



Universidade Federal do Ceará

Departamento de Patologia e Medicina Legal

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica

Francisca Bruna Stefany Aires do Nascimento

Avaliação da atividade antifúngica da hidralazina, seu efeito sinérgico com itraconazol e mecanismo de ação sobre cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol

Fortaleza

2018

FRANCISCA BRUNA STEFANY AIRES DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA HIDRALAZINA, SEU EFEITO SINÉRGICO COM ITRACONAZOL E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE CEPAS DE *Candida* spp. RESISTENTES AO FLUCONAZOL

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior

FORTALEZA

2018

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)

D1a DO NASCIMENTO, FRANCISCA BRUNA STEFANY AIRES.
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA HIDRALAZINA, SEU EFEITO SINÉRGICO COM
AZÓLICOS E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE CEPAS DE *Candida* spp. RESISTENTES AO
FLUCONAZOL / FRANCISCA BRUNA STEFANY AIRES DO NASCIMENTO. – 2018.
71 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. HELIO VITORIANO NOBRE JÚNIOR.

1. *Candida*. 2. hidralazina. 3. fluconazol. 4. itraconazol. 5. sinergismo. I. Título.

CDD 616.9

FRANCISCA BRUNA STEFANY AIRES DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA HIDRALAZINA, SEU EFEITO SINÉRGICO COM ITRACONAZOL E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE CEPAS DE *Candida* spp. RESISTENTES AO FLUCONAZOL

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.

Aprovada em: 19/ 12/ 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti

Faculdade Maurício de Nassau

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rômulo Rocha Regis

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Á Deus,
Aos meus pais, Stenio e Lucia
e meu esposo Aristóteles.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me alcançar todos os dias com seu amor e misericórdia que se renovam a cada manhã. Por me ouvir e amparar sempre. Por segurar a minha mão e passar comigo todos os desertos, quando eu não acreditava que seria capaz.

A Universidade Federal do Ceará.

Ao programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica, a coordenadora, profa. Dr. Sâmia Brilhante, bem como a todos os professores.

A CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior, pela orientação de tantos anos, todos os conselhos e a confiança em mim depositada. Pela calma e sabedoria.

Ao Bruno Coelho Cavalcanti pela parceria conosco, por sempre auxiliar em tudo quanto possível. Pelas colaborações prestadas a essa pesquisa e pela disponibilidade em participar da banca examinadora.

Ao professor Iri Sandro Pampolha Lima, por participar da banca examinadora (qualificação), pela disponibilidade e todas as colaborações que certamente engrandecem tanto o trabalho quanto a mim.

Ao professor Thalles Barbosa Grangeiro, pela disponibilidade em participar da banca examinadora agregando conhecimento ao estudo e sempre estando disposto a colaborar com o LABIMAN.

Ao professor Rômulo Rocha Regis, por trazer uma nova visão a nossa microbiologia, pela disponibilidade em participar da banca examinadora e pela colaboração ao LABIMAN.

A minha sempre coorientadora, Cecília Rocha da Silva, por sua dedicação, estando sempre disponível a ajudar e aconselhar. Por sempre dar o seu melhor, de forma alegre e leve, a quem tenho tanta admiração.

Aos meus colegas de laboratório Livia Sá, João Batista, Anderson Ramos, Rosana Campos, Maria Aparecida, Helaine Almeida, Aryadine Venâncio, Daiana Dias, Lisandra Juvêncio, Amanda Cavalcante e Danial Sampaio pelas colaborações, divisão de trabalho, TSAs, sementeiras, biofilmes, meios de cultura, companherismo, risadas, almoços, lanches, confraternizações e por serem tamanha alegria.

Em especial a Letícia Serpa Sampaio por ter se tornado uma amiga me fazendo crescer como pessoa. Por dividirmos experimentos, alegrias, sonhos, preocupações e tudo aquilo que a convivência diária nos trouxe.

Aos meus pais Stenio e Lucia, que são meu porto seguro, a quem eu devo a vida, amor, cuidado, gratidão e tudo de bom que possa existir.

Aos meus irmãos Phelippe e Stenio Júnior, por todas as vezes que também foram meus pais.

Ao meu esposo Aristóteles Júnior, por dividir comigo a vida, os dias lindos e também os difíceis. Por toda ajuda, incentivo e paciência.

“Leve é a tarefa quando muitos dividem o trabalho.” Homero.

RESUMO

Atualmente as infecções fúngicas continuam sendo responsáveis por elevada morbidade e mortalidade. *Candida* spp. é o quarto patógeno mais isolado em infecções sanguíneas acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos. O aumento no número de casos de resistência fúngica e a capacidade de *Candida* spp., em formar biofilmes complexos de difícil tratamento mostram que o atual arsenal farmacológico antifúngico é limitado. O redirecionamento de fármacos pode ser uma alternativa eficaz. Atualmente o anti-hipertensivo vasodilatador hidralazina tem sido estudado por sua atividade antitumoral, porém não existem estudos acerca de sua atividade antifúngica. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antifúngica da hidralazina sozinha e em combinação com fluconazol ou itraconazol sobre isolados clínicos de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol. Pela técnica da microdiluição em caldo, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada, segundo o protocolo do Clinical and Laboratory Standards Institute. A toxicidade da hidralazina foi avaliada sobre fibroblastos murinho L929. Foram utilizados ensaios de citometria de fluxo para investigar o mecanismo de morte celular e pelo ensaio colorimétrico do MTT avaliou-se a redução de viabilidade celular do biofilme de *Candida albicans*. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad 6.0 através da análise de variância (ANOVA) seguidos pelos testes de Tukey ou pelo Student Newman Keuls ($p < 0,05$). O CIM da HID variou de 16 a 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e houve sinergismo com o itraconazol reduzindo as concentrações de HID e ITRA, mas não com o fluconazol. A HID não foi tóxica nas concentrações testadas. Observou-se redução de viabilidade celular, aumento na despolarização mitocondrial, produção de EROS, externalização da fosfatidilserina e danos ao DNA. A HID apresentou atividade antifúngica sobre biofilme formado de *C. albicans* em concentrações superiores ao CIM. Em conclusão, a HID mostrou potencial antifúngico frente as cepas de *Candida* spp. testadas.

Palavra chave: *Candida*, resistência antifúngica, hidralazina, fluconazol, itraconazol, sinergismo, apoptose, redirecionamento farmacológico.

ABSTRACT

Currently, fungal infections are responsible for high morbidity and mortality. *Candida* spp. is the fourth most pathogen isolated in blood infections which affecting immunocompromised patients. The increase in the number of cases of fungal resistance and the ability of *Candida* spp. to form complex biofilms of difficult treatment show that the current pharmacological antifungal arsenal is limited. The redirection of drugs may be an effective alternative. Currently, the hydralazine vasodilator antihypertensive has been studied for its antitumor activity, but there are not studies about its antifungal activity. This study's aim was to evaluate the antifungal activity of hydralazine alone and in combination with fluconazole or itraconazole on the clinical isolates of fluconazole resistant *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*. By the broth microdilution technique, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined according to the protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute. Hydralazine toxicity was evaluated on L929 murine fibroblasts. Flow cytometry assays were used to investigate the cell death mechanism and by the MTT colorimetric assay evaluated the reduction of cell viability of the *Candida albicans* biofilm. The statistical analysis was performed using the GraphPad 6.0 software through analysis of variance (ANOVA) by Tukey tests or by Student Newman Keuls ($p < 0.05$). The MIC of the HYD ranged from 16 to 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and there was synergized with itraconazole reducing the combinations of HYD and ITRA, but not with fluconazole. The HYD was not toxic at the concentrations tested. Cellular viability reduction, increased mitochondrial depolarization, EROS production, phosphatidylserine externalization, and DNA damage were observed. The HYD presented antifungal activity against the biofilm of *C. albicans* in superior concentrations than the MIC. In conclusion, the HYD showed antifungal potential against strains of *Candida* spp. tested.

Keywords: *Candida*, antifungal resistance, hydralazine, fluconazole, itraconazole, synergism, apoptosis, pharmacological redirection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Etapas de formação do biofilme de <i>Candida albicans</i>	24
Figura 2	Cloridrato de hidralazina.....	28
Figura 3	Mecanismo de ação da hidralazina.....	29
Figura 4	Viabilidade celular de <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> após a exposição á FLC, HID, ITRA e HID associado ao ITRA.....	50
Figura 5	Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)em cepas de <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> após a exposição á FLC, HID, ITRA e HID associado ao ITRA.....	52
Figura 6	Espécies reativas de oxigênio (EROS) produzidas por cepas de <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> após a exposição á FLC, HID, ITRA e HID associado ao ITRA.....	54
Figura 7	Externalização da fosfatidilserina em cepas de <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> após a exposição á FLC, HID, ITRA e HID associado ao ITRA.....	56
Figura 8	Avaliação dos danos ao DNA provocados em células de <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> após a exposição FLC, HID, ITRA e HID associado ao ITRA.....	58
Figura 9	Efeito da hidralazina (A) variando de CIM a 50x CIM e da anfotericina B (B) sobre biofilme formado de <i>Candida albicans</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição de espécies de <i>Candida</i> spp. emisolados de corrente sanguínea coletados em centros médicos na América Latina e Caribe (1997 – 2016).....	19
Tabela 2	Nº do GenBank das cepas clínicas utilizadas no estudo.....	32
Tabela 3	Atividade antifúngica do fluconazol, itraconazol e hidralazina frente as cepas de <i>Candida</i> spp.....	42
Tabela 4	Avaliação do efeito sinérgico da hidralazina com o fluconazol sobre cepas de <i>Candida</i> spp	44
Tabela 5	Avaliação do efeito sinérgico da hidralazina com o itraconazol sobre cepas de <i>Candida</i> spp.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ANFO	Anfotericina B
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDR	<i>Candida Drug Resistanc</i>
CI ₅₀	Concentração inibitório média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DCF	2',7' Diclorofluoresceína
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína não fluorescente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FICI	<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>
FITC	Fluoresceína
FLC	Fluconazol
H ₂ DCFDA	Diacetato de 2',7' - diclodihidrofluoresceína
HEPES	N - (2-Hidroxietyl) piperazina-N' - (ácido 2-etanosulfônico)
HID	Hidralazina
IP ₃	Trifosfato de inositol
ITRA	Itraconazol
MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i>
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)propanesulfonic Acid</i>
MTT	Brometo de difeniltetrazólio -[3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo]
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI	Iodeto de propídio
PPB	Tampão fosfato de potássio
RH123	Rodamina 123
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UTI	Unidade de terapia intensiva
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
Δψ _m	Potencial transmembrana mitocondrial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Infecções Fúngicas.....	17
2.2 Incidência de Candidemias.....	18
2.3 Fatores Associados às Infecções Fúngicas.....	20
2.4 Gênero <i>Candida</i>	21
2.5 Biofilmes de <i>Candida</i> spp.....	23
2.6 Arsenal Farmacológico	25
2.7 Resistência Antifúngica.....	26
2.8 Novas Estratégias Terapêuticas	27
2.9 Hidralazina	28
3. HIPÓTESES	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo geral	31
4.2 Objetivos específicos	31
5. METODOLOGIA	32
5.1 Recuperação das cepas.....	32
5.2 Fármacos.....	33
5.3 Teste de Sensibilidade aos Fármacos.....	33
5.3.1 <i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos antifúngicos</i>	33
5.3.2 <i>Ensaio do sinergismo</i>	34
5.3.3 <i>Análise dos dados</i>	34
5.4 Avaliação da Citotoxicidade.....	34
5.4.1 <i>Cultivo de células L929</i>	35
5.4.2 <i>Atividade antiproliferativa em células L929</i>	35
5.5 Avaliação do mecanismo de morte celular.....	35
5.5.1 <i>Preparo das suspensões de células de <i>Candida</i> spp.</i>	35
5.5.2 <i>Tratamento das células de <i>Candida</i> spp.</i>	36
5.5.3 <i>Determinação da viabilidade celular</i>	36
5.5.4 <i>Determinação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células de <i>Candida</i> spp.</i>	36
5.5.5 <i>Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio em células de <i>Candida</i> spp.</i>	36
5.5.6 <i>Determinação da externalização de fosfatidilserina em células de <i>Candida</i> spp.</i>	

5.5.7	<i>Análise dos dados</i>	37
5.6	Avaliação dos Danos ao DNA	37
5.6.1	<i>Ensaio do cometa</i>	37
5.6.2	<i>Análise dos dados</i>	38
5.7	Ensaio de Biofilme	38
5.7.1	<i>Formação dos biofilmes de isolados de <i>Candida</i> spp. e quantificação da biomassa</i> 39	
5.7.2	<i>Determinação da atividade dos fármacos sobre biofilmes formados de <i>Candida</i> spp.</i> 40	
5.7.3	<i>Análise dos dados</i>	40
6.	RESULTADOS	41
6.1	Atividade antifúngica do fluconazol, itraconazol e hidralazina frente as cepas de <i>Candida</i> spp.	41
6.2	Avaliação do efeito sinérgico da hidralazina.	43
6.3	Atividade Citotóxica da Hidralazina	46
6.4	Determinação da viabilidade celular de <i>Candida</i> spp. após a exposição a diferentes fármacos.	47
6.5	Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células de <i>Candida</i> spp. após a exposição a diferentes fármacos.	49
6.6	Produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células de <i>Candida</i> spp. após a exposição a diferentes fármacos.	51
6.7	Externalização da fosfatidilserina em células de <i>Candida</i> spp. após a exposição a 9diferentes fármacos.	53
6.8	Análise de dano ao DNA	55
6.9	Biofilme	57
6.9.1	<i>Atividade da hidralazina sobre biofilmes formados</i>	57
7.	DISCUSSÃO	59
8.	CONCLUSÃO	63
9.	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, os fungos são reconhecidos como agentes de infecções nasocomiais importantes, sendo a *Candida* spp. responsável pela maioria das infecções fúngicas invasivas (MATTA, SOUZA E COLOMBO, 2017). Essa levedura faz parte da microbiota normal da pele e das mucosas, do trato gastrointestinal e geniturinário na maioria dos indivíduos, porém na presença de alterações como desequilíbrios na microbiota ou na defesa imunológica a *Candida* spp. pode se tornar um agente infeccioso importante (DAVIDSON, NETEA E KULLBERG, 2018).

As infecções podem variar de superficiais não letais a sistêmicas com elevadas taxas de mortalidade, acometendo indivíduos expostos a fatores de risco como, por exemplo, em uso de antibióticos de amplo espectro, contraceptivos, cateteres, cirurgia gastrointestinal ou os portadores de doenças como o diabetes mellitus e AIDS (MAYER, WILSON E HUBE, 2013).

A maioria das infecções microbianas que acometem os humanos envolve a formação de biofilmes. *Candida albicans* é a espécie fúngica mais associada a formação desses biofilmes acometendo *stentes*, próteses, cateteres, marca-passos e implantes estabelecendo infecções disseminadas e mais graves (RAMAGE, MARTINEZ E LÓPEZ-RIBOT, 2006).

O tratamento das infecções fúngicas é limitado pela toxicidade não seletiva dos fármacos, ocasionado pela semelhança entre as células eucarióticas fúngicas e humanas (TSUI, KONG E JABRA-RIZK, 2016). O fluconazol, usado desde a década de 1980, é o fármaco de escolha para o tratamento da maioria das infecções causadas por *Candida* spp. (MATTA, SOUZA E COLOMBO, 2017). Os episódios de candidíase invasiva continuam sendo potencialmente fatais, mostrando que o arsenal terapêutico continua limitado (MARINS, T.A. et al., 2018).

