



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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SINERGISMO DA CETAMINA COM DERIVADOS  
AZÓLICOS EM MICRO-ORGANISMOS NA FORMA PLANCTÔNICA E EM  
ISOLADOS FORMADORES DE BIOFILME**

**João Batista de Andrade Neto**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2019**

**João Batista de Andrade Neto**

Avaliação *In Vitro* Do Sinergismo Da Cetamina Com Derivados Azólicos Em Micro-Organismos Na Forma Planctônica E Em Isolados Formadores De Biofilme

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior

FORTALEZA – CEARÁ

2019

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)

---

A1a ANDRADE NETO, JOÃO BATISTA DE.  
Avaliação in vitro do sinergismo da cetamina com derivados azólicos em micro-organismos na forma plactônica e em isolados formadores de biofilme. / JOÃO BATISTA DE ANDRADE NETO. – 2019.  
119 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

1. Candida spp.. 2. Resistência ao FLC. 3. Cetamina. 4. Atividade sinérgica. 5. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 616.9

---

**JOÃO BATISTA DE ANDRADE NETO**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SINERGISMO DA CETAMINA COM DERIVADOS  
AZÓLICOS EM MICRO-ORGANISMOS NA FORMA PLANCTÔNICA E EM  
ISOLADOS FORMADORES DE BIOFILME**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação  
em Microbiologia Médica da Faculdade de  
Medicina da Universidade Federal do Ceará, como  
parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor em  
Microbiologia Médica

Data da defesa: 22 de abril de 2019

---

Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Bruno Coelho Cavalcanti

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Universidade Estadual do Cariri (URCA)

A Deus.

Aos meus pais Francisco Ari e Francisca Antônia.

Em memória de Auricélio Batista de Andrade e João Batista de Andrade.

## **AGRADECIMENTO**

À Deus, sempre presente e enchendo de bênçãos minha vida.

Aos meus pais, Francisco Ari de Andrade e Francisca Antônia Dantas de Andrade, a minha gratidão por todo amor e apoio dedicados a mim, e por ter transformado momentos de trabalho tenso em colaboração e incentivos.

A minha noiva Haissa Esmeraldo, por todo amor, apoio e por estar ao meu lado quando eu mais precisei.

Aos meus irmãos, João Henrique de Andrade e Larissa Nara Dantas de Andrade, por não me deixarem desistir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior, pela oportunidade concedida e confiança depositada, por todos os ensinamentos, incentivos e participação efetiva na minha formação profissional.

Ao Dr. Bruno Coelho Cavalcanti e ao Prof. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães pelos seus préstimos, sugestões, informações técnicas e incentivos úteis para a vida profissional e pela oportunidade única de trabalhar com ambos.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro e a Profa. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo pelos ensinamentos adquiridos durante os últimos anos.

À Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva pela ajuda incomparável, apoio e participação efetiva na realização deste trabalho.

À colega Daiana Barroso pelo apoio e ajuda na realização deste trabalho.

Aos amigos, Akhenaton Onassis, Anderson Ramos da Silva, Igor Sá Carneiro, Daniel Domingues Freitas, Rosana de Sousa Campos, Bruna Nascimento, Letícia Serpa, Lavouisier Franklin e demais colegas do LABEL, pela contribuição direta ou indireta, pela convivência, incentivo, apoio e acima de tudo amizade.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, pelas oportunidades adquiridas durante o mestrado.

“You can't stop the winds of change,  
Because everything that coming will be  
rearranged.”

(The Kooks)

## RESUMO

A emergência das estirpes de *Candida* spp. com resistência a compostos antifúngicos, principalmente a classe dos azólicos, é um problema crescente em hospitais de todo o mundo e estão associadas a uma elevada morbimortalidade, além de estarem relacionadas a um alto ônus econômico a nível hospitalar. Dessa forma a terapia combinada de drogas tornou-se uma das estratégias mais utilizadas e eficazes para aliviar este problema. No presente trabalho avaliamos o efeito sinérgico da cetamina com dois derivados azólicos, o itraconazol (ITRA) e o fluconazol (FLC), frente a cepas e ao biofilme formado de *Candida* spp resistentes ao FLC. Além disso avaliamos os efeitos genotóxicos e mutagênicos da cetamina sobre leucócitos do sangue periférico (PBLs) e *Salmonella typhimurium* (TA98, TA97a, TA100 e TA102) através de vários estudos experimentais baseados em diferentes parâmetros na presença ou não do metabolizante exógeno fração S9. A avaliação da interação medicamentosa foi determinada pelo cálculo da concentração inibitória fracionária e técnicas de citometria de fluxo. Concluímos que a cetamina, quando administrada em combinação com o fluconazol ou o itraconazol, exibiu atividade frente a estirpes de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, o que provavelmente ocorre através de alterações na integridade da membrana das células de levedura e da geração de espécies reativas de oxigênio, disfunção mitocondrial e danos no DNA que poderiam levar à morte por apoptose. A avaliação dos isolados formadores de biofilme após o tratamento mostrou reduções significativas na atividade das células do biofilme ( $p < 0.05$ ). Nossos dados revelaram que a cetamina induziu um efeito citotóxico fraco em PBLs após 24 horas. Uma pequena quantidade de quebras totais no DNA foram detectados no ensaio do cometa alcalino e modificado (emprego de FPG enzima) apenas em concentrações mais elevadas (500 e 700  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de cetamina. No entanto, as lesões no DNA foram quase completamente reparadas, o que reflete na falta de mutagênese (micronúcleos e aberrações cromossômicas) nos PBLs e nenhum aumento nos números de revertentes no teste de Ames (500 a 5.000  $\mu\text{g} / \text{placa}$ ). Em resumo, a cetamina apresentou sinergismo com os compostos azólicos frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, onde nas concentrações testadas, esta droga demonstrou ser um agente calstogênico fraco e desprovido de propriedades mutagênicas em modelos procarióticos.

**Palavras-chave:** *Candida* spp., Resistência ao FLC, Cetamina, Atividade sinérgica, Citotoxicidade, Genotoxicidade, Mutagenicidade.

## ABSTRACT

The emergence of *Candida* spp. with resistance to antifungal compounds, mainly the azoles class, is a growing problem in hospitals around the world and are associated with a high morbidity and mortality, in addition to being related to a high economic burden at the hospital level. In this way combined drug therapy has become one of the most widely used and effective strategies to alleviate this problem. In the present work, we evaluated the synergistic effect of ketamine with two azole derivatives, itraconazole (ITRA) and fluconazole (FLC), against strains of *Candida* spp. resistant to fluconazole and to the biofilm formed of *C. albicans* and we decided to evaluate the genotoxic and mutagenic effects of ketamine on peripheral blood leukocytes (PBLs) and *Salmonella typhimurium* (TA98, TA97a, TA100, and TA102) through several well-established experimental protocols based on different parameters in the presence or not of exogenous metabolizing S9 fraction. The evaluation of the drug interaction was determined by calculating the fractional inhibitory concentration and flow cytometry techniques. We conclude that ketamine, when administered in combination with fluconazole or itraconazole, exhibited activity against strains of *Candida* spp. resistant to fluconazole, which probably occurs through changes in membrane integrity of yeast cells and generation of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction and DNA damage that could lead to death by apoptosis. The evaluation of biofilm forming isolates after treatment showed statistically significant reductions in biofilm cell activity ( $P < 0.05$ ). Our data revealed that ketamine induces a weak cytotoxic effect on PBLs after 24 h and is devoided of hemolytic effects. A small amount of DNA strand breaks levels were detected in the modified comet assay (employment of FPG enzyme) only at highest concentrations (500 and 700  $\mu\text{g/mL}$ ) of ketamine, highlighting our pro-oxidant data regarding ketamine. However, the oxidative DNA lesions were almost completely repaired which reflects in the lack of mutagenesis (micronuclei and chromosomal aberrations) on PBLs and no increases in revertants numbers on *S. typhimurium*/microsome test (500 to 5,000  $\mu\text{g/plate}$ ). In summary, ketamine is a weak oxidative DNA damaging agent and is devoid of mutagenic properties on eukaryotic and prokaryotic models.

