod\\_7\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servico_saude/microbiologia/mod_7_2004.pdf)>.
- BAL, A.M. The echinocandins: three useful choices or three too many?. **Int. Journal Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 1, p.13–18, 2010.

BARCHIESI, Francesco *et al.* Experimental Induction of Fluconazole Resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 44, n. 6, p. 1578–1584, 2000.

BARRY, A. L.; PFALLER, M. A.; RENNIE, R. P.; FUCHS, P. C.; BROWN, S. D. Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth microdilution, Etest, and disk diffusion methods. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, p.1781-1784, 2002.

BASTOLA DR, OTU H H, DOUKAS, S E, *et al.* Utilization of the relative complexity measure to construct a phylogenetic tree for fung. **Mycol Res** 108:117-125. 2004.

BERGAMASCO MD, *et al.* Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. **Mycoses**, v.56, n.3, p.256-263, 2013.

BLANKENSHIP JR, MITCHELL AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr Opin Microbiol** 9(6): 588-594, 2006.

BOO TW, O'REILLY B, O'LEARY J, CRYAN B. Candidaemia in an Irish tertiary referral hospital: epidemiology and prognostic factors. **Mycoses**, v.48, p.251-9, 2005.

BOTELHO AR, PLANTA RJ. Species identification of *Candida albicans* by hybridization with oligonucleotides derived from ribosomal DNA internal spacers. **Yeast**. 10: 709–717. 1994.

BRAMBILLA, Giovanni; MATTIOLI, Francesca; MARTELLI, Antonietta. Genotoxic and carcinogenic effects of antipsychotics and antidepressants. **Toxicology**. v. 261, p. 77–88, 2009.

CHONG, Pearlie P. *et al.* Epidemiology of invasive fungal infections in lung transplant recipients on long-term azole antifungal prophylaxis. **Clinical Transplantation**, v. 29, n. 4, p. 311–318, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ctr.12516>>.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Approved Standard M27-A3, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement, M27S4, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

CORTI M, *et al.*. *Candida parapsilosis* meningitis in a patient with AIDS. Report of a case and review of the literature. **Rev Iberoam Micol**, v.30, n.2, p.122-124, 2013.

CORZO -LEÓN, Dora E. *et al.* Epidemiology and outcomes of invasive fungal infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients in the era of antifungal prophylaxis: a single-centre study with focus on emerging pathogens. **Mycoses**. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/myc.12318>>.

COSTA, C. R. *et al.* Análise molecular e dimorfismo de isolados de *Candida albicans* suscetíveis e resistentes aos azólicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 44, n. 6, p. 740–744, 2011.

COSTA, C. R. **Fatores de virulência de isolados de *Candida* de pacientes imunocoprometidos. Caracterização molecular de *Candida albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol.** Tese. Universidade Federal de Goiás - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. 2009.

COSTE, Alix *et al.* Genotypic Evolution of Azole Resistance Mechanisms in Sequential *Candida albicans* isolates. **Eukaryotic Cell**. v. 6, n. 10, p. 1889–1904, 2007.

COUTAUX, A.F., MOONEY, J.J., WIRTH, D.F. Neuronal monoamine reuptake inhibitors enhance *in vitro* susceptibility to chloroquine in resistant *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 38, p. 1419-1421. 1994.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Exp. Opin. Investig. Drugs**, v. 9, p. 2783-2797, 2000.

DA COSTA, V. G. *et al.* Nosocomial Bloodstream *Candida* Infections in a Tertiary-Care Hospital in South Brazil: A 4-Year Survey. **Mycopathologia**, v. 178, p.243–250, 2014.



DA SILVA, Cecília Rocha *et al.* Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 4, p. 1691–700, abr. 2013.

DABAR, George *et al.* Community and Health-care Associated Infections in Critically Ill Patients: A Multicenter Cohort Study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 37, p. 80–85, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971215001332>>.

De LOGU, A.; *et al.*, E. In vitro activity of 2-cyclohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 55, p. 692-698, 2005.