A problemática atual é composta pelo aumento das infecções causadas por *Candida* não-albicans (BRAGA et al., 2018). O surgimento cada vez maior de isolados resistentes as terapias disponíveis e a formação de biofilmes intrinsecamente resistentes a diversos tratamentos, além da dificuldade para o desenvolvimento de novos medicamentos, que demandam altos investimentos e muitos anos (FERREIRA et al., 2009). Diante desse cenário o redirecionamento de fármacos ganha destaque nos estudos de novos antimicrobianos.

O desenvolvimento de fármacos ocorre a partir de diversos mecanismos, a triagem aleatória de moléculas é um deles, que associado ao redirecionamento de fármacos pode atender a urgência no desenvolvimento de novos antifúngicos, reduzindo custos e tempo, além

de apropriar-se de anos de estudos da molécula em questão, havendo maior segurança sobre diversos aspectos.

A hidralazina é um vasodilatador, utilizado no tratamento de hipertensão. Está no mercado desde a década de 1950 e atualmente tem sido estudado acerca do seu potencial antitumoral. Ruiz-Maganã et al.,(2016) demonstrou a capacidade da hidralazina em desencadear a apoptose dependente de caspases em células T leucêmicas mutante p53, ativando a via apoptótica mitocondrial e induzir danos no DNA.

Nesse contexto o presente estudo tem o objetivo de avaliar a atividade antifúngica da hidralazina, tendo caráter inovador já que não existem outros estudos semelhantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções Fúngicas

Os fungos são amplamente encontrados na natureza, estando distribuídos em diferentes tipos de solo, detritos vegetais, substratos orgânicos e colonização de mucosas totalizando 611.000 espécies. Cerca de 600 espécies podem ser agentes patogênicos ao homem (BADIEE E HASHEMIZADEH, 2014).

Nas últimas décadas ocorreram muitos avanços na medicina, como por exemplo, em relação a transplante de órgãos e tratamento HIV/AIDS que têm proporcionado aumento na expectativa de vida de pacientes imunocomprometidos. Entretanto esses avanços são responsáveis também pelo aumento nas infecções fúngicas invasivas nessa população, já que os fungos atualmente têm sido cada vez mais identificados como agentes de infecções nasocomiais acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos ou aqueles expostos a fatores de risco (BADIEE E HASHEMIZADEH, 2014; MATTA, SOUZA E COLOMBO, 2017).

Os mais diversos agentes fúngicos podem causar infecções através da inalação de esporos, inoculação cutânea e subcutânea, penetração em mucosas ou ingestão de toxinas causando infecções que podem variar muito quanto a gravidade. As infecções podem ser de pele e membrana mucosa sistêmicas afetando múltiplos órgãos (BADIEE E HASHEMIZADEH, 2014; BENEDICT et al., 2018). Outro fator agravante nessas infecções é a semelhança de sintomatologia das infecções fúngicas com as demais, o que pode retardar o diagnóstico e consequentemente o tratamento correto (BENEDICT et al., 2018).

Os fungos *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., e *Fusarium* spp. são os principais agentes causadores de infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes, mas são as infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* as principais causas de morbidade e mortalidade, sendo responsáveis por 26.735 hospitalizações tendo impacto econômico de 1,4 bilhões de dólares anualmente (ARENDRUP E PETERSON, 2017; BENEDICT et al., 2018).

2.2 Incidência de Candidemias

A candidemia é uma infecção grave de corrente sanguínea e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade principalmente em pacientes críticos. Existe uma variação epidemiológica em diferentes partes do mundo, porém há concordância sobre a prevalência de *Candida albicans* com importante aumento das infecções causadas por *Candida* não-*albicans* (BRAGA PR et al., 2018; MATTA, SOUZA E COLOMBO, 2017).

A candidíase invasiva acomete mundialmente cerca de 250.000 pessoas por ano sendo responsável por mais de 50.000 mortes. A *Candida albicans* é a espécie responsável por mais de 50% das infecções sistêmicas em todo o mundo (KULLBERG E ARENDRUP, 2015; BADIEE E HASHEMIZADEH, 2014). Nos Estados Unidos e Europa estudos apontam que nas últimas décadas a *Candida* spp. foi o quarto agente patogênico que mais causou infecções de corrente sanguínea, sendo superado apenas pelas infecções bacterianas causadas por *Staphylococcus* coagulase-negativa, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp. (TRAGINNIDIS, TSOULAS E GROLL, 2014).

Matta, Souza e Colombo (2017) realizaram uma revisão que contemplou estudos nas Américas central, Latina e do Sul entre 1997 a 2016. Foram analisados 40 estudos que relataram mais de 12.000 episódios de candidemia, mostrados na Tabela 1 a seguir. Ao longo desses 19 anos, *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente em 32 dos 40 estudos, chegando a 66,4% em um estudo realizado na Colômbia. A espécie de *Candida* não-*albicans* mais prevalente foi *Candida parapsilosis* seguido por *C. tropicalis*, ambos chegaram a superar *C. albicans* em alguns estudos, além de *C. glabrata*, *C. guilliermondii* que também apresentaram importantes taxas de prevalência. Outras espécies foram relatadas com menos frequência como *C. rugosa*, *C. pelliculosa*, *C. lusitaniae*, *C. famata* e *C. lipolytica*.

Tabela 1: Distribuição de espécies de *Candida* spp. emisolados de corrente sanguínea coletados em centros médicos na América Latina e Caribe (1997 – 2016).

País/ Território	Referência	Período	Distribuição de espécies (%)						
			Ca	Cp	Ct	Cgla	Ck	C. gui	OCS
Argentina	Rodero et al. (2005)	1999-2000	45.5	29.9	16.5	2.7	1.18	0.39	6.83
Argentina	Cordoba et al. (2011)	2007-2008	42.1	28.5	16.9	4.7	0.47	1.66	5.67
Argentina	Lopez Moral et al. (2012)	2005-2008	41.3	24.3	19.9	6.3	0.59	1.76	5.85
Argentina	Riera et al. (2014)	2010-2012	41	20	12	10	1.5	3	12.5
Brasil	Colombo et al. (1999)	1995-1996	37	25	24	4	1	2	7
Brasil	Costa et al. (2000)	1994-1996	51.2	17.8	11.9	2.3	1.19	9.5	6.11
Brasil	Colombo et al. (2003)	1996-1998	41.5	20.5	24	4.5	1	2	6.5
Brasil	Goldani and Mario (2003)	1996-1999	32.6	23.7	26.7	8.9	1.9	0	6.2
Brasil	Antunes et al. (2004)	2002-2003	48.3	25.8	13.3	3.3	1.7	1.6	6
Brasil	Aquino et al. (2005)	1998-2004	45	24.4	15.3	6.9	4.6	0.76	3.04
BRasil	Colombo et al. (2006)	2003-2004	40.9	20.5	20.9	4.9	1.1	2.4	9.3
Brasil	Medrano et al. (2006)	2000-2002	28	36	16	4	0	12	4
Brasil	Colombo et al. (2007)	2002-2003	38	23	17	3	1	6	12
Brasil	da Matta et al. (2007)	1995-2003	40	23.8	24.3	4.4	0.6	3	3.9
Brasil	Girão et al. (2008)	1999-2006	40	18	34	1	3	1	3
Brasil	Franca et al. (2008)	2001-2004	59	9	15	7	2	2	6
Brasil	Motta et al. (2010)	2006	52.2	22.1	14.7	6.6	1.6	0.8	2
Brasil	Sampaio Camargo et al. (2010)	1997-2007	44	22	15	9	6	0.66	3.34
Brasil	Bonfietti et al. (2012)	1998-2006	44	37	13	5	1	0	0
Brasil	Hoffmann-Santos et al. (2013)	2006-2011	34.6	38.4	18.4	5.3	0	1.5	1.8
Brasil	Moretti et al. (2013)	2006-2010	44	14.4	21.7	11.2	3.5	1.3	3.9
Brasil	Colombo et al. (2013)	2006-2007	34	26	24	7	3	2	4
Brasil	Santos et al. (2014)	1995-2009	35.7	46.6	9.7	3.5	0.94	1.65	1.91
Brasil	Colombo et al. (2014)	2003-2012	42	19	20	9	1.14	0.86	8
Brasil	da Costa et al. (2014)	2006-2011	28.7	24.1	30.5	8.3	1.8	0	6.6
Brasil	Doi et al. (2014)	2007-2010	34.3	24.1	15.3	10.2	1.5	0.7	13.9
Colombia	Cortes et al. (2011)	2001-2007	50.9	15.5	15.5	2	2.36	3.3	10.44
Colombia	Cortes et al. (2013)	2004-2008	56	16	17.3	2.6	0.8	0	7.3
Colombia	Cortes et al. (2014)	2008-2009	66.4	14.5	10.6	1.5	0	1.5	5.5
Colombia	Ortiz Ruiz et al. (2016)	2008-2012	52	17	17	6	3	4	1
Costa Rica	Villalobos et al. (2016)	2007-2011	38	42	10	7	NR	NR	3
México	Gonzales et al. (2008)	2004-2007	31.9	37.9	14,8	8	2.7	1.3	3.3
México	Corzo- Leon et al. (2014)	2008-2010	46	5	26	13.5	5	3	1.5
Peru	Bustamante et al. (2014)	2009-2011	39.9	28.1	23.5	5.2	0.7	2	0.6
Porto Rico	Conde-Rosa et al. (2010)	2005-2006	28	49	17	4	1	0	1
Venezuela	Franco et al. (2008)	2003-2005	18.8	26	39	7.8	2.6	0	5.8
Múltiplo a	Pfaller et al. (2000)	1997-1998	43	26.1	16.8	6.6	0.9	0	6.6
Múltiplo	Pfaller et al. (2001)	1997-1999	45	25	16	6	1	NR	7
Múltiplo	Godoy et al. (2003)	1999-2000	42	21.3	24.2	7.7	0	2.9	1.9
Múltiplo	Nucci et al. (2013)	2008-2010	37.6	26.5	17.6	6.3	2.7	6.5	2.8

Ca: *C. albicans*. Cp: *C. parapsilosis*. Ct: *C. tropicalis*. Cgla: *C. glabrata*. Ck: *C. krusei*. Cgui: *C. guilliermondii*; OCS: outras espécies de *Candida*. ^aEstudos incluindo diferentes centros em países da América Latina; NR: não reportado.

Fonte: Adaptado de MATTA, SOUZA E COLOMBO, 2017.

O estudo publicado por Braga PR et al., (2018) mostra o perfil epidemiológico de candidemia ao longo de 21 anos (janeiro de 1996 a dezembro de 2016) em um hospital público terciário no Rio de Janeiro, Brasil. Foram relatados 331 casos de candidemia nesse período que acometeram 324 indivíduos. A taxa global de incidência foi de 1,30 episódios para cada 1000 internações. O perfil dos pacientes sofreu mudanças ao longo dos anos, os indivíduos acometidos foram cada vez mais velhos, de 52,5 anos no período de 1996 a 60,5 anos no período de 2016. Também pode ser observado o aumento do número de pacientes com insuficiência renal crônica, doença cardíaca, em diálise, em uso de corticosteroide, amins

vasoativas e em ventilação mecânica. Em relação as espécies não foram observadas mudanças significativas ao longo dos anos, *Candida albicans* foi responsável por 37,5% dos casos, *C. tropicalis* 28,1%, *C. parapsilosis* 18,4%, *C. glabrata* 6,9% e *C.pelliculosa*, *C. krusei*, *C. famata* *C.guilliermodii*, *C.kefry*, *C. zeylanoides*, *C. lipolytica* foram responsáveis por 8,76% dos casos.

A candidíase vulvovaginal é a infecção fúngica mais frequentemente causada por *C. albicans*, seguido de *C. glabrata* e *C. krusei*. Aproximadamente 30 a 50% das mulheres vão ter pelo menos 1 episódio dessa infecção durante a vida (HANI et al.,2015; JACOB L. et al.,2018). Em um estudo que acompanhou 954.182 mulheres de 2014 a 2016, foram diagnosticadas com candidíase vulvovaginal 50.279 mulheres (5,3%) com maior prevalência aquelas com idade entre 18 e 25 anos (7,1%), seguida pelas que possuíam idade entre 31 a 35 anos (6,9%) e posteriormente as que possuíam idade entre 26 e 30 anos (6,8%) (JACOB L. et al.,2018).

2.3 Fatores Associados às Infecções Fúngicas

As infecções fúngicas podem acometer pacientes imunocompetentes, mas são os indivíduos imunodeprimidos os principais acometidos. Essas infecções estão correlacionadas a indivíduos com neutropenia por mais de 10 dias, portadores de HIV/ Aids, os que fazem corticoterapia prolongada ou uso de imunossupressores ou adenosnutrição. Existem também fatores de risco que fazem com que os indivíduos se tornem susceptíveis a essas infecções. Dentre os principais fatores de risco associados as infecções fúngicas estão: os transplante de medula óssea, as cirurgias de grande porte, principalmente as abdominais, a antibióticoterapia de amplo espectro e/ou prolongada , uso de dispositivos como cateteres vasculares centrais, e a permanência prolongada em unidade de terapia intensiva (UTI) (BADIEE E HASHEMIZADEH, 2014; KULLBERG E ARENDRUP, 2015).

Outro fator associado as infecções causadas por *Candida* é o diabetes mellitus. Essa doença é responsável por alterar a homeostase da pele bem como opH, além de estabelecer altas concentrações de glicose na epiderme o que torna a pele e a região vulvovaginal o ambiente ideal para o crescimento de infecção de microorganismos saprofíticos, como por exemplo a *Candida* spp.(RIPPKE, F., BERARDESCA, E. E WEBER, T.M., 2018; BEHM, B. et al, 2012).As infecções superficiais causadas por essa levedura podem acometer a pele, unhas ou membrana mucosas, como orofaringe, esôfago e trato genital onde na maioria dos casos não

são graves, porém na presença de fatores como o diabetes, esses casos podem se tornar recidivos e crônicos (DAVIDSON, NETEA E KULLBERG, 2018).

O uso de fraldas por crianças e idosos também é um fator favorável as infecções fúngicas. O microambiente é estabelecido pela presença de fezes com pH variando de 6,5 a 7,5, urina com pH variando 4,6 a 8,0e produtos como lipases, proteases e uréases que contribuirão para a elevação do pH local para 7. A fragilidade da pele ocasionada pela descamação e fricção, a umidade excessiva e microambiente modificado favorecem a proliferação fúngica e o estabelecimento de dermatite de contato ou irritativa (POGACAR, 2018).

Na pele o pH normal é ácido, próximo de 5, e o que o mantém são moléculas ácidas produzidas pelas células da epiderme e glândulas bem como metabólitos provenientes da microbiota residente. Diversos fatores podem causar desequilíbrio no pH normal da pele favorecendo a instalação de infecções causadas por *Candidaspp.* (RIPPKE, F., BERARDESCA, E. E WEBER, T.M., 2018; RUNEMAN B, FAERGEMANN J, LARKÖ O, 2000).

Dentre as mulheres acometidas pela candidíase vulvovaginal, os fatores associados a esse tipo de infecção são o uso de contraceptivos orais, gravidez, doenças psiquiátricas (como depressão e ansiedade), antibióticos sistêmicos, câncer, contraceptivos vaginais, antibióticos para o tratamento de infecções ginecológicas e diabetes mellitus (JACOB L. et al.,2018).

2.4 Gênero Candida

O reino *Fungi* é composto por organismos eucariontes unicelulares e multicelulares no qual se encontram as leveduras do gênero *Candida*, pertencentes ao filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes e ordem Saccharomycetales (FERNANDES et al.,2016).

O gênero *Candida* possui mais de 150 espécies diferentes (HANI et al.,2015).A maioria das espécies é encontrada em plantas e solos somente cerca de 10% dessas leveduras fazem parte da microbiota humana normal colonizando a superfície da pele e as mucosas orofaríngea, genital e gastrointestinal em 30 a 70% dos indivíduos saudáveis sem causar nenhum tipo de dano quando em equilíbrio com o hospedeiro (POLKE, HUBE E JACOBSEN, 2015; SIDRIM E ROCHA, 2004)Apenas algumas espécies causam infecções em humanos sendo a *C. albicans* a mais patogênica (HANI et al.,2015).