**Keywords:** *Candida* spp. FLC Resistance. Ketamine. Synergistic Activity. Cytotoxicity. Genotoxicity. Mutagenicity

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Avaliação por citometria de fluxo da redução no número de células viáveis, em uma única cepa representativa de <i>C. albicans</i> resistente ao FLC .....	58
<b>Figura 2</b>	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) em cepa de <i>C. albicans</i> resistente ao FLC. As células foram marcadas com rodamina 123 (50 nM) .....	60
<b>Figura 3</b>	Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em uma cepa representativa de <i>C. albicans</i> resistente ao FLC por citometria de fluxo .....	62
<b>Figura 4</b>	Teste de TUNEL em uma única cepa representativa de <i>C. albicans</i> mostrando a fragmentação do DNA .....	64
<b>Figura 5</b>	Avaliação do índice de dano ao DNA através da distribuição dos índices de danos, utilizando a versão alcalina do ensaio do cometa, em <i>C. albicans</i> resistente ao FLC.	66
<b>Figura 6</b>	Avaliação do índice de dano ao DNA através da distribuição dos índices de danos, utilizando a versão alcalina do ensaio do cometa modificada (FPG), em uma cepa representativa de <i>C. albicans</i> resistente ao FLC.....	67
<b>Figura 7</b>	Externalização da fostatidilserina pela marcação com anexina V.....	69
<b>Figura 8</b>	Avaliação da viabilidade celular, pelo teste do MTT (A) e características morfológicas apoptóticas em PBLs humanos tratados por 24 horas com cetamina (A) ou doxorrubicina e MMS .....	76
<b>Figura 9</b>	Cinética de reparo das quebras da fita de DNA, avaliada pelo ensaio alcalino cometa em PBLs humanos tratados por 6 h com cetamina a 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ A) ou 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ e $4 \times 10^{-5}$ MMS .....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela 1: Efeito antifúngico da cetamina (CET), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITR) sozinhos e em combinação contra cepas de <i>Candida</i> spp. O sinergismo foi avaliado pelo método checkerboard para derivação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI).....	55
Tabela 2	Efeito antifúngico da cetamina (KET), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITRA) isolados e em combinação com biofilme formado por <i>Candida</i> spp avaliado pelo modo de concentração inibitória fracional (ICF).....	71
Tabela 3	Atividade citotóxica de cetamina (CET), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITR) isolada e em combinação em células L929. Os dados são apresentados como valores IC50 e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) a partir de três experiências independentes, realizadas em triplicado.....	74
Tabela 4	Formação de nitratos, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas em leucócitos humanos de sangue periférico (PBLs) após exposição 24h de exposição da cetamina.....	78
Tabela 5	Determinação dos efeitos da cetamina sobre o índice de dano (DI) em leucócitos humanos de sangue periférico (PBLs) com e sem ativação metabólica (mistura S9) e na presença ou ausência da enzima FPG.....	80
Tabela 7	Índice mitótico, frequência de aberrações cromossômicas e alterações numéricas em PBLs cultivados após a exposição da cetamina sem ativação metabólica (fração S9).....	84
Tabela 8	Índice mitótico, frequência de aberrações cromossômicas e alterações numéricas em PBLs cultivados após a exposição da cetamina com ativação metabólica (fração S9).....	85
Tabela 9	Indução de revertentes <i>his+</i> para duas linhagens de <i>S. typhimurium</i> (TA100 e 102) para a avaliação da mutagenicidade da Cetamina, com (S9) e sem (S9) ativação metabólica.....	87

Tabela 10 Indução de revertentes *his+* para duas linhagens de *S. typhimurium* (TA98 e 97a) para 88  
a avaliação da mutagenicidade da Cetamina, com (S9) e sem (S9) ativação  
metabólica.....

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP Binding Cassete</i>
ANFO B	Anfotericina B
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CET	Cetamina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CDR	<i>Candida drug resistance</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DCF	2',7' Diclorofluoresceína
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína não Fluorescente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotereitol
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FICI	<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>
FITC	Fluoresceína
FLC	Fluconazol
FPG	<i>Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase</i>
GFP	<i>Glu-fibrinogen peptide</i>
H <sub>2</sub> DCFDA	Diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína
HEPES	N - (2-Hidroxietil) piperazina-N' - (ácido 2-etanosulfônico)
IAA	Iodoacetamida
ITRA	Itraconazol
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MFS	<i>Major facilitator superfamily</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 propídeo
PS	Fosfatidilserina

PBL	Leucócito de Sangue Periférico
QS	<i>Quorum sensing</i>
RH123	Rodamina 123
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mL
UTI	Unidade de terapia intensiva
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
$\Delta\psi_m$	Potencial transmembrana mitocondrial

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1 Candidíase.....	21
2.2 Mecanismos de Patogenicidade.....	21
2.3 Epidemiologia das infecções causadas pelo gênero <i>Candida</i> .....	23
2.4 Principais Agentes Antifúngicos.....	26
2.5. Resistência aos Antifúngicos nas Infecções por <i>Candida</i> .....	29
2.6. Importância de novas estratégias terapêuticas.....	33
2.7 Atividade antimicrobiana dos Anestésicos.....	35
2.8 Cetamina.....	36
<b>3. HIPÓTESES .....</b>	<b>38</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
4.1 Objetivo Geral .....	38
4.2 Objetivos Específicos .....	38
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
5.1 Recuperação das cepas .....	40
5.2 Antifúngicos .....	40
5.3 Teste de Sensibilidade aos antifúngicos .....	40
5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos .....	40
5.3.2 Teste do sinergismo pela técnica de microdiluição em caldo: <i>checkerboard</i> .....	41
5.4 Testes utilizando citometria de fluxo .....	42
5.4.1 Preparo das suspensões de células de <i>Candida albicans</i> .....	42
5.4.2 Tratamento das células de <i>Candida albicans</i> .....	42
5.4.3 Determinação da viabilidade celular .....	42
5.4.4 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial em células de <i>Candida albicans</i> .....	43
5.4.5 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) em células de <i>Candida albicans</i> ..	43
5.4.6 Determinação da externalização de fosfatidilserina em células de <i>Candida albicans</i> .....	43
5.5 Testes utilizando microscopia de fluorescência.....	44
5.5.1 Ensaio do Cometa .....	44
5.5.2 Análise da oxidação de bases purinas do DNA .....	45
5.5.3 Análise de fragmentação de DNA .....	45

5.6 Ensaio no Biofilme formado .....	45
5.6.1 Crescimento dos isolados de <i>Candida</i> spp. no modo biofilme.....	45
5.6.2 Determinação da atividade de Cetamina sobre biofilmes formados de <i>Candida</i> spp.....	46
5.7 Ensaio de Citotoxicidade.....	47
5.7.1 Cultivo de células L929 de Fibroblastos de Murinos .....	47
5.7.2 Inibição da proliferação celular de L929 usando o teste de MTT.....	47
5.8 Ensaio de Genotoxicidade e Mutagenicidade.....	47
5.8.1 Produtos Químicos.....	47
5.8.2 Ensaio com leucócitos do sangue periférico (PBLs).....	48
5.8.2.1 Isolamento de leucócitos do sangue periférico (PBLs).....	48
5.8.2.2 Avaliação da viabilidade celular.....	48
5.8.2.3 Caracterização morfológica dos PBLs apoptóticos.....	49
5.8.2.4 Medidas de produção de nitrito / nitrato.....	49
5.8.2.5 Mensuração da peroxidação lipídica (ensaio TBARS) .....	49
5.8.2.6 Mensuração da oxidação de proteínas.....	50
5.8.2.7 Ensaio cometa.....	50
5.8.2.8 Cinética de reparação das quebras de fita de DNA.....	51
5.8.2.9 Ensaio de micronúcleo (MN) com bloqueio de citocinese.....	51
5.8.2.10 Teste de aberrações cromossômicas (CAs).....	52
5.8.3 Ensaio Salmonella/microsoma para avaliação da mutagenicidade (Teste de Ames) ...	52
5.9 Análise dos dados.....	52
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
6.1 Atividade antifúngica da Cetamina frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes a azólicos....	53
6.2 Efeito da combinação entre os azólicos (FLC e ITRA) e a Cetamina frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes a azólicos.....	53
6.3 Avaliação do tipo de morte celular em <i>Candida</i> spp. após exposição da Cetamina isolada e associada aos azólicos .....	57
6.3.1 Redução da viabilidade das células de <i>C. albicans</i> após o tratamento da Cetamina isolada e em combinação os azóis.....	57
6.3.2 Alterações sobre o potencial transmembrana mitocondrial das células de <i>C. albicans</i> são induzidas pelo tratamento com a cetamina isolada e associada com os antifúngicos azólicos .....	59

6.3.3 Aumento da geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células de <i>C. albicans</i> após o tratamento com a cetamina isolada e combinada aos azólicos.....	61
6.3.4 A fragmentação do DNA é induzida pela cetamina isolada e em combinação com azóis em cepas de <i>C. albicans</i> detectadas pela técnica do TUNEL.....	63
6.3.5 O Co tratamento da cetamina com os derivados azólicos promove danos no DNA das células de <i>Candida</i> spp .....	65
6.3.6 O Co tratamento da cetamina com os derivados azólicos promove a externalização da fosfatidilserina nas células de levedura .....	68
6.4 Associação da cetamina com os derivados azólicos promove redução do biofilme formado	70
6.5 Atividade citotóxica de cetamina e azóis contra células L929 de mamíferos.....	73
6.6 A cetamina tem um potencial citotóxico fraco frente aos leucócitos de sangue periférico	75
6.7 A cetamina apresenta um perfil pró-oxidante fraco .....	77
6.8 A cetamina tem efeitos clastogênicos fracos .....	79
6.9 A Cetamina não demonstrou efeitos mutagênicos em bactérias.....	86
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>98</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>114</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A candidemia é a infecção fúngica mais importante para os pacientes hospitalares, sendo um problema crescente nos hospitais terciários do mundo inteiro, pois é uma importante causa de mortalidade e de aumento nas despesas hospitalares, onde quando comparamos os pacientes hospitalizados sem candidemias, os pacientes com candidemias possuem gastos hospitalares maiores e ficam em média mais dias internados, gerando ônus consideráveis aos serviços hospitalares (COLOMBO, et. al., 2014; AHMED et al., 2014; DRGONA, et al., 2014; PFALLER et al., 2016; OZ & GOKBOLAT, 2018; ULU KILIC et al., 2017). De acordo com NUCCI et al., (2013), na América Latina, incluindo o Brasil, a candidemia nosocomial é classificada como um importante problema de saúde pública.

Atualmente, o tratamento das infecções fúngicas invasivas possui poucas opções terapêuticas, sendo que apenas três classes de antifúngicos são utilizadas na prática clínica (azólicos, equinocandinas e poliênicos), com um total de 8 drogas aprovadas pelo FDA (US Food and Drug Administration) (LEPAK & ANDES, 2011; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2017). Contudo, no Brasil a oferta é ainda menor, onde segundo a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (BRASIL, 2017), apenas o Fluconazol (FLC), o Itraconazol (ITRA) e a Anfotericina B (ANFO) encontram-se disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas invasivas no Sistema Único de Saúde (SUS).