DE MEDEIROS, AP, *et al.*. Genetic relatedness among vaginal and anal isolates of *Candida albicans* from women with vulvovaginal candidiasis in north-east Brazil. **J Med Microbiol**. Nov; v. 63, p. 1436-45. 2014. doi: 10.1099/jmm.0.076604-0.

DELFINO, D *et al.* Potential association of specific *Candida parapsilosis* genotypes , bloodstream infections and colonization of health workers ' hands. **Clin Microbiol Infect**. 2014.

DEMITTO, F. D. O. *et al.* Suscetibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v. 48, n. 5, p. 315–321, 2012.

D'ENFERT, C. Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. **Current Opinion in Microbiology**. V12, I4, P 358–364. 2009.

DIEKEMA, D.J. *et al.* The changing epidemiology of healthcare-associated over three decades. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, p. 45-48, 2012.

FAROOGI, J.; *et al.* Species identification of invasive yeasts including *Candida* in Pakistan: limitations of phenotypic methods. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 62, n.10, p.995-998, 2012.

FELDMAN, M., FRIEDMAN, L.S., BRANDT, L.J.. Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. Pathophysiology, Diagnosis, Management, 8ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 2006

FLEMMING, Hans-curt; WINGENDER, Jost. The biofilm matrix. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>>.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 109–18, 2011.

FORTUN J, RUIZ I, MARTIN-DAVILA P, CUENCA-ESTRELLA M. Fungal infection in solid organ recipients. **Enferm Infecc Microbiol Clin 30 Suppl**, v.2, p.49-56, 2012.

GALLUZZI, L *et al.* Mitochondrial gateways to cancer. **Mol. Aspects Med.**, v. 31, n. 1, p. 1-20, 2010.

GHANNOUM MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev** 13(1): 122-143, 2000.

GIRI S, KINDO AJ. A review of *Candida* species causing blood stream infection. **Indian J Med Microbiol**, v.30, n.3, p.270-278, 2012.

GOODNICK, PJ; GOLDSTEIN, B. Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders. Basic Pharmacology. **J Psychopharmacol**. V. 12, n3, sup B, 3-20, 1998.

GUNYAR, OA, *et al.*. Airborne microfungus flora determined in the different units of the department of Tulay Aktas Oncology Hospital, Ege University. **Fresenius Environmental Bulletin**. V.24, Issue 1B, p.317-323, 2015.

GUO, Qiongjie *et al.* Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. *Journal of medical microbiology*, v. 57, n. Pt 4, p. 457–62, abr. 2008.

HAWSER, S P; DOUGLAS, L Julia. Biofilm Formation by *Candida* Species on the Surface of Catheter Materials In Vitro. v. 62, n. 3, p. 915–921, 1995.

HAWSER, S P. Comparisons of the susceptibilities of planktonic and adherent *Candida albicans* to antifungal agents: a modified XTT tetrazolium assay using synchronised *C. albicans* cells. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 34, p. 149-152, 1996.

HAWSER S P.; *et al.* Comparison 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfenyl)- 5 - [(Phenylamino)carbonyl] - 2H – tetrazolium -hydroxide XTT) in colorimetric method with the standardized national committee for clinical laboratory standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 1450-1452, 1998.

HUANG X, MADAN A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Res** 9:868–877. 1999.

HWANG, I. ;*et al.* Amentoflavone Stimulates Mitochondrial Dysfunction and Induces Apoptotic Cell Death in *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4 , p. 207–218, 2012.

IWEN, P C; HINRICHS, S H; RUPP, M E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal. **Medical Mycology**. p. 87–109, 2002.

IWEN P C. Molecular detection na typing of fungal pathogens. **Clin Lab Med**; 23:781-799. 2003.

KANAFANI ZA, PERFECT JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents:mechanisms and clinical impact. **Clin Infect Dis** 46(1): 120-128, 2008.

KAPLAN, HI; SADOCK, BJ. Synopsis os psychiatry. 8th Ed. Baltimore, USA: Williams; Wilkins; 1998.