Dentre as principais espécies isoladas em humanos estão *C. albicans*, *C.tropicalis*, *C. parasilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C.*

pelliculosa, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, *C. utilis* e *C. norvogensis* (FERNANDES et al., 2016).

Algumas espécies de *Candida* são pleomórficas, podendo apresentar-se na forma de levedura como blastoconídio ou na forma de filamento como hifa verdadeira ou pseudo-hifa. A capacidade de alternar ou se manter em diferentes formas ao mesmo tempo está ligado a transição entre comensal e patógeno (TSUI, KONG E JABRA-RIZK, 2016). A forma de hifa é mais invasiva enquanto a forma de levedura é responsável pela disseminação (MAYER, WILSON E HUBE, 2013).

Um fator que deve influenciar no pleomorfismo é o pH do meio em que a cepa se encontra. A forma de levedura é favorecida pelo pH ácido enquanto a forma filamentosa é favorecida por pH neutro ou básico (RIPPKE, F., BERARDESCA, E. E WEBER, T.M., 2018). O pH mais elevado pode favorecer infecções mais ativas com lesões mais evidentes já que a forma mais potencialmente infectante é a filamentosa, favorecida por esse pH (RUNEMAN B, FAERGEMANN J, LARKÖ O, 2000). A formação de hifas também é favorecida pela presença de CO₂, temperatura fisiológica, N-acetilglicosamina e soro além do aporte nutricional (MAYER, WILSON E HUBE, 2013).

As hifas atuam como um fator de virulência pela capacidade de mascarar o β -glucano da parede celular conseguindo driblar o sistema imunológico e penetrar em células epiteliais na invasão tecidual (LOHSE et al., 2017)

Além da capacidade de alternar entre as formas de levedura e hifa as cepas de *Candida* spp. apresentam outros fatores de virulência que favorecem as infecções. A expressão de adesinas contribui na adesão a diferentes substratos e formação de biofilmes. A expressão de invasinas e o tigmotropismo a superfície celular promovem a penetração nas mucosas, também ocorre a secreção de lipases, fosfolipases e proteases. Essas enzimas hidrolíticas iniciam a degradação das barreiras mucosas e da pele favorecendo o a adesão da levedura aos tecidos (MAYER, WILSON E HUBE, 2013; BARBOSA, 2011).

A virulência pode variar entre espécies ou até mesmo entre cepas da mesma espécie. *C. parapsilosis* parece ser menos virulenta estando relacionada a baixa mortalidade quando é agente de candidemia, já *C. krusei* que também é pouco virulenta está relacionada a infecções em indivíduos imunodeprimidos após a exposição á azólicos. *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* são espécies mais virulentas (KULLBERG E ARENDRUP, 2015).

2.5 Biofilmes de *Candida* spp.

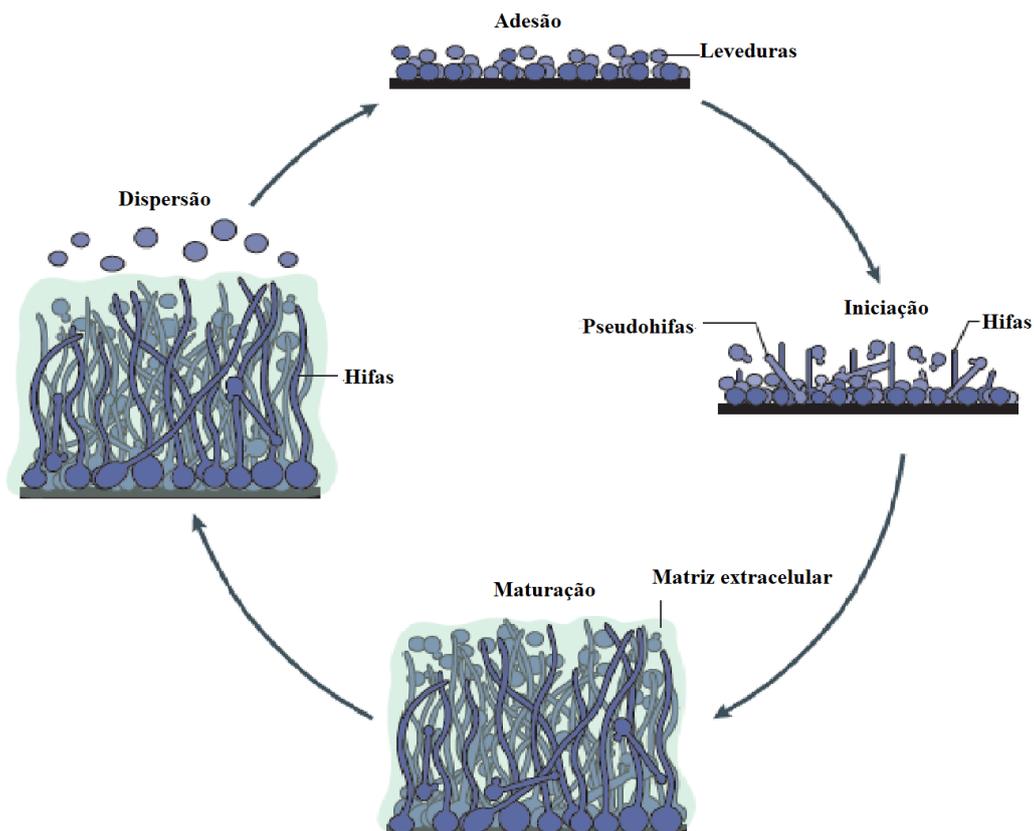
O biofilme é uma comunidade coordenada de microorganismos irreversivelmente aderidos a uma superfície produzindo matriz extracelular (CAVALHEIRO E TEIXEIRA, 2018). De uma forma geral a adesão pode ocorrer em superfícies sólidas ou interface de líquido-ar, bióticas ou abióticas, contemplando dentes, tecidos ou dispositivos como, por exemplo, cateteres intravasculares, urinários, válvulas cardíacas, marca-passos e próteses articulares tornando-se agentes de infecções. Os biofilmes de *Candida* spp. acometem principalmente a mucosa vaginal e oral, cateteres e dentaduras (LOHSE et al., 2017; CAVALHEIRO E TEIXEIRA, 2018)

As células que estão no biofilme podem apresentar características fisiológicas e morfológicas diferentes de quando se encontram na forma planctônica ou dispersa, como, por exemplo, a metabolização lenta ou ausente de antimicrobianos, promovendo a essas células resistência aos tratamentos e a perturbações externas. Também pode ocorrer a expressão de fatores de virulência, como a expressão de hifas e pseudohifas além da interação com a microbiota bacteriana local, havendo a formação de biofilmes polimicrobianos, compostos por gêneros e/ou espécies diferentes garantindo vantagens específicas para cada espécie (CAVALHEIRO E TEIXEIRA, 2018; LOHSE et al., 2017).

O processo de formação do biofilme de *Candida* spp., demonstrado na Figura 1, tem como início a adesão dos blastoconídios em uma superfície onde as células vão se multiplicar ocorrendo a formação de uma microcolônia. Posteriormente as células começam a se organizar, aumentando a densidade celular formando hifas e pseudo-hifas para garantir a ancoragem. Tem início então a produção de substância polimérica extracelular. Na etapa de maturação o biofilme apresenta uma estrutura tridimensional contendo uma densa camada de células em diferentes estágios envolvidos por matriz extracelular bem pronunciada, como uma rede. Posteriormente inicia-se o processo de dispersão, onde células, principalmente blastoconídios são liberados do biofilme propagando a colonização/ infecção em outros locais. (CAVALHEIRO E TEIXEIRA, 2018; LOHSE et al., 2017; TSUI, KONG E JABRA-RIZK, 2016)

O tempo que cada etapa no processo de formação do biofilme demanda deve variar de acordo com o gênero ou espécie. Como exemplo, o biofilme formado por *C. albicans* leva em média 11 h para formação de microcolônias, de 12 a 30 h para estabelecer a produção de substância polimérica extracelular e formação da densa rede de células. A maturação pode levar de 38 a 72 horas, sendo seguida pela dispersão (CAVALHEIRO E TEIXEIRA, 2018).

Os biofilmes de *Candida albicans* têm a função de armazenar células resistentes aos diversos antifúngicos, que podem se multiplicar e disseminar infecções através da corrente sanguínea, já a matriz que é composta por proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos tem como função fornecer proteção física, garantindo a integridade estrutural do biofilme, controlando a adesividade e dispersão de células além de atuar como fonte de nutrientes (PIERCE et al., 2017; LOHSE et al., 2017).



FONTE: adaptado de Lohse *et al* (2017).

Figura 1: Etapas de formação do biofilme de *Candida albicans*. O início se dá pela adesão das células da levedura a uma determinada superfície, ocorre o aumento da densidade celular com diferenciação em hifas, posteriormente tem-se a etapa de maturação com uma estrutura tridimensional e por último a etapa de dispersão.

Cada biofilme exibe características únicas a depender das células que o compõe. Estudos apontam que para a formação do biofilme de *C. albicans in vitro* existe um conjunto central de nove genes reguladores necessários, são eles Bcr1, Brg1, Efg1, Flo8, Gal4, Ndt80, Rob1, Rfx2 e Tec1. A deleção de Bcr1, por exemplo, está associada à falta de hifas na estrutura do biofilme maduro, deleção de Ndt80 está associada à produção de um biofilme com

espessura reduzida enquanto a deleção de Rfx2 está associada a produção de um biofilme anormalmente espesso e a deleção de Rfg1 está associada a baixa aderência ao substrato sólido (LOHSE et al.,2017).

2.6 Arsenal Farmacológico

Atualmente o arsenal farmacológico disponível para o tratamento de infecções fúngicas causadas por *Candida* spp.é composto principalmente pelos derivados azólicos, derivados polinênicos e equinocandinas (SANTOS et al.,2018).

Os poliênicos são fungicidas utilizados clinicamente desde a década de 1950, se ligam ao ergosterol na membrana da célula fúngica produzindo poros que levam a perda de moléculas e eletrólitos como o potássio e magnésio, promovendo um desequilíbrio osmótico na célula. A anfotericina B e a nistatina são os representantes macrolídios poliênicos. A toxicidade da anfotericina B levou a indústria farmacêutica a desenvolver novas formulações lipídicas menos nefrotóxicas, como a anfotericina B lipossomal, porém o alto custo é o fator limitante (TAVARES, W., 2014; RANG et al., 2012).

Os derivados azólicos bloqueiam a enzima 14 α -demetilase impedindo assim a conversão de lanosterol em ergosterol, bloqueando assim na síntese do ergosterol, o que resulta no aumento da permeabilidade da membrana, além de inibir o crescimento da célula fúngica.Fazem parte dessa classe os imidazóis, cetoconazol e miconazol, que estão no mercado desde a década de 1960 e os triazóis de 1ª geração fluconazol, itraconazol desde a década de 1980 e a 2ª geração representada pelo voriconazol. Atualmente o fluconazol é a droga de escolha para o tratamento da maioria dos casos de candidíase e candidemia, porém o surgimento de casos de resistência tem sido fator limitante do seu uso (TAVARES, W., 2014;RANG et al., 2012).

Na década de 1990 surgiu a classe das equinocandinas. Fármacos fungicidas que inibem a glucana sintetase, impedindo a formação de glucana por meio do bloqueio da enzima β - 1,3- glucano sintetase levando a produção de uma parede celular defeituosa, o que irá permitir a entrada de água levando a lise osmótica. Os fármacos que compõe essa classe são a caspofungina, micafungina e anidulafungina (TAVARES, W., 2014; RANG et al., 2012).

A escolha do antifúngico a ser usado no tratamento das infecções causadas por *Candida* spp.deve levar em consideração a epidemiologia e o perfil de sensibilidade das cepas locais (MATTA, SOUZA E COLOMBO, 2017).

Braga PR (2018) relatou mudanças no tratamento dos pacientes com candidemia no período de 1996 a 2016, onde se pode observar a redução do uso de anfotericina B desoxilato de 47,4% no período de 1996 para 11,9% no período de 2016, redução no uso de azólicos de 48,7% no período de 1996 para 39,0% no período de 2016 e aumento no uso de equinocandinas de 0% a 49,1% no período de 2016.

Em outro estudo, publicado por Marins T.A. (2018) realizado em um hospital particular de atendimento terciário em São Paulo, Brasil, foram coletados dados de 2008 a 2016 no qual se pode observar a mudança no perfil do uso dos antifúngicos. Após o diagnóstico de candidemia o agente mais usado para o tratamento foi o fluconazol (42,6%) seguido por micafungina (35,7%) e caspofungina (24,3%). Esse estudo mostrou que ao longo desses anos, houve um aumento no consumo de anfotericina B lipossomal, micafungina e voriconazol. Em contrapartida, houve uma redução no uso de caspofungina e fluconazol. Esse fato pode ser explicado pelo uso profilático de anfotericina B e voriconazol. O baixo custo de micafungina foi o responsável pela substituição no uso de caspofungina, que tem um custo mais elevado.

A redução no uso de fluconazol se deu pelo aumento no número de infecções causadas por espécies de *C. não-albicans*, já que o tratamento dessas infecções é preferencialmente realizado com anfotericina B. Mas, ainda sim, o fluconazol continua sendo o agente antifúngico mais utilizado.

2.7 Resistência Antifúngica

A resistência aos antifúngicos pode ocorrer após a exposição a um dado fármaco, de forma induzida ou de forma natural, quando é intrínseco à espécie como, por exemplo, *C. krusei* que é intrinsecamente resistente ao fluconazol (SANTOS et al., 2018).

O aumento das infecções fúngicas tem levado a um aumento no uso de agentes antifúngicos importantes, como os triazólicos e equinocandinas, tanto na terapia profilática como na terapia empírica, o que tem sido responsável pelo surgimento de cepas clínicas resistentes (MATTA, SOUZA E COLOMBO, 2017).

O mecanismo de resistência ao fluconazol se dá pela expressão de bombas de efluxo, que tem a função de impedir o acúmulo do fármaco no interior da célula. Esse mecanismo tende a ocorrer após a exposição da cepa ao fluconazol, sendo mediado pela expressão do gene CDR (Cdr1 e Cdr2) e MDR1. Também pode ocorrer a substituição de ergosterol por outro esterol, faltando sítio de ligação para o azólico, mediado pela mutação no gene ERG3 (SANTOS et al., 2018)

Além da resistência de células planctônicas de *Candida* spp. emerge a problemática do biofilme. O tratamento de infecções causadas por biofilmes pode ser difícil pela presença de células *persisters*, que se encontram em dormência metabólica, a dificuldade do antifúngico penetrar na matriz extracelular e alcançar as células, além da superexpressão de bombas de efluxo a matriz também impede que as células sejam fagocitadas (LOHSE et al.,2017).

O fluconazol não é eficaz no tratamento de biofilme de *C. albicans*, isso ocorre porque as células conseguiram regular os genes responsáveis pela síntese do ergosterol superexpressando ERG1, ERG3, ERG11 e ERG25. Assim, é possível reverter a produção de ergosterol inibida pelo fluconazol (TSUI, KONG E JABRA-RIZK, 2016).

2.8 Novas Estratégias Terapêuticas

Nas últimas décadas ocorreram muitos avanços no desenvolvimento de antifúngicos, entretanto episódios de candidíase invasiva continuam sendo potencialmente fatais, mostrando que o arsenal terapêutico continua limitado (MARINS T.A. et al., 2018).

O fato das células humanas serem eucarióticas assim como as células fúngicas limita os alvos disponíveis de ação para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos. Por isso a necessidade pela busca de substâncias mais eficazes e novos mecanismos de ação para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. (SANTOS et al.,2018).