No Brasil, os azólicos, principalmente o fluconazol, são os antifúngicos de escolha para a terapia das candidíases, principalmente por se tratar de fármacos relativamente baratos e bem tolerados. Todavia, nas últimas décadas tivemos um aumento das espécies de *Candida* spp. com sensibilidade reduzida ou resistência intrínseca aos compostos azólicos, fato este preocupante levando-se em conta a vantagem desta classe. (WIEDERHOLD, 2017; LIMA et al., 2017; TERÇAS et al., 2017; DOI et al., 2016). Além disso, a expressão de fatores de virulência e a capacidade de formar biofilme nas espécies de *Candida* spp. torna o tratamento dessas infecções ainda mais desafiador. Dentro deste contexto, os biofilmes tornam-se um problema clínico suplementar, tendo em vista que podem ser encontrados em diversos dispositivos médicos o que pode dificultar a erradicação das infecções pelo gênero *Candida* (CAVALHEIRO et al., 2018)

Dentro dessa conjuntura o uso de combinações de fármacos com atividade antifúngica, como os azólicos, juntamente com fármacos não antifúngicos surge como uma promissora

alternativa terapêutica para o tratamento de estirpes resistentes (TOBUDIC et al., 2012; DA SILVA et al., 2013; PINA-VAZ et al., 2005). Nesse contexto, os anestésicos têm sido descritos como potenciais agentes antimicrobianos, para que possam agir sozinhos ou em associação com outros antimicrobianos (PELZ et al., 2008; JOHNSON et al., 2008).

A Cetamina (KET), um potente antagonista não competitivo dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), já teve sua atividade antimicrobiana descrita na literatura de forma isolada ou em combinação com o propofol (VASCONCELOS et al., 2005; BEGEC et al., 2013; GOCMEN, et al., 2008; KRUSZEWSKA et al., 2002; 2010). Contudo até a presente data, na literatura consultada, não foram encontrados relatos do efeito sinérgico da Cetamina com compostos azólicos frente a cepas de *Candida* spp.

De uma forma geral os anestésicos são capazes de modificar estruturalmente as moléculas de DNA interferindo em suas funções, sendo considerados por muitos autores como agentes genotóxicos exógenos (ALLEVA et al., 2003; SZYFTER et al., 2004; SILVA et al., 2016). Nas últimas décadas houve um aumento no número de agentes utilizados na anestesiologia, contudo em sua maioria não há uma compreensão completa de seus efeitos potenciais sobre a saúde dos pacientes (NOGUEIRA et al., 2016).

A toxicidade da cetamina contra vários tipos de células e tecidos é bem descrita na literatura (LEFFA et al., 2016; OZTURK et al., 2014; LIU et al., 2013; RUDIN et al., 2005; TOYAMA et al., 2006). De acordo com SHAN et al., (2018) e ITO et al., (2015) o mecanismo mais provável de toxicidade seria através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em um estudo proposto por LIU et al., (2013), foi demonstrado que os camundongos após serem expostos por um longo período de tempo a cetamina, apresentaram níveis elevados de ROS, bem como morte celular neuronal.

Contudo, de uma maneira geral, poucos estudos avaliaram o dano ao DNA induzido pela cetamina (LEFFA et al., 2016). Vale destacar, também, que o Observatório Europeu da Droga e da Toxicod dependência (OEDT) publicou um relatório em 2002, sublinhando a inexistência de estudos mutagênicos relevantes *in vivo* com cetamina. Além disso, mais de 15 anos após a publicação do documento do EMCDDA, Comitê de Especialistas em Dependência de Drogas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2015, durante o 37º Encontro, revelaram ainda falta de estudos conclusivos sobre o potencial mutagênico *in vivo* da cetamina. Recentemente, BRAZ & KARAHALIL (2015) publicaram um estudo de revisão sobre o potencial *in vivo* da genotoxicidade de anestésicos já utilizados e os atualmente utilizados em

anestesia, e autores concluíram que muitos esforços devem ser abordados devido aos resultados conflitantes e poucos encontrados na literatura científica. Complementarmente, os estudos genotóxicos / mutagênicos *in vitro* com cetamina disponíveis são escassos e insuficientes e não permitem uma avaliação razoável do seu potencial genotóxicos (OEDT, 2002).

Assim sendo, em decorrência do uso amplo do fármaco para diversos fins faz se necessário avaliar a segurança de seu uso, onde o conhecimento sobre essa droga permitirá um uso consciente e racional, evitando erros (LEFFA et al., 2016).

Dessa forma, o presente trabalho buscou avaliar o efeito sinérgico entre a Cetamina e dois derivados azólicos, fluconazol e itraconazol, frente a células planctônicas e o biofilme formado de cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, elucidando os possíveis mecanismos envolvidos na ação citotóxica através de procedimentos tais como citometria de fluxo e teste do cometa versão alcalina. Além disso, este estudo foi desenhado para avaliar *in vitro* os efeitos genotóxicos e mutagênicos do cloridrato de cetamina em PBLs estimulados por fitohemaglutinina e *Salmonella typhimurium* (um modelo procariótico) através de vários protocolos experimentais bem estabelecidos baseados em parâmetros distintos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Candidíase

A terminologia “candidíase” é uma aceção ampla, bastante utilizada para se referir a um conjunto de patologias causadas pelas leveduras do gênero *Candida*. A candidíase é a infecção fúngica oportunista de maior prevalência no mundo (SIDRIM & ROCHA, 2004). O gênero *Candida* inclui mais de 200 espécies de leveduras, sendo que a *C. albicans* é a espécie mais isolada em infecções humanas (PAPON et al., 2013). Em decorrência deste fato, durante muito tempo acreditou-se que apenas a *C. albicans* era capaz de infectar seres humanos, porém existem mais de 20 espécies que podem causar doenças no homem (CDC, 2015; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Nos seres humanos estas leveduras são residentes comuns do trato intestinal e também podem ser encontradas nas mucosas, como a vaginal. Contudo, dificilmente são isoladas na pele íntegra e quando o analista se depara com um isolamento, pode se tratar de uma proliferação anormal no intestino ou uma doença de pele preexistente (CDC, 2015; SIDRIM & ROCHA, 2004). Atualmente, as espécies deste gênero mais correlacionadas com as manifestações clínicas em nível global são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e recentemente a *C. auris* (COLOMBO et al, 2017; ARENDRUP & PATTERSON, 2017).

As manifestações clínicas das candidíases são extensas e variam dependendo do organismo afetado, indo de sintomas triviais, como a colonização das mucosas, até quadros clínicos sistêmicos, tais como a infecção em diversos órgãos. Nos quadros de candidíases, as mucosas mais acometidas são o esôfago, a boca e a vagina (SIDRIM & ROCHA, 2004; MAYER et al., 2013). Dentro deste contexto, de uma forma geral, as espécies do gênero podem levar a ocorrência de dois tipos de processos infecciosos em seres humanos: as infecções superficiais (candidíase oral ou vaginal) e as infecções sistêmicas (CALDERONE, 2012). É importante ressaltarmos que durante a infecção superficial e sistêmica, as cepas de *Candida* spp. necessitam uma variedade de fatores de virulência para obter êxito na colonização e infecção dos sítios anatômicos (MAYER et al., 2013).

### 2.2 Mecanismos de patogenicidade

As cepas de *Candida* spp. são capazes de produzir diversos fatores de virulência, merecendo destaque as proteinases e as lipases, pois favorecem a invasão tecidual no

hospedeiro. Todavia, a progressão da infecção é dependente também de fatores interligados ao hospedeiro, cabendo destacar que as infecções são iniciadas pelo desequilíbrio do binômio parasita/hospedeiro. Cabe destacarmos que as alterações no pH ou na hidratação e a concentração de nutrientes são fatores relacionados com as infecções de pele e mucosas. Enquanto que a imunossupressão do sistema fagocitário do hospedeiro esta comumente relacionada com as candidíases sistêmicas (SIDRIM & ROCHA, 2004; MAYER et al., 2013).

A capacidade patogênica das leveduras pode ser atribuída a algumas características importantes tais como: a formação de estruturas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) que podem representar obstáculos para a fagocitose; produção de enzimas hidrolíticas que promovem danos teciduais (proteínases, fosfolipases e hemolisinas); produção de metabólitos que podem desencadear reações alérgicas do tipo imediato ou tardio; “inundação antigênica” (mananas) do micro-organismo nas infecções graves, levando a uma depressão da imunidade celular; variação fenotípica e adesão (manoproteínas) ; formação do biofilme microbiano em dispositivos médicos ou nos tecidos do hospedeiro (SARDI *et al.*, 2013; KOTHAVADE; RAJENDRA; PANTHAKI, 2010; SIDRIM & ROCHA, 2004).

O biofilme é um importante fator de virulência das espécies de *Candida* spp. Essa estrutura é caracterizada como comunidade microbiana imóvel que se encontra ligada a uma superfície (biótica ou abiótica), sendo que este arranjo se encontra incorporado numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) que são sintetizadas pelos próprios micro-organismos. Dentre os substratos mais comuns podemos citar os cateteres e dentaduras (abióticos) e as superfícies das células mucosas (bióticas) (MAYER et al., 2013; DONLAN; COSTERTON, 2002).

A formação do biofilme é um processo sequencial que inclui a aderência das células leveduriformes ao substrato, a proliferação celular, formação de hifas e pseudo-hifas na camada superior do biofilme, síntese e acúmulo do material da matriz extracelular e por fim, a dispersão das células do biofilme. É importante destacarmos que os biofilmes maduros apresentam uma resistência maior frente aos agentes antimicrobianos e aos sistema imunológico do hospedeiro, em comparação com as células planctônicas. A baixa efetividade dos antimicrobianos frente aos biofilmes parece estar relacionada com a sua arquitetura complexa, que dificulta a difusão das moléculas, e ao aumento da expressão de bombas de efluxo na superfície das células (MAYER et al., 2013; SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). Outra temática importante é no que se refere a dispersão das células, onde o estudo de UPPULURI et al. (2010) revelou que as células que foram disseminadas do biofilme tornaram-se mais virulentas.

