



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

LETÍCIA SERPA SAMPAIO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DO IBUPROFENO FRENTE A
ISOLADOS DE *CANDIDA* SPP. RESISTENTES AO FLUCONAZOL E SUA
ATIVIDADE CONTRA BIOFILME FORMADO**

FORTALEZA - CEARÁ

2017

LETÍCIA SERPA SAMPAIO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DO IBUPROFENO FRENTE A ISOLADOS DE *CANDIDA* SPP. RESISTENTES AO FLUCONAZOL E SUA ATIVIDADE CONTRA BIOFILME FORMADO

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: Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

FORTALEZA

2017

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)

S184a Sampaio, Letícia Serpa.
AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE DO IBUPROFENO FRENTE A ISOLADOS DE
CANDIDA SPP. RESISTENTES AO FLUCONAZOL E SUA ATIVIDADE CONTRA BIOFILME
FORMADO / Letícia Serpa Sampaio. – 2017.
70 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

1. Candida spp. 2. resistência. 3. ibuprofeno. 4. biofilme. 5. apoptose. I. Título.

CDD 616.9

LETÍCIA SERPA SAMPAIO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DO IBUPROFENO FRENTE A ISOLADOS
DE CANDIDA SPP. RESISTENTES AO FLUCONAZOL E SUA ATIVIDADE
CONTRA BIOFILME FORMADO**

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: Microbiologia Médica.

Aprovada em 07 / 07 / 2017.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti
Faculdade Maurício de Nassau

Prof^a Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite
Universidade Federal do Ceará (UFC)

**À Deus e
à minha família.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda sabedoria e amor, que com Sua grandeza se aproxima na minha pequenez e me impulsiona a dar passos largos e a sonhar grandes sonhos.

À minha Santíssima Virgem Maria, a todos os anjos e santos que incessantemente intercedem e cuidam de mim.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido durante todo o período do mestrado.

Ao meu orientador, Professor Dr. Hélio Vitoriano, pela confiança e apoio, por ser um exemplo de profissional e de ser humano. Por transmitir aos alunos seu conhecimento e desejar que em cada um o mesmo seja multiplicado. Por todos os conselhos oferecidos durante os dias de graduação e pós-graduação e por me ensinar que uma vitória nunca é plena quando há perdedores.

Aos professores membros da banca que dispuseram de seu tempo para estarem presentes, contribuindo para a melhoria do trabalho realizado.

Aos meus amigos de laboratório, Cecília Rocha, Rosana Sousa, Bruna Nascimento, João Batista e todos os alunos que fazem parte do LABIMAN, pela convivência diária, amizade construída e pelo espírito de equipe que move cada um. Muito obrigada pela completa disponibilidade e pelo apoio durante todo esse período, sem vocês essa vitória não seria concretizada! Tenho uma enorme admiração por cada um de vocês!

Aos meus pais, Vínício e Regina, meus maiores incentivadores, vocês me ensinaram e ensinam a viver de forma leve, tendo consciência que “tudo concorre para o bem daqueles que amam a Deus”, e que todas as dificuldades são oportunidades para eu me tornar alguém melhor!

Aos meus irmãos, Gabriella e Eduardo, vocês são tesouros para mim, muito obrigada pelas risadas, conversas, palavras de incentivo!

Ao meu noivo, Lucas, por ser carinho de Deus para mim, muito obrigada por toda paciência, cuidado, ajuda e todos os incentivos que me fizeram acreditar que tudo daria certo e me tranquilizaram nos momentos mais incertos.

Aos meus amigos de comunidade que me sustentaram com suas orações e intenções particulares por mim.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM), bem como à todos os docentes que me formaram durante os 2 anos de mestrado pela excelência no ensino e conhecimento partilhado.

E de modo geral a todos os parceiros do LABIMAN que permitiram que esse trabalho se concretizasse.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar, mas o
mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Santa Teresa de Calcutá

RESUMO

Nos últimos anos, houve um crescimento na incidência de infecções fúngicas oportunistas. Fungos do gênero *Candida* tem sido documentados como importante causa de infecções e estão relacionados à alta morbidade e mortalidade entre pacientes hospitalizados, aumento nos custos hospitalares e tempo de internação hospitalar, configurando assim um importante problema de saúde pública. A maioria das infecções fúngicas está associada à formação de biofilme, que representa um aumento na resistência aos antifúngicos. Somado a essa problemática está o fato de existirem poucos antifúngicos disponíveis no mercado. Dessa forma, faz necessária a busca por novas opções terapêuticas e nesse contexto surge o redirecionamento de fármacos, propondo um novo olhar para fármacos com outras indicações terapêuticas. O ibuprofeno é um anti-inflamatório não esteroide e alguns pesquisadores tem relatado sua atividade frente a cepas de *Candida* spp. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade do ibuprofeno frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, nas formas planctônicas e de biofilme, utilizando técnicas de microdiluição em caldo, citometria de fluxo e teste do cometa. O ibuprofeno apresentou atividade sobre as cepas de *Candida* spp. utilizadas (2 *C. albicans*, 5 *C. tropicalis*, 2 *C. parapsilosis*), com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 6,5 a 13 mM e não induziu a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nem o dano ao DNA na concentração equivalente ao CIM em cepas de *C. albicans* (CIM=6,5 mM), *C. tropicalis* (CIM=13 mM) e *C. parapsilosis* (CIM=13 mM). Verificou-se que o ibuprofeno reduziu a viabilidade celular, promoveu despolarização mitocondrial e aumentou a externalização de fosfatidilserina, sugerindo, assim, a morte celular por apoptose. A viabilidade celular do biofilme formado (24 horas) foi determinada por meio do ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT) e foi verificado que o ibuprofeno promove redução de aproximadamente 50% da viabilidade celular na concentração de CIM (13 mM) em isolado de *C. albicans*, de *C. tropicalis* e de *C. parapsilosis* ($p < 0,05$). Dessa forma, conclui-se que o ibuprofeno é capaz de inibir o crescimento *in vitro* de *Candida* spp. resistente ao fluconazol tanto na forma planctônica como em biofilme formado, sugerindo que este fármaco tem potencial para agir como agente antifúngico com atividade apoptótica.

Palavras-chave: *Candida* spp, resistência, ibuprofeno, biofilme, apoptose.

ABSTRACT

In recent years, there has been an increase in the incidence of opportunistic fungal infections. *Candida* species have been documented as an important cause of infections and related to high morbidity and mortality among hospitalized patients, increasing hospital costs and length of stay, configuring an important public health problem. Most fungal infections are associated with biofilm formation, which represents an increase in antifungal resistance. In addition to this problem, there are few antifungal agents available. That way, it is necessary to search for new therapeutic options and in this context the drug repurposing appears, proposing a “new eyes” for drugs with other therapeutic indications. Ibuprofen is a non-steroidal anti-inflammatory drug and some researchers have reported its activity against *Candida* spp. The present study aimed to evaluate the activity of ibuprofen against fluconazole resistant *Candida* spp., in planktonic and biofilm forms, using broth microdilution techniques, flow cytometry and comet assay. Ibuprofen showed activity against nine strains of *Candida* spp. (2 *C. albicans*, 5 *C. tropicalis*, 2 *C. parapsilosis*) with the minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 6,5 to 13 mM and it did neither induced reactive oxygen species (ROS) generation nor DNA damage on equivalent concentrations to MIC in strains of *C. albicans* (MIC=6,5 mM), *C. tropicalis* (MIC=13 mM) and *C. parapsilosis* (MIC=13 mM). It was found that ibuprofen reduces cell viability, promotes mitochondrial depolarization and enhancing phosphatidylserine externalization, suggesting cell death by apoptosis. The cell viability of the biofilms was determined by assaying reduction of the tetrazolium salt (MTT) and it was verified that ibuprofen promoted about 50% reduction in cell viability at MIC concentration (13 mM) in *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* isolates ($p < 0,05$). That way, we concluded that ibuprofen is able to inhibit the growth of fluconazole resistant *Candida* spp. *in vitro* both in planktonic cells and biofilm formed, suggesting that this drug has potential to act as antifungal compound with apoptotic activity.

Keywords: *Candida* spp, resistance, ibuprofen, biofilm, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alguns fatores de risco para incidência de infecções invasivas por <i>Candida</i> spp.	18
Figura 2 - Fatores de virulência para <i>Candida</i> spp	21
Figura 3 - Fases da formação de biofilme de <i>Candida</i> spp. em superfícies bióticas ou abióticas	23
Figura 4 - Estrutura química do ibuprofeno	29
Figura 5 - Desenho esquemático do teste de sensibilidade – protocolo M27-A3, CLSI (2008)	34
Figura 6 - Efeito do IBU sobre a viabilidade celular de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i> resistentes ao fluconazol	40
Figura 7 - Avaliação do percentual de células de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i> resistentes ao fluconazol com despolarização da membrana mitocondrial	41
Figura 8 - Avaliação da formação de EROs em células de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i> resistentes ao fluconazol	42
Figura 9 - Efeito do ibuprofeno em diferentes concentrações sobre a externalização da fosfatidilserina em células de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i> resistentes ao fluconazol	43
Figura 10 - Avaliação do índice de dano ao DNA em <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i> resistentes ao fluconazol através do ensaio do cometa versão alcalina	44
Figura 11 - Atividade do ibuprofeno frente ao biofilme formado de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> resistentes ao fluconazol	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito antifúngico do Ibuprofeno contra cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol	39
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
ANFO B	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDC	<i>Center for Disease, Control and Prevention</i>
CDR	<i>Candida drug resistance</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
COX	Ciclo-oxigenase
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína não fluorescente
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Fluoresceína
FLC	Fluconazol
H ₂ DCFDA	Diacetato 2',7'- diclorodihidrofluoresceína
IBU	Ibuprofeno
IP	Iodeto de propídio
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
MTT	Brometo de difeniltetrazólio –[3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo]
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PG	Prostaglandina
PPB	<i>Potassium Phosphate Buffer</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
Rh123	Rodamina 123
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TX	Tromboxano
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mL
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
$\Delta\psi_m$	Potencial transmembrana mitocondrial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Infecções fúngicas	17
2.2. Candidiase invasiva.....	17
2.3. Gênero <i>Candida</i> e sua relevância clínica	19
2.4. Patogenia e fatores de virulência.....	21
2.5. Biofilme.....	22
2.6. Resistência ao biofilme	25
2.7. Antifúngicos	25
2.8. Resistência aos azólicos	27
2.9. Novas estratégias terapêuticas.....	28
2.10. Ibuprofeno	29
3. HIPÓTESES	31
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo geral.....	32
4.2. Objetivos específicos.....	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1. Microorganismos.....	33
5.2. Fármacos	33
5.3. Testes de sensibilidade antifúngica	33
5.3.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos.....	33
5.3.2. Análise dos dados.....	34
5.4. Ensaio utilizando citometria de fluxo	35
5.4.1. Preparo das suspensões de células de <i>Candida</i> spp.	35
5.4.2. Tratamento das células de <i>Candida</i> spp.....	35
5.4.3. Avaliação da integridade de membrana	35
5.4.4. Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	35
5.4.5. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	36
5.4.6. Determinação da externalização de fosfatidilserina.....	36
5.4.7. Análise dos dados.....	36
5.5. Ensaio do Cometa.....	36

5.6. Biofilme.....	37
5.6.1. Formação do biofilme de isolados de <i>Candida</i> spp.	37
5.6.2. Determinação da atividade do ibuprofeno sobre biofilmes formados de <i>Candida</i> spp.	38
5.6.3. Análise dos dados.....	38
6. RESULTADOS	39
6.1. Atividade antifúngica do ibuprofeno frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol.	39
6.2. Avaliação preliminar do mecanismo de morte celular em <i>Candida</i> spp. após exposição ao ibuprofeno	40
6.2.1. Avaliação da integridade de membrana de cepas de <i>Candida</i> spp. tratadas com ibuprofeno	40
6.2.2. Efeito do ibuprofeno sobre o potencial transmembrana mitocondrial de células de <i>Candida</i> spp.	41
6.2.3. Efeito do ibuprofeno sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de <i>Candida</i> spp.....	42
6.2.4. Detecção da externalização de fosfatidilserina (PS) induzida pelo ibuprofeno em células de <i>Candida</i> spp.....	42
6.2.5. Avaliação dos danos ao DNA de células de <i>Candida</i> spp. promovidos pelo ibuprofeno	43
6.3. Atividade do ibuprofeno frente a biofilme formado de <i>Candida</i> spp.	44
7. DISCUSSÃO	45
8. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	66

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com avanços nos procedimentos médicos e cirúrgicos, houve um aumento na incidência de infecções oportunistas, sobretudo infecções fúngicas, sendo os principais fungos patogênicos os do gênero *Candida*, responsáveis por 70% a 90% dos casos de infecções fúngicas invasivas. Estas infecções estão associadas à alta taxa de mortalidade e morbidade, especialmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), custos elevados para os sistemas de saúde, sendo deste modo um problema de saúde pública (YAPAR, 2014; DELALOYE e CALANDRA, 2014)

Atualmente, existem mais de 150 espécies do gênero *Candida*, porém a maioria não é patogênica, das quais menos de 15 espécies causam doenças em humanos. Dentre as espécies capazes de causar infecções, cinco são responsáveis por 92% dos casos de candidemia (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosi*, e *C. krusei*) (GUINEA, 2014). Entre essas, a principal espécie responsável por causar candidíase invasiva é *Candida albicans*, correspondendo 50-70% dos casos. Porém, nos últimos anos, tem-se observado um aumento na incidência de infecções causadas por *Candida* não *albicans*, principalmente, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (CATALDI *et al.*, 2016; GUINEA, 2014).

A capacidade desses microorganismos infectarem um indivíduo está relacionada com seus fatores de virulência, tais como adesão aos tecidos e dispositivos médicos do hospedeiro, formação de biofilme, secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares e também com fatores relacionados ao hospedeiro, como imunossupressão, neutropenia e idade (SARDI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012; YAPAR, 2014).

Entre os fatores de virulência, pode-se destacar a formação de biofilme, que de acordo com o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, ocorre em mais de 80% de todas as infecções microbianas humanas (BANDARA *et al.*, 2016). Biofilmes consistem em comunidades de microorganismos que se encontram aderidas a superfícies como próteses e cateteres, rodeadas por uma matriz extracelular e organizadas por moléculas de sinalização (sistema *quorum sensing*) (SARDI *et al.*, 2013). Essa estrutura organizacional faz com que biofilmes resistam às defesas do hospedeiro e em geral sejam mais resistentes aos antifúngicos em comparação as células planctônicas. Dessa forma, infecções associadas à biofilmes representam graves preocupações clínicas, tanto em relação ao paciente quanto aos gastos envolvidos no tratamento (SILVA-DIAS *et al.*, 2015; FOX *et al.*, 2015).

O tratamento de infecções fúngicas invasivas possui poucas opções terapêuticas. Atualmente apenas três classes de antifúngicos são utilizadas na prática clínica: azólicos, equinocandinas e polienos. O desenvolvimento de agentes antifúngicos, comparado com o de

antibióticos, é relativamente limitado, tendo em vista problemas inerentes a identificação de um agente eficaz que com ação frente a células fúngicas, que são eucarióticas, sem ser tóxico para as células hospedeiras (SILVA *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, o aumento da incidência de *Candida* não *albicans*, bem como seu potencial de desenvolver resistência a antifúngicos tem sido relatados, representando assim um desafio para o manejo clínico. Essa mudança na epidemiologia da infecção por *Candida* spp. tem sido parcialmente relacionada ao uso generalizado do fluconazol, que consiste num antifúngico barato, com baixa toxicidade e disponível para administração oral, promovendo assim seleção de cepas menos sensíveis a esse antifúngico (GARNACHO-MONTERO *et al.*, 2010; SANGUINETTI *et al.*, 2015; WHALEY *et al.*, 2017).

Diante dessa problemática, faz-se necessária a busca por novas alternativas terapêuticas e nesse contexto destaca-se o redirecionamento de fármacos, já aprovados, pela *Food and Drug Administration (FDA)*, visto que possuem propriedades farmacológicas e toxicológicas bem caracterizadas, reduzindo assim o tempo e custo para desenvolvimento de um medicamento (SILES *et al.*, 2013).