KATRAGKOU, Aspasia; WALSH, Thomas J.; ROILIDES, Emmanuel. Invasive Fungal Infections in Pediatric Solid Organ Transplant Patients: Epidemiology and Management. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 2, p. 57–64, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12281-015-0217-2>>.

KHOSRAVI AR, *et al.* Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabetes mellitus. **Mycol Med**, v.18, p.83-88, 2008.

KOTHAVADE, R. J. *et al.* *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. Pt 8, p. 873–80, 2010.

KROM, B. P.; COHEN, J. B.; FESER, G. E. M.; CIHLAR, R. L. Optimized candidal biofilm microtiter assay. **J. Microbiol. Methods**, v. 68, p. 421-423, 2007.

KRUSZEWSKA, H; ZAREBA, T; TYSKI, S. Examination of antimicrobial activity of selected non-antibiotic products. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 67, n. 6, p. 733–6, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21229899>>.

KUMAR, S; GAUTAM, S; SHARMA, A. Antimutagenic and antioxidant properties of plumbagin and other naphthoquinones. **Mutation research**, v. 755, n. 1, p. 30–41, 4 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23688616>>.

KURTZMAN CP, FELL JW, BOEKHOUT T. The Yeasts: A Taxonomic Study. **Elsevier**. United States of America, 2011.

LASS-FLÖRL, C *et al.* Antifungal Activity against *Candida* Species of the Selective Serotonin-Reuptake Inhibitor, Sertraline. **Clinical Infectious Diseases**. v. 33, p. 135–136, 2001a.

LASS-FLÖRL, C *et al.* Antifungal properties of selective serotonin reuptake inhibitors against *Aspergillus* species in vitro. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 775–9, dez. 2001b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11733460>>.

LASS-FLÖRL, Cornelia *et al.* Interaction of sertraline with *Candida* species selectively attenuates fungal virulence in vitro. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 35, p. 11-15. 2003.

LEE, Chung Soo *et al.* Fluoxetine Induces Apoptosis in Ovarian Carcinoma Cell Line OVCAR-3 Through Reactive Oxygen Species-Dependent Activation of Nuclear Factor-**Nordic Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, n. Iii, p. 446–453, 2009.

LEMOS *et al.* Evaluation of genotoxic effect of prozac (fluoxetine) without and with addition of vitamins A and C by means of the comet assay in culture of CHO-K1 cells. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 26, n. 2, p.95-100, jul./dez. 2005.

LEVKOVITZ Y, *et al.* Differential induction of apoptosis by antidepressants in glioma and neuroblastoma cell lines: Evidence for p-c-Jun, cytochrome c, and caspase-3 involvement. **J Mol Neurosci** v. 27, p. 29–42. 2005.

LIM CS, ROSLI R, SEOW HF, CHONG PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v.31, n.1, p. 21-31, 2012.

LOTT TJ, KUYKENDALL RJ, REISS E. Nucleotide sequence analysis of the 5 $\phi$ 8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species. **Yeast** 9: 1199–1206. 1993.

MAVOR AL, THEWES S, HUBE B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. **Curr Drug Targets**, v.6, n.8, p.863-874, 2005.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–28, 15 fev. 2013.

MERCURE S, ROUGEAU N, MONTPLAISIRE S, LEMAY G. Complete nucleotide sequence of *Candida albicans* 5 $\phi$ 8S rRNA coding gene and flanking internal transcribed spacers. **Nucleic Acids Res** 21: 4640, 1993.

MITCHELL, M; HUDSPETH, M; WRIGHT, A. Flow Cytometry Susceptibility Testing for the Antifungal Caspofungin. **J of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 6, p. 2586–2589, 2005.

MORETTI ML, *et al.*. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. **Med Mycol**, v.51, n.3, p.225-230, 2013.

NAGLIK JR, CHALLACOMBE SJ, HUBE B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiol Mol Biol Rev** 67(3): 400-428, 2003.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5476>>.