## 2.3 Epidemiologia das infecções causadas pelo gênero *Candida*

### 2.3.1 Candidemias

A espécie *C. albicans* é um dos patógenos mais comuns causadores de micoses superficiais, infecções de mucosas e infecções sistêmicas, apesar de o número de infecções causadas por outras espécies do gênero *Candida* terem aumentado significativamente nos últimos anos (PFALLER e DIEKEMA, 2007; LIONAKIS et. al., 2013; WANG et. al., 2016).

A candidemia é um problema crescente em hospitais terciários de todo o mundo (PFALLER e DIEKEMA et al., 2007; COLOMBO, et. al., 2014; AHMED et al., 2014). Estudos apontam espécies do gênero *Candida* como um dos microrganismos mais isolados em amostras de sangue de pacientes internados em hospitais (MAGILL et al., 2014). As infecções da corrente sanguínea (ICIs) causadas por espécies de *Candida* spp. são causas significativas de morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes de unidades de terapia intensiva e pacientes com malignidade hematológica (OZ, GOKBOLAT, 2018).

Segundo COLOMBO et al., (2017) em pacientes com neoplasias hematológicas e receptores de transplante de células-tronco, as espécies de *Candida* surgem como o grupo mais comum de infecções fúngicas, onde, a candidemia e a candidíase intra-abdominal são duas grandes preocupações em termos de morbimortalidade. Em um estudo retrospectivo multicêntrico feito por BASSETI et al., (2017) em 10 centros na Europa e no Brasil, de um total de 42 pacientes receptores de transplantes com infecções fúngicas, as candidemias representaram a maioria dos casos (57,1%), seguida pela candidíase intra-abdominal (42,9%), onde a candidemia mostrou-se como um fator de risco associado a mortalidade.

A candidemia é a infecção fúngica mais importante em pacientes hospitalares em todo mundo, sendo causadora de sepse e gerando altas taxas de mortalidade e grandes custos hospitalares (DRGONA, et al., 2014; PFALLER et al., 2016). Esses episódios contribuem para o aumento da permanência hospitalar e para as despesas médicas, representando um dos maiores encargos financeiros para os sistemas de saúde (MORGAN, et al., 2005).

A incidência de candidemia varia consideravelmente entre as regiões geográficas e entre os centros médicos. Na Europa e nos Estados Unidos, por exemplo, foram reportadas taxas de 0.2-1.87 e 0-2.4 por 1000 admissões hospitalares, respectivamente. Na América Latina e no Brasil, a candidemia nosocomial é um importante problema de saúde pública (NUCCI et al., 2013).

Em estudo publicado por ULU KILIC et al., (2017) em um hospital terciário na Turquia, foi avaliada a incidência de candidemias num período de 6 anos. Os autores

descreveram que a incidência anual de candidemia foi de quase 0.30 casos/1000 admissões, sendo a *C. albicans* o principal isolado (48.1% dos episódios), seguidas das estirpes de *C. parapsilosis* (25.1%) e *C. glabrata* (11.7%). Contudo, as espécies não albicans foram responsáveis por um tempo maior de internação, uma média de 20 dias. Além disso, os episódios de candidemia representaram uma alta mortalidade.

No Brasil, foram reportadas taxas de 2.49 casos de candidemias por 1000 internações, com aproximadamente 50% de mortalidade (COLOMBO, et al., 2006). Estudos epidemiológicos sugerem que *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são as espécies-não-albicans mais frequentes isoladas no Brasil (NUCCI, et al., 2013).

Em um trabalho mais recente realizado na unidade de emergência do hospital das clínicas de Ribeirão Preto - SP, CANELA et al., (2017) referiram que no período de 2014 a 2015, da totalidade de 79 isolados de *Candida* spp. oriundas de sangue, houve um predomínio das espécies de *C. albicans* (44%), seguido respectivamente por *C. glabrata* (19%), *C. tropicalis* (19%), *C. parapsilosis* (14%) e *C. orthopsilosis* (4%). A incidência de candidemia foi de 1.52 casos/1000 admissões e a taxa de mortalidade nesses pacientes foi aproximadamente de 52%.

Além da alta morbidade e mortalidade, as candidemias estão relacionadas a um ônus econômico de cerca de US \$ 300 milhões por ano nos Estados Unidos. Quando comparamos com pacientes hospitalizados sem candidemias, os pacientes com candidemias possuem gastos hospitalares maiores e ficam em média mais dias internados, gerando ônus consideráveis aos serviços hospitalares (ULU KILIC et al., 2017).

Além disso, o surgimento de espécies de *Candida* não albicans com sensibilidade reduzida ou resistência intrínseca a compostos antifúngicos, principalmente os azóis, é um grande problema devido ao uso crescente de fluconazol (FLC) na terapia de candidíases (LIMA et al., 2017).

### **2.3.2 Candidíase vulvovaginal (CVV)**

A candidíase vulvovaginal (CVV) é um dos diagnósticos mais frequentes na ginecologia. Estima-se que 75% das mulheres adultas apresentaram, pelo menos uma vez na vida, algum episódio dessa infecção. A grande taxa de recorrência, que se caracteriza por pelo menos três infecções anuais, e presença de mecanismos de resistência tem feito o tratamento de CVV um desafio crescente (De MEDEIROS et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014).

A CVV é muito comum em mulheres adultas, atingindo a faixa etária entre 20 a 40 anos. Estima-se que 50% das mulheres com idade de 25 anos terá pelo menos um episódio de

candidíase vulvovaginal e entre as mulheres pré-menopausa, 75% terão sofrido pelo menos um episódio de CVV e 45% sofrido dois episódios ou mais (TUR, 2013). A CVV tem incidência aproximada de 25%, e ocupa o segundo lugar entre as vaginites, precedido apenas pela vaginite bacteriana (FEUERSCHUETTE et al., 2010).

Dentre os casos de candidíase vulvovaginal 80% a 90% são devidos a *C. albicans*; 10% a 20% são causadas por espécies não albicans (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*). (CORSELLO, 2003). O desenvolvimento da candidíase vulvovaginal depende de uma colonização prévia pelo microrganismo seguida de uma redução da imunidade da paciente (SOBEL, 2007). O período gestacional, o uso de contraceptivos orais de altas doses, a terapia de reposição hormonal, o diabetes mellitus não controlado, e o uso de antibióticos sistêmicos ou tópicos estão associados com o aumento de glicogênio, que age como um elemento nutritivo e facilitador do crescimento fúngico, favorecendo dessa forma o surgimento da CVV (HOLANDA et al., 2007; TUR, 2013).

### 2.3.3 Candidíase oral

Estima-se que os microrganismos do gênero *Candida*, principalmente a *C. albicans*, estejam presentes na cavidade bucal de aproximadamente 75% da população. Nos indivíduos imunocompetentes, essa colonização geralmente permanece benigna. Contudo, em situações de imunocomprometimento, o hospedeiro pode sofrer infecções na cavidade oral. As infecções orais causadas pelas espécies do gênero *Candida* são chamadas de “candidíase oral”. Na candidíase oral as manifestações clínicas são variadas e podem ser observadas desde achados locais, como por exemplo as estomatites, até formas mais graves e generalizadas como a candidíase hiperplásica crônica (RUHNKE, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2004). Esse tipo de infecção é causado predominantemente pelas cepas de *C. albicans*, onde em pacientes imunocomprometidos, pode haver a colonização de outras regiões como a orofaringe e o esôfago (PAPAS et al., 2009).

Em um estudo realizado por MAÑAS et al., (2012) em uma unidade de tratamento oncológica na Espanha, foi observado que de um total de 92 pacientes, 26% apresentaram um quadro clínico de candidíase de orofaringe, onde a *C. albicans* foi o micro-organismo mais isolado. Num outro estudo feito BERBERI et al., (2015), o autor avaliou as formas clínicas da candidíase oral, onde, constatou uma maior prevalência da forma pseudomembranosa. Ainda nesse mesmo estudo, a *C. albicans* foi a espécie mais frequente, sendo isolada em 92% das amostras coletadas.

## 2.4 Principais agentes antifúngicos

O tratamento das infecções fúngicas invasivas possui poucas opções terapêuticas. Atualmente, apenas três classes de antifúngicos são utilizadas na prática clínica (azólicos, equinocandinas e poliênicos), com um total de 8 drogas aprovadas pelo FDA (US Food and Drug Administration) (LEPAK e ANDES, 2011). O número reduzido de drogas antifúngicas quando comparadas as antibacterianas, consiste em parte as dificuldades inerentes à identificação de um agente eficaz que atue em células fúngicas, que são eucarióticas, sem ser tóxico para as células hospedeiras (LEPAK e ANDES, 2011; SILVA *et al.*, 2012).

Segundo as diretrizes da Sociedade Americana de Doenças Infeciosas (IDSA) para o tratamento das candidemias, o fluconazol pode ser usado como uma alternativa aceitável para o tratamento de primeira linha de pacientes não graves, onde em casos mais graves recomenda-se o uso das equinocandinas ou anfotericina-B. Porém, a mais recente diretriz da IDSA pode potencialmente dispor as equinocandinas como a terapia de primeira linha, apesar de atualmente o fluconazol ainda ser amplamente prescrito (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2017; PAPPAS *et al.*, 2016). Contudo, no Brasil, segundo a relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME, 2017), apenas o Fluconazol, o Itraconazol e a Anfotericina B encontram-se disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas invasivas.