Nesse contexto, o ibuprofeno é um antiinflamatório não esteroideal (AINE), cujo mecanismo de ação consiste na inibição não seletiva das enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2), e conseqüente inibição na síntese de prostaglandina (PGD₂, PGF₂, PGE₂, PGI₂) e tromboxano (TX). Estudos tem mostrado sua ação antifúngica e antibacteriana (PINA-VAZ *et al.*, 2000; ALEM e DOUGLAS, 2004). Rosato *et al.* (2016) demonstraram a atividade do ibuprofeno isolado e em associação com a anidulafungina contra cepas isoladas e biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*.

Dessa forma, o presente trabalho teve como finalidade estudar a ação antifúngica do ibuprofeno frente células planctônicas de três espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) bem como avaliar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito antifúngico e sua atividade frente a biofilme formado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Infecções fúngicas

Os fungos estão amplamente distribuídos no solo, no ar, nos detritos vegetais, na pele, em superfícies internas do corpo humano. Existem aproximadamente 1,5 milhões de espécies de fungos na Terra, porém apenas cerca de 300 são oportunistas e podem causar doenças em humanos (BROWN *et al.*, 2012; JOTHIESWARI e REDDY, 2014). Esses microrganismos oportunistas podem causar infecções superficiais leves ou graves, ou sistêmicas, atingindo a corrente sanguínea e afetando os órgãos internos. (SPAMPINATO e LEONARDI, 2013; MAYER *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, tratamentos utilizados para HIV/AIDS, avanços médicos nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e em relação ao transplante de órgãos levaram a um aumento na expectativa de vida de pacientes. Porém, associado a esses avanços na medicina, houve um crescimento na incidência de infecções oportunistas, em especial, infecções fúngicas, sendo os principais fungos patógenos os do gênero *Candida*, responsáveis por 70% a 90% dos casos de infecções fúngicas invasivas, estando essas infecções associadas à alta taxa de mortalidade (YAPAR, 2014; DELALOYE e CALANDRA, 2014)

Em relação à taxa de colonização por fungos do gênero *Candida*, em indivíduos hospitalizados é maior do que na comunidade em geral. Dessa forma, internação prolongada contribui para um aumento na chance de incidência de infecções por *Candida* spp. (KHOURI *et al.*, 2016). Um estudo realizado por Doi *et al.* (2016) em 16 hospitais brasileiros classificou *Candida* spp. como a sétima causa de infecções invasivas adquiridas em hospital. Pfaller *et al.* (2014) realizaram um estudo em hospitais nos Estados Unidos e no Canadá e mostraram que entre 6.845 pacientes com infecções fúngicas invasivas, 5.036 correspondiam a candidíase invasiva.

De acordo com o CDC dos Estados Unidos, cerca de 46000 infecções por *Candida* acometem pacientes hospitalizados nesse país a cada ano, prolongando o tempo de internação de 3-13 dias e um custo de US \$ 6000,00 a US \$ 29000,00 (DEORUKHKAR, 2016).

2.2. Candidíase invasiva

O termo "Candidíase Invasiva" equivale a "Candidíase Disseminada", "Candidíase Sistêmica" e "Candidíase Hematogênica", surgindo essa infecção a partir da disseminação hematogênica ou pela inoculação direta em local de estéril de espécies de *Candida*. Estudos tem mostrado que a candidemia, que corresponde a infecções fúngicas sanguíneas sem envolvimento de órgãos, é responsável pela maior parte dos casos de candidíase invasiva, assim

como em pacientes hospitalizados, representa uma das principais causas de doenças graves e está acompanhada de uma alta taxa de mortalidade (KULLBERG e ARENDRUP, 2015; GHANNOUN e PERFECT 2009; TADEC *et al.*, 2016; VAZQUEZ *et al.*, 2013).

Infecções causadas por *Candida* spp. podem ser classificadas como endógenas, quando causadas por microrganismos presentes na própria microbiota do paciente, ou exógenas, quando isolados que não fazem parte de sua própria microbiota colonizam a pele, catéteres intravenosos, infusões parenterais. Isolados exógenos estão frequentemente envolvidos com surtos em hospitais, em que ocorre a infecção de vários pacientes por um mesmo isolado (GUINEA, 2014). Fatores de risco (Figura 1) como cirurgia abdominal, uso de antibióticos de amplo espectro e agentes imunossupressores, hemodiálise, permanência prolongada na UTI, nutrição parenteral total, uso crescente de dispositivos invasivos, especialmente intravasculares, colonização por espécies de *Candida*, neutropenia, insuficiência renal são alguns fatores que contribuem para a incidência de infecções invasivas causadas por fungos do gênero *Candida* (SULEYMAN e ALANGADEN, 2016; YAPAR *et al.*, 2014).

Figura 1 - Alguns fatores de risco para incidência de infecções invasivas por *Candida* spp.



Fonte: autor

Um estudo conduzido em 183 centros médicos dos Estados Unidos no ano de 2011 classificou o gênero *Candida* como a causa mais comum de infecções sanguíneas (MAGILL *et al.*, 2014).

De Paula *et al.* (2014) analisaram amostras de 242 pacientes portadores do vírus HIV do Centro de Referência Dr. Bruno Piancastelli Filho, no ano de 2010 em Londrina. Dentre 242 pacientes, 122 (50,4%) estavam colonizados por *Candida* spp. e 11 (9%) destes apresentaram colonização por duas espécies de *Candida*, totalizando 133 isolados recuperados dessas amostras. Entre as espécies, *C. albicans* foi a mais isolada 75,2% (100/133), *C. tropicalis* 2,25% (3/133), *C. dubliniensis* 2,25% (3/133) e *C. krusei* 1,5% (2/133).

Em 2015, Silva *et al.* analisaram 24 episódios de candidemia ocorridos no Hospital São Vicente de Paulo, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 2010 a 2011, concluindo que *C. albicans* foi a espécie prevalente, responsável por 41,67% dos casos, *C. parapsilosis* (16.67%), *C. krusei* (12.5%), *C. tropicalis* (8.33%), *C. glabrata* (8.33%) e outras espécies de *Candida* (12.5%). De modo que, 58,33% dos casos de candidemia foram causados por *Candida* não *albicans*.

Um estudo realizado por Delfino *et al.* (2014), no período de 2008 a 2012 em três UTIs do Hospital Universitário da Itália, relatou a ocorrência de 761 infecções sanguíneas, dentre as quais 149 foram causadas por fungos do gênero *Candida*, sendo assim a espécie mais frequente foi *C. parapsilosis* (89/149). Nesse mesmo estudo no período de março a abril de 2012 foram coletadas amostras das mãos de 129 profissionais de saúde e 50 apresentaram positividade para leveduras, sendo a espécie mais encontrada *C. parapsilosis*, entre 77 isolados fúngicos, 44 correspondiam a cepas dessa espécie. Uma análise molecular também foi realizada e mostrou que alguns genótipos de *C. parapsilosis* recuperados das mãos de profissionais de saúde foram também encontrados em amostras sanguíneas de pacientes, mostrando a transmissão horizontal de profissionais de saúde para pacientes internados na UTI.

Dessa forma, infecções nosocomiais configuram um sério problema entre pacientes internados, diminuindo a qualidade de vida e aumentando custos hospitalares. A taxa de mortalidade de candidemia durante admissão hospitalar no Brasil é alta, cerca de 72.2%, sendo de fundamental importância diagnóstico precoce, o controle da fonte infecciosa e a escolha da terapia antifúngica adequada (DOI *et al.*, 2016).

2.3. Gênero *Candida* e sua relevância clínica

Fungos do gênero *Candida* são microrganismos comensais que normalmente colonizam pele, boca, mucosas do trato gastrointestinal, genitourinário, e vagina sem apresentar riscos ao hospedeiro. Porém, condições facilitadoras como, por exemplo, desequilíbrio do sistema imune do hospedeiro, podem ativar um processo infeccioso (BRUNKE *et al.*, 2016; FORNARI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2012).

O gênero *Candida* é constituído por aproximadamente 150 espécies, que mostram consideráveis variações filogenéticas e fenotípicas entre si. Sabe-se que grande parte das espécies de *Candida* é incapaz de crescer a uma temperatura de 37 °C, o que impede que estas sejam patogênicas ou mesmo comensais para seres humanos (SILVA *et al.*, 2012). Dentre as espécies capazes de causar candidemia, cinco são responsáveis por 92% dos casos (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei*) (GUINEA, 2014).

Na maioria dos contextos clínicos, a principal espécie responsável por causar candidíase invasiva é *Candida albicans*, correspondendo 50-70% dos casos. Porém, nos últimos anos, estudos longitudinais documentaram um aumento na incidência de infecções causadas por *Candida* não *albicans*, principalmente, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Desse modo, pode-se observar que a epidemiologia das infecções causadas por espécies de *Candida* tem mudado (CATALDI *et al.*, 2016; GUINEA, 2014). É importante salientar que a frequência e distribuição de *Candida* spp. causando infecções está relacionada às áreas geográficas, predisposição dos pacientes e às unidades hospitalares onde os estudos são conduzidos. A epidemiologia se faz importante pelo fato da variedade na distribuição de espécies em determinado local orientar a seleção correta da terapia antifúngica (GUINEA, 2014; PFALLER *et al.*, 2014).

Guinea em 2014 realizou um estudo em que revisou casos de candidemia relatados em diversos países, incluindo Estados Unidos, Islândia, Espanha, Noruega e Finlândia, concluindo que *Candida albicans* foi a principal causa de candidemia em todos eles, porém entre *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* houve uma considerável diferença na proporção de casos em cada país, enquanto nos Estados Unidos estudos reportaram alto número de casos causados por *Candida glabrata* e baixo número de casos causados por *Candida parapsilosis*, na Espanha houve uma inversão na incidência dessas espécies.

Em relação à predisposição dos pacientes, recém-nascidos, pacientes transplantados e que recebem nutrição parenteral possuem maior risco de adquirir infecção por *Candida parapsilosis*. Estudos tem mostrado também uma alta porcentagem, em comparação a adultos, de *C. parapsilosis* em crianças menores de um ano de idade (PUIG-ASENSIO *et al.*, 2016; PEMAN *et al.*, 2011; PAMMI *et al.*, 2013). Em contra partida, *C. tropicalis* é considerada uma causa incomum de infecção em crianças, normalmente sendo causa de infecção em pacientes neutropenicos e em Unidades de Terapia Intensiva, bem como, em pacientes com leucemia (PFALLER *et al.*, 2015).

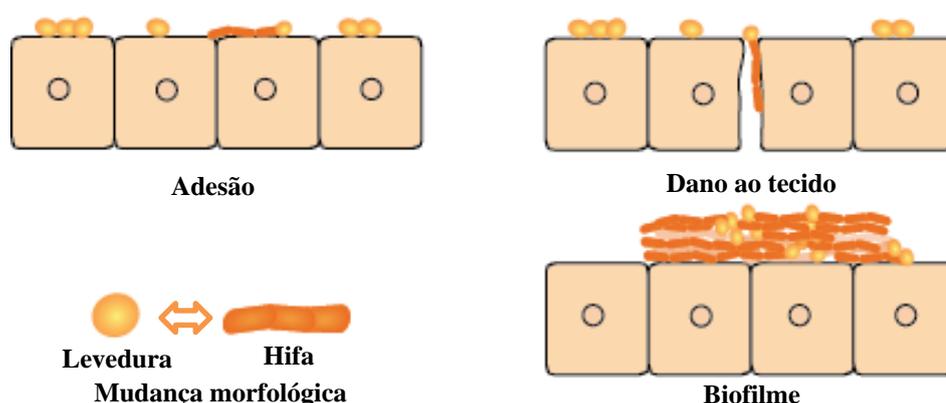
Um estudo realizado por Escribano *et al.* (2013) analisou amostras de 202 pacientes com candidemia, dentre estas, foram observados 217 episódios de candidemia causados por *C. albicans*. Nesse estudo foram encontrados 19 genótipos epidêmicos que infectaram dois ou mais pacientes, assim o elevado número de casos de candidemia tendo como causa *C. albicans* pode está relacionado com a possibilidade de essas cepas serem transmitidas horizontalmente entre pacientes em um mesmo ambiente hospitalar.

2.4. Patogenia e fatores de virulência

A sobrevivência e crescimento do microorganismo infectante bem como danos no hospedeiro e desequilíbrio na homeostase são processos necessários para a patogenia de microorganismos. Falhas no sistema imunológico, predisposições genéticas, rompimento da integridade da pele e barreira mucosa podem ser fatores predisponentes à infecção e invasão de fungos do gênero *Candida* (ILIEV e UNDERHILL, 2013; BRUNKE *et al.*, 2016).

A capacidade desses microorganismos infectarem um indivíduo está relacionada com seus fatores de virulência (Figura 2), tais como adesão aos tecidos e dispositivos médicos do hospedeiro, formação de biofilme, secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares, e também com fatores relacionados ao hospedeiro, como imunossupressão, neutropenia e idade (SARDI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012; YAPAR, 2014).

Figura 2 - Fatores de virulência para *Candida* spp.



Fonte: autor

Adesão

Um dos principais fatores para colonização persistente, formação de biofilmes e estabelecimento de doença consiste na adesão das cepas a uma superfície. Inicialmente, o contato é mediado por forças passivas, como forças de *Van der Waals*, forças hidrofóbicas e forças repulsivas (SILVA-DIAS *et al.*, 2015; MOYES *et al.*, 2015). Após essa etapa, adesinas específicas, presentes na superfície de células fúngicas, ligam-se a receptores nas células do hospedeiro (RIBET e COSSART, 2015). Adesinas (polissacarídeos e glicoproteínas) são proteínas especializadas de superfície que se ligam a açúcares e aminoácidos na superfície de outras células e também promovem a aderência à superfícies abióticas (VERSTREPEN e KLIS, 2006; MODRZEWSKA e PIOTR, 2015).

O gene HWP1 é reconhecido como um dos mais importantes para o processo de adesão e sua expressão é induzida pelo contato físico entre o fungo e células epiteliais (MODRZEWSKA e PIOTR, 2015).

Produção de enzimas hidrolíticas

O processo de aderência, penetração tecidual, invasão e destruição do tecido do hospedeiro é mediado por enzimas hidrolíticas, tais como fosfolipases, proteinases, lipases, hemolisinas. A produção dessas enzimas variam em relação à cepa de *Candida* spp. e ao local da infecção (SARDI *et al.*, 2013; PAKSHIR *et al.*, 2013).

As fosfolipases possuem a capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster nos glicerofosfolipídeos de membrana celular, facilitando assim a invasão do epitélio da mucosa hospedeira (SINGHAI *et al.*, 2012). Quanto à atividade das proteinases, elas são capazes de degradar estruturas de superfície celular e inibir as funções do sistema imune do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2013). Lipases são capazes de catalisar reações, como hidrólise e síntese de triacilgliceróis, por esse motivo elas possuem uma ampla variedade de funções – aumentam a adesão do fungo a célula do hospedeiro, modulam reações inflamatórias, medeiam a aquisição de nutrientes (TOTH *et al.*, 2017). Hemolisinas são produzidas para destruir hemácias, possuem a capacidade de degradar a hemoglobina e utilizar o ferro da célula hospedeira, facilitando, desse modo, a invasão de hifas numa candidíase sistêmica (SARDI *et al.*, 2013).

Mudança morfológica

C. albicans é um fungo pleomórfico capaz de alterar sua morfologia de leveduras para hifas, processo este influenciado pelos ciclos biológicos de nutrição e reprodução. Hifas aderem e invadem de forma mais eficiente células hospedeiras em comparação com leveduras, facilitam a disseminação hematogênica, possibilitando o movimento pelos tecidos do hospedeiro. A invasão por hifas pode ocorrer a partir da endocitose induzida e da penetração ativa (ILIEV e UNDERHILL, 2013; MAYER *et al.*, 2012).