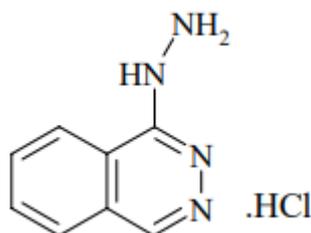
O desenvolvimento de novos fármacos enfrenta muitas barreiras. A cada 100.000 novas moléculas descobertas apenas uma vai chegar ao mercado como um novo medicamento. E o custo para desenvolver um novo medicamento chega a um milhão e meio de dólares (FERREIRA et al.,2009).

A dificuldade de desenvolver novos medicamentos, a necessidade de reduzir custos e a urgência de novos antimicrobianos faz com que novos estudos sobre os medicamentos já existentes no mercado ganhem uma nova percepção. A associação de fármacos já utilizados como antimicrobianos, com outros antimicrobianos ou com novas moléculas pode ser a chave para o desenvolvimento de um novo fármaco. Uma alternativa eficaz é o redirecionamento ou reposicionamento de fármacos já existentes no mercado com outros fins terapêuticos.

2.9 Hidralazina

A hidralazina pertence a classe dos vasodilatadores e possui indicação terapêutica, aprovado no Brasil pela ANVISA para o tratamento de hipertensão e vem sendo utilizada para tal desde a década de 1950 (ZUCKERMAN et al., 2018). Atualmente é comercializada como cloridrato de hidralazina nas apresentações de comprimido 25 mg ou 50 mg (Apresolina®) e solução injetável 20 mg/mL (Nepresol®). É um fármaco classificado como seguro pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (MALACHIAS et al., 2016) sendo amplamente utilizado em pacientes com hipertensão gestacional e em pacientes com insuficiência cardíaca, apesar de não ser a terapia de primeira linha para tratamento da hipertensão (ZUCKERMAN et al., 2018).

A hidralazina possui nome químico monoclórato de 1-hidralazina ftalazina, é um derivado de ftalazina obtido a partir do tratamento da ftalazona com oxiclóreto de fósforo levando a conversão em 1-cloroftalazina, é condensada com hidrato de hidralazina para formar uma hidralazina e posteriormente é neutralizada com HCl para obtenção do cloridrato de hidralazina, mostrada na Figura 2 (GENNARO, 2003).

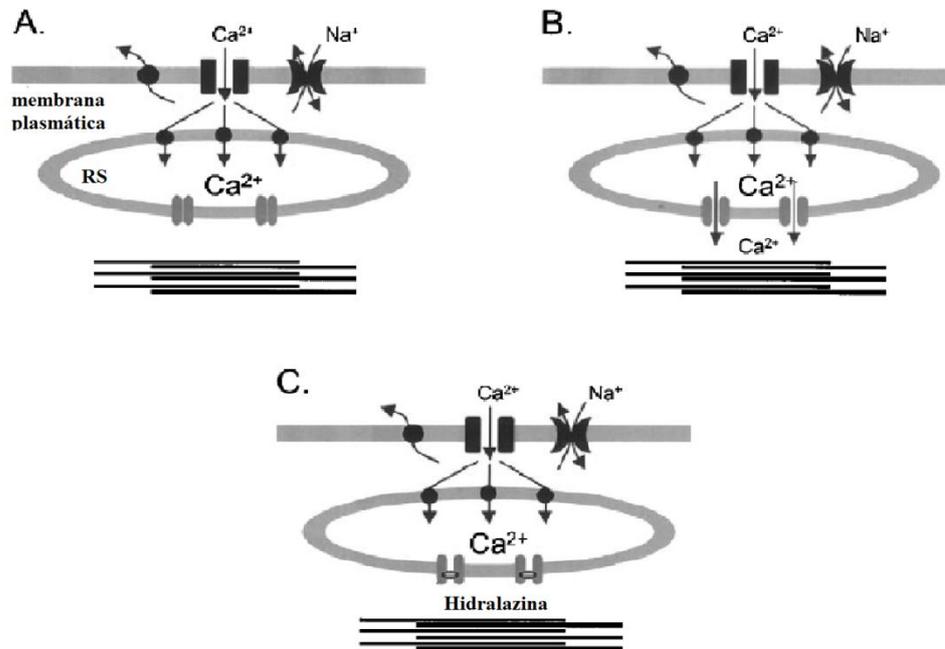


Fonte: Anvisa, 2010.

Figura 2: Cloridrato de Hidralazina

O mecanismo de ação que ocorre no seu uso clássico antihipertensivo, representado na Figura 3, se dá pela atuação direta da hidralazina sobre a musculatura lisa vascular com efeito sobre arteríolas, mas não sobre as veias. Em condições normais de repouso o cálcio se acumula na membrana superficial do retículo sarcoplasmático, na presença do trifosfato de inositol (IP_3) o canal de cálcio é aberto permitindo a passagem do cálcio para as proteínas contráteis ocorrendo a contração muscular (ELLERSHAW E GURNEY, 2001). O efeito anti-hipertensivo ocorre pela redução dos níveis citoplasmáticos de IP_3 , responsável pela liberação do cálcio no retículo sarcoplasmático, impedindo a vasoconstrição no músculo liso (LARINI L.,

2008). O efeito final é a redução na resistência periférica, diminuição da pressão arterial e aumento do débito cardíaco e no volume sistólico, porém também ocorre o aumento reflexo da frequência cardíaca, por isso esse fármaco é bem tolerado quando associado a betabloqueadores (HERMAN, L.L; BHIMJI, S. S, 2017; YAGIELA et al.,2011).



Fonte:

Adaptado de Ellershaw and Gurney (2001).

Figura 3: Mecanismo de ação da hidralazina. (A) O cálcio entra na célula e se acumula no retículo sarcoplasmático, (B) na presença de IP_3 o cálcio é liberado permitindo a contração muscular. (C) na presença da hidralazina ocorre a redução de IP_3 impedindo a liberação do cálcio.

3. HIPÓTESES

- 3.1 A hidralazina apresenta atividade antifúngica, *in vitro*, frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol
- 3.2 A hidralazina apresenta efeito sinérgico com o fluconazol e ou itraconazol, *in vitro*, na atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.
- 3.3 A hidralazina atua através da formação de espécies reativas de oxigênio nos isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.
- 3.4 A hidralazina apresenta efeito antifúngico frente ao biofilme de *Candida albicans*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica da hidralazina isolada e associada ao fluconazol e itraconazol sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* e biofilme de *C. alicans*.

4.2 Objetivos específicos

- 4.2.1 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fluconazol e itraconazol frente a cepas de *Candida* spp.
- 4.2.2 Determinar a CIM da hidralazina frente a cepas de *Candida* spp.resistentes ao fluconazol.
- 4.2.3 Determinar o efeito sinérgico através do calculo do Índice de combinação inibitória fracionária (FICI) da associação de hidralazina mais fluconazol e hidralazina mais itraconazol.
- 4.2.4 Avaliar a toxicidade da hidralazina sobre células fibroblastos L929 de murinos.
- 4.2.5 Investigar o possível mecanismo de ação da hidralazina através da citometria de fluxo.
- 4.2.6 Avaliar a redução da viabilidade celular promovida pela hidralazina nos biofilmes de *Candida albicans*.

5. METODOLOGIA

5.1 Recuperação das cepas

Para o desenvolvimento do presente estudo foram utilizadas cepas de *Candida* spp. pertencentes a micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os isolados clínicos utilizados foram 13, sendo 5 de *C. albicans*, 3 de *C. parapsilosis*, 4 de *C. tropicalis* e 1 de *C. glabrata*. Também foram utilizadas cepas de cultura de coleção (American Type Culture Collection- ATCC), 1 cepa de *C. krusei* ATCC 6258 e 1 cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019. Os isolados possuem identificação molecular realizada através amplificação de DNA pela reação de cadeia da polimerase (PCR) usando primers ITS4 e ITS5 com número depositado no GenBank, apresentado na TABELA 2 a seguir.

Tabela 2: Nº do GenBank das cepas clínicas utilizadas no estudo.

Cepa	Nº Genbank
<i>C. albicans</i> 1	KJ740175
<i>C. albicans</i> 2	KJ740179
<i>C. albicans</i> 3	KJ740174
<i>C. albicans</i> 4	AB861479
<i>C. parapsilosis</i> 1	KJ740188
<i>C. parapsilosis</i> 2	KJ740186
<i>C. parapsilosis</i> 3	AB861487
<i>C. tropicalis</i> 1	AB861490
<i>C. tropicalis</i> 2	KJ740181
<i>C. tropicalis</i> 3	AB861491
<i>C. tropicalis</i> 4	KJ740185
<i>C. glabrata</i>	AB861484

As cepas estavam conservadas em criopreservação, em uma solução contendo caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia), alto teor de glicose (Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil) e glicerol (dinâmica, São Paulo, Brasil) estocadas a - 20°C. Para reativar as leveduras, elas foram descongeladas e uma pequena alíquota de cada foi suspensa em 1 mL de caldo Sabouraud (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 ou 48 horas a 35°C. Posteriormente, as cepas foram repicadas em ágar Sabouraud e incubadas por até 48 horas a 35°C. Para averiguar a pureza de cada amostra elas foram semeadas 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; ANDRADE NETO et al., 2014).

5.2 Fármacos

Os fármacos utilizados no presente estudo foram: fluconazol (FLC), itraconazol (ITRA), anfotericina b (ANFO B) e a hidralazina (HID) obtidos da Sigma Aldrich, (St. Louis, MO, USA). As soluções de ITRA e FLC foram preparadas segundo o CLSI (2008). Para o ITRA e a ANFO B foram preparadas soluções 100 vezes maior que a solução final do teste e diluídas em DMSO (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e o FLC e a HID foram diluídos em água destilada estéril. Os fármacos foram testados nas faixas de 64 a 0,125 µg/mL para o FLC; 16 a 0,0313 µg/mL para o ITRA, 4 µg/mL para a ANFO B e 0,5 µg/mL para a HID.

5.3 Teste de Sensibilidade aos Fármacos

5.3.1 *Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos antifúngicos*

Os testes de sensibilidade para determinação da CIM foram realizados utilizando a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M27-A3 do CLSI (2008). Para tal foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) (pH 7,0 ± 0,1) tamponado com 0,165 M ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA). Para a realização dos testes foram utilizadas placas do tipo elisa contendo 96 poços fundo U. A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade do meio RPMI 1640 e a coluna 12 como controle positivo do teste (inóculo + meio). Na coluna dois foram adicionados 200 µL do fármaco e em seguida realizou-se a diluição seriada para obter as concentrações decrescentes desejadas dos fármacos. Para o preparo do inóculo as cepas foram semeadas em ágar Sabouraud e incubadas por 24 horas. A partir desse cultivo foi preparada uma suspensão em solução salina 0,9% de acordo com a escala 0,5 McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). 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. Um volume de 100 µL desta suspensão padronizada foi adicionado em cada poço contendo o fármaco. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 35 °C (± 2 °C) e após esse período a leitura visual foi realizada.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 50% do crescimento da levedura, em comparação com o crescimento obtido no poço controle contendo somente o meio de cultura e o inóculo padronizado (coluna 12) para os derivados azólicos e para a hidralazina (CLSI, 2008).

Para avaliar a ocorrência de resistência aos azólicos foram levados em consideração os seguintes pontos de corte: CIM ≥ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para itraconazol e CIM ≥ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para fluconazol (CLSI, 2012). Todo o experimento foi realizado em triplicata e foram utilizadas as cepas padrão como controle, de acordo com o CLSI: *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

5.3.2 Ensaio do sinergismo

Após a determinação do CIM de cada fármaco isolado, foi realizada a avaliação do sinergismo utilizando a microdiluição em caldo, a técnica do *checkerboard* (ODDS, 2003). Nesta técnica, foi utilizada microplaca de 96 poços, onde cada poço contém uma combinação única de diferentes concentrações dos fármacos testadas, no qual se determina o percentual de inibição do crescimento das células na presença de diferentes combinações dos fármacos em relação ao poço controle. Assim, foi avaliado o sinergismo entre a hidralazina e o fluconazol e entre a hidralazina e o itraconazol, a partir das concentrações referentes aos valores dos MICs de cada cepa. O ensaio foi realizado frente a todas as cepas do estudo.

A interação entre os fármacos foi realizada a partir da determinação do FICI (*fractionary inhibitory concentration*) o qual é obtido pela soma do FIC de cada fármaco, que se trata da relação entre o CIM de cada fármaco utilizada em combinação e o CIM do mesmo fármaco utilizada sozinha (Quadro 1). Desta forma, foram considerados os seguintes parâmetros: FICI $\leq 0,5$: sinergismo, FICI $> 4,0$: antagonismo e $0,5 < \text{FICI} < 4,0$: indiferente (ODDS, 2003).

$$\text{FICI} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B \text{ Onde: } \text{FIC}_A = \text{CIM}_{\text{fármaco A em combinação}} / \text{CIM}_{\text{fármaco A isoladamente}}$$

$$\text{FIC}_B = \text{CIM}_{\text{fármaco B em combinação}} / \text{CIM}_{\text{fármaco B isoladamente}}$$

Quadro 1-Determinação do Índice de Combinação Inibitória Fracionária

5.3.3 Análise dos dados

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

5.4 Avaliação da Citotoxicidade

5.4.1 Cultivo de células L929

Foram cultivadas células L929 de fibroblasto murino adquiridas de um banco de células do Rio de Janeiro sob condições padrões (a 37 °C com 5% de CO₂) em MEM (meio essencial mínimo) contendo sais de Earle. O meio de cultura foi suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, 100 ug/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina. Para a avaliação dos efeitos citotóxicos, as células foram cultivadas durante 2 dias sob condições padrões e depois o meio foi substituído com meio fresco contendo hidralazina ou DMSO, como controle. A concentração final de DMSO no meio de cultura foi mantida constante, isto é, menos do que 0,1 % (v/v) (CAVALCANTI et al., 2009, NETO et al., 2014).

5.4.2 Atividade antiproliferativa em células L929

A avaliação do potencial antiproliferativo da HID sobre as células L929 foi realizada através do método colorimétrico MTT. As células L929 foram distribuídas em microplaca de 96 poços (0.3 x 10⁶ células/poço) e a HID foi adicionada (200 µg/mL) dissolvida em água, seguido de incubação por 72h, dentro das condições padrão de cultivo. Depois disso, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 µL da solução 10% de MTT e foi reincubada por 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período as placas foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado ressuspensionado em DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células metabolicamente viáveis, as absorbâncias foram lidas com auxílio do espectrofotômetro de placa (Packard Spectra Count, Canada), no comprimento de onda de 550nm (ANDRADE NETO et al., 2014, CAVALCANTI, et al., 2009).

5.5 Avaliação do mecanismo de morte celular

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

Para os ensaios de citometria de fluxo foram utilizados um isolado de cada espécie, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Tabela 2). 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 min) e lavadas três vezes com solução salina

0,85%. Por fim, as células ($\sim 10^6$ células/mL) foram ressuspensas em meio RPMI (Adaptado de DA SILVA et al., 2013; ANDRADE NETO et al., 2014).

5.5.2 Tratamento das células de *Candida* spp.

Para a determinação da densidade celular, avaliação do potencial transmembrana mitocondrial, detecção de espécies reativas de oxigênio e marcação por anexina V, as cepas de *Candida* spp. foram expostas ao FLC (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ANFO B (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como controle positivo/morte, HID (1/2 CIM, CIM e 2x CIM), ITRA (CIM), HID + ITRA(CIM) e em meio RPMI que foi utilizado como controle negativo. As células tratadas foram incubadas a 37 °C durante o período de 24 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (DA SILVA et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2014).

5.5.3 Determinação da viabilidade celular

As células de *Candida* spp. após exposição à HID, ITRA e HID + ITRA, além de ANFO B e FLC durante 24 h, foram marcadas com iodeto de propídeo (PI) foram 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).