### 2.4.1 Anfotericina B

A anfotericina B (ANFO) é um macrolídeo poliênico heptaênico (7ligações duplas conjugadas; 1 micosamina ligada ao anel principal) com comportamento anfotérico. Sua descoberta remota ao ano de 1955, onde Instituto Squibb de Pesquisa Médica isolou a anfotericina B a partir do *Streptomyces nodosus*, após a coleta de amostras de solo próximas ao rio Orinoco, na Venezuela. O seu mecanismo de ação de se baseia na interação da anfotericina B com a porção esterol da membrana fúngica, onde em decorrência disso, esse antifúngico parece levar a formação de poros na membrana plasmática. Aparentemente a porção micosamina da molécula interage eletrostaticamente com as hidroxilas do ergosterol. A Anfotericina B liga-se não só ao ergosterol mas também ao colesterol nas células hospedeiras, o que o torna altamente tóxico (GRAY, *et al.*, 2012; GOODMAN, 2013). Alguns autores apontam para o envolvimento do estresse oxidativo na atividade antifúngica da anfotericina B, especialmente nas cepas de *C. albicans*. Em um estudo feito por ARANGO *et al.*, (2014), foi evidenciado que a produção de EROs pela ANFO é um mecanismo de ação universal e que está diretamente correlacionado com o seu efeito fungicida.

A anfotericina B é um dos antifúngicos mais potentes, demonstrando atividade ampla frente a espécies de leveduras, incluindo *Cryptococcus* spp. e a maioria das espécies de *Candida* spp., com a exceção da *C. lusitaniae* (NETT & ANDES, 2016). A anfotericina B, assim como todos os Macrolídeos poliênicos, apresenta baixa hidrossolubilidade e uma toxicidade considerável após administração parenteral. Cabe destacarmos, que a devido a presença de grupos carboxilas e aminas, a anfotericina B apresenta solubilidade em extremos de pH (GOODMAN, 2013).

Um total de quatro formulações de anfotericina B estão disponíveis na clínica médica: Anfotericina B convencional (C-AMB); Anfotericina B lipossomal (L-AMB); Complexo lipídico anfotericina B (ABLCL); Dispersão coloidal anfotericina B (ABCD). A C-AMB, é insolúvel em água, mas tem sua formulação desenvolvida para a via intravenosa, devido ao fato de o fármaco formar um complexo com um sal biliar (desoxicolato). Esse complexo é comercializado na forma de um pó liofilizado para injeção. A ABCD, possui quantidades equimolares de ANFO e de sulfato de colesteril formuladas para injeção, contudo essa formulação alcança níveis sanguíneos inferiores as da C-AMB. Atualmente, a ABCD tem seu uso aprovado para o tratamento da aspergilose invasiva em pacientes incapazes de tolerar a C-AMB. A L-AMB é uma formulação composta por diminutas vesículas e é vendido comercialmente sob a forma de pó liofilizado para injeção. A L-AMB apresenta níveis sanguíneos equivalentes aos da C-AMB, após a administração intravenosa, além de ter um correspondência no que se refere ao sucesso do tratamento empírico em pacientes neutropênicos febris. Contudo o acúmulo da L-AMB no fígado e no baço é maior, quando comparado com a C-AMB. O ABLCL é um complexo de ANFO com lipídeos (diesteroilfosfatidilcolina e diesteroilfosfatidilglicerol), onde seus níveis sanguíneos são inferiores as da C-AMB. Esta formulação tem seu uso aprovado para a terapia de recuperação de micoses profundas (GOODMAN, 2013; FILIPPIN e SOUZA, 2006).

#### **2.4.2 Antifúngicos azólicos**

Os antifúngicos azólicos abrangem duas grandes classes, os imidazóis e os triazóis. O mecanismo de ação geral deste grupo de fármacos é através da inibição da enzima 14 $\alpha$ -esterol demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica, por meio da ligação ao sítio enzimático, impedindo a demetilação do lanosterol em ergosterol e levando a um acúmulo de 14 $\alpha$ -metilesteróis. Esses metilesteróis podem desagregar o arranjo compacto das cadeias acil dos fosfolipídios, comprometendo as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados a membrana. Alguns azólicos de uso tópico podem agir aumentando diretamente a

permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo (GOODMAN, 2013; SIDRIM & ROCHA, 2004).

O primeiro relato da atividade antifúngica de um composto azólico foi feita por Wooley e colaboradores em 1944, onde foi demonstrado uma atividade antifúngica do Benzimidazol frente a cepas de *Sacharomyces cerevisiae* (MAERTENS, 2004; WOOLEY et al., 1944). Contudo, o início do interesse pelos compostos azólicos só se inicia em 1958 com a introdução do Clormidazol, um derivado do Benzimidazol. Devido ao entusiasmo da indústria farmacêutica, no início da década seguinte 3 novos compostos tópicos foram inseridos no mercado: o Clotrimazol pela Bayer<sup>®</sup>, Miconazol e Econazol pela Janssen Pharmaceutical<sup>®</sup>. Em 1969 foi lançado no mercado o primeiro azol para uso parenteral, o miconazol. Entretanto, o seu primeiro uso foi documentado somente em 1978, no celebre trabalho do Dr Wust, onde foi relatado o sucesso no tratamento de 6 pacientes com candidíase sistêmica e de 3 pacientes com infecção pulmonar (WÜST & LENNARTZ, 1978). Apesar do sucesso obtido no tratamento da candidíase sistêmica, o uso parenteral do Miconazol ficou limitado em decorrência de sua toxicidade.

Em 1981, a FDA (Food and Drugs Administration) aprovou o uso sistêmico do Cetoconazol, um derivado imidazólico desenvolvido pela Janssen Pharmaceutical<sup>®</sup>. No decorrer da década de 80, este fármaco tornou-se o tratamento padrão para as infecções fúngicas sistêmicas, além de ser, até aquele momento, o único agente antifúngico oral disponível. Além disso, seu uso foi recomendado como alternativa eficaz para o tratamento pela anfotericina B nas blastomicoses, histoplasmose e paracoccidiodomicose em pacientes imunocompetentes. Contudo, o Cetoconazol demonstrou ineficácia no tratamento das infecções profundas acometidas pelo gênero *Candida* e ineficácia frente as aspergiloses e zigomicoses MAERTENS, (2004)

Além disso, ao longo dos anos, o Cetoconazol apresentou diversas deficiências clínicas, tais como: baixa penetração na barreira hematoencefálica (BHE), diversos efeitos colaterais (exemplo: hepatotoxicidade), baixa eficácia em imunocomprometidos (fungistático), doses maiores que 400mg/dia inibiam a testosterona. Diante disso, no final dos anos 80, um novo grupo de agentes antifúngicos foram lançados e denominados de triazóis (MAERTENS, 2004; GOODMAN, 2013). O primeiro triazolico para uso humano comercializado foi o Terconazol, cujo o intuito terapêutico seria o tratamento da candidíase vaginal e das dermatomicoses. Contudo, no início dos anos 90 são lançados os dois primeiros triazólicos de amplo espectro, o fluconazol e o itraconazol (MAERTENS, 2004).

A introdução da primeira geração dos triazólicos representou um grande avanço no tratamento de infecções fúngicas. Tanto o fluconazol quanto o itraconazol apresentaram um espectro mais amplo de atividade antifúngica que os imidazóis e tiveram um perfil de segurança marcadamente melhorado em comparação com a anfotericina B e o cetoconazol. O Fluconazol foi inserido no mercado pela Pfizer® e em 1990 teve seu uso em humanos aprovado. Porém, o fluconazol apresentou baixa eficácia frente as aspergiloses e algumas cepas do gênero *Candida*. Em 1992, o Itraconazol (Janssen Pharmaceutical®) foi aprovado pela FDA. O itraconazol tem sua eficácia comprovada e é aprovado pela FDA para o tratamento da candidíase de orofaringe e esôfago. Contudo, seu uso para os tratamentos das candidemias é limitante, pois a solução de itraconazol produz mais efeitos colaterais ao trato gastrointestinal, tornando seu uso restrito somente aos pacientes que não respondem ao fluconazol (GOODMAN, 2013; SIDRIM & ROCHA, 2004).

A despeito do seu uso difundido, os triazólicos tornaram-se sujeitos a uma séria de limitações clínicas importantes, principalmente relacionadas ao desenvolvimento de resistência, interações medicamentosas perigosas, perfil farmacocinético abaixo do ideal, e toxicidade. Dessa forma, com o intuito de superar tais limitações, novos análogos foram desenvolvidos e inseridos no mercado no início do século XXI. Os triazólicos ditos de "segunda geração", incluem o voriconazol, posaconazol e o ravuconazol. Essas moléculas apresentam uma maior potência e possuem uma atividade melhorada contra patógenos resistentes e emergentes, em particular contra *Aspergillus* spp (MAERTENS, 2004; GOODMAN, 2013). Segundo MAERTENS (2004), esses compostos representaram uma verdadeira expansão do arsenal antifúngico, pois possuem um perfil de toxicidade melhor que o dos triazóis de primeira geração e possuem as interações medicamentosas controláveis.

## **2.5 Resistência aos antifúngicos nas infecções por *Candida***

### **2.5.1 Resistência aos poliênicos**

Os poliênicos são produtos naturais isolados do *Streptomyces nodosus*, um actinomiceto de solo. Os poliênicos representam uma família com mais de 500 moléculas, contudo, somente anfotericina B encontra-se disponível pra o tratamento das infecções em humanos. Apesar de sua toxicidade elevada, este fármaco continua sendo a primeira escolha para o tratamento da maioria das micoses sistêmicas em pacientes imunocomprometidos (FILIPPIN & SOUZA, 2006). Porém, nos últimos anos, o aumento no consumo dos poliênicos

tem levado a ocorrência de resistências de cepas de *Candida* spp., em especial de *C. glabrata* (BAILLY et al., 2016).