2.5. Biofilme

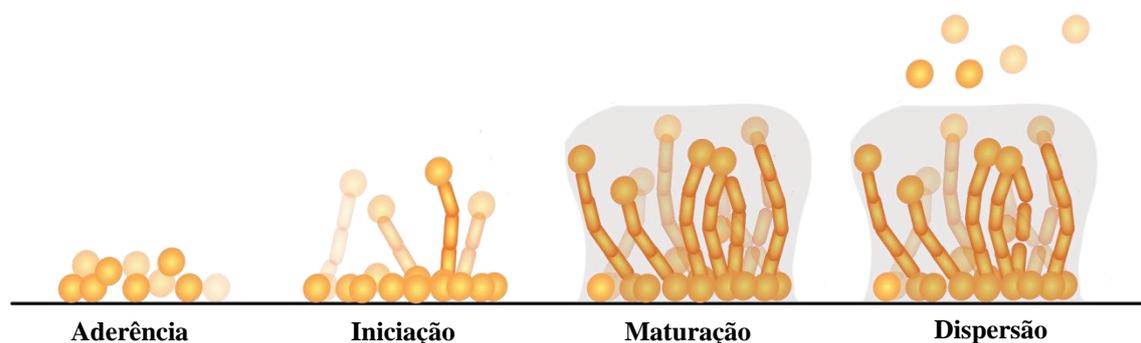
Fungos e bactérias podem existir na natureza como células livres (planctônicas) ou agrupadas na forma de biofilmes, que consiste numa associação de microrganismos da mesma espécie ou de espécies diferentes aderida a superfícies bióticas ou abióticas, como dispositivos médicos: próteses, cateter venosos centrais, cateteres urinários, válvulas cardíacas, marca-passo, dentaduras, lentes de contatos. Os microrganismos presentes nessa associação possuem alta comunicação entre si e usam sistema de sinalização intercelular ou *quorum sensing* para regulação de processos dentro do biofilme (SOTO, 2013; NOBILE e JOHNSON, 2015).

O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América estima que mais de 80% de todas as infecções microbianas humanas estão associadas a biofilmes (BANDARA *et al.*, 2016). As infecções associadas a dispositivos com biofilme tem um forte impacto na gestão do paciente e gastos hospitalares, visto que, uma vez a infecção por biofilme instalada torna-se mais difícil o tratamento, aumentando o tempo de internação e os custos hospitalares relacionados ao paciente (RAJENDRAN *et al.*, 2016).

Biofilmes conferem vantagens aos microorganismos, como: proteção em relação ao ambiente, aumento da disponibilidade de nutrientes, cooperação metabólica e aquisição de novos traços gênicos (TAFF *et al.*, 2013; NETT *et al.*, 2014). Estudos mostram que células presentes no biofilme apresentam fatores de virulência diferentes de células planctônicas, sendo essa forma de organização mais importante que o crescimento planctônico, podendo causar infecções crônicas (TUMBARELLO *et al.*, 2012; BOUZA *et al.*, 2015).

Candidemia está frequentemente relacionada ao crescimento de biofilme de *Candida* spp. em dispositivos médicos como, cateter venoso central e para hemodiálise (PIERCE *et al.*, 2015). Uma das mais frequentes infecções nosocomiais corresponde à infecção da corrente sanguínea associada a cateter, sendo *Candida* spp. a terceira causa mais comum destas infecções, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade (BOUZA *et al.*, 2015). A cada ano, mais de cinco milhões de cateteres venosos centrais são colocados nos Estados Unidos e apesar do avanço nos procedimentos médicos, mais de 50% dos pacientes com cateteres venosos apresentam infecção por biofilme de *Candida* spp. (FOX *et al.*, 2015).

Figura 3 - Fases da formação de biofilme de *Candida* spp. em superfícies bióticas ou abióticas



Fonte: adaptado de Nobile e Johnson, 2015

O processo de formação do biofilme é complexo e está representado na Figura 3. Inicialmente, consiste na adesão de células a uma superfície, que podem ser, por exemplo, um dispositivo médico ou a mucosa vaginal ou oral, nessa etapa as células começam a se ligar

umas as outras e há um aumento da produção de adesinas e de outras proteínas de superfície, corresponde a etapa crucial para o desenvolvimento do biofilme. Após aderência, as células formam uma camada basal sobre a superfície e começam a passar da forma de levedura para a forma de hifas ou pseudohifas, formas que contribuem para a estabilidade da arquitetura do biofilme e agem como suporte (NOBILE e JOHNSON, 2015; BONHOMME e D'ENFERT, 2013).

Na etapa de maturação há a produção da matriz extracelular, que contém glicoproteínas, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e DNA extracelular. De modo geral, a matriz extracelular fornece proteção contra o sistema imune do hospedeiro e age como barreira física à penetração de fármacos, contribuindo assim para a manutenção da integridade do biofilme (NOBILE e JOHNSON, 2015; SILVA *et al.*, 2017b; MARTINS *et al.*, 2010).

A dispersão de células do biofilme ocorre durante todo o processo de formação do biofilme e promove à disseminação da doença. As células dispersas possuem uma maior propriedade de aderência e maior capacidade de formar biofilme em relação a células planctônicas, e também apresentam elevada virulência (UPPULURI *et al.*, 2010).

As células que constituem o biofilme são capazes de se comunicar entre si, a partir do sistema *quorum sensing*, que consiste em pequenas moléculas que se acumulam dependendo da densidade celular e influenciam o comportamento das células induzindo, por exemplo, alterações na expressão de genes relacionados à virulência, morfologia das células, crescimento, formação do biofilme e resistência ao stress oxidativo (POLKE e JACOBSEN, 2017; ALBUQUERQUE *et al.*, 2013). Uma importante substância regulatória do sistema *quorum sensing* é o farnesol que é uma molécula natural, produzida de forma endógena. Altas concentrações de farnesol interferem diretamente na morfologia de células fúngicas, inibindo a conversão de levedura para hifa em *C. albicans*, impedindo assim a formação do biofilme. Sua atividade também está relacionada resistência do biofilme a medicamentos (ALBUQUERQUE E CASADEVALL, 2012).

Em relação ao tratamento farmacológico, azólicos possuem uma baixa atividade contra biofilmes de *Candida* spp. anfotericina B lipídica pode ser uma alternativa no tratamento e equinocandinas apresentam uma melhor atividade (WALRAVEN e LEE, 2013).

Alterações na resistência do biofilme aos antifúngicos são observadas desde a fase inicial de aderência a superfícies até formação de biofilme maduro, em que a resistência é maior em relação à fase inicial. Essa resistência é multifatorial e torna o biofilme altamente persistente (BANDARA *et al.*, 2016; FINKEL e MITCHELL, 2011).

2.6. Resistência ao biofilme

A produção de biofilme por *Candida* spp está associada a uma maior resistência aos antifúngicos, que por sua vez está relacionada a mecanismos de resistência planctônicos, como ativação de genes de bomba de efluxo (CDR1, CDR2, MDR) e mutação gene ERG 11 que codifica a enzima lanosterol 14- α -desmetilase, envolvidos nos estágios iniciais do desenvolvimento do biofilme. Mecanismos específicos estão relacionados ao estágio mais avançado do biofilme, entre eles: produção de matriz extracelular que limita a penetração de drogas, redução do crescimento das células, aumento na densidade celular, mudanças no metabolismo e na composição de esterol da membrana, presença de células persistentes e ativação de vias induzidas pelo estresse. A matriz extracelular de biofilmes maduros, entre outros componentes, contém 1,3- β -glucano que participa do sequestro de antifúngicos, incluindo fluconazol, anfotericina B e flucitosina. Contém também DNA extracelular que promove resistência à anfotericina B e às equinocandinas. Dessa forma, o aumento da resistência dentro de biofilme fúngico é complexa e mediada pela interação de múltiplos mecanismos (TAFF *et al.*, 2013; WALRAVEN e LEE, 2013; Høiby *et al.*, 2015; SARDI *et al.*, 2013; FOX *et al.*, 2015).

2.7. Antifúngicos

O desenvolvimento de agentes antifúngicos, comparado com o de antibióticos, é relativamente limitado. Isso por conta de problemas inerentes a identificação de um agente eficaz que atue em células fúngicas, que são células eucarióticas, sem ser tóxico para as células hospedeiras (SILVA *et al.*, 2012).

Os principais agentes antifúngicos utilizados na terapêutica contemporânea consistem em quatro categorias: os poliênicos (nistatina e anfotericina B), os triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol), as equinocandinas (casposfungina, anidulafungina e micafungina) e flucitosina (FURLLETTI *et al.*, 2008; MATTHAIYOU *et al.*, 2015).

Os poliênicos nistatina e anfotericina B possuem amplo espectro de atividade antifúngica, sendo a nistatina reservada para infecções superficiais e a anfotericina B para candidíase invasiva. Essas drogas atuam por interação com componentes esteroides da membrana de células fúngicas, formando poros na membrana que aumentam a sua permeabilidade e levam a ruptura da célula. O ponto negativo consiste em efeitos adversos da anfotericina B, como nefrotoxicidade associado ao seu uso. Esses fármacos são usadas com cautela principalmente em microrganismos resistentes a azólicos e equinocandinas. A dispersão coloidal de anfotericina B foi desenvolvida com intuito de reduzir os efeitos adversos e

possuem maior tolerabilidade, porém um custo elevado (GOODMAN e GILMAN, 2012; COLOMBO *et al.*, 2013; FURLLETTI *et al.*, 2008).

Antifúngicos azólicos tem como mecanismo de ação inibir a biossíntese de ergosterol, interagem com uma enzima fúngica chamada lanosterol-14- α -desmetilase, inibindo a conversão de lanosterol para ergosterol, importante componente da membrana fúngica. Azólicos são divididos em dois grupos, os imidazólicos e os triazólicos. O clotrimazol, lançado em 1960, foi o primeiro imidazólico com ação tópica e ainda é usado para candidíase superficial. Os triazólicos estão subdivididos em primeira geração (itraconazol e fluconazol) e segunda geração (voriconazol e posaconazol). Isavuconazol, uma nova segunda geração, ainda está sob investigação clínica (COLOMBO *et al.*, 2013).

O fluconazol apresenta um excelente perfil de segurança, boa absorção no trato gastrointestinal e é eficaz no tratamento de infecções superficiais e sistêmicas por *Candida* spp., incluindo casos de candidíase oroesofágica, candidemia, candidúria e suas complicações. Em relação a *C. krusei*, sabe-se que possui resistência intrínseca e *C. glabrata* possui menor sensibilidade ao fluconazol, nesses casos utiliza-se voriconazol e posaconazol (COLOMBO *et al.*, 2013). Em casos de pacientes com fatores de risco para infecções por *Candida* spp. o tratamento profilático indicado em alguns casos, pode ser iniciado com fluconazol. Entre os triazóis, fluconazol tem maior penetração no líquido cefalorraquidiano (LCR) e vítreo, por essa razão é frequentemente utilizado no tratamento de infecções intraoculares e no sistema nervoso central por *Candida* spp. (PAPPAS *et al.*, 2016; PAPPAS *et al.*, 2009).

Uma nova classe de antifúngicos são as equinocandinas, exclusivas para uso parenteral, sua atividade biológica contra *Candida* spp. consiste em impedir a formação 1,3- β -D glucana na parede celular, reduzindo assim a integridade celular da parede fúngica, levando a instabilidade osmótica e consequente morte celular. Possui três representantes: caspofungina, micafungina e anidulafungina (GOODMAN e GILMAN, 2012; PERLIN, 2015). Possuem baixo potencial de causar insuficiência renal ou hepática e sua baixa toxicidade pode ser explicado pelo fato dessas drogas terem como alvo uma enzima específica para fungos, não encontrada em seres humanos (SUCHER *et al.*, 2009). Dessa forma, estão entre os antifúngicos mais seguros e bem tolerados e são indicados pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas para a maioria dos pacientes neutropênicos com candidemia (COLOMBO *et al.*, 2013; PAPPAS *et al.*, 2016).

Flucitosina é uma pirimidina fluorada sintética. Geralmente, é utilizada com anfotericina B para tratamento de algumas micoses profundas causadas por *Candida* spp. (GOODMAN e GILMAN, 2012).

O tratamento de escolha correto para candidíase invasiva é principalmente relacionado a dois fatores: espécies de *Candida* e a condição do sistema imune no hospedeiro (PAPPAS *et al.*, 2016).

De acordo com o Colombo *et al.* (2013), o tratamento de escolha para candidíase sistêmica corresponde ao fluconazol oral, podendo ser considerado outras opções para pacientes que não respondem a terapia com esse medicamento.

Um estudo realizado por Colombo *et al.* (2014) em dois períodos diferentes, 2003–2007 e 2008-2012, analisou em hospitais terciários do Brasil, as características de candidemia em pacientes na UTI e mostrou que o uso de equinocandinas como terapia primária para candidemia aumentou no segundo período de estudo em relação ao primeiro e pareceu estar associado a melhores resultados, como diminuição da taxa de mortalidade (76,4%-primeiro período, 60,8%-segundo período).

2.8. Resistência aos azólicos

A resistência aos antifúngicos é um fenômeno cada vez mais relatado e pode ser definido microbiológica ou clinicamente. A resistência clínica está relacionada à persistência de uma infecção fúngica, mesmo após tratamento com terapia adequada. E a resistência microbiológica corresponde a não sensibilidade de uma cepa fúngica a um antifúngico, determinado pelo teste de sensibilidade *in vitro* e comparado com outras cepas da mesma espécie. A resistência pode ser classificada também como intrínseca, encontrada naturalmente em algumas cepas fúngicas, ou adquirida após exposição a determinado agente antifúngico em cepas que antes eram sensíveis e passaram a desenvolver resistência. A resistência microbiológica e fatores como: sistema imune debilitado, doença de base, biodisponibilidade reduzida do antifúngico e aumento do metabolismo da droga podem contribuir para o desenvolvimento da resistência clínica (SANGUINETTI *et al.*, 2015).

Resistência a azólicos está relacionada a vários mecanismos, como: super expressão de bomba de efluxo, que são codificadas pelos genes CDR e MDR, reduzindo a concentração de fármacos ligados a enzima alvo, 14 - α - lanosterol desmetilase. Genes MDR estão envolvidos na resistência específica ao fluconazol; alteração na estrutura tridimensional da enzima 14 - α - lanosterol desmetilase, induzida por mutações no gene que a codifica; superprodução da enzima alvo pelo aumento da expressão do gene ERG11 (MAUBON *et al.*, 2014; SANGUINETTI *et al.*, 2015).

Em relação à resistência ao fluconazol, cepas de *C. albicans* se apresentam como mais sensíveis a esse antifúngico, sendo a resistência incomum (5%), porém entre espécies de

C.parapsilosis e *C. tropicalis* há uma maior prevalência de resistência uma maior prevalência 4-10% e 4-9%, respectivamente (MAUBON *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, o aumento da incidência de *Candida* não *albicans*, bem como seu potencial de desenvolver resistência a antifúngicos tem sido relatados, representando assim um desafio para o manejo clínico. Essa mudança na epidemiologia da infecção por *Candida spp.* tem sido parcialmente relacionada ao uso generalizado do fluconazol que consiste num antifúngico barato, com baixa toxicidade e disponível para administração oral, promovendo assim seleção de cepas menos sensíveis a esse antifúngico (GARNACHO-MONTERO *et al.*, 2010; SANGUINETTI *et al.*, 2015; WHALEY *et al.*, 2017).

O aumento no número de cepas resistentes associado ao limitado arsenal terapêutico disponível para o tratamento de candidíase invasiva representam uma preocupação no manejo clínico dessas infecções. Dessa forma se faz necessária a busca por novas estratégias terapêuticas.

2.9. Novas estratégias terapêuticas

Nas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas oportunistas tem aumentado, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente entre pacientes imunocomprometidos. Associada a crescente taxa de isolamento de cepas de *Candida spp.* tem sido relatado um aumento na resistência dessas espécies aos antifúngicos, em especial ao fluconazol, configurando assim um desafio no manejo terapêutico dessas infecções (ROEMER e KRYSAN, 2014; MAUBON *et al.*, 2014).