5.5.4 Determinação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) em células de *Candida* spp.

As células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* após exposição à FLC, ANFO B, HID, ITRA e HID + ITRA durante 24 h foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), incubadas com rodamina 123 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (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 (Guava EasyCyte™ Mini System). Para cada experimento, 10000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA et al., 2014; NETO et al., 2014).

5.5.5 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio em células de *Candida* spp.

Para a detecção de EROs produzidas durante um período de cultura de 24 h, as células foram incubadas com H₂DCFDA (20 µM) (Diacetato 2',7'- diclorodihidrofluoresceína) (Sigma, USA), durante 30 min no escuro a 35 °C. Subsequentemente, as células foram colhidas, lavadas, ressuspensas em PBS, e analisadas imediatamente por citometria de fluxo (DA SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

5.5.6 Determinação da externalização de fosfatidilserina em células de *Candida* spp.

As células de *Candida* spp. após exposição à HID, ITRA e HID + ITRA durante o intervalo de 24 h 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 *Candida* spp. 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 min 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).

5.5.7 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).

5.6 Avaliação dos Danos ao DNA

5.6.1 Ensaio do cometa

O ensaio em cometa alcalino foi realizado essencialmente como descrito por Miloshev, Mihayloy e Anachkova (2002). Até 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 min, lavadas com água destilada, e ressuspensas em tampão S (1M de sorbitol, 25 mM de KH₂PO₄, pH 6,5). Alíquotas de

aproximadamente 5×10^4 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 min a 30 °C para desintegrar a parede da célula da 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 (NaOH 30 mM, 1M 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 min 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 min a 0,5 V/ cm e amperagem ajustada para 24 mA. Após eletroforese, os géis foram neutralizados por submersão das lâminas em 10 mM Tris HCl pH 7,5 durante 10 min seguido por incubações consecutivas por 10 min 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) foram analisadas para cada grupo experimental. A leitura foi 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 calculado para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de zero (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (DA SILVA et al., 2013; ANDRADE NETO et al., 2014).

5.6.2 Análise dos dados

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

5.7 Ensaios de Biofilme

Após a realização dos ensaios descritos anteriormente, onde foi avaliado o potencial antifúngico da hidralazina e do itraconazol sobre células planctônicas foram realizados ensaios

para avaliar o potencial desse fármaco sobre biofilmes de *Candida albicans* em microplaca de 96 poços.

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

A formação do biofilme foi realizada sobre placas de poliestireno de acordo com a metodologia de Pierce *et al.* (2008), com pequenas modificações. Também foi realizado o ensaio para avaliar a capacidade das cepas em formarem biofilme através da quantificação da biomassa. Para esses testes foram utilizadas todas as cepas clínicas de *C. albicans* presentes estudo. As cepas de *Candida spp.* foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 35 °C por 24 h. Em seguida, as leveduras foram suspensas em 5 mL de meio caldo YNB (Sigma, USA) e incubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e lavadas com PBS por três vezes. Os inóculos foram ajustados de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI. Posteriormente, foram dispensados 200 µL da suspensão celular em uma placa de 96 poços fundo chato. Na coluna 12 adicionou-se somente RPMI como controle de esterilidade. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após esse período, o sobrenadante foi aspirado e a placa foi lavada delicadamente com PBS por três vezes para remoção das células não aderentes.

Posteriormente foi realizada a quantificação da biomassa, onde foram adicionados 200 µL de metanol puro para fixar as células, após 10 min o metanol foi retirado e adicionado 200 µL de cristal violeta 0,3%. Após de 20 min o cristal violeta foi retirado e adicionado 200 µL de etanol puro. Para leitura da densidade óptica (DO) foram transferidos 100 µL dessa solução para uma nova placa que foi levada para o espectrofotômetro – 590 nm. O controle negativo foram os poços nos quais não foram adicionados leveduras.

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

Para realização dos ensaios de sensibilidade em biofilme de *Candida albicans* foi a cepa selecionada está indicada na TABELA 2, a qual teve a melhor produção de biofilme obtida por essa metodologia

5.7.2 Determinação da atividade dos fármacos sobre biofilmes formados de *Candida spp.*

Após formação do biofilme, como descrito acima, foi feita a avaliação a atividade de da hidralazina. Para tal foram adicionados 200 μ L de HID nas concentrações a serem testadas; CIM, 2x CIM, 10x CIM, 20x CIM e 50x CIM. A anfotericina foi utilizada como controle. Foram preparados dois controles, um controle negativo sem inóculo apenas com RPMI e outro controle de 100% de crescimento fúngico, ou seja, sem tratamento com nenhum fármaco, apenas RPMI, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após este período, 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). Para cada cepa, foi utilizada uma solução na proporção (75:6); 75 mL de solução de sal de MTT (1 mg/ mL em PBS), 6 mL de solução de menadiona (1 mM em acetona; Sigma, Alemanha) e incubadas por 35 °C por 18 h, protegidas da luz. Após incubação o corante foi removido, os poços lavados 3x com PBS e adicionado DMSO (200 μ L). Após 10 a 15 min, retirou-se 100 μ L de cada poço e transferiu-se para uma nova placa. A leitura foi realizada no leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. A redução de crescimento foi comparada ao poço que corresponde a 100% de crescimento, livre de fármaco (PIERCE et al., 2008). A concentração de HID variou de 32 a 6400 μ g/ mL e a de ANFO de 0,125 a 16 μ g/ mL. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.7.3 Análise dos dados

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

6. RESULTADOS

6.1 Atividade antifúngica do fluconazol, itraconazol e hidralazina frente as cepas de *Candida spp.*

Os resultados apresentados na Tabela 3 a seguir, mostram que para as cepas utilizadas no presente estudo a CIM do fluconazol variou de $\geq 8\mu\text{g/mL}$ a $\leq 64\mu\text{g/mL}$, mostrando um perfil de resistência em todas as cepas, exceto para a cepa ATCC de *Candida parapsilosis* que apresenta perfil de sensibilidade, de acordo com CLSI (2008). Para o itraconazol o CIM variou de $\geq 0,06\mu\text{g/mL}$ a $\leq 1\mu\text{g/mL}$, portando somente 2 cepas apresentaram perfil de resistência, sendo em sua maioria sensíveis a esse fármaco. A hidralazina mostrou atividade antifúngica com valores de CIM próximos aos encontrados no fluconazol. Houve uma variação de $\geq 16\mu\text{g/mL}$ a $\leq 128\mu\text{g/mL}$ nas CIM da hidralazina frente as cepas de *Candida spp.*

Tabela 3: Atividade antifúngica do fluconazol, itraconazol e hidralazina sobre cepas de *Candida* spp.

Cepa	Origem	Valores de CIM ^a (µg/mL e µM)		
		Fluconazol	Itraconazol	Hidralazina
<i>C. albicans</i> 1	Sangue	32	0,25	32 /163,26
<i>C. albicans</i> 2 *	Sangue	32	0,5	128 / 653,06
<i>C. albicans</i> 3	Sangue	16	0,25	16/ 81,63
<i>C. albicans</i> 4	Sangue	32	1	64/ 326,53
<i>C. albicans</i> 5	Urina	16	0,25	32/ 163,26
<i>C. parapsilosis</i> 1	Sangue	32	0,25	64/ 326,53
<i>C. parapsilosis</i> 2	Sangue	8	0,06	128/ 653,06
<i>C. parapsilosis</i> 3*	Sangue	32	0,25	32/ 163,26
<i>C. tropicalis</i> 1	Sangue	32	0,25	64/ 326,53
<i>C. tropicalis</i> 2	Sangue	32	0,25	32/ 163,26
<i>C. tropicalis</i> 3	Urina	32	0,25	32/ 163,26
<i>C. tropicalis</i> 4*	Sangue	32	0,5	128/ 653,06
<i>C. glabrata</i>	Urina	64	1	32/ 163,26
<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	-	2	0,125	128/ 653,06
<i>C. krusei</i> ATCC6258	-	16	0,25	32/ 163,26

^aA CIM foi aquela capaz de promover 50% de redução do crescimento fúngico após 24 horas, de acordo com o documento M27 A3 do CLSI. Os valores de CIM são médias geométricas e foram obtidos a partir de experimentos realizados em triplicatas.

*Isolados utilizados nos ensaios de biofilmes e citometria.

6.2 Avaliação do efeito sinérgico da hidralazina.

Após a determinação das CIMs para fluconazol, itraconazol e hidralazina realizamos ensaios para avaliar o possível sinergismo entre o fluconazol e a hidralazina e entre o itraconazol e a hidralazina. Para a avaliação do efeito sinérgico foi determinada a concentração inibitória fracionária (FICI) através da técnica do *checkerboard*. A combinação dos fármacos foi realizada a partir do CIM individual de cada cepa e o resultado foi determinado através do cálculo do FICI e classificado em sinérgico (S) onde o FICI é $\leq 0,5$; indiferente (I) onde o FICI é $> 0,5$ e ≤ 4 e antagônico (A) quando o FICI é > 4 .

Na Tabela 4, podemos observar o efeito da hidralazina com o fluconazol, que para as cepas do nosso estudo, em sua maioria, a associação mostrou-se indiferente, porém duas cepas, uma de *C. tropicalis* e outra de *C. parapsilosis* a associação dos dois fármacos mostrou efeito sinérgico promovendo a redução da CIM tanto do fluconazol quanto da hidralazina.

A Tabela 5 apresentada a seguir, mostra o efeito da hidralazina associada ao itraconazol onde para os isolados do nosso estudo, em sua maioria, a associação apresentou efeito sinérgico promovendo a redução da CIM dos dois fármacos. Nessa associação apenas para dois isolados a associação mostrou-se indiferente.

Tabela 4: Avaliação do efeito sinérgico da associação da hidralazina com o fluconazol sobre cepas de *Candida* spp.

Cepa	Valores de CIM ^a (µg/mL) Isolado		Valores de CIM ^a (µg/mL) Associado		FICI	Interpretação ^b
	FLC	HID	FLC	HID		
<i>C. albicans</i> 1	32	32	16	16	1	I
<i>C. albicans</i> 2	32	128	32	128	2	I
<i>C. albicans</i> 3	16	16	16	16	2	I
<i>C. albicans</i> 4	32	64	32	64	2	I
<i>C. albicans</i> 5	16	32	16	32	2	I
<i>C. parapsilosis</i> 1	32	64	8	16	0,5	S
<i>C. parapsilosis</i> 2	8	128	8	128	2	I
<i>C. parapsilosis</i> 3	32	32	32	32	2	I
<i>C. tropicalis</i> 1	32	64	8	16	0,5	S
<i>C. tropicalis</i> 2	32	32	32	32	2	I
<i>C. tropicalis</i> 3	32	32	16	16	1	I
<i>C. tropicalis</i> 4	32	128	32	128	2	I
<i>C. glabrata</i> 1	64	32	32	16	1	I
<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	2	128	2	128	2	I
<i>C. krusei</i> ATCC6258	16	32	16	32	2	I

^aA CIM foi aquela capaz de promover 50% de redução do crescimento fúngico após 24 horas, de acordo com o documento M27 A3 do CLSI. Os valores de CIM são médias geométricas e foram obtidos a partir de experimentos realizados em triplicatas

^b(I: indiferente; S: sinergismo)

Tabela 5: Avaliação do efeito sinérgico da associação da hidralazina com o itraconazol sobre cepas de *Candida* spp.

Cepa ^a	Valores de CIM ^a (µg/mL) Isolado		Valores de CIM ^a (µg/mL) Associado		FICI	Interpretação ^b
	ITRA	HID	ITRA	HID		
	<i>C. albicans</i> 1	0,25	32	0,03		
<i>C. albicans</i> 2	0,5	128	0,125	32	0,5	S
<i>C. albicans</i> 3	0,25	16	0,03	2	0,245	S
<i>C. albicans</i> 4	1	64	0,125	8	0,25	S
<i>C. albicans</i> 5	0,25	32	0,03	4	0,245	S
<i>C. parapsilosis</i> 1	0,25	64	0,03	8	0,245	S
<i>C. parapsilosis</i> 2	0,06	128	0,01	16	0,2917	S
<i>C. parapsilosis</i> 3	0,25	32	0,03	4	0,245	S
<i>C. tropicalis</i> 1	0,25	64	0,03	8	0,245	S
<i>C. tropicalis</i> 2	0,25	32	0,03	4	0,245	S
<i>C. tropicalis</i> 3	0,25	32	0,06	8	0,49	S
<i>C. tropicalis</i> 4	0,5	128	0,06	16	0,245	S
<i>C. glabrata</i>	1	32	0,5	32	1,5	I
<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	0,125	128	0,125	128	2	I
<i>C. krusei</i> ATCC6258	0,25	32	0,03	4*	0,245	S

^aA CIM foi aquela capaz de promover 50% de redução do crescimento fúngico após 24 horas, de acordo com o documento M27 A3 do CLSI. Os valores de CIM são médias geométricas e foram obtidos a partir de experimentos realizados em triplicatas

^b(I: indiferente; S: sinergismo)

6.3 Atividade Citotóxica da Hidralazina

Após a exposição dos fibroblastos de murino, linhagem L929 a 200 µg/mL (1.020µM) de hidralazina não houve interferência na proliferação celular, bem como no controle utilizado, a água ($p < 0,05$). A concentração inibitória média (CI₅₀) foi maior que o intervalo testado, portanto não foi observada citotoxicidade da hidralazina em até 200 µg/mL, equivalente a 1.020µM.

6.4 Determinação da viabilidade celular de *Candida* spp. após a exposição a diferentes fármacos.

Através da análise de citometria pela exclusão do iodeto de propídio pode-se avaliar a redução de viabilidade celular das cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC após diferentes tratamentos, apresentados na Figura 4 a seguir. As células tratadas com FLC (8 µg/mL) não apresentaram redução de viabilidade celular significativa em relação ao controle para as cepas de *C. albicans*(2,83%), *C. parapsilosis* (5,46%) e *C. tropicalis*(9,34%).

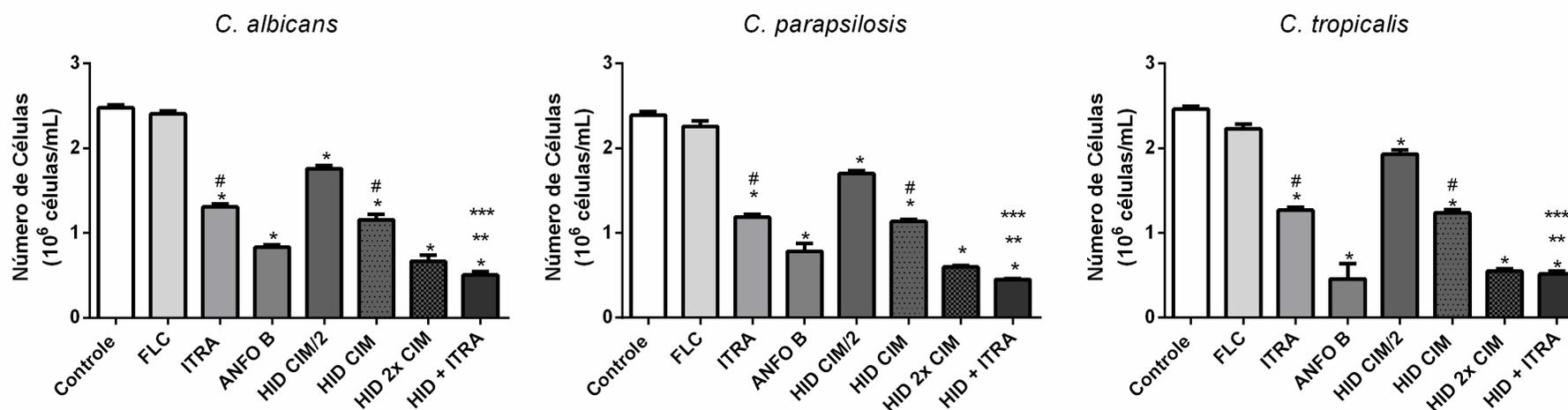
Para *C. albicans* houve redução significativa de viabilidade celular em todos os demais tratamentos, em ANFO (4 µg/mL) (66,39%) que foi utilizada no ensaio como controle positivo de morte, ITRA (0,5 µg/mL)(46,96%), HID CIM/2 (64 µg/mL) (29,14%), HID CIM (128 µg/mL)(53,44%), HID 2xCIM (256 µg/mL) (73,27%). A associação que mostrou-se sinérgica nos ensaios de sensibilidade apresentaram a maior redução de viabilidade HID (32 µg/mL) + ITRA (0,25 µg/mL) (79,75%), maior inclusive do que a ANFO que é o controle positivo/morte.