NETT, Jeniel *et al.* Putative Role of  $\beta$  -1 , 3 Glucans in *Candida albicans* Biofilm Resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2007, 51(2):510. DOI: 10.1128/AAC.01056-06.

NWEZE EI, OGBONNAYA UL. Oral *Candida* isolates among HIV-infected subjects in Nigeria. **J Microbiol Immunol Infect**, v.44, n.3, p.172-177, 2011.

NUCCI, Marcio *et al.* Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS one**, v. 8, n. 3, p. e59373, jan. 2013.

NÚÑEZ, María J *et al.* Effects of psychological stress and fluoxetine on development of oral candidiasis in rats. **Clinical and vaccine immunology** : CVI, v. 17, n. 4, p. 668–73, abr. 2010.

ODDS, FRANK C. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. Bailliere Tindall, 1988.

OLIVEIRA, Ana S *et al.* Anti- *Candida* Activity of Fluoxetine Alone and Combined with Fluconazole : a Synergistic Action against Fluconazole-Resistant Strains. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 58, n. 7, p. 4224-26. 2014.

OLIVEIRA, Sofia Costa de *et al.* Ibuprofen Potentiates the In Vivo Antifungal Activity of Fluconazole against *Candida albicans* Murine Infection. **Antimicrob. Agents Chemother** v. 59, n. 7, p. 4289–4292, 2015.

ORTEGA, M *et al.* *Candida* spp. bloodstream infection: influence of antifungal treatment on outcome. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 562–8, mar. 2010.

PERES, *et al.* Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiro de Dermatologia.** v. 85 (5), p. 657-67, 2010.

PFALLER, M.A.*et al.* Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 3, p. 164-176, 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American journal of medicine**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S3–13, jan. 2012.

PFALLER, M. *et al.* Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 74, n. 4, p. 323–31, 2012.

PFALLER, Michael a. *et al.* Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

PIERCE, Christopher G *et al.* A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **NHI Public Access** v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2009.

PINA-VAZ C, *et al.* Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. **J Antimicrob Chemother** 56:678-685. 2005.

PIRES, Regina Helena. **Formação de biofilmes e resistência a antifúngicos e biocidas em *Candida parapsilosis* e *C. orthopsilosis* isoladas de águas usadas para hemodiálise**. Tese (Programa de pós- graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêutica - Universidade Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2010.

RAINEY, Meredith M *et al.* The Antidepressant Sertraline Targets Intracellular Vesiculogenic Membranes in Yeast. **Genetics**. v. 185, p. 1221-33. 2010.

RAJPUT, Sandeep B; KARUPPAYIL, S Mohan. Phytomedicine  $\beta$ -Asarone, an active principle of *Acorus calamus* rhizome, inhibits morphogenesis, biofilm formation and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 20, n. 2, p. 139–142, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2012.09.029>>.

RAMAGE G.; WALLE, K. V.; WICKES, B. L.; LWICKES, B. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 2475-2479, 2001.

RAMAGE G.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryot. Cell**, v. 4, p. 633-638, 2005.

RAMAGE G, MOWAT E, JONES B, WILLIAMS C, LOPEZ-RIBOT J. Our current understanding of fungal biofilms. **CRC Crit Rev Microbiol**, v.35, p.340-55, 2009.

RANG; DALE. **Farmacologia** / H. P. Rang *et al.*: [tradução de Raimundo Rodrigues Santos e outros]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RESENDE JC, DE RESENDE MA, SALIBA JL. Prevalence of *Candida* spp. in hospitalized patients and their risk factors. **Mycoses**, v.45, n.8, p.306-312, 2002.

RIESELMAN, M. H., HAZEN, K. C.; CUTLER, J. E. Determination of antifungal MICs by a rapid susceptibility assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 333-340, 2000.

RODRIGUES, C.F.; *et al.* Detection and Quantification of Fluconazole within *Candida glabrata* Biofilms. **Mycopathologia**. DOI 10.1007/s11046-015-9862-9. 2015.