O tratamento de infecções fúngicas invasivas possui poucas opções terapêuticas, atualmente, apenas três classes de antifúngicos são utilizadas na prática clínica, azólicos, equinocandinas e polienos, estando a maioria dos fármacos dessas classes associada a graves efeitos adversos ao paciente, por exemplo, nefrotoxicidade relacionada a anfotericina B, distúrbios visuais relacionado ao voriconazol e insuficiência cardíaca congestiva causada por itraconazol. Fluconazol é uma droga bem tolerada e bastante utilizado na prática clínica, em especial na profilaxia para evitar candidíase invasiva em UTIs, porém a exposição prévia a esse antifúngico aumenta o risco de resistência, dificultando o tratamento (MONTAGNA *et al.*, 2013; ROEMER e KRYSAN, 2014; PAPPAS *et al.*, 2016; SAFDAR *et al.*, 2010; BAYHAN *et al.*, 2015; VOLLENBROICH *et al.*, 2014).

Diante dessa problemática faz-se necessário o desenvolvimento de novos compostos antifúngicos e alternativas terapêuticas. O redirecionamento de fármacos tem se destacado pelo fato do desenvolvimento de um medicamento novo ser um processo longo, difícil e

extremamente caro, em torno de 15 anos de pesquisa requerendo um investimento de aproximadamente US \$1,5 bilhões. Dessa forma, medicamentos já aprovados pela *Food and Drug Administration (FDA)* representam esse caminho alternativo com menor tempo e custo, ou seja, a busca por um novo olhar para antigos fármacos e para aqueles com outras indicações terapêuticas (PIERCE *et al.*, 2015; TOBINICK, 2009).

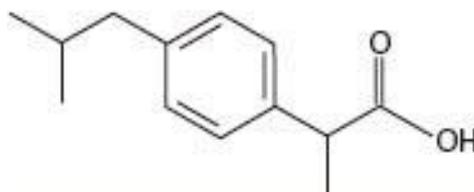
Como exemplo, pode-se citar Silva *et al.* (2017a) que demonstraram a atividade dos inibidores seletivos de recaptação de serotonina (SSRIs) fluoxetina, sertralina e paroxetina contra cepas de *Candida spp.* resistentes ao fluconazol, apresentando-os assim como uma opção de fármacos antifúngicos.

A possibilidade de identificar propriedades antifúngicas em compostos com outras indicações terapêuticas está relacionada ao fato de fungos serem células eucarióticas, possuindo assim muitas vias bioquímicas comuns com seres humanos (JUDD e MARTIN, 2009).

2.10. Ibuprofeno

Ibuprofeno é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE), derivado do ácido propiônico. É utilizado como analgésico, antipirético, anti-inflamatório. Seu mecanismo de ação consiste na inibição não seletiva da enzima ciclooxigenase (COX-1, COX-2), que corresponde a primeira enzima na via sintética das prostaglandinas (PGD₂, PGF₂, PGE₂, PGI₂), sendo responsável por converter o ácido araquidônico em prostaglandina, prostanóide que medeia a inflamação (GOODMAN e GILMAN, 2012).

Figura 4 - Estrutura química do ibuprofeno



Fonte: autor

Existem duas formas de COX, COX-1 e COX-2. COX-1 é expressa de maneira constitutiva na maioria das células e fonte dominante de prostanóides para funções de manutenção e COX-2 é a fonte mais importante de formação de prostanóides de inflamação. O ibuprofeno inibe de modo não seletivo tanto COX-1 como COX-2 (GOODMAN e GILMAN, 2012).

A inflamação, *in vivo*, é mediada pela produção de eicosanoides incluindo prostaglandinas e leucotrienos. As prostaglandinas são produzidas a partir do ácido araquidônico via ciclooxigenases (COX-1 e COX -2) e *Candida albicans* são capazes de produzir prostaglandina E (PGE) a partir do ácido araquidônico do hospedeiro (ERB-DOWNWARD E NOVEER, 2007). Em infecções crônicas por *Candida albicans*, tem sido observada a presença de elevados níveis de prostaglandina, molécula esta que pode estar associada à colonização fúngica, à instalação da infecção por *C. albicans* e também à indução da liberação de ácido araquidônico das células do hospedeiro durante a infecção, levando a um aumento na produção de prostaglandina E, modulação do crescimento celular e morfogênese fúngica (ALEM e DOUGLAS, 2004; NOVERR *et al.*, 2001).

Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) inibem a COX e impedem a síntese de PGE, molécula que está relacionada também como a melhora na formação do tubo germinativo em *C. albicans*. Dessa forma, esses fármacos podem ter uma potencial atividade antifúngica (DE QUADROS *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por Scott *et al.*, 1995 demonstrou o efeito do ibuprofeno isolado bem como associado ao fluconazol frente a cepas de *C. albicans*. Rosato *et al.* (2016) relatou a atividade do ibuprofeno em associação com a anidulafungina, um antifúngico pertencente a classe das equinocandinas, contra biofilme formado (48 h) de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii* após tratamento de 24 h com 1 mM de ibuprofeno. Pina Vaz *et al.* (2000) avaliou a atividade do ibuprofeno e outros anti-inflamatórios não esteroidais, frente a cepas de *C. albicans* e *C. não albicans* e teve como resultado que o ibuprofeno na concentração de 1-3 mg/ml foi capaz de inibir 80% do crescimento desses isolados. Esse estudo também avaliou a viabilidade celular e integridade de membrana, utilizando o marcador iodeto de propídeo e o efluxo de K⁺.

Diante de relatos na literatura acerca atividade anti-*Candida* do ibuprofeno, o presente trabalho visa colaborar com a avaliação da ação desse fármaco frente a cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol, tanto na forma planctônica como de biofilme, tendo como diferencial a prospecção do seu mecanismo de ação frente a cepas de *Candida* spp. a partir da avaliação da despolarização mitocondrial, integridade de membrana, produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), dano ao DNA e externalização de fosfatidilserina.

3. HIPÓTESES

3.1. Ibuprofeno apresenta atividade antifúngica *in vitro* frente cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

3.2. Ibuprofeno tem ação antifúngica contra biofilmes de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica do ibuprofeno frente a isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, na forma planctônica e de biofilme, bem como seu possível mecanismo de ação.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para o ibuprofeno frente a cepas de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol;
- Avaliar a ação do ibuprofeno sobre o biofilme formado de *Candida* spp.
- Avaliar utilizando técnicas de citometria de fluxo a integridade de membrana, produção de espécies reativas de oxigênio, alterações no potencial de transmembrana mitocondrial e externalização da fosfatidilserina após 24 horas de tratamento com ibuprofeno em 1 cepa de *Candida albicans*, 1 de *C. tropicalis* e 1 de *C. parapsilosis* resistente ao fluconazol;
- Avaliar os danos ao DNA utilizando o ensaio do cometa.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Microorganismos

Para realização desse estudo foram utilizadas 9 cepas clínicas de *Candida* spp. (5 *C. tropicalis*, 2 *C. parapsilosis* e 2 *C. albicans*) identificadas molecularmente e 2 cepas padrão ATCC (*C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019). Essas cepas pertencem à micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) e estavam a estocadas em ágar Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) a -20°C . Com o intuito de reativá-las, as cepas foram descongeladas, ressuspensas em caldo Sabouraud (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a 35°C . Em seguida, foram repicadas em ágar Sabouraud e incubadas por até 48 horas a 35°C . Com a finalidade de verificar a pureza, cada amostra foi semeada em meio cromogênico HiCrome *Candida* differential Agar (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 48 horas a 35°C . Todo o procedimento foi realizado sob normas de biossegurança nível 2 (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.2. Fármacos

Nesse estudo, foram utilizados os seguintes fármacos: fluconazol (FLC) e ibuprofeno sódico (IBU) obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

As soluções de FLC e IBU foram preparadas com água destilada estéril e a faixa concentração utilizada no teste variou de FLC 0,0015 - 0,8 mM (FLC) e 0,025 - 13 mM (IBU) (CLSI, 2008).

5.3. Testes de sensibilidade antifúngica

5.3.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos

A técnica utilizada para realização do teste de sensibilidade foi a de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008). Para realização do teste foi utilizado meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) (pH $7,0 \pm 0,1$) tamponado com 0,165 M ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA) e placas de 96 poços fundo U.

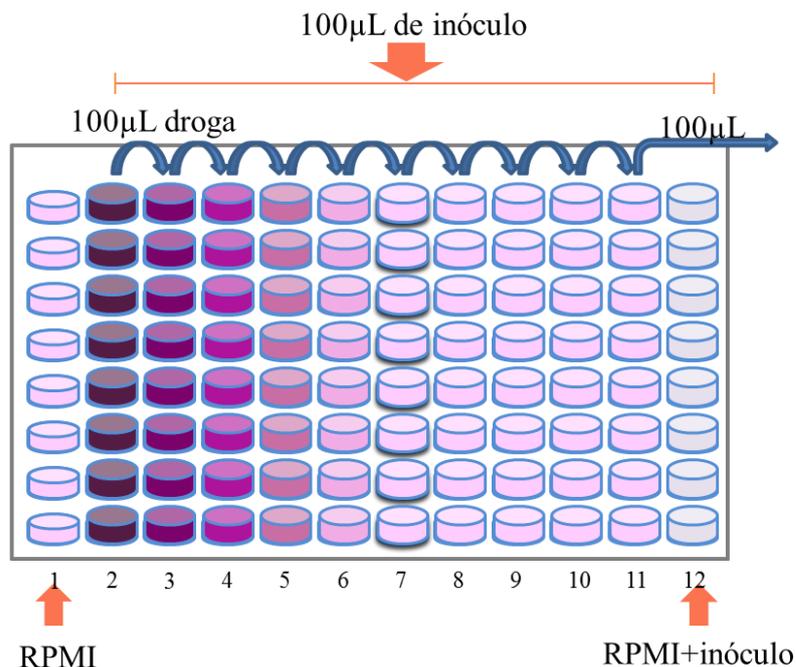
Como representado na Figura 5, inicialmente, foi adicionado 200 μL do fármaco na coluna dois e em seguida realizou-se a diluição seriada para obtenção do intervalo de concentração desejado dos fármacos. A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade do meio RPMI 1640 e a coluna 12 como controle positivo do teste (inóculo + meio). A partir de um cultivo de 24 horas de cada isolado a ser testado, foi preparada uma suspensão de inóculo

inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland (CLSI,2008). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI 1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/ mL. O volume de 100 µL desta suspensão padronizada foi adicionado a cada poço contendo o fármaco e no controle positivo do teste. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C (± 2 °C) e após esse período foi realizada a leitura visual.

De acordo com o CLSI (2008), concentração inibitória mínima é determinada como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 50% do crescimento do microrganismo, em comparação com o verificado no poço controle contendo somente o meio de cultura e o inóculo padronizado (coluna 12).

Com a finalidade de avaliar a ocorrência de resistência ao fluconazol foram levados em consideração o ponto de corte: CIM ≥ 8 µg/ mL para fluconazol (CLSI, 2012). Todo o experimento foi realizado em triplicata e foram utilizadas as cepas controle: *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

Figura 5 – Desenho esquemático do teste de sensibilidade – protocolo M27-A3, CLSI (2008)



Fonte: autor

5.3.2. Análise dos dados

Os testes de sensibilidade *in vitro* foram realizados em triplicata em diferentes dias. As médias geométricas foram usadas estatisticamente para comparar os resultados do CIM.

5.4. Ensaio utilizando citometria de fluxo

5.4.1. Preparo das suspensões de células de *Candida* spp.

Foram utilizados um isolado de cada espécie de *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Tabela 1) para realização dos ensaios de citometria de fluxo. As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 horas. Após, foram suspensas em 5 mL de meio YPD e reincubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e lavadas três vezes com solução salina 0,85%. Por fim, as células ($\sim 10^6$ células/mL) foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.4.2. Tratamento das células de *Candida* spp.

O ensaio para determinação da viabilidade celular, avaliação do potencial transmembrana mitocondrial, detecção de espécies reativas de oxigênio e marcação por anexina V, foi realizado a partir da exposição de 1 cepa de *Candida albicans*, 1 de *C. tropicalis* e 1 de *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol (FLC-0,21 mM), anfotericina B (Anfo B-0,00433 mM), ibuprofeno (IBU-CIM, 2xCIM e 4xCIM) e em meio RPMI 1640 que foi utilizado como controle negativo. As células tratadas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (DA SILVA *et al.*, 2014; NETO *et al.*, 2014).

5.4.3. Avaliação da integridade de membrana

As células das três espécies de *Candida* após exposição ao IBU durante o intervalo de tempo de 24 horas foram marcadas com iodeto de propídeo - IP (1 $\mu\text{g/mL}$ em PBS) (Sigma, USA) e analisadas por citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). Para cada experimento, 10000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013).

5.4.4. Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$)

As células das três espécies de *Candida* após exposição ao IBU durante o intervalo de tempo de 24 horas foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), incubadas com rodamina 123 (1 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma, USA) a 37 °C por 15 min no escuro. Posteriormente, foram lavadas duas vezes com PBS e reincubadas a 37 °C por 30 min. A fluorescência foi determinada por citometria de fluxo. Para cada experimento, 10000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2014; NETO *et al.*, 2014).

5.4.5. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Com a finalidade de detectar EROs produzidas durante um período de cultura de 24 horas em exposição ao IBU, as células foram incubadas com H₂DCFDA (20 µM) (Diacetato 2',7'- diclorodihidrofluoresceína) (Sigma, USA), durante 30 minutos no escuro a 35 °C. Logo após esse processo, as células foram colhidas, lavadas, ressuspensas em PBS, e analisadas imediatamente por citometria de fluxo. Para cada experimento, 10000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.4.6. Determinação da externalização de fosfatidilserina

As células das três espécies de *Candida* após exposição ao IBU durante o intervalo de tempo de 24 horas foram coletadas por centrifugação e digeridas com de Zymolyase 20T (2 mg/ mL) (Seikagaku Corporation, Japão) em tampão fosfato de potássio (PPB, 1 M pH 6,0) durante 2 h a 30 °C. Os esferoplastos de *C. albicans* foram ressuspensos em uma solução contendo anexina V- FITC (Guava Nexin Kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA) e IP (Sigma, USA) ausência de luz e a 37 °C. Após 20 minutos a suspensão foi analisada por citometria de fluxo. Para cada experimento 10000 eventos foram avaliados, e os restos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.4.7. Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados a partir da média ± E.P.M de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelo Student Newman Keuls (p <0,05), utilizando o programa Prism versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.5. Ensaio do Cometa

O ensaio em cometa alcalino foi realizado essencialmente como descrito por Miloshev; Mihayloy; Anachkova (2002). Cerca de 200 µL de agarose 0,5% (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) foi espalhada em cada lâmina e seca a temperatura ambiente antes da aplicação da suspensão de células sobre as lâminas. As células de *Candida* spp. foram centrifugadas em microcentrífuga de eppendorf durante 5 minutos, lavadas com água destilada, e ressuspensas em tampão S (1 M de sorbitol, 25 mM de KH₂PO₄, pH 6,5). Alíquotas de aproximadamente 5×10⁴ células foram misturadas com agarose de baixo ponto de fusão (37°C) contendo de Zymolyase 20T (2 mg/mL) e espalhado sobre as lâminas, coberto com lamínulas e incubadas

durante 20 minutos a 30°C para desintegrar a parede da célula de levedura e obter os esferoplastos. A fim de minimizar a atividade de enzimas celulares endógenas, todos os procedimentos que se seguem foram realizados numa sala fria a 8 a 10 °C. As lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em uma solução (30 mM de NaOH, 1 M de NaCl, 0,1% laurilsarcosina, 50 mM EDTA, pH 12,3) durante 1 h para lisar os esferoplastos. As lâminas foram lavadas três vezes durante 20 minutos cada em uma solução (30 mM de NaOH, 10 mM de EDTA e pH 12,4) para o desenrolamento do DNA e, em seguida, submetido a eletroforese no mesmo tampão. A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 0,5 V/cm e amperagem ajustada para 24 mA. Os géis foram neutralizados, após eletroforese, por submersão das lâminas em 10 mM Tris HCl pH 7,5 durante 10 minutos seguido por incubações consecutivas por 10 minutos em etanol 76% e 96%. Finalmente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, coradas com brometo de etídio (1 mg/mL) e visualizadas em microscópio de fluorescência. Todos os passos acima foram realizados no escuro para evitar danos adicionais no DNA. Imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas idênticas) foram analisadas para cada grupo experimental. A leitura é feita através de escores de acordo com o tamanho da cauda (de não danificado - 0 a dano máximo - 4), e o valor de índice de dano foi calculada para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de zero (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (COLLINS, 2004).