A cepa de *C. parapsilosis* também apresentou redução de viabilidade celular após os demais tratamentos. A ANFO (4 µg/mL) (67,22%) também foi utilizada no ensaio como controle de morte, ITRA (0,25 µg/mL) (50,42%), HID CIM/2 (16 µg/mL) (28,57%), HID CIM (32 µg/mL)(52,52%), HID 2xCIM (64 µg/mL) (75,63%) e a associação que mostrou-se sinérgica nos ensaios de sensibilidade HID (4 µg/mL) + ITRA (0,03 µg/mL) (81,09%) que apresentou a maior redução de viabilidade do grupo sendo maior do que o controle de morte ANFO.

C. tropicalis também apresentou redução de viabilidade celular após os demais tratamentos. A ANFO (4 µg/mL) (81,70%) foi utilizada no ensaio como controle de morte, ITRA (0,5 µg/mL) (48,37%), HID CIM/2 (64 µg/mL) (21,95%), HID CIM (128 µg/mL)(50%), HID 2xCIM (256 µg/mL) (78,04%) e a associação que mostrou-se sinérgica nos ensaios de sensibilidade HID (16 µg/mL) + ITRA (0,06 µg/mL) (79,26%).

Foi possível observar que a redução de viabilidade celular mostrou-se semelhante entre as três espécies testadas, apresentando relação dose dependentes e o efeito sinérgico da associação de HID e ITRA.

Figura 4: Viabilidade celular de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* após a exposição (24 h) á FLC (8µg/ mL), HID (CIM/2, CIM e 2x CIM), ITRA, HID associado ao ITRA. Foram utilizados RPMI e ANFO B (4 µg/ mL) como controles negativo e positivo, respectivamente.



Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M).

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

p<0,05 comparado com o ANFO B por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

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

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

6.5 Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células de *Candida* spp. após a exposição a diferentes fármacos.

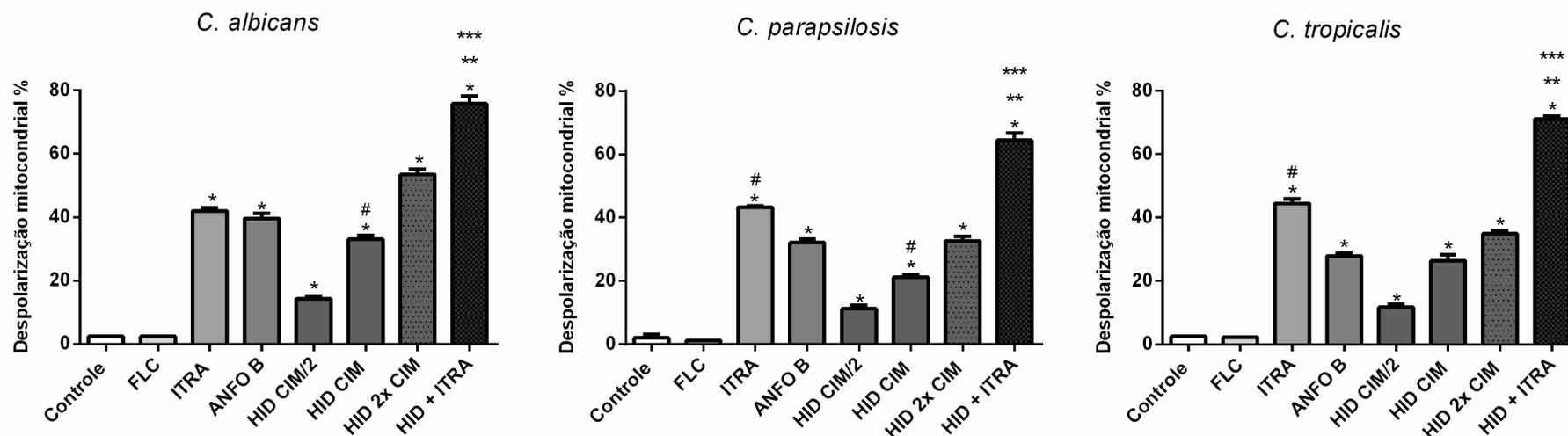
Os resultados apresentados na figura 5a seguir mostram a despolarização mitocondrial de células *C. albicans* causada pelo ITRA (0,5 $\mu\text{g/mL}$) (42,04%), HID CIM/2 (64 $\mu\text{g/mL}$) (14,23%), HID CIM (128 $\mu\text{g/mL}$) (33,13%), HID 2xCIM (256 $\mu\text{g/mL}$) (53,51%) e pela associação sinérgica de HID (32 $\mu\text{g/mL}$) + ITRA (0,25 $\mu\text{g/mL}$) (75,83%), frente ao FLC (8 $\mu\text{g/mL}$) (2,44%) que não foi significativo e ao controle positivo de despolarização mitocondrial, a ANFO (4 $\mu\text{g/mL}$) (39,66%). Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo (2,42%).

Esse comportamento também pode ser observado sobre as células de *C. parapsilosis* quando receberam o mesmo tratamento. Houve despolarização mitocondrial sobre as células tratadas com ITRA (0,25 $\mu\text{g/mL}$) (43,22%), HID CIM/2 (16 $\mu\text{g/mL}$) (11,20%), HID CIM (32 $\mu\text{g/mL}$) (21,25%), HID 2xCIM (64 $\mu\text{g/mL}$) (32,64%) e pela associação sinérgica de HID (4 $\mu\text{g/mL}$) e ITRA (0,03 $\mu\text{g/mL}$) (64,47%), frente ao FLC (1,13%) que não foi significativo e ao controle positivo de despolarização mitocondrial, a ANFO (33,13%), todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo (2,10%).

O mesmo comportamento ocorreu sobre a cepa de *C. tropicalis*. Houve despolarização mitocondrial causada por ITRA (0,5 $\mu\text{g/mL}$) (44,50%), HID CIM/2 (64 $\mu\text{g/mL}$) (11,70%), HID CIM (128 $\mu\text{g/mL}$) (26,36%), HID 2x CIM (256 $\mu\text{g/mL}$) (34,89%) e pela associação sinérgica de HID (16 $\mu\text{g/mL}$) e ITRA (0,06 $\mu\text{g/mL}$) (71,09%), frente ao FLC (2,26%) que não foi significativo e ao controle positivo de despolarização mitocondrial, a ANFO (27,92%), todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo (2,54%).

Os resultados demonstram a despolarização mitocondrial causada pela HID de forma dose-dependente e amplificada quando associada ao ITRA, sendo maior do que o controle ANFO.

Figura 5: Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* após a exposição de 24 h ao FLC (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), HID (CIM/2, CIM e 2x CIM), ITRA e HID associado ao ITRA. Foram utilizados RPMI, como controle negativo e ANFO (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como controle de morte.



Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M).

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

$p < 0,05$ comparado com o ANFO B por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

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

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

6.6 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células de *Candida* spp. após a exposição a diferentes fármacos.

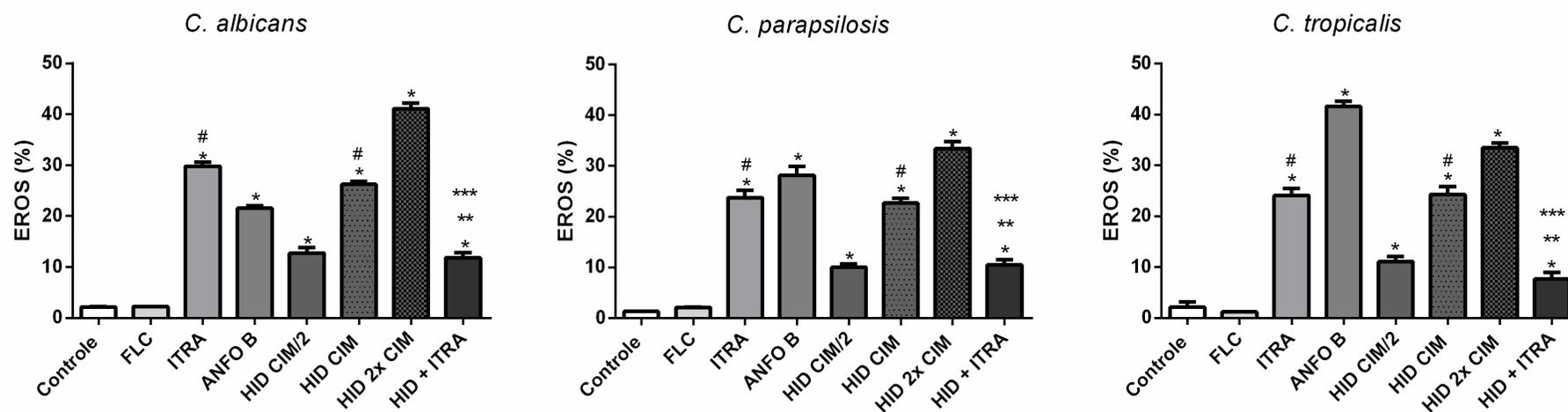
As células de *C. albicans* apresentaram produção de EROS quando tratadas pelo ITRA (0,5 µg/mL) (29,81%), HID CIM/2 (64 µg/mL) (12,75%), HID CIM (128 µg/mL)(26,24%), HID 2xCIM (256 µg/mL) (41,09%) e pela associação sinérgica de HID (32 µg/mL) e ITRA (0,25 µg/mL) (11,08%), frente ao FLC (8µg/mL)(2,25%) que não foi significativo e ao controle positivo, a ANFO (4µg/mL)(21,56%). Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo (2,14%).

Frente as células de *C. parapsilosis* pode-se observar o mesmo padrão de produção de EROS diante do mesmo tratamento: ITRA (23,78%), HID CIM/2 (10,03%), HID CIM (22,69%), HID 2xCIM (33,49%) e pela associação sinérgica de HID e ITRA (10,52%), frente ao FLC (2,09%) que não foi significativo e ao controle positivo, a ANFO (28,17%). Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo (1,31%).

Para *C. tropicalis* também foi possível observar produção de EROS diante do tratamento semelhante: ITRA (24,11%), HID CIM/2 (11,08%), HID CIM (24,32%), HID 2xCIM (33,46%) e pela associação sinérgica de HID e ITRA (7,69%), frente ao FLC (1,19%) que não foi significativo e ao controle positivo, a ANFO (41,56%). Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo (2,13%).

Houve produção de EROS pelas células de *Candida* spp. causado pelo tratamento com HID de forma dose dependente, porém quando analisado a associação de HID e ITRA a produção de EROS foi menor em comparação com a HID ou o ITRA isolados, demonstrado na figura 6 a seguir.

Figura 6: Espécies reativas de oxigênio (EROS) produzidas por cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* após a exposição de 24 h ao FLC (8µg/ mL), HID (CIM/2, CIM e 2x CIM), ITRA e HID associada ao ITRA. Também foram utilizados RPMI como controle negativo e ANFO (4 µg/ mL) como controle de morte.



Os dados são apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M).

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

p<0,05 comparado com o ANFO B por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

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

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

6.7 Externalização da fosfatidilserina em células de *Candida spp.* após a exposição a diferentes fármacos.

Ocorreu a externalização de fosfatidilserina nas células de *C. albicans* tratadas com ITRA (0,5 µg/mL) (47,93%), HID CIM/2 (64 µg/mL) (13,12%), HID CIM (128 µg/mL) (31,13%), HID 2x CIM (256 µg/mL) (53,10%) e também quando tratadas pela associação sinérgica de HID (32 µg/mL) e ITRA (0,25 µg/mL) (82,91%), frente ao FLC (8 µg/mL) (0,91%) que não foi significativo e ao controle positivo, a ANFO (4 µg/mL) (49,92%). Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo (0,96%).

Sobre a cepa de *C. parasilosis* a externalização de fosfatidilserina também ocorreu quando as células receberam os mesmo tratamentos: ITRA (39,91%), HID CIM/2 (11,56%), HID CIM (24,40%), HID 2xCIM (45,11%) e pela associação sinérgica de HID e ITRA (73,12%), frente ao FLC (1,90%) que não foi significativo e ao controle positivo, a ANFO (36,51%). Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo (1,90%).

O mesmo comportamento pode ser observado nas células de *C. tropicalis* diante do tratamento semelhante: ITRA (42,84%), HID CIM/2 (9,65%), HID CIM (19,93%), HID 2x CIM (35,61%) e pela associação sinérgica de HID e ITRA (78,99%), frente ao FLC (1,16%) que não foi significativo e ao controle positivo, a ANFO (42,23%). Todos os tratamentos foram comparados ao controle negativo (1,20%).

A externalização de fosfatidilserina mostrada pela coloração com a Anexina V foi positiva quando as células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parasilosis* foram tratadas com a HID de forma dose-dependente e o efeito foi maior nas células expostas a associação de HID e ITRA, sendo maior do que quando expostas aos tratamentos isolados de HID ou ITRA, mostrado

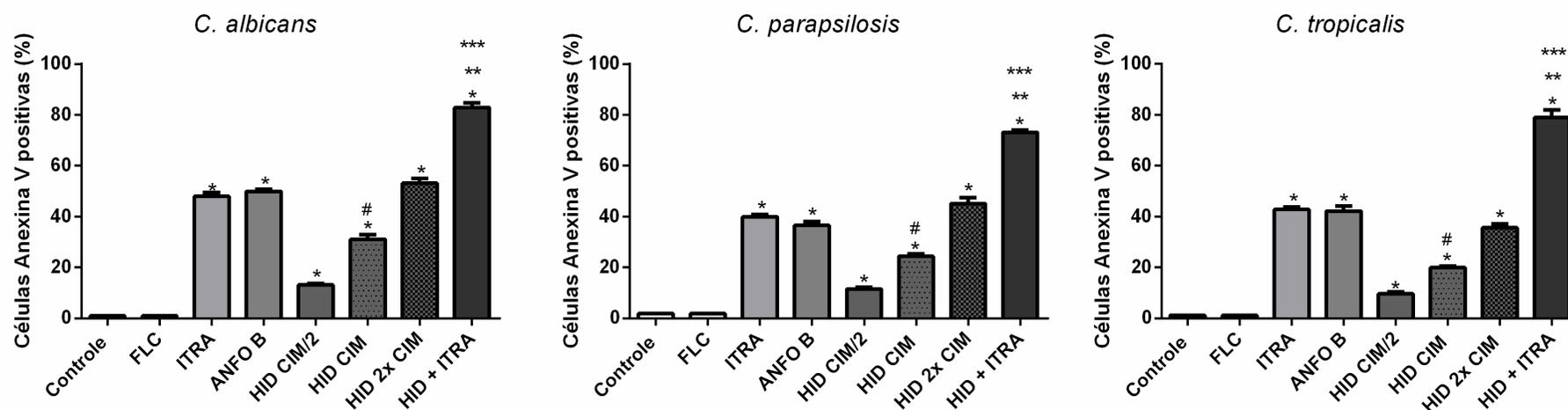
figura

7

a

seguir.