ROSADO V, *et al.*. Incidence of infectious complications associated with central venous catheters in pediatric population. **Am J Infect Control**, v.41, n.9, p.81-84, 2013.

RUHNKE M, *et al.*. Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul- Ehrlich- Society for Chemotherapy. **Mycoses**, v.54, n.4, p.279-310, 2011.

SAHIN, Sezin Zorlu *et al.* Invasive Fungal Infections in Renal Transplant Recipients: Epidemiology and Risk Factors. **Mycopathologia**, p. 43–50, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11046-015-9875-4>>.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. The condensed protocols from Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor**, NY. 1989.

SANDERS-JUSH, E; MAYER, SE. Inibidores específicos da recaptção da serotonina. In: Hardman JG, Limbird LE, GOODMAN-GILMAN A. As Bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro, Brasil: McGraw-Hill. P.205-20. 2003.



SARDI, J. C O *et al.* *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART1, p. 10–24, 2013.

SERAPEIM A *et al.* Selective serotonin reuptake inhibitors directly signal for apoptosis in biopsy-like Burkitt lymphoma cells. **Blood** v. 101, p. 3212–19. 2003.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004. cap. 25, p. 266-267, 2004.

SILVA, S. *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.

SILVESTRI, Romano *et al.* Imidazole analogues of fluoxetine, a novel class of anti-*Candida* agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3924–6, 29 jul. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15267229>>.

SUDBERY, Peter; GOW, Neil; BERMAN, Judith. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**. v. 12, n. 7, 2004.

SUN, Yuqian *et al.* Epidemiology, Management, and Outcome of Invasive Fungal Disease in Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation in China: A Multicenter Prospective Observational Study. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 21, n. 6, p. 1117–1126, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879115002189>>.

TANG, Jih-Luh *et al.* High Incidences of Invasive Fungal Infections in Acute Myeloid Leukemia Patients Receiving Induction Chemotherapy without Systemic Antifungal Prophylaxis: A Prospective Observational Study in Taiwan. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0128410, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0128410>>.

THOMPSON DS, CARLISLE PL, KADOSH D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic Cell** 10(9): 1173-1182, 2011.

TOBUDIC, S; KRATZER, C; PRESTERL, E. Azole-resistant *Candida* spp. – emerging pathogens? **Mycoses**. v. 55, p. 24–32, 2012.

TODOROVIC, Nevena *et al.* Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: A histopathological study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 59, p. 20–30, 2014.

TSAI P-W, *et al.*. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. **BioMedicine** 3: 51-64, 2013.

VAN DER VELDEN WJ, *et al.*. Host-microbe interactions in stem cell transplantation: recognizing *Candida* in infection and inflammation. **Virulence**, v.1, n.3, p. 180-184, 2010.

WANG, TianMing *et al.* In vitro antifungal activity of baicalin against *Candida albicans* biofilms via apoptotic induction. **Microbial Pathogenesis**, v. 87, p. 21–29, 2015.

Disponível

em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401015001060>>

WARNER, S.A.J. Genomic DNA Isolation and Lambda Library Construction.. In: Foster, G.D.; Twell, D. (Eds). *Plant Gene Isolation: Principles and Practice*. West Sussex: John Wiley & Sons. p.51-73. 1996.

WHITE, T.; BRUNS,T.; LEE, S.; TAYLOR, J.. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322 In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. **Academic Press**, San Diego, CA. 1990.

XIAO, J. *et al.* The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. **PLoS Pathog.** 8, 1002623. 2012.

ZHAI, Bing *et al.* The Antidepressant Sertraline Provides a Promising Therapeutic Option for Neurotropic Cryptococcal Infections. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 7, p. 3758–3766, 2012.

ZNAIDI, S.; NESSEIR, A.; CHAUVEL, M.; ROSSIGNOL, T.; D'ENFERT, C. A comprehensive functional portrait of two heat shock factor-type transcriptional regulators involved in *Candida albicans* morphogenesis and virulence. **PLoS Pathog**, n.9, v.8, e1003519, 2013.