Nos Estados Unidos, OSTROSKY-ZEICHNER et al., (2003), em um estudo multicêntrico sobre candidemias avaliaram a sensibilidade à anfotericina B em 2000 isolados de *Candida* spp., dos quais 0,8% possuíam resistência ao poliênico. Essa resistência foi observada nos isolados de *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*. Em um outro estudo, AL-DORZI, et al (2018) foi revelada uma crescente resistência de cepas de *Candida* spp. oriundas de pacientes das unidades de terapia intensiva, onde foi possível detectar que a anfotericina B ocorreu em 3,1% dos isoaldos. Um pesquisa feita por MARQUEZ (2017) num centro assistencial de alta complexibilidade no Chile, mostrou que a anfotericina B apresentou atividade em 90% dos 37 casos de candidemia relatados, porém nas cepas de *C. krusei* e de *C. parapsilosis* foi evidenciado um perfil de sensibilidade dependente da dose.

No Brasil, MENEZES, et al (2016) demonstrou a resistência *in-vitro* à anfotericina B (cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. kefyr*) em 12,7% das 63 amostras isoladas em um hospital universitário de Minas Gerais, todas com CIM de 2 µg/mL. Em um trabalho realizado por TERÇAS, et al 2017 no Hospital Presidente Vargas localizado em São Luiz – MA, a partir de isolados de *Candida* spp, oriundos da orofaringe de pacientes hospitalizados com Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), que 4% dos isolados apresentaram resistência a anfotericina B.

## 2.5. Resistência aos azólicos

No início dos anos 90, o fluconazol, até então o primeiro antifúngico triazólico de amplo espectro, é aprovado para uso humano. Seu assentimento representou um marco na terapia antifúngica tendo em vista que, ao contrário dos seus antecessores, como por exemplo o Cetoconazol, este antifúngico não apresentava as mesmas deficiências clínicas. A partir de então, deu-se início a era dos triazólicos, onde em 1992 a FDA aprovou o uso em humanos do itraconazol e no ano 2000 o uso do voriconazol, posaconazol e ravuconazol (MAERTENS, 2004).

Contudo, na metade da década de 90, os primeiros relatos sobre a resistência aos azólicos são divulgados, onde os trabalhos apontam para uma resistência mediada pelas bombas de efluxo e por alterações no gene ERG 11 (MAERTENS, 2004). Com isso, o avanço da resistência aos atuais agentes antifúngicos azólicos a que são usados na clínica transformou-se em um problema gradativo, principalmente em pacientes que necessitam de um tratamento a

longo prazo ou aqueles que recebem uma profilaxia antifúngica (ARENDRUP & PATTERSON, 2017). Este fato torna-se preocupante, tendo em vista que o fluconazol é um fármaco relativamente barato e bem tolerado quando administrado por via oral (WIEDERHOLD, 2017).

De uma forma generalizada a resistência adquirida aos azóis, principalmente nas cepas de *Candida* spp., é frequentemente descrita em pacientes com AIDS e candidíase de orofaringe ou mucosa. (ARENDRUP & PATTERSON, 2017). Dentro desta perspectiva, segundo WHALEY et al., (2017), as taxas elevadas de resistência de cepas de *Candida* spp. nestes pacientes estão associadas ao tratamento prévio com o fluconazol. Além disso, algumas espécies de *Candida* spp. são intrinsecamente resistentes ou menos sensíveis aos azólicos.

Na maior parte dos casos, os patógenos mais comuns em infecções fúngicas são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Contudo, a preponderância das espécies diverge quanto a geografia, os riscos do hospedeiro e a prática clínica. Globalmente existe um predomínio das espécies de *C. albicans* (44-70% dos casos), sendo a *C. tropicalis* a segunda espécie mais comum no sul e sudeste asiático. A *C. glabrata* é a espécie não-albicans mais isolada nos EUA e Reino Unido. No continente europeu, de uma forma geral, a *C. parapsilosis* predomina perante as não-albicans. No Brasil, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* compartilham a mesma segunda posição. A *C. auris* surgiu mais recentemente, causando 5,2% das candidemias em UTI's na Índia (COLOMBO et al, 2017).

Apesar da *C. albicans* ser o isolado mais comum nos pacientes com candidíase, a resistência antifúngica é incomum, onde estudos de vigilância sugeriram que a resistência ao fluconazol é inferior a 2% (PERLIN et al., 2017). Todavia as infecções cometidas pelas espécies não albicans estão se tornando as mais importantes em várias regiões do mundo, merecendo destaque a *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (WIEDERHOLD, 2017). Este fato torna-se mais relevante com a explanação da Organização Mundial de Saúde de que a resistência ao fluconazol é de fato mais comum nas espécies de *Candida* não albicans (WHO, 2014).

Em um trabalho descrito por CASTANHEIRA et al., (2016), com dados oriundos do “SENTRY Antifungal Surveillance Program”, em 2013, dos 1846 isolados clínicos de 31 países, 11.9% e 11.6% das estirpes de *C. glabrata* e *C. tropicalis*, respectivamente, foram resistentes ao fluconazol. O Programa de Vigilância Antifúngica da ARTEMIS descreveu uma expansão da resistência ao fluconazol nas estirpes de *C. glabrata* nos EUA, de 9% em 1992-2001 para 14% em 2001-2007 (PFALLER et al., 2009). Experiências publicadas em alguns centros dos EUA, mostraram taxas de resistência ao fluconazol em 14% dos isolados de *C.*

*glabrata*, acompanhados por 7,5% nos isolados de *C. parapsilosis* e 9% dos isolados de *C. tropicalis* (PERLIN et al., 2017).

Em um trabalho conduzido por MORETTI et al., (2013), no hospital universitário das clínicas da Universidade de Campinas, foi verificada que entre os anos de 2006 a 2010, a *C. albicans* foi responsável por 44% dos episódios gerais de candidemia, seguida por *C. tropicalis* (21,7%), *C. parapsilosis* (14,4%), *C. glabrata* (11,2%) e *C. krusei* (3,5%). Contudo, o autor revela que a incidência de *C. glabrata* aumentou significativamente de 2006 a 2010, sugerindo que outros fatores de risco podem ter um papel importante, excetuando o fluconazol, podem ter um papel importante.

Em um estudo de vigilância multicêntrica realizado por DOI et al., (2016) em 16 hospitais distribuídos em cinco regiões do Brasil, foi avaliada a sensibilidade aos antifúngicos em cepas de *Candida* spp oriundas da corrente sanguínea. Nessa pesquisa foi relatado que as espécies de *Candida* não-*albicans* representaram 65,7% dos isolados de leveduras. Contudo, todos os isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* mostraram-se sensíveis ao fluconazol. No entanto, dos isolados de *C. glabrata*, 36% eram resistentes ao fluconazol.

Um outro estudo feito por LIMA et al., (2017), em um hospital universitário no centro-oeste brasileiro, revelou que dentre os isolados de *Candida* spp. oriundos de amostras de urina, a maior parte eram representadas pelas espécies não-*albicans*, onde as estirpes de *C. glabrata* apresentaram os maiores índices de resistência. Dessa maneira observamos que a *C. glabrata* está emergindo como uma das principais causadoras de *Candida* spp não-*albicans* no Brasil.

Uma pesquisa realizada no Hospital Presidente Vargas, na cidade de São Luiz-MA, com isolados de *Candida* spp. coletados da mucosa de orofaringe de 52 pacientes hospitalizados com AIDS. Na presente pesquisa houve uma prevalência das espécies de *C. albicans*, porém a taxa de resistência foi maior nas espécies não-*albicans*, principalmente as espécies de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. famata* (TERÇAS et al., 2017).

No final da década passada, uma nova espécie de *Candida* foi descrita como um agente causador de otomicose, a partir de então a *C. auris* emergiu rapidamente nos cinco continentes, representando um sério problema de saúde pública. Estudos já demonstraram que sua virulência é semelhante a *C. albicans* e possuem resistência universal ao fluconazol (COLOMBO et al, 2017; SCHWARTZ & PATTERSON, 2018). Sua presença já está intrinsecamente relacionada com grandes surtos em hospitais no Reino Unido e nos Estados Unidos (SCHELENZ et al., 2016; TSAY et al., 2017).

Vale ressaltar, também, que a *C. auris* possui uma demasiada capacidade de provocar infecções nosocomiais, isto em parte está relacionado com sua capacidade de persistir em pacientes e superfícies ambientais por longos períodos. Além do mais, os métodos de identificação fenotípica não são eficazes frente as cepas de *C. auris*, levando a atrasos nas medidas de prevenção e controle da infecção (SCHELENZ et al., 2016).

OSTROSKY-ZEICHNER et al., (2017), avaliaram pacientes adultos que receberam fluconazol durante a internação em 150 hospitais nos EUA, no período de 2004 a 2013. Da totalidade dos pacientes envolvidos no estudo (987), 49% falharam ao tratamento com fluconazol. Dos que falharam, 70% trocaram ou acrescentaram outro antifúngico, 21% tiveram um segundo teste positivo de *Candida* spp. e 42% morreram durante a hospitalização.

Dentro deste contexto, a resistência a drogas antifúngicas, principalmente nas espécies de *Candida* spp., tornou-se cada vez mais relevante na condução das infecções fúngicas invasivas. Vale ressaltar, também, que estas infecções possuem taxas elevadas de morbimortalidade, além do mais espécies MDR (“Multidrug-Resistant”) de *C. glabrata* e *C. auris* emergiram como espécies importantes em centros médicos, representando um desafio significativo no gerenciamento destas infecções. Desse modo, um diagnóstico micológico preciso acompanhado de uma terapia guiada por testes de sensibilidade devem ser usados para otimizar o manejo clínico (ARENDRUP & PATTERSON, 2017).