Figura 7: Externalização da fosfatidilserina em cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* após a exposição de 24 h ao FLC (8µg/ mL), HID (CIM/2, CIM e 2x CIM), ITRA, HID associado ao ITRA. O RPMI foi utilizado como controle negativo e a ANFO (4 µg/ mL) como controle de morte.



Os dados são apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M).

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

p<0,05 comparado com o ANFO B por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

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

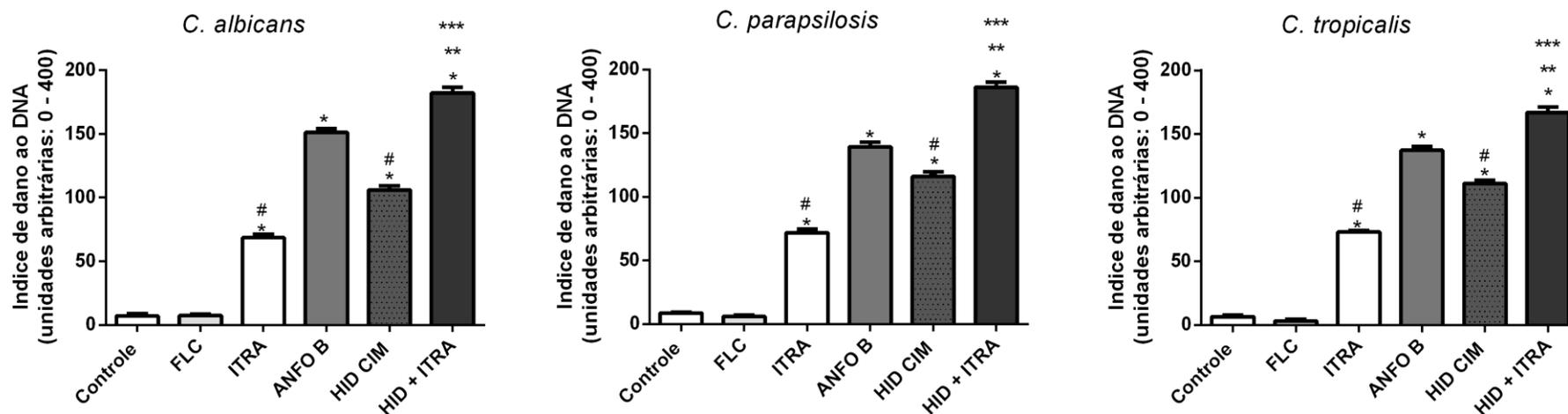
*** p<0,05 comparado com o HID CIM por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.8 Análise de dano ao DNA

Ocorreram lesões no DNA de células de *C. albicans*, *C. parasilosis* e *C. tropicalis* induzidas pelo ITRA (0,5; 0,25; 0,5 µg/mL), a HID CIM (128; 32; 128 µg/mL) e a associação de HID (32; 4; 16 µg/mL) e ITRA (0,25; 0,03; 0,06 µg/mL), respectivamente. O tratamento com o FLC não promoveu danos de forma significativa.

A associação de HID e ITRA foi mais eficaz na promoção de danos ao DNA, nas três espécies estudadas, do que os tratamentos individuais de ITRA ou HID. Os resultados estão apresentados na figura 8 a seguir.

Figura 8: Avaliação dos danos ao DNA provocados em células de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* após a exposição de 24 h ao FLC (8 µg/ mL), HID (CIM), ITRA e HID associada ao ITRA. O RPMI foi utilizado como controle negativo e a ANFO (4 µg/ mL) como controle de morte.



Os dados são apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M).

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

$p < 0,05$ comparado com o ANFO B por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

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

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

6.9 Biofilme

Após avaliarmos a ação da hidralazina sobre células planctônicas e verificarmos que esse fármaco apresentou boa atividade antifúngica tanto de forma isolada quando associada ao itraconazol avaliamos seu potencial frente a isolados formadores de biofilme de *C. albicans* (cepa 2) em um biofilme já estabelecido. Foram testadas concentrações de hidralazina que variaram em CIM (128µg/mL), 2x CIM (256µg/mL), 10x CIM (1280µg/mL), 20x CIM (2560µg/mL) e 50x CIM (6400µg/mL) para *C. albicans*. As concentrações de anfotericina utilizadas foram 0,125; 0,250; 0,500; 1; 2; 4; 8; e 16µg/mL.

6.9.1 Atividade da hidralazina sobre biofilmes formados

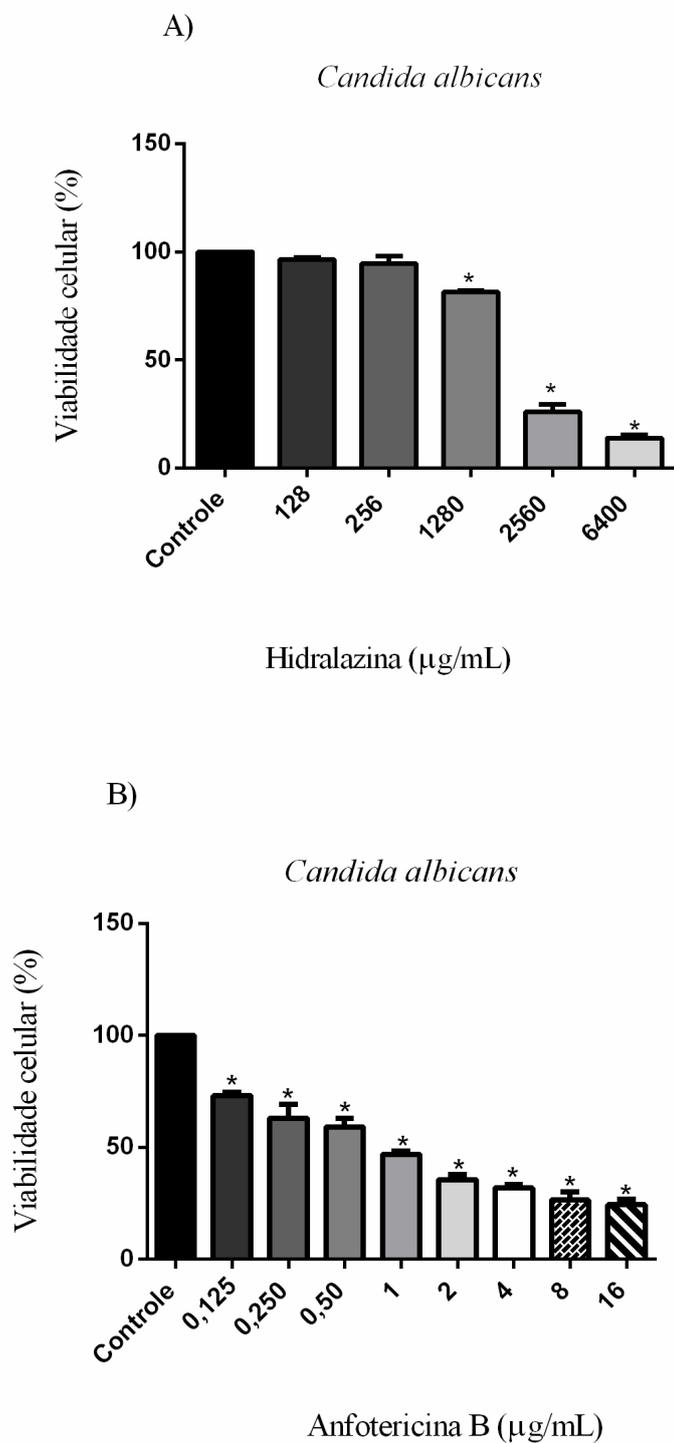
A figura 9; A e B correspondem ao resultado, mostrado em porcentagem (%) de viabilidade celular ($P < 0,05$) após o tratamento do biofilme formado (24 h) com hidralazina e anfotericina B.

Para o biofilme de *C. albicans* tratados com hidralazina, mostrado na figura 9 A, houve redução de viabilidade celular ($P < 0,05$) a partir de 10x CIM. A variação de viabilidade celular foi para *C. albicans* 96,61% (CIM) a 13,99% (50x CIM).

O efeito do tratamento dos biofilmes com a anfotericina B pode ser observado na Figura 9 B. Houve redução de viabilidade celular ($P < 0,05$) em todas as concentrações testadas para *C. albicans*.

Os valores de viabilidade celular dos biofilmes encontram-se no Apêndice 1.

Figura 9: Efeito da hidralazina (A) variando de CIM a 50x CIM e da anfotericina b (B)sobre biofilme formado de *Candida albicans*



* $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Turkey.

7. DISCUSSÃO

A *Candida* spp. é o principal agente de infecções fúngicas invasivas cuja a incidência tem aumentado, com elevada mortalidade e muitos casos de insucesso terapêutico (CAMPITELLI et al., 2017). Esse cenário expõe a eminente urgência no desenvolvimento de novos antifúngicos. Um mecanismo historicamente eficaz no desenvolvimento de novos fármacos é o rastreio de muitos compostos através da realização de testes de sensibilidade *in vitro*, a fim de identificar agentes biologicamente ativos (SALCI et al., 2018).

No presente estudo foram utilizadas cepas clínicas isoladas de amostras de sangue e urina resistentes ao fluconazol e cepas ATCCs, que de acordo com o CLSI (2008) devem ser inseridas nos ensaios de sensibilidade como controle, já que possuem um perfil definido. A hidralazina mostrou ter atividade frente a todas as cepas de *Candida* spp. utilizadas no estudo havendo uma variação no CIM, de $\geq 16\mu\text{g/mL}$ a $\leq 128\mu\text{g/mL}$, que não parece ter relação com a espécie ou origem já que essa variação foi homogênea entre as mesmas. Em revisão de literatura não foram identificados estudos semelhantes, onde a hidralazina tenha sido testada frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol ou sensíveis.

A associação de fármacos pode ser uma alternativa muito benéfica e eficaz na tentativa de requalificar os antifúngicos disponíveis no mercado, aumentando assim sua vida útil. O sinergismo de fármacos pode ampliar o espectro, aumentar o efeito fungicida e reduzir a toxicidade de compostos (CAMPITELLI et al., 2017). Mediante a eminente atividade da HID obtida isoladamente foram realizados ensaios para avaliar seu efeito quando associado ao fluconazol. Essa associação mostrou-se sinérgica frente a duas cepas clínicas (13,33%), de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, porém frente as demais cepas a associação mostrou-se indiferente.

A segunda associação foi realizada entre hidralazina e itraconazol e mostrou-se muito promissora, já que houve sinergismo entre esses fármacos para a maioria das cepas, 86,66% e foi indiferente para as demais cepas. Não houve antagonismo em nenhuma associação, já que essa é uma preocupação quando é realizada a associação de medicamentos antifúngicos, como o uso clínico de ITRA e anfotericina B que não é recomendado (MARTINEZ, 2006). Outros autores também mostraram sinergismo entre ITRA e outros fármacos frente a cepas de *Candida* spp. Król, Nawrot e Bartoszewicz (2018) identificou sinergismo entre o ITRA e o ibuprofeno frente a *C. albicans* enquanto a associação do ibuprofeno com o FLC foi sinérgica, indiferente ou antagônica. Brilhante et al., (2017) observou o sinergismo entre o ITRA e a prometazina frente a maioria das cepas de *C.*

tropicalis testadas, enquanto a associação entre o FLC e a prometazina mostrou-se sinérgica somente frente a cepas de *C. tropicalis* resistentes, mas não frente a cepas sensíveis.

A toxicidade de compostos é uma barreira para o desenvolvimento de novos fármacos, bem com novos antifúngicos. Os ensaios mostraram que as concentrações de HID necessárias para inibir o crescimento fúngico de *Candida* spp. não foram tóxicas em células L929 de mamíferos, já que até 1.020 μM não houve efeito tóxico ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$) e o maior concentração necessária para inibir o crescimento fúngico (CIM) foi 653,06 μM (128 $\mu\text{g/mL}$). Os nossos resultados demonstram que a HID têm potencial para o desenvolvimento de um novo antifúngico, já que a toxicidade é um importante critério para tal. Esse é um ensaio necessário para o desenvolvimento de novos fármacos, recomendado pela ANVISA. Em contraste com os nossos achados, Chatard M. e colaboradores (2016) avaliaram a citotoxicidade da HID sobre células bEnd.3 endoteliais e identificaram atividade tóxica em 200 μM .

O ensaio de viabilidade celular demonstrou que tratamento de células de *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *C. parapsilosis* com HID em concentrações crescentes provocou redução significativa no número de células em relação ao controle, corroborando com os ensaios de sensibilidade. A associação de HID e ITRA foi capaz de reduzir potencialmente mais o número de células do que nos tratamentos individuais com esses fármacos, confirmando o sinergismo de HID e ITRA. Esses dados mostram que a HID causa dano nas membranas celulares, necessários para a exclusão do iodo de propídio, possivelmente com consequente perda de função. O que não ocorreu quando as células foram tratadas com o FLC (8 $\mu\text{g/mL}$), coerentemente, já que as cepas são resistentes a esse fármaco.

O tratamento de células de *Candida* spp. com HID provocou despolarização ou redução no potencial transmembrana mitocondrial em relação dose dependente e quando a HID foi associada ao ITRA a despolarização mitocondrial foi amplificada, demonstrando o efeito sinérgico desses fármacos. A alteração no $\Delta\Psi\text{m}$ está correlacionada com a apoptose, morte celular programada causada pela desregulação mitocondrial consequente da alteração na permeabilidade da organela que leva a perda de proteínas para o espaço intermembranar (SEVRIUKOVA I., 2011). Um estudo conduzido por Ruiz-Magana e colaboradores (2016) mostrou que a HID ativa a via apoptótica mitocondrial induzindo a apoptose de forma dose dependente, semelhantemente aos nossos resultados. Os ensaios realizados com linhagens de células T leucêmicas mostraram ainda que a apoptose mitocondrial induzida pela HID é dependente de caspase 9, além do que esse fármaco foi capaz de ativar BAK, proteína pró-apoptótica essencial no início da perda de função da mitocôndria.

Nós também realizamos ensaios para avaliar a produção espécies reativas de oxigênio pelas células de *Candida* spp. Nossos resultados mostram que a HID foi capaz de induzir a produção de EROS na dependência da concentração, quando isoladamente. Em contraste com os demais ensaios que também mostraram efeitos dose-dependente da HID, a produção de EROS reduziu quando houve a associação ao ITRA, sendo menor do que qualquer tratamento isoladamente. A associação de HID e ITRA pode ter produzido efeito antioxidante ou pode ter sido inibido pela redução da concentração desses fármacos, demonstrando o efeito dose dependente para a produção de EROS. Leiro et al., (2004) mostrou que a HID tem efeito antioxidante, sobre macrófagos, em concentrações especialmente elevadas, como 10.000 μM , nossos estudos foram conduzidos com até 1.306,12 μM (2x CIM), porém serão necessários mais ensaios para elucidar o efeito antioxidante sobre as cepas de *Candida* spp.

Na avaliação da externalização da fosfatidilserina pela marcação com anexina V, nossos resultados mostram o efeito positivo do tratamento com HID sobre as células de *Candida* spp. , bem como a associação sinérgica de HID e ITRA. A externalização desse fosfolipídio ocorre no processo de apoptose. Esses dados corroboram com os ensaios de $\Delta\Psi\text{m}$, confirmando que a HID induz a apoptose celular.

Os resultados de $\Delta\Psi\text{m}$, EROS e externalização da fosfatidilserina mostraram-se semelhantes entre as espécies de *Candida* testadas e que são resistentes ao FLC, demonstrando o potencial efeito da HID como antifúngico.

O último ensaio para tentar elucidar o mecanismo de morte foi o ensaio do cometa. Nossos resultados mostram que houve dano ao DNA nas células de *Candida* spp. tratadas com HID e maior dano quando a HID foi associada ao ITRA, em relação ao controle. Ruiz-Magana e colaboradores (2016) também demonstraram que a HID causou dano ao DNA no ensaio do cometa, através da quebra da fita de DNA com 400 e 600 μM (64 e 96 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente.