5.6. Biofilme

5.6.1. Formação do biofilme de isolados de *Candida* spp.

Neste ensaio foram utilizadas microplacas de acordo com a metodologia de Pierce *et al.* (2008), com pequenas modificações. Uma cepa boa formadora de biofilme de cada espécie de *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Tabela 1) foi selecionada. As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 horas. Em seguida, as leveduras foram suspensas em 5 mL de meio YPD e reincubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 minutos) e lavadas com PBS, este processo foi repetido três vezes. As células foram ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI 1640. Logo em seguida, foram dispensados 200 µL do inóculo em uma placa de 96 poços fundo chato. No poço 12 adicionou-se somente RPMI 1640 como controle de esterilidade. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Então, o sobrenadante foi aspirado e a placa foi lavada delicadamente com PBS por três vezes para

remoção das células não aderentes. Por fim, pode-se visualizar a formação de biofilme no fundo de cada poço, estando estes preparados para a próxima etapa.

5.6.2. Determinação da atividade do ibuprofeno sobre biofilmes formados de *Candida* spp.

Ao biofilme formado, foram adicionados 200 µL de ibuprofeno nas diversas concentrações testadas (CIM/4, CIM/2, CIM, 2x CIM, 4x CIM, 10x CIM e 20xCIM). O controle negativo (poço sem formação de biofilme, apenas com RPMI 1640) e o controle de 100% de crescimento (com suspensão de células em RPMI 1640 sem o fármaco) foram preparados e a microplaca foi incubada a 35 °C por 24 horas. Após este tempo, o fármaco foi aspirado e a placa lavada com PBS por três vezes. Em seguida, adicionou-se o corante de viabilidade celular brometo 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT) (1 mg/mL) (Sigma, USA). Após incubação de 18 a 20 horas no escuro, o corante foi removido, os poços lavados 3x com PBS e adicionado DMSO (200 µL). Após 5 a 15 minutos, o volume de 100 µL foi retirado de cada poço e transferido para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. A redução de crescimento foi comparada ao poço que corresponde a 100% de crescimento, sem fármaco (PIERCE *et al.*, 2008). A concentração de ibuprofeno variou de 3,25 a 260 mM. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Esse ensaio utiliza o sal 3- (4,5- dimetil-2-tiazol) -2,5- difenil-brometo de tetrazólio (MTT) e tem como princípio a capacidade da succinato desidrogenase, enzima do Ciclo de Krebs que se encontra ativa em mitocôndrias de células metabolicamente viáveis, de converter (MTT), que possui a cor amarela, em cristais de formazan, que possui a cor azul escura. Sendo possível, dessa forma, analisar a viabilidade celular (KONDO *et al.*, 1966; WASSERMAN; TWENTYMAN,1988).

5.6.3. Análise dos dados

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

6. RESULTADOS

6.1. Atividade antifúngica do ibuprofeno frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

Com a finalidade de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do ibuprofeno foram realizados testes de sensibilidade a partir da técnica de microdiluição em caldo. O ensaio foi realizado também com o fluconazol a fim de confirmar a resistência frente a esse antifúngico das cepas em estudo. O ibuprofeno apresentou atividade antifúngica frente às cepas selecionadas, como demonstrado na Tabela 1, com CIM variando de 6,5 a 13 mM.

Tabela 1 - Efeito antifúngico do ibuprofeno contra cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

Cepa ^a	Origem	Nº Genbank	CIM ^b	
			FLC(mM)	IBU(mM)
<i>C.tropicalis 1</i>	Sangue	KF616840	0,05	13
<i>C.tropicalis 2</i> * **	Sangue	AB861490	0,2	13
<i>C. tropicalis 3</i>	Sangue	KF616841	0,2	13
<i>C. tropicalis 4</i>	Sangue	KJ740181	0,2	13
<i>C. tropicalis 5</i>	Sangue	AB861491	0,2	13
<i>C. albicans 1</i> *	Sangue	KJ740174	0,4	6,5
<i>C. albicans 2</i> **	Sangue	KJ740175	0,4	13
<i>C. parapsilosis 1</i> *	Sangue	AB861487	0,4	13
<i>C.parapsilosis 2</i> **	Sangue	KJ740191	0,05	13
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	-	-	0,0031	13
<i>C. krusei</i> ATCC	-	-	0,05	13

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

^b O CIM foi definido como a concentração de fármaco que produziu 50 % de redução de crescimento fúngico após 24 horas de incubação em *Candida* spp. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27-S4 do CLSI. Os valores do CIM são expressos em mM. O CIM representa a média geométrica de pelo menos 3 CIM determinados em diferentes dias. Foi utilizada a faixa de FLC 0,0015 - 0,8 mM e de IBU 0,025 - 13 mM.

Para avaliação da ocorrência de resistência, o seguinte valor foi levado em consideração: CIM \geq 0,025mM equivalente a CIM \geq 8 μ g/mL para fluconazol (CLSI, 2012).

* Cepas utilizadas para investigar o mecanismo de ação do ibuprofeno.

** Cepas utilizadas para o teste do biofilme.

6.2. Avaliação preliminar do mecanismo de morte celular em *Candida* spp. após exposição ao ibuprofeno

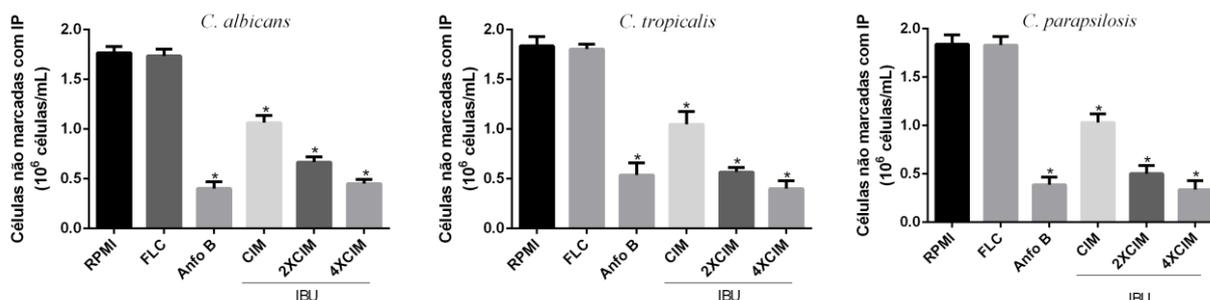
Após determinação do efeito antifúngico do ibuprofeno frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, foram realizados ensaios de citometria de fluxo objetivando avaliar o mecanismo de morte celular induzido pelo ibuprofeno. Em todas as análises foram utilizados um controle negativo (RPMI), anfotericina B (0,00433 mM) como controle positivo de morte e ibuprofeno, que foi avaliado nas concentrações de CIM (13 mM), 2x CIM (26 mM) e 4x CIM (52 mM). Com o intuito de investigar se haviam diferenças nos eventos celulares analisados após a exposição ao ibuprofeno, foi selecionada uma cepa representativa de cada espécie (Tabela 1). As análises foram realizadas após 24h de exposição ao fármaco.

6.2.1. Avaliação da integridade de membrana de cepas de *Candida* spp. tratadas com ibuprofeno

De acordo com a Figura 6, IBU nas concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM promoveu uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de células IP negativo nas três cepas de diferentes espécies, após 24 horas de exposição, em relação ao controle.

Anfotericina B (0,00433 mM) utilizada como controle positivo, após 24 horas de exposição, reduziu o número de células IP negativo quando comparadas com o controle nas três espécies testadas. Os valores absolutos obtidos na avaliação do efeito do ibuprofeno sobre a integridade de membrana estão expressos no Anexo I.

Figura 6 - Efeito do IBU sobre a integridade de membrana de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol. As células foram tratadas com IBU em diferentes concentrações (CIM=13 mM, 2xCIM=26 mM, 4xCIM=52 mM), com RPMI (controle negativo), com FLC (0,2 mM) e com Anfo B (0,00433 mM) por 24 horas, em seguida, marcadas com iodeto de propídeo e avaliadas por citometria de fluxo.



Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes.

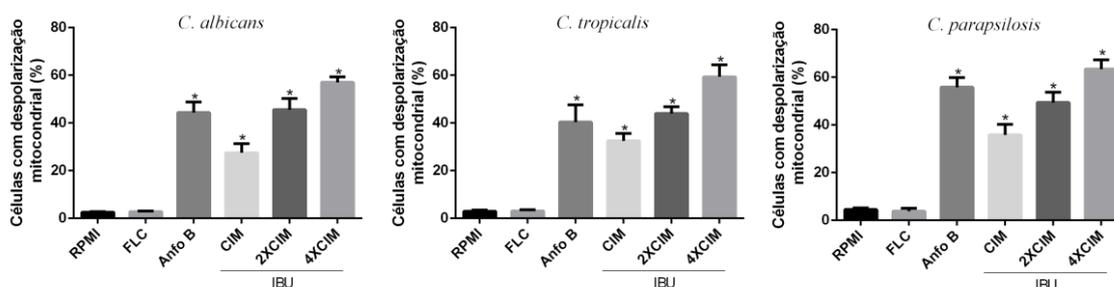
* $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.2.2. Efeito do ibuprofeno sobre o potencial transmembrana mitocondrial de células de *Candida* spp.

As células de *Candida* spp., após 24 horas de exposição ao IBU nas concentrações de CIM (13 mM), 2x CIM (26 mM) e 4x CIM (52mM) foram marcadas com rodamina 123 com a finalidade de detectar o percentual de células com baixo potencial elétrico transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Na Figura 7 pode-se observar que, quando as cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram tratadas com ibuprofeno nas diferentes concentrações (CIM, 2xCIM, 4xCIM), houve um aumento no percentual de células com despolarização mitocondrial quando comparadas com o controle. O percentual de células com despolarização mitocondrial observado nas concentrações de CIM, 2XCIM e 4xCIM para cada espécie de *Candida* foram estatisticamente diferentes entre si, demonstrando, dessa forma, que o efeito do ibuprofeno foi dependente da concentração.

Anfotericina B (0,00433 mM) utilizada como controle positivo apresentou um aumento no percentual de células com despolarização mitocondrial nas três espécies testadas quando comparadas com o controle. Os valores absolutos obtidos a partir desse ensaio estão expressos no Anexo II.

Figura 7 - Avaliação do percentual de células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol com despolarização da membrana mitocondrial. As células foram tratadas com IBU em diferentes concentrações (CIM =13 mM, 2xCIM=26 mM, 4xCIM=52 mM), com RPMI (controle negativo), com FLC (0,2 mM) e com Anfo B (0,0043 mM) por 24 horas, em seguida marcadas com rodamina 123 e avaliadas por citometria de fluxo.



Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes.

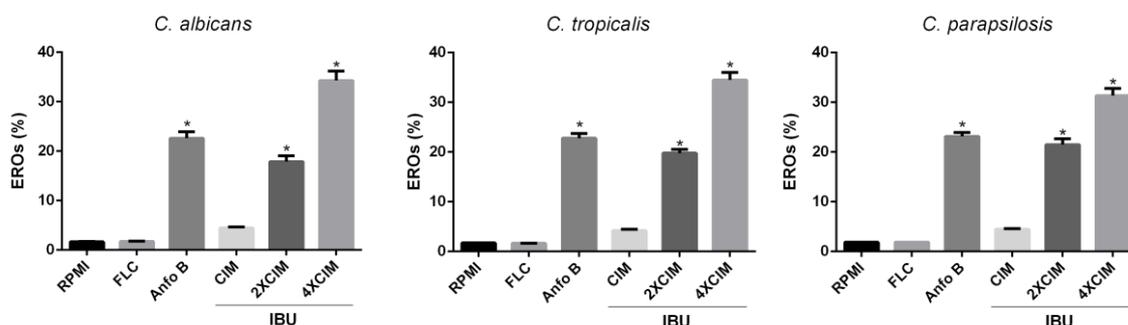
* $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.2.3. Efeito do ibuprofeno sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de *Candida* spp.

Como representado na Figura 8, nas três cepas de *Candida* spp. a formação de EROs na concentração de ibuprofeno equivalente ao CIM (13 mM) não foi significativa quando comparada ao controle ($p > 0,05$). As células tratadas com ibuprofeno na concentração equivalente a 2xCIM (26 mM) e 4xCIM (52 mM) para as três espécies de *Candida* apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção intracelular de EROS quando comparadas ao grupo controle.

Anfotericina B (0,00433 mM) utilizada como controle positivo apresentou um aumento no percentual de EROs nas três espécies testadas quando comparadas com o controle. Os valores absolutos obtidos na avaliação da produção de EROs estão expressos no Anexo III.

Figura 8 - Avaliação da formação de EROs em células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol. As células foram tratadas com IBU em diferentes concentrações (CIM =13 mM, 2xCIM=26 mM, 4xCIM=52 mM), com RPMI (controle negativo), com FLC (0,21 mM) e com Anfo B (0,00433 mM) por 24 horas, em seguida marcadas com H₂DCFDA e avaliadas por citometria de fluxo.



Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

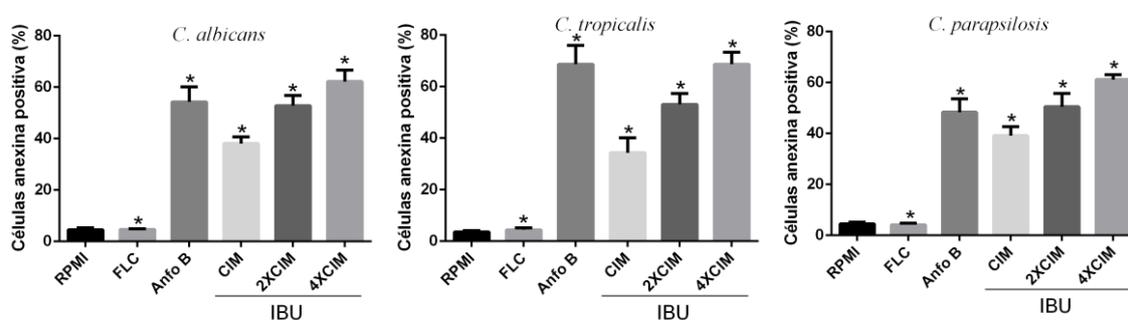
6.2.4. Detecção da externalização de fosfatidilserina (PS) induzida pelo ibuprofeno em células de *Candida* spp.

As células de *Candida* spp. após 24 horas de exposição ao ibuprofeno nas concentrações de CIM (13 mM), 2xCIM (26 mM) e 4xCIM (52 mM) foram tratadas com anexina V-FITC/ IP e como mostrado na Figura 9 houve um aumento na proporção de células marcadas pela anexina, indicando aumento na externalização da

fosfatidilserina nos isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* quando comparadas ao grupo controle. As frequências de células anexina positiva observadas nas concentrações de CIM, 2XCIM e 4xCIM para as três espécies de *Candida* foram estatisticamente diferentes entre si, demonstrando, dessa forma, que o efeito do ibuprofeno foi dependente da concentração.

Anfotericina B (0,00433 mM) foi utilizada como controle positivo e provocou um aumento na proporção de células detectadas com fosfatidilserina externalizada para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Os valores absolutos obtidos a partir desse ensaio estão expressos no Anexo IV.

Figura 9 - Efeito do ibuprofeno em diferentes concentrações sobre a externalização da fosfatidilserina em células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol. As células foram tratadas com IBU em diferentes concentrações (CIM=13 mM, 2xCIM=26 mM, 4xCIM=52 mM), com RPMI (controle negativo), com FLC (0,21 mM) e com Anfo B (0,00433 mM) por 24 horas, em seguida utilizando o marcador Anexina V – FITC/IP foram avaliadas por citometria de fluxo. A análise foi realizada a partir da contagem de células Anexina positivo/ IP negativo somada à quantidade de células Anexina positivo/ IP positivo.



Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes.