## **2.6 Importância de novas estratégias terapêuticas**

A busca por novos fármacos com outras indicações terapêuticas é uma proposta interessante para o tratamento de estirpes resistentes aos antimicrobianos e nos últimos anos diversas publicações científicas do mundo inteiro vem abordando esse tema (DA SILVA et al., 2013; BRILHANTE et al., 2010; COSTA e SILVA et al. 2017; ANDRADE NETO et al., 2019). Se comparamos com as metodologias tradicionais de busca de moléculas antimicrobianas, o redirecionamento de fármacos possui diversas vantagens, tais como a disponibilidade na literatura dos dados referentes aos aspectos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos (SERAFIN e HÖRNER, 2018).

Dentro deste contexto, esta abordagem permite uma redução no tempo de desenvolvimento de novos fármacos o que permite uma redução considerável dos custos de produção, o que torna esta interpelação uma alternativa estratégica interessante para o descobrimento de novas moléculas (MEHNDIRATTA et al., 2016; SERAFIN e HÖRNER, 2018). Ainda dentro desta abordagem, é importante ressaltarmos que o redirecionamento dos fármacos ou de drogas em vários estágios de teste, são particularmente úteis nos países pobres

e emergentes, com o intuito da promoção e fortalecimento da pesquisa e da indústria farmacêutica (CHONG et al., 2007; SAVOIA, 2016).

Segundo dados provenientes da FDA, nesta década o reposicionamento de medicamentos é responsável por quase 30% das moléculas aprovadas nos EUA. Dessa forma, JIN & WONG (2014), abordam que a “reciclagem” de fármacos antigos, o resgate de “drogas engavetadas” e o prolongamento da vida das patentes tornariam o reposicionamento de drogas uma forma atraente para a descoberta de novas drogas

A combinação de antimicrobianos em busca de atividades sinérgicas tem sido utilizado nas últimas décadas, principalmente para o tratamento das infecções bacterianas crônicas (GOODMAN, 2013; SERAFIN e HÖRNER, 2018). Os tratamentos sinérgicos possibilitam uma expansão do espectro de ação do antimicrobiano, dificultam o surgimento de novas estirpes resistentes e superam os mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Dentro desse contexto, a combinação de drogas não antimicrobianas com os antimicrobianos pode consistir numa opção terapêutica válida para superar o problema da fraca atividade de drogas individuais, onde os não antibióticos são compostos auxiliares que podem aumentar a atividade *in vitro* de certos antimicrobianos (GUO et al., 2008; KRUSZEWSKA, et al., 2010; TOBUDIC et al., 2012; SERAFIN e HÖRNER, 2018).

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

Dessa forma SERAFIN e HÖRNER (2018), apontam que o uso de drogas não-antimicrobianas com perfis de toxicidade determinados, podem representar alternativas promissoras para o tratamento das infecções. Contudo, segundo os mesmos, o redirecionamento de fármacos deve ser encarado como apenas um ponto de partida, onde estudos adicionais devem ser inseridos, tais como a descrição do mecanismo de ação e estudos de genotoxicidade e mutagenicidade, dentre outros, seriam de suma importância para um uso seguro e racional destas medicações.

## 2.7 Atividade antimicrobiana dos anestésicos

Nos últimos anos diversos estudos tem demonstrado o efeito antibacteriano dos fármacos anestésicos, tanto intravenosos quanto locais, como também seu efeito combinado com outras drogas. (BEGEC *et al.*, 2013, ALDLER, D.; DAMBORG, P.; VERWILGHEN, D., 2017). Dentre os anestésicos locais, a lidocaína é o fármaco mais detalhadamente estudado, demonstrado sua propriedade antimicrobiana tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Alguns dos resultados mais promissores já citados a respeito da lidocaína diz respeito ao seu uso na redução da incidência de endoftalmite após injeção intravítrea, profilaxia para infecções de ferida cirúrgica, prevenção de infecção associada à cateter e redução de biofilme na mucosa oral (RAZAVI, D.; BAZZAZ, B., 2019).

No que tange ao efeito da lidocaína como antimicrobiano no mucosa oral, demonstrou-se que um spray do referido fármaco a 10% possui atividade bactericida contra *E. coli*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus salivaris* com um minuto de aplicação. A aplicação de spray de lidocaína no mucosa por três minutos causou 60-95% de redução de biofilme formado. De acordo com o estudo, o efeito foi dependente do tempo de exposição e da concentração do fármaco (SRISATJALUK, R.; KLONGNOI, B.; WONGSIRICHAT, N., 2016).

Outro estudo conduzido por LU *et al.* (2014) demonstrou que uma infusão contínua de lidocaína através de bomba osmótica inibiu o crescimento de *S. aureus* em feridas cirurgicamente criadas em ratos, constatando uma redução de dez vezes no crescimento bacteriano. É importante ressaltar que o efeito antibacteriano nesse estudo foi descrito como dose-dependente, assim como o uso da lidocaína como anestésico em cirurgias poderia diminuir a probabilidade de desenvolvimento de infecção em sítio cirúrgico.

A atividade da bupivacaína também já foi demonstrada. Em uma concentração de 2,5mg/mL, metade da concentração utilizada na prática clínica, inibiu 93% dos isolados utilizados em um estudo (n=37/40), com ênfase na inibição das espécies de *S. aureus* e *E. coli*. Já para *P. aeruginosas* a concentração inibitória mínima (CIM) foi de 5 mg/mL (ALDLER, D.; DAMBORG, P.; VERWILGHEN, D., 2017). Esse resultado corrobora com os achados de GRIMMOND e BROWNRIDGE (1986), os quais determinaram que na concentração de 2,5mg/mL (CIM) a bupivacaína inibi o crescimento de *E. coli*, *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*.

PELZ *et al.* (2008), realizou uma análise do potencial antimicrobiano de sete preparações comerciais de anestésicos (cloridrato de articaína, cloridrato de bupivacaína, cloridrato de mepivacaína, lidocaína, prilocaína, hidrocloreto de procaína e hostacaína)

contra 311 cepas de bactérias de 52 espécies diferentes e 14 cepas de *Candida albicans*, todos os patógenos pertenciam a flora da pele, oral e intestinal. Os valores das CIM de todos os anestésicos locais variaram entre 0,25 e 16 mg/mL<sup>-1</sup>. No que tange ao efeito antifúngico, PINA-VAZ, (2000) encontrou valores de CIM entre 12,5-50,0 µg/mL, 5,0- 40,0 mg/mL e 2,5-10,0 mg/mL para benzidamina, lidocaína e bupivacaína, respectivamente, para espécies de *Candida albicans* e não-albicans. Esse efeito foi atribuído a geração de dano na membrana da célula fúngica, bem como devido a inibição seletiva de canais de sódio (RODRIGUES, *et al.*, 2000).

Comparações da atividade antimicrobiana de diferentes anestésicos, principalmente de uso local, também tem sido relatada. Em um estudo demonstrou-se que a ropivacaína não inibiu nenhum dos microrganismos testados (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*). A bupivacaína reduziu as células viáveis de *P. aeruginosa* em soluções a 0,5% e 0,25%. Diluições de lidocaína a 5% e 2% e prilocaína a 2% reduziram as células viáveis de todos os microrganismos utilizados e a prilocaína a 1,0% reduziu as células viáveis de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A lidocaína 1% reduziu apenas as células viáveis de *P. aeruginosa* e a prilocaína a 0,5% reduziu apenas *E. coli* (AYDIN, O.; EVIGOR, M.; ARYDIn, N., 2001).

## 2.8 Cetamina

A cetamina (“Special K”) é um anestésico dissociativo, também usado atualmente como droga de fins recreativos (MORGAN & CURRAN, 2012). Um análogo, a fenciclidina (PCP, “pó de anjo”) era um alucinógeno popular na década de 1970, porém seu uso declinou. Esses fármacos produzem a sensação de euforia. Em doses mais elevadas podem causar alucinações e sensação de desligamento, desorientação e torpor. A PCP foi descrita como causadora de episódios psicóticos e é usada em animais de experimentação para a produção de um modelo para a esquizofrenia (RANG, 2016).

Seu principal efeito farmacológico é o bloqueio do canal receptor de NMDA. Certa vez, isso foi erroneamente descrito como “ação nos receptores de  $\sigma$ -opioides”. A metoxetamina, um derivado químico da cetamina, é um antagonista NMDA e um inibidor da recaptura de 5-HT, o que pode contribuir para os seus efeitos no SNC (RANG, 2016).

Com o uso repetido da cetamina desenvolve-se tolerância, resultando na ingestão de doses cada vez maiores para atingir o mesmo efeito. O uso repetido está associado a efeitos tóxicos sérios e persistentes, incluindo dor abdominal, cistite ulcerativa (com dor intensa da bexiga associada), danos hepáticos e disfunção cognitiva (MORGAN & CURRAN, 2012). A

combinação de cetamina com fármacos depressores como o álcool, barbitúricos e heroína pode resultar em sobre dosagem perigosa (RANG, 2016).

A cetamina é um anestésico geral e é caracterizada pelo rápido início de ações, incluindo analgesia, anestesia, pressão arterial elevada e dilatação nas vias aéreas inferiores. Considerando seus efeitos favoráveis sobre o sistema cardiovascular e pulmonar, a cetamina pode ser particularmente valiosa para a indução da anestesia em um paciente hipovolêmico. Além disso, alguns estudos documentaram a atividade antimicrobiana da cetamina (BEGEC et al., 2013; GOCMEN, et al., 2008; KRUSZEWSKA et al., 2002).

Com relação a atividade antimicrobiana dos anestésicos intravenosos, a cetamina tem sido apontada como um agente promissor. GOCMEN, BUYUKKOCAK e CAGLAYAN (2008), demonstraram que na concentração de 125µg, a cetamina possui efeito antibacteriano contra *E. faecalis* e *P. aeruginosas*. Aumentando a concentração para 250 – 500 µg/mL a ação é mais efetiva. A concentração inibitória mínima (CIM) encontrada para *S. aureus* e *S. pyogenes* foi de 500 µg/mL. Constatando que o efeito antibacteriano é amplo e variado, estando ainda deficientes as pesquisas relacionadas a propriedade antifúngica da cetamina.