A falha terapêutica no tratamento de infecções fúngicas está associada ao desenvolvimento de resistência ou tolerância aos antifúngicos e a capacidade das células de *Candida* spp. em formarem biofilmes (WUYTS, VAN DIJCK E HOLTAPPELS, 2018).

A diversidade e complexidade dos biofilmes pode explicar a resistência aos antifúngicos. Estão presentes tipos celulares distintos, como blastoconídios, hifas ou pseudo-hifas e células persistentes, o microambiente também pode variar em região de hipóxia na base e região de maior aporte de oxigênio na superfície do biofilme, a presença de bombas de efluxo e o sequestro de moléculas antifúngicas por componentes celulares da matriz, como o

polissacarídeo β -1,3 glucana, que apesar de estar presente em pequenas quantidades impede a difusão do fármaco (TAFF et al.,2012; TSUI, KONG E JABRA-RIKZ, 2016; LOHSE et al.,2017).

Nossos ensaios de sensibilidade demonstraram a atividade antifúngica da hidralazina isoladamente e o sinergismo com o itraconazol frente a células planctônicas de *Candida* spp., entretanto são os biofilmes que estão associados as infecções crônicas (HIROTA et al.,2016). Diante disso, realizamos ensaios para avaliar o potencial antifúngico da HID sobre biofilmes de *Candida* spp. analisando a viabilidade celular através do ensaio de redução do MTT.

Os resultados demonstraram que a HID apresentou atividade antifúngica sobre os biofilmes de *Candida albicans*. No biofilme formado as concentrações de CIM que inibiram o crescimento de células planctônicas não foram capazes de reduzir a viabilidade celular ($P < 0,05$), isso só ocorreu quando foi utilizada uma concentração maior, em 10X CIM. O que era esperado, pois a característica associada aos biofilmes é a resistência aos antifúngicos (WUYTS, VAN DIJCK E HOLTAPPELS, 2018). O aumento da concentração do fármaco provocou redução progressiva na viabilidade dos biofilmes demonstrando que o efeito antifúngico da HID sobre o biofilme de *Candida* é dose dependente.

O tratamento de infecções crônicas pode ser difícil principalmente quando relacionadas a instalação de biofilmes. Inibir a adesão celular impedindo o processo de formação do biofilme deve ser a melhor forma de tratamento. Nossos ensaios demonstraram que a HID sozinha é capaz de dismantelar o biofilme instalado. Entretanto, são necessários mais estudos já que os biofilmes responsáveis por infecções *in vivo* são mais complexos do que os sistemas de biofilme formados *in vitro* (TSUI, KONG E JABRA-RIKZ, 2016).

8. CONCLUSÃO

No presente estudo, o redirecionamento de fármacos a partir da triagem de moléculas se mostrou ainda eficaz na busca por novos fármacos já que foi possível demonstrar que a hidralazina é um promissor antifúngico. Esse fármaco apresentou atividade antifúngica contra cepas clínicas de *Candida* resistentes ao fluconazol, reduzindo a viabilidade celular, causando danos no DNA com possível morte por via apoptótica mitocondrial em concentrações não tóxicas. O sinergismo com o ITRA melhorou seus efeitos anti *Candida*. Além disso, a hidralazina mostrou potencial contra biofilme formado de *Candidaalbicans*.

9. REFERÊNCIAS

- ALSTERHOLM, M. et al. Frequency of bacteria, Candida and Malassezia Species in Balanoposthitis. **Acta Dermato-Venereologica**. v.88, p.331-336, 2008.
- ANDRADE NETO, J.B. *et al.* Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds *in vitro* against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: a special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PloS One**, v. 9, n. 5, 2014.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, v.2.p.833, 5ª Ed. Brasília, 2010.
- ARENDRUP, M.C; PATTERSON, T.F. Multidrug-Resistant Candida: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 216, n. 3, p.445-451, 2017.
- BADIEE, P.; HASHEMIZADECH, Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis and clinical management. **Indian Journal Med Res**, v.139, p.195-204, 2014.
- BARBOSA, G.M. Atividade antifúngica de correntes elétricas contínuas de baixa intensidade em leveduras de *Candida albicans*. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- BEHM, B. et al. Skin signs in diabetes mellitus. **Journal Of The European Academy Of Dermatology And Venereolog**, v. 26, n. 10, p.1203-1211, 2012.
- BENEDICT, K. et al. Estimation of direct healthcare costs of fungal diseases in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, p.1-7, 2018.
- BITAR, D. et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001–2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p.1163-1169, 2014. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
- BRAGA, P.R. et al. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p.273-277, 2018.
- BRILHANTE, R.S.N. et al. *Candida tropicalis* from veterinary and human sources shows similar *in vitro* hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*. **Veterinary Microbiology**, v. 192, p.213-219, 2016.
- BRILHANTE, R.S.N. et al. *In vitro* effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. **Medical Mycology**, p.1-11, 2017.
- CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. **CLSI Document M27-A3**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth

informational supplement. **CLSI document M27-S4**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

CAMPITELLI, M. et al. Combination antifungal therapy: A review of current data. **Journal Of Clinical Medicine Research**, v. 9, n. 6, p.451-456, 2017.

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

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M.C. Candida biofilms: threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers In Medicine**, v. 5, p.1-15, 13, 2018.

CHATARD, M. et al. Hypoxic stress induced by hydralazine leads to a loss of blood-brain barrier integrity and an increase in efflux transporter activity. **Plos One**, v. 11, n. 6, p.1-14, 23, 2016.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K. Candida biofilms: development, architecture, and resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 4, p.1-24, 2015.

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

DA SILVA, A. Ret al. Berberine antifungal activity in fluconazole-resistant pathogenic yeasts: action mechanism evaluated by flow cytometry and biofilm growth inhibition in *Candida* spp.. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p.3551-3557, 2016.

DA SILVA, C.R. et al. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691-1700, 2013.

DA SILVA, C.R. et al. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1468- 78, 2014.

DA SILVA, E. N. Jr. et al. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. **European Journal Medical Chemical**, v. 46, n. 1, p. 399- 410, 2011

DANTAS, A.S. et al. Cell biology of *Candida albicans* –host interactions. **Current Opinion In Microbiology**, v. 34, p.111-118, dez. 2016.

DAVIDSON, NETEA E KULLBERG. Patient susceptibility to candidiasis - A potential for adjunctive immunotherapy. **Journal Of Fungi**, v. 4, n. 1, p.9-29, 2018.

ELLERSHAW; GURNEY. Mechanisms of hydralazine induced vasodilatation on rabbit aorta and pulmonary artery. **British Journal of Pharmacology**. v.134, n.3, p.621-631. 2001.

FERNANDES, J.A.L. et al. Evolution and Application of Inteins in *Candida* species: A Review. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p.1-15, 2016.

- FERREIRA, F.G, et al. Fármacos: do desenvolvimento à retirada no mercado. **Revista Eletrônica de Farmácia**, V.1, p.14-24, 2009.
- GALLUZZI, L.et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p.486-541, 23 jan. 2018.
- GARCIA, L.G.S.et al. Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p.662-669, 2018.
- GENNARO, A.R. **Remington Farmacia**. 20ª edição. Buenos Aires: Panamericana, 2003. P.1505
- HANI, Umme et al. Candidiasis: a fungal infection - current challenges and progress in prevention and treatment. **Infection disorders- Drug Targets**, v.15,p.42-52, 2015.
- HELAL, M.; DADACHOVA, E. Radioimmunotherapy as a novel approach in HIV, bacterial, and fungal infectious diseases. **Cancer Biotherapy And Radiopharmaceuticals**, v. 33, n. 8, p.330-335, 2018.
- HERMAN LL; BHIMJI SS. Hydralazine. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2018.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470296>
- HIROTA, K. et al. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p.321-330, 2016.
- IMAD, S.; NISAR, S.; MAQSOOD, Z.T. A study of redox properties of hydralazine hydrochloride, an antihypertensive drug. **Journal Of Saudi Chemical Society**, v. 14, n. 3, p.241-245, 2010.
- JACOB, L.et al. Prevalence of vulvovaginal candidiasis in gynecological practices in Germany: A retrospective study of 954,186 patients. **Current Medical Mycology**, v. 4, n. 1, p.6-11, 2018.
- KRÓL, J.; NAWROT, U.; BARTOSZEWICZ, M.. Anti-candidal activity of selected analgesic drugs used alone and in combination with fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole and isavuconazole. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 2, p.327-331, 2018.
- KULLBERG, B.J.; ARENDRUP, M.C. Invasive Candidiasis. **New England Journal Of Medicine**, v. 373, n. 15, p.1445-1456, 2015.
- LARINI, LOURIVAL. **Fármacos e Medicamentos**, Porto Alegre: ArtMed, 2008. P. 165
- LEE, J.et al. Antibiofilm and Antivirulence Activities of 6-Gingerol and 6-Shogaol Against *Candida albicans* Due to Hyphal Inhibition. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 8, p.1-10, 28 ago. 2018.
- LEIRO, J. M. et al., Antioxidant activity and inhibitory effects of hydralazine in inducible NOS/COX-2 gene and protein expression in rat peritoneal macrophages. **Internacional Immunopharmacology**, v.4, n.2 p.163-177, 2004.

- LOHSE, M.B. et al. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p.19-31, 2017.
- MAGANA, M. et al. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 3, p.1-49, 4 abr. 2018.
- MALACHIAS MVB, Souza WKS, Plavnik FL, Rodrigues CIS, Brandão AA, Neves MFT, et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2016; 107(3Supl.3):1-83
- MARINS, T. et al. Evaluation of *Candida* bloodstream infection and antifungal utilization in a tertiary care hospital. **Bmc Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p.1-13, 18 abr. 2018.
- MARTINEZ R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal brasileiro de pneumologia**, v. 32, 2006.
- MATTA, SOUZA E COLOMBO. Revisiting species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from latin american medical centers. **Journal Of Fungi**, v. 3, n. 2, p.24-38, 2017.
- MAYER, F.L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p.119-128, 2013.
- MILOSHEV, G.; MIHAYLOV, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell electrophoresis on yeast cells. **Mutation Research**, v. 513, p. 69-74, 2002.
- NETT, Jeniel. The host's reply to *Candida* biofilm. **Pathogens**, v. 5, n. 1, p.33-43, 2016.
- NFOR, E.N. et al. Synthesis, crystal structure and antifungal activity of a Ni(II) complex of a new hydrazone derived from antihypertensive drug hydralazine hydrochloride. **Polyhedron**, v. 63, p.207-213, 2013.
- ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the *checkerboard* puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, 2003.
- O'MEARA, T.R. et al. High - throughput screening identifies genes required for *Candida albicans* induction of macrophage pyroptosis. **Mbio**, v. 9, n. 4, p.1-20, 2018.
- PAPPAS, P.G. et al. Clinical practice guideline for the management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, p.933-983, 2015.
- PIERCE, C.G et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p.1494-1500, ago. 2008.
- PIERCE, C. et al. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p.14-22, 2017.
- POGACAR, M.S. et al. Diagnosis and management of diaper dermatitis in infants with emphasis on skin microbiota in the diaper area. **International Journal of Dermatology**, p.265-275, 2018.

- POLKE, M; HUBE, B; JACOBSEN, I.D. Candida survival strategies. **Advances In Applied Microbiology**, p.139-235, 2015.
- RAMAGE, MARTINEZ E LÓPEZ-RIBOT. Candidabiofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **Fems Yeast Research**, v. 6, n. 7, p.979-986, 2006.
- RANG. H.P., DALE, M. M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- RIPPKE, F; BERARDESCA, E; WEBER, T. M. PH and Microbial Infections. **Ph Of The Skin: Issues and Challenges**, p.87-94, 2018.
- ROSA, Fernanda Costa. **Perfil de sensibilidade e influência de antifúngicos na formação de biofilme em isolados orais de Candida albicans de pacientes com AIDS e indivíduos imunocompetentes**. 2014. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Mestrado em Biologia Parasitária, Universidade Ceuma, São Luís, 2014.
- RUIZ-MAGANÃ, et al. The antihypertensive drug hydralazine activates the intrinsic pathway of apoptosis and causes DNA damage in leukemic T cells. **Oncotarget**, v.7, n.16, p. 21875-21886, 2016.
- RUNEMAN B, FAERGEMANN J, LARKÖ O. Experimental Candida albicans lesions in healthy humans: dependence on skin pH. **Acta Dermato- Venereol**.v.80, p.421– 424, 2000.
- SALCI, T.P. et al. Targeting Candida spp. to develop antifungal agents. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 4, p.802-814, 2018.
- SANTOS et al. Candida Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p.1-23, 2018.
- SEVRIOUKOVA, I.F. Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 12, p.2545-2579, 2011.
- SIDRIM, J. J. Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2004.
- SILVA et al. Candida Species Biofilms' Antifungal Resistance. **Journal Of Fungi**, v. 3, n. 1, p.8-25, 2017.
- SINHA et al. DNA Cleavage and Detection of DNA Radicals Formed from Hydralazine and Copper (II) by ESR and Immuno-Spin Trapping. **Chemical Research In Toxicology**, v. 27, n. 4, p.674-682, 2014.
- SPAMPINATO, C; LEONARDI, D. Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **Biomed Research International**, v. 2013, p.1-13, 2013.
- STEPANOVIĆ et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p.175-179, 2000.
- SUBRAMANIAN et al. Synthesis and in vitro evaluation of hydrazinyl phthalazines against malaria parasite, Plasmodium falciparum. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 14, p.3300-3306, 2016.

SUNet al. In vitro interactions between IAP antagonist AT406 and azoles against planktonic cells and biofilms of pathogenic fungi *Candida albicans* and *Exophiala dermatitidis*. **Medical Mycology**, p.1-5, 2018.

TAFF et al. A *Candida* biofilm- induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 8, p.1002848-1002861, 2012.

TAVARES, Walter. **Antibióticos e quimioterápicos para o uso clínico**. 3ª edição. São Paulo: Atheneu, 2014.

TRAGIANNIDIS, A; TSOULAS, C; GROLL, A.. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines. **Mycoses**, v. 58, n. 1, p.10-21, 2014.

TSUI, C; KONG, E.; JABRA-RIZK,. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens And Disease**, v. 74, n. 4, p.18-31, 2016.

WEERASEKERA et al. Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 11, p.697-702, 2016.

WHIBLEY; GAFFEN. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans Candida* species. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p.42-52, 2015..

WUYTS, J; VAN DIJCK, P; HOLTAPPELS, M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? **Plos Pathogens**, v. 14, n. 10, p.1007301-1007315, 2018.

YAGIELA J, DOWD F, JOHNSON B, MARIOTTI A, NEIDLE. **Farmacologia e terapêutica para dentistas**. 6ª edição. Elsevier, 2011.

ZUCKERMAN, R. et al. Hydralazine-associated adverse events: a report of two cases of hydralazine-induced ANCA vasculitis. **Brazilian Journal Of Nephrology**, v. 40, n. 2, p.193-197, 2018.

.

10. APÊNDICE 1: VIABILIDADE CELULAR (%) DO BIOFILME DE *Candida albicans* TRATADOS COM HIDRALAZINA E ANFOTERICINA B.

<i>Candida albicans</i> - HIDRALAZINA	
	VIABILIDADE CELULAR (%)
CONTROLE	100
CIM	96,61
2X CIM	94,60
10X CIM	81,60*
20X CIM	26,00*
50X CIM	13,99*

<i>Candida albicans</i> - ANFOTERICINA B	
	VIABILIDADE CELULAR (%)
CONTROLE	100
0,125 µg/mL	73,14*
0,250 µg/mL	63,12*
0,50 µg/mL	59,11*
1 µg/mL	46,94*
2 µg/mL	35,61*
4 µg/mL	31,96*
8 µg/mL	26,45*
16 µg/mL	24,25*

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