*p<0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

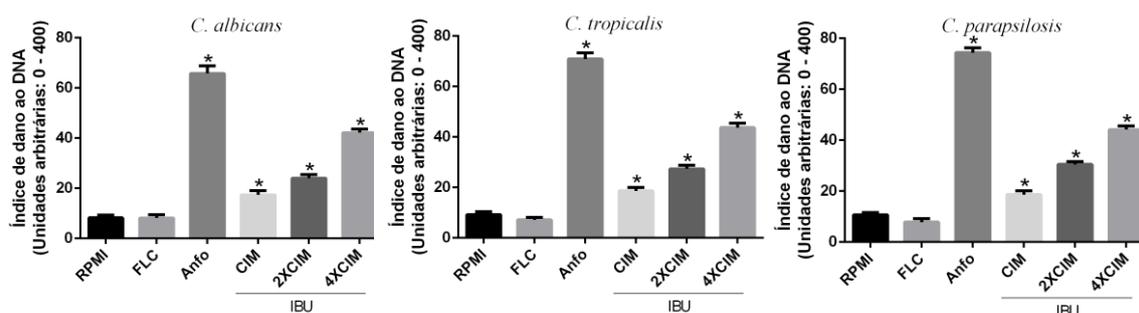
6.2.5. Avaliação dos danos ao DNA de células de *Candida* spp. promovidos pelo ibuprofeno

O ensaio do cometa na versão alcalina foi utilizado para verificar quebras no DNA de *Candida* spp. quando tratadas com ibuprofeno. A Figura 10 demonstra que na concentração CIM (13 mM), 2xCIM (26 mM) e 4xCIM (52 mM) houve um aumento significativo no índice de dano ao DNA das células testadas (p<0,05). O índice de dano ao DNA observados nas concentrações de CIM, 2XCIM e 4xCIM para *C. tropicalis* e

C. parapsilosis foram estatisticamente diferentes entre si, demonstrando, dessa forma, que o efeito do ibuprofeno foi dependente da concentração para essas espécies.

Anfotericina B (0,00433 mM) utilizada como controle positivo apresentou um aumento no índice de dano ao DNA nas três espécies testadas quando comparadas com o controle. Os valores absolutos obtidos a partir desse ensaio estão expressos no anexo V.

Figura 10 - Avaliação do índice de dano ao DNA em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol através do ensaio do cometa versão alcalina. As células foram tratadas com IBU em diferentes concentrações (CIM =13 mM, 2xCIM= 26 mM, 4xCIM=52 mM), com RPMI (controle negativo), com FLC (0,21 mM) e com Anfo B (0,00433 mM) e em seguida foram analisadas pelo ensaio do cometa versão alcalina.



Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes.

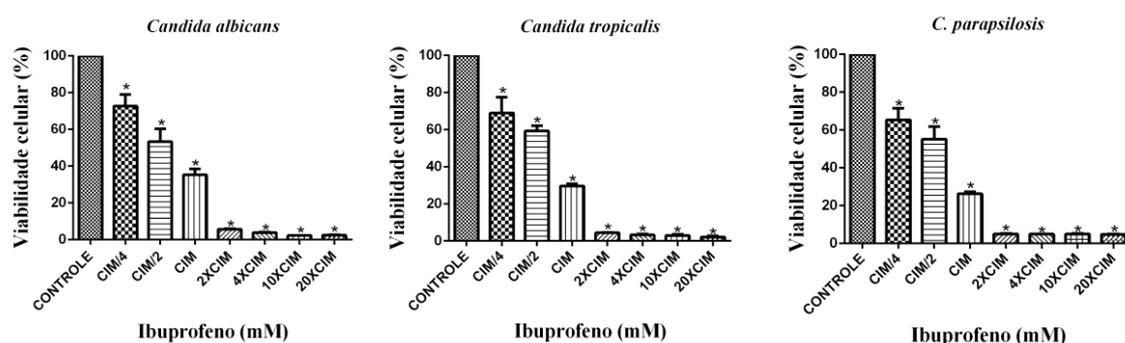
* $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.3. Atividade do ibuprofeno frente a biofilme formado de *Candida* spp.

Tendo em a vista a importância da organização de microorganismos na forma de biofilme associado à dificuldade no tratamento, após confirmação da ação do ibuprofeno frente a células planctônicas de *Candida* spp. foi verificada sua atividade frente ao biofilme formado (24 horas) de cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Foram utilizadas concentrações inibitórias e subinibitórias (CIM/4 = 3,25 mM, CIM/2=6,5 mM, CIM=13 mM, 2xCIM=26 mM, 4xCIM=52 mM, 10xCIM=130 mM, 20xCIM=260 mM) e observou uma redução de mais de 50% da viabilidade celular do biofilme em relação ao controle na concentração de CIM (13 mM) nos três isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Figura 11). O percentual de células

viáveis no biofilme formado frente aos isolados de *Candida* spp. estão expressos no Anexo VI.

Figura 11 - Atividade do ibuprofeno frente ao biofilme formado de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol. Foi considerado o CIM= 13 mM do IBU e as concentrações testadas variaram de 3,25 mM (CIM/4) a 260 mM (20xCIM). A avaliação da viabilidade celular foi realizada utilizando o ensaio de redução do MTT.



*p<0,05 comparado com o controle (RPMI) por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

7. DISCUSSÃO

O redirecionamento de fármacos, já aprovado pela *Food and Drug Administration (FDA)*, é um importante meio de prospecção de novas alternativas terapêuticas, visto que esses fármacos possuem propriedades farmacológicas e toxicológicas bem caracterizadas, possibilitando assim uma redução no tempo e custo para desenvolvimento de um medicamento (SILES *et al.*, 2013). Nesse contexto, destacamos o ibuprofeno, que corresponde a um anti-inflamatório não esteroideal com relatos de atividade antifúngica e antibacteriana (PINA-VAZ *et al.*, 2000 ;ELVERS e WRIGHT, 1995).

Dessa forma, inicialmente, as cepas foram selecionadas a partir da micoteca do Laboratório de Bioproteção de Moléculas Antimicrobianas e avaliadas quanto à viabilidade celular e à manutenção do perfil de sensibilidade ao fluconazol, visto que todas estavam viáveis e resistentes quando estocadas. O congelamento pode causar danos a células fúngicas, como: aumento da concentração de eletrólitos e de radicais livres, mudanças no pH, desidratação celular e a formação de cristais de gelo no espaço intracelular que representa efeito danoso para célula (SHAW; ORANRATNACHAI;

TROUNSON, 2000). Assim, a técnica de microdiluição em caldo, protocolo M27-A3, foi utilizada para verificar a atividade antifúngica do fluconazol. Todas as cepas se mantiveram resistentes (Tabela 1).

A atividade antifúngica do ibuprofeno frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol foi avaliada e concentrações entre 6,5 a 13 mM (1,5 a 3 mg/ml) foram capazes de inibir 50% do crescimento fúngico de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Um estudo realizado por Pina-Vaz e colaboradores (2000), avaliou a atividade antifúngica do ibuprofeno e mostrou uma inibição de 80% do crescimento de 2 cepas de *C. albicans* (uma resistente e uma sensível ao fluconazol), 2 *C. glabrata* e 2 *C. krusei* resistentes ao fluconazol, 2 *C. tropicalis*, 2 *C. guilliermondii* e 2 *C. lusitaniae* todas sensíveis ao fluconazol em concentrações variando de 1 a 3 mg/ml de ibuprofeno. Dessa forma, pode-se observar que os resultados encontrados estão condizentes com os presentes na literatura e que a variação na sensibilidade não está diretamente relacionada às espécies de *Candida*, podendo estar relacionada às variações genéticas de cada cepa (CIRAK *et al.*, 2003).

Após verificar a atividade antifúngica do ibuprofeno frente a cepas de *Candida* spp. surgiu o interesse de aprofundar o conhecimento acerca do possível mecanismo de morte celular envolvido. Dois importantes mecanismos de morte celular correspondem à necrose e à apoptose. Por algum tempo a necrose foi definida como morte celular acidental, porém recentes evidências genéticas tem revelado a existência de caminhos de regulação da necrose, este tipo de morte celular está associado a eventos como extravasamento do conteúdo intracelular, granulação citoplasmática e edema celular (oncoses) (BERGHE *et al.*, 2014). Em relação a apoptose, este mecanismo é o principal tipo de morte celular que ocorre quando o dano ao DNA é irreparável, causando algumas mudanças específicas como condensação e fragmentação nuclear, clivagem de DNA cromossômico e externalização de fosfatidilserina (OUYANG *et al.*, 2012). A morte celular por apoptose pode ser ativada de duas formas: via intrínseca, envolvendo a participação mitocondrial e induzida, principalmente, por danos celulares, como, danos ao DNA, estresse oxidativo; e a via extrínseca envolvendo a participação de um receptor específico que promove a ativação direta da cascata das caspases, levando à destruição celular (BAYLES, 2014).

Nesse contexto, ensaios de citometria de fluxo foram realizados com a finalidade de averiguar possíveis mecanismos de ação do ibuprofeno. Dessa forma, foi

selecionada para esses ensaios uma cepa de cada espécie (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) para observar possíveis diferenças no mecanismo de ação do ibuprofeno.

Inicialmente, as células foram tratadas com o ibuprofeno em diferentes concentrações (CIM=13 mM, 2xCIM=26 mM, 4xCIM=52 mM) e submetidas a técnicas de citometria de fluxo para verificar: viabilidade celular, alteração do potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e externalização da fosfatidilserina.

O ensaio para avaliação da integridade de membrana foi realizado utilizando o marcador iodeto de propídeo (IP), sendo observada redução na integridade de membrana das cepas de *Candida* spp. nas três concentrações de ibuprofeno utilizadas (CIM=13 mM, 2xCIM=26 mM, 4xCIM=52 mM). Pina-Vaz *et al.* (2000) investigaram o mecanismo de ação do ibuprofeno e observaram que esse fármaco promovia aumento da permeabilidade ao IP em células de *Candida albicans* em concentrações fungicidas (10-20 mg/ml). De Quadros *et al.* (2011) com o intuito de verificar se o mecanismo de ação do ibuprofeno e de outros AINEs, como aspirina, salicilato de sódio e indometacina, em cepas de *Candida* spp. era dependente de prostaglandina E2 (PGE2), realizaram um estudo e mostraram que a presença de PGE2 exógena não afetou o efeito fungicida do ibuprofeno e sugeriram que o mesmo causava danos na membrana celular de *C. albicans*.

A despolarização mitocondrial é um evento que pode indicar início do processo de apoptose pela via intrínseca (BONNET *et al.*, 2007). O potencial transmembrana mitocondrial também foi avaliado nesse estudo, sendo observado um aumento no percentual de células com despolarização mitocondrial com o aumento da concentração de ibuprofeno, podendo sugerir o início do processo apoptótico para as 3 cepas selecionadas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Nesse contexto, um estudo realizado por Sanz-Blasco *et al.* (2008) mostrou que o ibuprofeno e outros AINEs, em baixas concentrações (1 µM), causavam a despolarização mitocondrial em células do cerebelo. Outro estudo realizado por Moorthy *et al.* (2008) mostrou que o ibuprofeno promoveu alterações morfológicas em mitocôndrias de células hepáticas de ratos tratados com 10 mg/kg por 15 dias.

A fosfatidilserina (PS) corresponde a um fosfolípido da membrana interna e, durante o processo apoptótico, é externalizada para a superfície celular, indicando que a célula seja fagocitada por macrófagos (ENGELAND *et al.*, 1998). Sua determinação é realizada utilizando a anexina V, proteína cálcio-dependente capaz de se ligar a PS

externalizada na célula que se encontra nos estágios iniciais de apoptose (LIU *et al.*, 2009). No presente trabalho, o ibuprofeno nas três concentrações promoveu aumento na externalização de PS nas três cepas selecionadas, podendo sugerir que as células estavam em processo de apoptose inicial. Redpath *et al.* (2009) demonstraram a externalização de fosfatidilserina em células de melanoma humano após tratamento com 10 mM de ibuprofeno, sugerindo a indução da apoptose nessas células, corroborando assim com os resultados encontrados no presente trabalho.

Neste estudo também foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio, sendo observado que na concentração de CIM de ibuprofeno a produção de espécies reativas de oxigênio não foi significativa em células de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, porém na concentração de 2CIM e 4xCIM alterações em todas as cepas foram observadas. O ibuprofeno é um derivado do ácido propiônico e uma característica comum a esses derivados é a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) na presença de luz (ADACHI *et al.*, 2007). Um estudo realizado por Husain *et al.* (2015) demonstrou que a geração de EROs pelo ibuprofeno (0,05mM – 0,3mM) na presença de luz é dependente da concentração de ibuprofeno e observou também a interação desse fármaco com o DNA.

Em relação à avaliação do dano ao DNA promovido pelo ibuprofeno, ensaios mostraram que na três concentrações (CIM, 2xCIM e 4xCIM) houve dano significativo ao DNA das células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. O ibuprofeno é um composto fotoativo, que tem a capacidade de intercalar-se a molécula de DNA tornando-a sensível ao dano após exposição à luz (ADACHI *et al.*, 2007; HUSAIN, *et al.*, 2015).

Diante do exposto, mais estudos são necessários para um melhor esclarecimento acerca o mecanismo de ação do ibuprofeno frente a células fúngicas de *Candida* spp., visto que existem poucos relatos na literatura acerca o assunto.

As infecções relacionadas a biofilmes estão associadas a um aumento no período de permanência hospitalar, nos custos hospitalares e a uma maior taxa de mortalidade quando comparadas as infecções associadas a microrganismos não formadores de biofilme (RAJENDRAN *et al.*, 2016). Essa forma de organização confere resistência antifúngica aos microrganismos os quais estão associados. Dessa forma, a capacidade de *Candida* spp. formar biofilmes resistentes aos medicamentos é um fator importante que contribui para a falha terapêutica e por isso, a busca por novos

antifúngicos, principalmente tendo como alvo o biofilme, se torna fundamental (PIERCE, *et al.*, 2015).

Nesse contexto, após verificar a atividade do ibuprofeno frente a células planctônicas de *Candida* spp. foram realizados ensaios com biofilme formado (24 horas) para observar se o ibuprofeno seria capaz de reduzir a viabilidade do biofilme formado.

A atividade do ibuprofeno foi avaliada a partir da seleção de três cepas de *Candida* spp. uma de cada espécie (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*) que se mostraram visualmente boas formadoras de biofilme. Foram utilizadas concentrações inibitórias e subinibitorias (CIM/4, CIM/2, CIM, 2x CIM, 4x CIM, 10x CIM e 20x CIM) de ibuprofeno, e verificou que houve uma redução na viabilidade do biofilme formado diretamente relacionado com o aumento na concentração. As três espécies apresentaram uma redução maior que 50% na viabilidade do biofilme quando tratadas com CIM, o que configuram um importante resultado, visto que biofilme são organizações difíceis de erradicar podendo ser até 2000 vezes mais resistentes que células planctônicas (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). Um estudo realizado por Ashraf *et al.* (2015) mostrou que 500 µg/ml de ibuprofeno foram capazes de reduzir 38% do biofilme formado de *C. albicans*. Mostrando assim que esse fármaco apresenta uma boa atividade contra biofilme maduro de cepas do gênero *Candida*, assim como foi mostrado no presente trabalho.

Dessa forma, tendo em vista os resultados obtidos a partir da realização deste trabalho, o ibuprofeno se apresenta, a partir de um novo olhar, como um fármaco com propriedades antifúngicas e também como um possível protótipo para o desenvolvimento de novas moléculas antifúngicas, obtidas a partir de alterações estruturais, com a finalidade de obter um composto com melhores características farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológica.

8. CONCLUSÃO

O ibuprofeno apresentou atividade antifúngica frente a cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol e sua ação pode estar relacionada ao fato deste fármaco promover dano ao DNA e consequente despolarização mitocondrial, além de promover aumento na externalização de fosfatidilserina, sugerindo assim que a morte celular ocorra por apoptose. Dessa forma, esse estudo possibilitou um melhor entendimento acerca o mecanismo de morte promovido pelo ibuprofeno frente a *Candida* spp. na forma planctônica. O ibuprofeno também foi capaz de reduzir a viabilidade do biofilme formado de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, M.; SAKAMOTO, H.; KAWAMURA, R.; WANG, W.; IMAI, K.; SHINOMURA, Y. Histology and Histopathology, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and oxidative stress in cancer cells. **Histology and Histopathology**, v. 22, p. 437-442, 2007.
- ALBUQUERQUE, P.; NICOLA, A.M.; NIEVES, E.; PAES, H. C.; WILLIAMSON, P. R.; SILVA-PEREIRA, I., CASADEVALL, A. Quorum sensing-mediated, cell density-dependent regulation of growth and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **MBIO**, v. 5, p. 1-15, 2013.
- ALBUQUERQUE, P. e CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi – a review. **Medical Mycology**, v. 50, p. 337–345, 2012.
- ALEM, M. A. S. e DOUGLAS, L. J. Effects of Aspirin and Other Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs on Biofilms and Planktonic Cells of *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, p. 41–47, 2004.
- ASHRAF, A.; YOUSRI, F.; TAHA, N.; EL-WALY, O.A.; EL-KAREEM RAMADAN, A.; ISMAIL, E.; HAMADA, R.; KHALAF, M.; REFAEE, M.; ALI, S.; MADYN, A.; EL – BAKY, R. M. A. Effect of Some Non steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Growth, Adherence and Mature Biofilms of *Candida* spp. **American Journal of Microbiological Research**, v. 3, p. 1-7, 2015.
- BANDARA, H. M. H. N. ; MATSUBARA, V. H. ; SAMARANAYAKE, L. P. Future therapies targeted towards eliminating *Candida* biofilms and associated infections. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.15, p. 299-318, 2016.
- BAYHAN, G. I.; GARIPARDIC, M.; KARAMAN, K.; AKBAYRAM, S. Voriconazole-associated visual disturbances and hallucinations. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 8, p.1-3, 2015.
- BAYLES, K. W. Bacterial programmed cell death: making sense of a paradox. **Nature Reviews/Microbiology**, v.12, p.63-69, 2014.

BERGHE, T. V.; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Molecular Cell Biology**, v. 15, p 135 – 147, 2014.

BENEDETTI, F. E; DOGUE, S. Different Placebos, Different Mechanisms, Different Outcomes: Lessons for Clinical Trials. **Plos One**, v.10, p.1-13, 2015.

BONHOMME, J. e D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 398- 403, 2013.

BONNET, S.; ARCHER, S. L.; ALLALUNIS-TURNER, J.; HAROMY, A.; BEAULIEU, C.; THOMPSON, R.; LEE, C. T.; LOPASCHUK, G. D.; PUTTAGUNTA, L.; BONNET, S.; HARRY, G.; HASHIMOTO, K.; PORTER, C. J.; ANDRADE, M. A.; THEBAUD, B.; MICHELAKIS, E. D. A. Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. **Cancer Cell**, v.11, p. 37–51, 2007.

BOUZA, E.; GUINEA, J.; GUEMBE, M. The Role of Antifungals against *Candida* Biofilm in Catheter-Related Candidemia. **Antibiotics**, v. 4, p. 1-17, 2015.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; LEVITZ, S. M. Tackling human fungal infections. **Science**. v. 336, p. 647, 2012.

BRUNKE, S.; MOGAVERO, S.; KASPER, L.; HUBE, B. Virulence factors in fungal pathogens of man. **Current Opinion in Microbiology**, v.32, p. 89-95, 2016.

CATALDI, V.; DI CAMPLI E.; FAZII, P.; TRAINI, T.; CELLINI, L. ; DI GIULIO, M. *Candida* species isolated from different body sites and their antifungal susceptibility pattern: Cross-analysis of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Medical Mycology**, v. 00, p. 1-11 ,2016.

CIRAK, M. Y.; KALKANCI, A.; KUSTIMUR, S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1027-1032, 2003.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. CLSI document M27- S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). References methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts approved standard M27-A3, 3rd ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249- 261, 2004.

COLOMBO, A. L.; Guimarães, T.; Camargo, L. F. A.; Richtmann, R.; de Queiroz-Telles, F.; Sallese, M. J. C.; da Cunha, C. A.; Yasudag, M. A. S.; Moretti, M. L.; Nuccii, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, v. 17, p. 283- 312, 2013.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SUKIENIK, T.; PASQUALOTTO, A. C.; ANDREOTTI, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; NOUE'R, S. A.; NUCCI, M. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive Care Medicine**, v. 40, p.1489–1498, 2014.

DELALOYE, J. E CALANDRA, T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. **Virulence**, v. 5, p. 161–169, 2014.

DA SILVA, C.R.; DE ANDRADE NETO, J.B.; SIDRIM, J.J.; ANGELO, M.R.; MAGALHÃES, H.I.; CAVALCANTI, B.C.; BRILHANTE, R.S.; MACEDO, D.S.; DE MORAES, M.O.; LOBO, M.D.; GRANGEIRO, T.B.; NOBRE JÚNIOR, H.V. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 1691-1700, 2013.

DE PAULA, S. B.; MOREY, A. T.; SANTOS, J. P.; DOS SANTOS, P. M C, GAMEIRO, D. G, KERBAUY, G; SENA, E. M; UEDA, L.T; CARNEIRO, M.; PINGE-FILHO, P.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Oral *Candida* colonization in HIV-infected patients in Londrina-PR, Brazil: antifungal susceptibility and virulence factors. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, p. 1350-1359, 2015.

DE QUADROS, A. U.; BINI, D.; PEREIRA, P. A. T.; MORONI, E. G.; M. MONTEIRO, C. Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism. **Folia Microbiológica**, v. 56, p. 349–352, 2011.

DELFINO, D.; SCORDINO, F.; PERNICE, I.; LO PASSO, C.; GALBO, R.; DAVID, A.; BARBERI, I.; CRISEO, G.; CASCIO, A.; ROMEO, O. Potential association of specific *Candida parapsilosis* genotypes, bloodstream infections and colonization of health workers' hands. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 946–951, 2014.

DEORUKHKAR, S. C. Changing Trends in Epidemiology of Candidiasis and Role of Non-*Albicans Candida* Species. **Advance techniques in Clinical Microbiology**, v.1. p. 1-2, 2016.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A; SIQUEIRA, R. A.; MOTA, V. P.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **Plos One**, v. 11, p. 1-9, 2016.

ELVERS, K. T. E WRIGHT, S. J. L. Antibacterial activity of the anti-inflammatory compound ibuprofen. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 82-84, 1995.

ENGELAND, M. V.; NIELAND, L. J. W.; RAMAEKERS, F. C. S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. **Cytometry**, v. 31, p. 1–9, 1998.

ERB-DOWNWARD JR, NOVERR MC. Characterization of prostaglandin E2 production by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 3498–3505, 2007.

ESCRIBANO, P.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M.; SÁNCHEZ-CARRILLO, C.; MUÑOZ, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Endemic genotypes of *Candida albicans* causing fungemia are frequent in the hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, p.2118-2123, 2013.

FINKEL, J.S.; MITCHELL, A.P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 109-118, 2011.

FORNARI G.; VICENTE, V. A.; GOMES, R. R.; MURO, M. D.; PINHEIRO, R. L.; FERRARI, C.; HERKERT, P. F.; TAKIMURAC, M.; CARVALHO, N. S.; QUEIROZ-TELLES, F. Susceptibility and molecular characterization of *Candida* species from patients with vulvovaginitis. **Brazilian Journal of microbiology**, v. 47, p. 373–380, 2016.

FOX, E.P.; SINGH-BABAK, S.D.; HARTOONI, N.; NOBILE, C.J. **Antifungals: From Genomics to Resistance and the Development of Novel Agents**, Caister Academic Press: Poole, UK, 2015. 71–90 p.

FURLETTI, V. F.; MARDEGA, R. C; OBANDO-PEREDA, G. A.; ANÍBAL, P. C.; DUARTE, M. C. T.; R. B. GONÇALVES; HÖFLING, J.F. Susceptibility of *Candida* spp. Oral isolates for azolic antifungals and amphotericin B. **Brazilian Journal Of Oral Sciences**, v. 7, p. 1543- 1549, 2008.

GARNACHO-MONTERO, J.; DÍAZ-MARTÍN, A.; GARCÍA-CABRERA, E.; DE PIPAÓN, M. R. P.; HERNÁNDEZ-CABALLERO, C.; AZNAR-MARTÍN, J.; CISNEROS, J. M.; ORTIZ-LEYBA, C. Risk Factors for Fluconazole-Resistant Candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 3149–3154, 2010.

GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. **Antifungal Therapy**, CRC Press, 2009. 488 p.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A, **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012. 2019 p.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p 5- 10, 2014.

HUSAIN, M. A.; SARWAR, T.; REHMAN, S. U.; ISHQI, H. M.; TABISH, M. Ibuprofen causes photocleavage through ROS generation and intercalates with DNA: A combined biophysical and molecular docking approach. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v 17, p. 1-45, 20, 2015.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; MOSER, C.; BASSI, G. L.; COENYE, T.; DONELLI, G.; HALL-STOODLEY, L. ; HOLÁ, V.; IMBERT, C.; KIRKETERP-MØLLER, K.; LEBEAUX, D.; OLIVER, A. ; ULLMANN, A. J. ; WILLIAMS, C. ESCMID* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, p.1–25, 2015.

ILIEV, I. D. e UNDERHILL, D. M. Striking a Balance: Fungal Commensalism versus Pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p.366–373, 2013.

JOTHIESWARI, D. e REDDY, K. B. An overview on fungal disease. **Intenational Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences**, v.4, p 194-200, 2014.

JUDD, W. R. E MARTIN, C. A. Antifungal Activity of Nontraditional Antifungal Agents. **Current Fungal Infection Reports**, v. 3, p. 86–95, 2009.

KHOURI, S.; RUIZ, L. S.; AULER, M. E. ; DA SILVA, B.C.M.; PEREIRA, V. B. R.; DOMANESCHI, C.; HAHN, R. C.; PAULA, C. R. Evaluation of infections by *Candida* at a university hospital of Vale do Paraíba region, São Paulo State, Brazil: species distribution, colonization, risk factors and antifungal susceptibility. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, p. 51-57, 2016.

KONDO, T.; IMAMURA, T.; ICHIHASHI, H. In vitro test sensitivity of tumor to carcinostatic agents. **Gann**, v. 57, p.113-121,1966.

KULLBERG, B. J. E ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **The New England Journal of Medicine**, v.373, p. 1445 – 1456, 2015.

LIU, T.; ZHU, W.; YANG, X.; CHEN, L.; YANG, R.; HUA, Z.; LI, G. Detection of Apoptosis Based on the Interaction between Annexin V and Phosphatidylserine. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 2410–2413, 2009.

MAGILL, S. S.; EDWARDS, J. R.; BAMBERG, W.; BELDAVS, Z. G.; DUMYATI, G.; KAINER, M. A.; LYNFIELD, R.; MALONEY, M.; MCALLISTER-HOLLOD, L.; NADLE, J.; RAY, S. M.; THOMPSON, D. L.; WILSON, L. E.; FRIDKIN, S. K. Emerging infections program healthcare-associated infections and antimicrobial use prevalence survey team. 2014 Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **The New England Journal of Medicine**, v.360, p. 1198–1208, 2014.

MACKILIS, J. D. e MADISON, R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 31, p. 43-46, 1990.

MARCHETTI, P.; CASTEDO, M.; SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; MACHO, A.; HAEFFNER, N.; HIRSCH, F.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v.184, p.1155-1160, 1996.

MARTINS, M.; UPPULURI, P.; THOMAS, D. P.; CLEARY, I. A.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT; J. L.; OLIVEIRA, R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v. 169, p. 323–331, 2010.

MATTHAIYOU, D. K.; CHRISTODOULOPOULOU, T.; DIMOLOPOULOS, G. How to treat fungal infections in ICU patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p 2-8, 2015.

MAUBON, D.; GARNAUD, C.; CALANDRA, T.; SANGLARD, D.; CORNET, M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Medicine**, v.40, p. 1241-1255, 2014.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, p. 119-128, 2013.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; JACOBSEN, I. D.; MIRAMO, P.; GROßE, K.; B. HUBE. The Novel *Candida albicans* Transporter Dur31 Is a MultiStage Pathogenicity Factor. **Plos Pathogens**, v.8, p.1-18, 2012.

MILOSHEY, G.; MIHAYLOY, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell electrophoresis on yeast cells. **Mutation Research**, v. 513, p. 69- 74. 2002.

MODRZEWSKA, B. E PIOTR, K. Adherence of *Candida* spp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. **Annals of Parasitology**, v. 61, p. 3–9, 2015.

MONTAGNA, M. T.; CAGGIANO, G.; LOVERO, G. DE GIGLIO, O.; CORETTI, C.; CUNA, T.; IATTA, R.; GIGLIO, M.; DALFINO, L.; BRUNO, F.; PUNTILLO, F. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). **Infection**, v.41, p. 645–653, 2013.

MOORTHY, M.; FAKURAZI, S.; ITHNIN, H. Morphological Alteration in Mitochondria Followin Diclofenac and Ibuprofen Administration. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 1901-1908, 2008.

MOYES, D. L; RICHARDSON, J. P.; NAGLIK, J. R. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. **Virulence**, v. 6 , p.228-246, 2015.

NETO, J. B. A.; DA SILVA, C. R.; NETA, M. A. S.; CAMPOS, R. S.; SIEBRA, J. T.; SILVA, R. A. C.; GASPAR, D. M.; MAGALHÃES, H.I. F.; DE MORAES, M. O.; LOBO, M. D. P.; GRANGEIRO, T. B. ; CARVALHO, T. S. C.; DIOGO, E. B. T.; DA SILVA JÚNIOR, E. N. ; RODRIGUES, F. A. R.; CAVALCANTI, B. C.; NOBRE JÚNIOR, H V. 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, p, 1-10 2014.

NETT, J.E.; BROOKS, E.G.; CABEZAS-OLCOZ, J.; SANCHEZ, H.; ZARNOWSKI, R.; MARCHILLO, K.; ANDES, D.R. Rat indwelling urinary catheter model of *Candida albicans* biofilm infection. **Infection and Immunity**, v. 82, p. 4931–4940, 2014.

NOBILE, C.J. E JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 71–92, 2015.

NOVERR, M.C.; PHARE, S.M.; TOEWS, G.B.; COFFEY, M.J.; HUFFNAGLE, G.B. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 2957–2963, 2001.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F.-T.; ZHOU, T.-T., LIU, B., BA, J.-K., Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, p.487-498, 2012.

PAKSHIR, K.; ZOMORODIAN, K.; KARAMITALAB, M.; JAFARI, M.; TARAZ, H.; EBRAHIMI, H. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 23, p. 113-118, 2013.

PAMMI, M.; HOLLAND, L.; BUTLER, G.; GACSER, A.; BLISS, J. M. *Candida parapsilosis* is a Significant Neonatal Pathogen: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Pediatric Infectious Disease**, v. 32, p. 206-216, 2013.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A. ; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; SCHUSTER, M. G.; VAZQUEZ, J. A.; WALSH, T. J.; ZAOUTIS, T. E.; SOBEL, J. D. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, p.1-50, 2016

PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.; BENJAMIN JR, D.K.; CALANDRA, T.F.; EDWARDS JR, J.E.; FILLER, S.G.; FISHER, J.F.; KULLBERG, B.J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A.C.; REX, J.H.; WALSH, T.J.; SOBEL, J.D. Clinical practice

guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 48, p.503–535. 2009.

PEMAN, J; CANTON, E.; LINARES-SICILIA, M.J.; ROSELLÓ, E. M.; BORRELL, N.; RUIZ-PÉREZ-DE-PIPAON, M. T.; GUINEA, J.; GARCÍA, J.; PORRAS, A. ; GARCÍA-TAPIA, A. M.; PÉREZ-DEL-MOLINO, L.; SUÁREZ, A.; ALCOBA, J.; GARCÍA-GARCÍA, I., Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 4158– 4163, 2011.

PERLIN, D. S. Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1354, p. 1-11, 2015.

PFALLER, M. A.; ANDES, D. R.; DIEKEMA, D. J.; HORN, D. L.; REBOLI, A. C.; ROTSTEIN, C.; FRANKS, B., AZIE, N.E. 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, p. 1-12, 2014.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. Antifungal susceptibilities of *Candida*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus* from the Asia and Western Pacific region: data from the SENTRY antifungal surveillance program (2010–2012). **The Journal of Antibiotics**, v. 68, p. 556-561, 2015.

PIERCE, C. G. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **NIH Public Access**, v. 3, p. 1494– 1500, 2008.

PIERCE, C. G.; SRINIVASAN, A.; RAMASUBRAMANIAN, A. K.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. From Biology to Drug Development: New Approaches to Combat the Threat of Fungal Biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 3, p. 1-18, 2015.

PINA-VAZ, C; SANSONETTY, F.; RODRIGUES, A. G.; MARTINEZ-DE OLIVEIRA, J. ; FONSECA, A.F.; MARDH, P. A. Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species. **Antimicrobial Agents**, v. 49, p.831-840, 2000.

POLKE, M. e JACOBSEN, I. D. Quorum sensing by farnesol revisited. **Current Genetics**, p. 1–7, 2017.

PUIG-ASENSIO, M.; PADILLA, B.; GARNACHO-MONTERO, J.; ZARAGOZA, O.; AGUADO, J.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; NILE, C. J.; SHERRIFF1, A.; JOHNSON, E. M.; HANSON, M. F.; WILLIAMS, C.; MUNRO, C. A.; JONES, B. J.; RAMAGE, G. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection—Scotland, 2012–2013. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 87–93, 2016.

RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; NILE, C. J.; SHERRIFF, A.; JOHNSON, E. M. HANSON, M. F. WILLIAMS, C.; MUNRO, C. A.; JONES, B. J.; RAMAG, G. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection—Scotland, 2012–2013. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 87–93, 2016.

REDPATH, M.; MARQUES, C.M.G.; DIBDEN, C.; WADDON, A.; LALLA, R.; MACNEIL, S. Ibuprofen and hydrogel-released ibuprofen in the reduction of inflammation-induced migration in melanoma cells. **British Journal of Dermatology**, v. 161, p. 25–33, 2009.

RIBET, D. e COSSART, P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. **Microbes and Infection**, v. 17, p. 173-183, 2015.

ROEMER, T. e KRYSAN, D. J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, p. 1-14, 2014.

ROSATO, A.; CATALANO, A.; CAROCCI, A.; CARRIERI, A.; CARONE, A.; CAGGIANO, G.; FRANCHINI, C.; CORBO, F.; MONTAGNA, M. T. In vitro interactions between Anidulafungin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms of *Candida* spp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p.1002-1005, 2016.

SAFDAR, A.; MA, J.; SALIBA, F.; DUPONT, B.; WINGARD, J. R.; HACHEM, R. Y.; MATTIUZZI, G. N.; CHANDRASEKAR, P. H.; KONTOYIANNIS, D. P.; ROLSTON, K. V.; WALSH, T. J.; CHAMPLIN, R. E.; RAAD, I. I. Drug-induced nephrotoxicity caused by amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B: a review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 89, p. 236–244, 2010.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖORL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p. 2–13, 2015.

SANZ-BLASCO S., VALERO R. A., RODRIGUEZ-CRESPO I., VILLALOBOS C., NUNEZ L. Mitochondrial Ca²⁺ Overload Underlies Ab Oligomers Neurotoxicity Providing an Unexpected Mechanism of Neuroprotection by NSAIDs. **PLoS ONE**, v. 3 p. e2718, 2008.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. E GIANNINI, M. J. S. M., *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10–24, 2013.

SCOTT, E. M.; TARIQ, V. N.; MCCRORY, R. M., Demonstration of Synergy with Fluconazole and Either Ibuprofen, Sodium Salicylate, or Propylparaben against *Candida albicans* *in Vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 29, p. 2610–2614, 1995.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v. 14, n. 7, p. 582-90, 2008.

SILES, S. A.; SRINIVASAN, A.; PIERCE, C. G.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; RAMASUBRAMANIANB, A. K. High-Throughput Screening of a Collection of Known Pharmacologically Active Small Compounds for Identification of *Candida albicans* Biofilm Inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 3681-3687, 2013.

SILVA, M. G. C.; RODRIGUES, G. S.; GONÇALVES, I. L.; GRAZZIOTIN, N. A. *Candida* species distribution and fluconazole susceptibility of blood isolates at a regional hospital in Passo Fundo, RS, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, p. 158-161, 2015.

SILVA, N. C.; NERY, J. M.; DIAS, A. L. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. **Mycoses**, v. 57, p. 1-11, 2013.

SILVA, R. A. C.; DA SILVA, C. R.; DE ANDRADE NETO, J. B.; DA SILVA, A. R.; CAMPOS, R. S.; SAMPAIO, L. S.; DO NASCIMENTO, F. B. S.A.; GASPAR, B. S.; FONSECA, S. G. C.; JOSINO, M. A. A.; GRANGEIRO, T. B.; GASPAR, D. M.; DE LUCENA, D. F.; DE MORAES, M.O. ; CAVALCANTI, B. C.; JÚNIOR, H. V. N. In vitro anti-*Candida* activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p.341-348, 2017a.

SILVA, S.; RODRIGUES, C. F.; ARAÚJO, D.; RODRIGUES, M. E.; HENRIQUES, M. *Candida* Species Biofilms Antifungal Resistance. **Journal of Fungi**, v. 3, p.1-17, 2017b.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 288– 305, 2012.

SILVA-DIAS, A.; MIRANDA, I. M.; BRANCO, J., MONTEIRO-SOARES, M.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p.1-8, 2015.

SINGHAI, M.; MALIK, A.; SHAHID, M. ; MALIK, M. A. ; GOYAL, R. Characterization of fungal biofilm-based catheter-related sepsis. **Chronicles of Young Scientists**, v. 3, p. 48–52, 2012.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v.4, p.223-229, 2013.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**, v.2013, p. 1-3, 2013.

SUCHER, A. J.; CHAHINE, E. B.; BALCER, H. E. Echinocandins: the newest class of antifungals. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 43, p. 1647–1657, 2009.

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections Epidemiology, Infection Control, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, p. 1023–1052, 2016.

TADEC, L.; TALARMIN, J. P.; GASTINNE, T.; BRETONNIERE, C.; MIEGEVILLE, M.; LE PAPE, P.; MORIO, F. Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7-year study. **Mycoses**, v. 59, p. 296–303. 2016.

TAFF, H. T.; MITCHELL, K. F.; EDWARD, J. A.; ANDES, D. R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, p.1-19, 2013.

TOBINICK, E.L. The value of drug repositioning in the current pharmaceutical market. **Drug news & perspectives**, v. 22, p.119–125, 2009.

TOTH, R.; TOTH, A. ; VAGVÖLGYI, C.; GACSER, A. *Candida parapsilosis* Secreted Lipase as an Important Virulence Factor. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, p. 1-7, 2017.

TUMBARELLO, M.; FIORI, B.; TRECARICHI, E M.; POSTERARO, P.; LOSITO, A. R.; DE LUCA, A.; SANGUINETTI, M.; FADDA, G ; CAUDA, R.; POSTERARO, B. Risk Factors and Outcomes of Candidemia Caused by Biofilm-Forming Isolates in a Tertiary Care Hospital. **Plos one**, v. 7, p. 1-9, 2012.

UPPULURI, P.; CHATURVEDI, A.K.; SRINIVASAN, A.; BANERJEE, M.; RAMASUBRAMANIAM, A. K.; KÖHLER, J. R.; KADOSH, D.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLOS Pathogens**, v. 6, p 1-13, 2010.

VAZQUEZ, J.A.; MICELI, M.H.; ALANGADEN, G. Invasive fungal infections in transplant recipients. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 1, p. 85-105, 2013.

VERSTREPEN, K. J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular Microbiology**, v.60, p.5–15, 2006.

VOLLENBROICH, R; MAEDER, M.T.; WEILENMANN, D. Congestive heart failure related to antifungal therapy with itraconazole. **International Journal of Cardiology**, v. 172, p.170-171, 2014.

WALRAVEN, C. J.; LEE, S. A. Antifungal Lock Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57, p. 1– 8, 2013.

WASSERMAN, T.H.; TWENTYMAN, P. Use of a colorimetric microtiter (MTT) assay in determining the radiosensitivity of cells from murine solid tumors. **International Journal of Radiation Oncology**, v. 15, p.699-702, 1988.

WHALEY, S. G.; BERKOW, E. L.; RYBAK, J. M.; NISHIMOTO, A. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p 1- 12, 2017.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95- 105, 2014.

ANEXOS

Anexo I. Efeito do ibuprofeno sobre a integridade de membrana em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistente ao fluconazol após 24 horas.

Integridade de membrana			
Tratamento	Média (10⁶ Células/ mL) ± EPM		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
RPMI	1,620 ± 0,080	1,701 ± 0,072	1,758 ± 0,049*
FLC	1,737 ± 0,027	1,805 ± 0,020	1,832 ± 0,037
ANFO B	0,331 ± 0,042*	0,466 ± 0,048*	0,351 ± 0,029*
CIM (13mM)	1,063 ± 0,030*	1,051 ± 0,034*	1,063 ± 0,028*
2x CIM (26mM)	0,667 ± 0,022*	0,568 ± 0,018*	0,503 ± 0,035*
4x CIM (52mM)	0,450 ± 0,018*	0,402 ± 0,330*	0,337 ± 0,038*

Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

Anexo II. Efeito do ibuprofeno sobre a despolarização mitocondrial em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistente ao fluconazol após 24 horas.

Despolarização Mitocondrial			
Tratamento	Média (%) ± EPM (n=3)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
RPMI	2,505 ± 0,103	2,985 ± 0,214	4,528 ± 0,287
FLC	2,840 ± 0,094	3,108 ± 0,181	3,858 ± 0,467
ANFO B	44,355 ± 1,840*	40,363 ± 2,952*	55,823 ± 1,671*
CIM (13mM)	27,495 ± 1,557*	32,485 ± 1,284*	35,820 ± 1,801*
2x CIM (26mM)	45,536 ± 1,928*	43,940 ± 1,162*	49,452 ± 1,747*
4x CIM (52mM)	58,970 ± 0,904*	59,375 ± 2,071*	63 433 ± 1,616*

Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

Anexo III. Efeito do ibuprofeno na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistente ao fluconazol após 24 horas.

Espécies Reativas de Oxigênio			
Tratamento	Média (%) ± EPM (n=3)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
RPMI	1,662 ± 0,068	1,704 ± 0,042	1,853 ± 0,032
FLC	1,760 ± 0,036	1,645 ± 0,047	1,882 ± 0,014
ANFO B	22,623 ± 1,067*	22,789 ± 0,965*	23,153 ± 0,807*
CIM (13mM)	4,454 ± 0,244	4,170 ± 0,264	4,460 ± 0,143
2x CIM (26mM)	17,873 ± 1,163*	19,772 ± 0,768*	21,490 ± 1,178*
4x CIM (52mM)	34,283 ± 1,898*	34,495 ± 1,491*	31,343 ± 1,480*

Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

Anexo IV. Efeito do ibuprofeno na externalização de fosfatidilserina em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistente ao fluconazol após 24 horas.

Células com Fosfatidilserina Externalizada			
Tratamento	Média (%) ± EPM (n=3)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
RPMI	4,291 ± 0,237	3,633 ± 0,135	4,466 ± 0,166
FLC	4,680 ± 0,117	4,418 ± 0,325	4,135 ± 0,261
ANFO B	53,328 ± 1,731*	66,287 ± 2,273*	45,664 ± 2,003*
CIM (13mM)	39,047 ± 1,044*	34,267 ± 1,696*	37,461 ± 1,306*
2x CIM (26mM)	52,840 ± 1,622*	53,113 ± 1,737*	50,512 ± 2,122*
4x CIM (52mM)	62,216 ± 1,835*	68,720 ± 1,908*	61,170 ± 0,760*

Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

Anexo V. Danos ao DNA após tratamento com ibuprofeno em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistente ao fluconazol após 24 horas.

Danos ao DNA			
Tratamento	Média (índice de dano) ± EPM (n=3)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
RPMI	8,222 ± 1,152	9,222 ± 1,152	8,889 ± 1,099
FLC	8,167 ± 1,276	7,167 ± 0,910	7,833 ± 1,352
ANFO B	65,778 ± 3,059*	70,889 ± 2,463	71,000 ± 2,095*
CIM (13mM)	17,333 ± 1,667*	14,667 ± 1,406*	16,000 ± 1,641*
2x CIM (26mM)	24,000 ± 1,461*	27,333 ± 1,280*	30,500 ± 1,118*
4x CIM (52mM)	42,167 ± 1,424*	43,667 ± 1,745*	44,167 ± 1,493*

Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

Anexo VI. Viabilidade celular em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* em biofilme após 24 horas de exposição ao ibuprofeno.

	Viabilidade (%)		
	Média ± E.P.M (n=3)		
Ibuprofeno(mM)	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Controle (-)	100	100	100
CIM/4 (3,25)	72,68 ± 6,35*	69,01 ± 8,40*	65,39 ± 6,18*
CIM/2 (6,5)	53,40 ± 6,88*	59,41 ± 2,78*	55,20 ± 6,62*
CIM (13)	35,30 ± 3,26*	29,74 ± 1,15*	26,27 ± 1,01*
2xCIM (26)	5,70 ± 0,38*	4,43 ± 0,32*	5,07 ± 0,33*
4xCIM (52)	3,86 ± 0,22*	3,91 ± 0,14*	4,97 ± 0,05*
10xCIM (130)	3,19 ± 0,19*	3,00 ± 0,69*	4,96 ± 0,38*
20xCIM (260)	2,45 ± 0,16*	2,22 ± 0,58*	4,82 ± 0,21*

Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos diferentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle por ANOVA seguido por Student Newman Keuls.

Ibuprofen Antifungal Activity on Both Planktonic and Biofilm Forms of Fluconazole-Resistant *Candida* spp. strains and Its Mechanism of Action Evaluated by Flow Cytometry

Letícia S. Sampaio 1,2, Cecília R. da Silva 1,3, Rosana S. Campos 1,3, Francisca B. S. A. do Nascimento, 1,2 João B. A. Neto 1,2, Lisandra J da Silva 1, Brenda S Gaspar , Manoel O. de Moraes 4, Bruno C. Cavalcanti 4, Hemerson I. F. Magalhães 5, Iri S. P. Lima 6 and Hélio V. N. Júnior^{1,2}

1. Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Laboratory of Bioprospection in Antimicrobial Molecules (LABIMAN), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;

2. Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;

3. Christus University Center, Fortaleza, CE, Brazil

4. Department of Physiology and Pharmacology, Neuropharmacology Laboratory, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;

5. School of Pharmacy, Federal University of Paraiba, João Pessoa, PB, Brazil;

6. Department Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Barbalha, CE, Brazil

Corresponding author:

Telephone number: # 55 85 3366 8274

Fax: # 55 85 3366 8257

E-mail: label_ufc@yahoo.com.br

ABSTRACT

Over the past few decades, researches have reported an increased incidence of invasive candidiasis and suggested that the majority of infections produced by this pathogen are associated with biofilm growth, which are more resistant to antimicrobial agents than planktonic cells. In addition to these problems, there are few antifungal agents available and it is necessary the development of novel therapeutic strategies. In that context, this study aimed to assess the antifungal potential of ibuprofen against fluconazole-resistant *Candida* spp. planktonic and biofilm forms proposing a new view to the drug that are used with other therapeutic indications, as well as to assess the mechanism of action of this drug. After 24 h, the fluconazole-resistant *Candida* spp. strains showed minimum inhibitory concentration (MIC) in the ranges of 1,5 – 3 mg/mL for ibuprofen by the broth microdilution method (M27-A3). According to our data by flow cytometry, ibuprofen cause fungal death after damaging the plasma and mitochondrial membrane associated to an increasement of phosphatidylserine externalization which activates apoptotic signaling pathways and leads to dose-dependant cell viability loss. Regarding biofilm-forming isolates, ibuprofen promotes a reduction of viability cell in mature biofilm of all the species tested ($p > 0,05$). Therefore, it was concluded that ibuprofen is capable of inhibit the growth in vitro of *Candida* spp. fluconazole-resistant, both in planktonic as biofilm form, inducing cell death by apoptosis.

Keywords: *Candida* spp., resistance, ibuprofen, biofilm, apoptosis.