O efeito antimicrobiano da cetamina também já foi evidenciado em associação com o propofol, o qual é considerado como um bom agente de crescimento microbiano devido a sua composição. A CIM e a concentração bactericida mínima (MBC) (para *Candida*, concentração fungicida mínima) de cetamina foram determinadas como: para *E. coli* 312,5, 312,5 µg / mL; *S. aureus* 19,5, 156 µg / mL; *P. aeruginosa* 312,5, 625 µg / mL; e *C. albicans* 156, 156 µg / ml. Na mistura de cetamina com propofol, a cetamina exibiu atividade antimicrobiana para *E.coli*, *P.aeruginosa* e *C.albicans* com MBCs de 1250, 625 e 625 µg / mL, respectivamente (BEGEC, et al., 2013). Sugerindo que o uso combinado de cetamina e propofol na prática clínica pode reduzir o risco de infecção.

### 3. HIPÓTESES

- 3.1 A cetamina apresenta efeito sinérgico com o fluconazol e o itraconazol antifúngico *in vitro* frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos.
- 3.2 A cetamina apresenta efeito sinérgico com o fluconazol e o itraconazol antifúngico *in vitro* sobre o biofilme formado de *Candida* spp. resistentes a azólicos.
- 3.3 O sinergismo proposto induz apoptose nas cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos.
- 3.4 A cetamina não apresenta efeito citotóxico, mutagênico e genotóxico frente a células L929, leucócitos de sangue periférico e nos modelos com procariotos.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da Cetamina associada ou não a antifúngicos clássicos sobre o crescimento de *Candida* spp. resistentes a derivados azólicos, nas formas planctônicas e biofilme, buscando elucidar possíveis mecanismos de ação, bem como avaliar *in vitro* os efeitos genotóxicos e mutagênicos da Cetamina.

#### 4.2 Objetivos específicos

- 4.2.1 Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para Cetamina frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos pertencentes à micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará;
- 4.2.2 Avaliar a associação entre a Cetamina e os derivados azólicos (itraconazol e fluconazol) frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol;
- 4.2.3 Determinar o potencial antifúngico da Cetamina contra biofilme de *Candida* spp. resistentes a azólicos;
- 4.2.4 Investigar possíveis mecanismos de ação da Cetamina frente as células de *Candida albicans* resistentes a azólicos, através de técnicas de citometria de fluxo e ensaio do cometa;
- 4.2.5 Avaliar o efeito da Cetamina sobre a inibição da proliferação celular de fibroblastos de murinho (L929).
- 4.2.6 Caracterizar a morfologia apoptótica dos leucócitos de sangue periférico (PBLs) após exposição com a Cetamina.

4.2.7 Mensurar a produção de nitrito/nitrato, a peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas em PBLs após exposição com Cetamina.

4.2.8 Avaliar a cinética de reparação do DNA e aberrações cromossômicas dos PBLs após exposição com a Cetamina

4.2.9 Avaliar os efeitos mutagênicos da Cetamina.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Recuperação das cepas

Neste estudo foram utilizadas 14 cepas de *Candida* spp. (4 *C. albicans*, 6 *C. tropicalis*, 3 *C. parapsilosis* e 1 *C. glabrata*) oriundas de amostras clínicas e identificadas molecularmente. Além disso, utilizamos 2 cepas padrão ATCC (*C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019). Todas as estirpes clínicas utilizadas neste estudo eram da micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Os isolados haviam sido estocados em Sabouraud caldo (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Com o intuito de determinar a viabilidade celular, as culturas foram ressuspensas em caldo Sabouraud (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte, foram semeadas em Sabouraud dextrose ágar (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, verificou-se o crescimento de cada isolado em meio cromogênico HiCrome *Candida* Differential Agar (HiMedia, Mumbai, Índia), os quais foram incubados sob as mesmas condições a fim de confirmar a pureza das colônias (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014). Todo o procedimento foi realizado sob normas de biossegurança nível 2.

### 5.2 Antifúngicos

Os agentes antifúngicos utilizadas neste estudo foram: fluconazol (FLC), itraconazol (ITZ) e anfotericina B (Anfo B) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). O cloridrato de cetamina (CET) foi adquirido comercialmente (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). As soluções de ITZ e Anfo B foram diluídas em DMSO (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). O FLC e a CET foram diluídos em água destilada. As concentrações dos fármacos testados variaram de 0,125 a 64  $\mu\text{g/mL}$  para o FLC, de 0,0313 a 16  $\mu\text{g/mL}$  para ITC e Anfo B. A CET foi testada na faixa de 0,07 a 3,73 mM.

### 5.3. Teste de sensibilidade aos antifúngicos

#### 5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos

Os ensaios para determinação da sensibilidade foram realizados de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008), baseando-se na técnica de microdiluição em caldo. O meio cultura RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) ( $\text{pH } 7,0 \pm 0,1$ ) tamponado com

0,165 M ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA), foi utilizado no respectivo teste. Para a realização dos testes, foram utilizadas placas de 96 poços fundo U. Na coluna 2 foram adicionados 200 µL do agente e em seguida, realizou-se a diluição seriada para obter o intervalo de concentração desejado. A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade do meio RPMI 1640 e a coluna 12 como controle negativo do teste (inóculo + meio). Para determinar a sensibilidade das células planctônicas, as drogas foram testadas em concentrações variando de 0,25 a 128 µg / ml para fluconazol (FLC), de 0,03 a 16 µg / ml para itraconazol (ITRA) e de 0,07 - cetamina 3,73 mM (CET). Os testes foram realizados a partir de uma cultura de micro-organismos de 24 horas, onde foi realizada uma suspensão de inóculo inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI a fim de se obter um inóculo final contendo  $0,5 - 2,5 \times 10^3$  UFC/mL. Um volume de 100 µL dessa suspensão padronizada foi adicionada em cada poço contendo os agentes descritos no **item 5.2**. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 35 °C ( $\pm 2$  °C) e após esse período a realizada uma leitura visual dos resultados. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do agente antifúngico capaz de inibir 50% do crescimento do microrganismo, em comparação com o verificado no poço controle (coluna 12) para os derivados azólicos e o cloridrato de cetamina (CLSI, 2008). Para avaliar a ocorrência de resistência ao itraconazol foi levado em consideração a seguinte ponto de corte: CIM  $\geq 1$  µg/mL. No caso do fluconazol foram utilizados os subsequentes pontos de corte: CIM  $\geq 8$  µg/mL (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*) e CIM  $\geq 64$  µg/mL (*C. glabrata*). (CLSI, 2008; CLSI, 2012). Os experimentos foram realizados em triplicata e em dias diferentes. Cepas de coleção foram utilizadas como controle do teste: *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

### **5.3.2 Teste do sinergismo pela técnica de microdiluição em caldo: *checkerboard***

Após a determinação do CIM de cada droga isolada, realizamos a técnica do *checkerboard* (ODDS, 2003). Nessa técnica, cada poço contém uma combinação única de diferentes concentrações dos fármacos testados, no qual se determina o percentual de inibição do crescimento das células na presença de diferentes combinações dos fármacos em relação ao poço controle. A concentração inicial das drogas em combinação foi a própria CIM obtida para cada isolado individual. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas do fármaco, a fim de se atingir uma concentração final que fosse 256 vezes menor que a concentração final do fármaco isolado. A interação entre os fármacos foi realizada a partir da determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI) o qual é obtido pela soma do FIC de cada

fármaco, que se trata da relação entre o CIM de cada fármaco utilizado em combinação e o CIM do mesmo fármaco utilizado sozinho. Dessa forma, foram considerados os seguintes parâmetros:  $FICI \leq 0,5$ : sinergismo,  $> 4,0$ : antagonismo e  $0,5 < FICI < 4,0$ : indiferente (ODDS, 2003; SILVA et al., 2013, 2014; SILVA, et al., 2016).

#### **5.4. Testes utilizando citometria de fluxo**

##### **5.4.1 Preparo das suspensões de células de *Candida albicans***

Para os ensaios de citometria de fluxo foi utilizado um isolado de *C. albicans* (ver Tabela 2), como cepa representativa. O microrganismo foi semeado em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 horas. Em seguida, as células foram suspensas em 5 mL de meio YPD e incubadas sob as mesmas condições, com o intuito de se alcançar a fase exponencial. 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 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) (Adaptado de DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

##### **5.4.2 Tratamento das células de *Candida albicans***

Para a determinação da viabilidade celular, avaliação do potencial transmembrana mitocondrial, detecção de espécies reativas de oxigênio e externalização de fosfatidilserina, o isolado de representativo de *C. albicans* resistente ao fluconazol foi exposto ao fluconazol (64 µg/ml), itraconazol (0.5 µg/ml), cetamina (3,73 mM), cetamina (0.93 mM) + fluconazol (8 µg/mL), e cetamina (0.7 mM) + itraconazol (0.03 µg/mL). O meio de cultura RPMI foi utilizado como controle negativo do teste e a anfotericina B (4 µg/mL) foi controle de morte. As células tratadas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

##### **5.4.3 Determinação da viabilidade celular**

As células de *Candida* spp. após exposição aos tratamentos propostos no **item 5.4.2** foram marcadas com iodeto de propídeo (PI) e analisadas por citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013, 2014; ANDRADE NETO, 2014).

#### **5.4.4 Determinação do potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) em células de *Candida albicans***

A rodamina 123 (Rh 123) é um corante lipofílico que é facilmente transportado para o interior da mitocôndria. Dessa forma, as células viáveis terão maior afinidade pelo corante (mitocôndria não despolarizada), de modo que as mitocôndrias despolarizadas emitirão menor intensidade de fluorescência. As células de leveduras após exposição aos tratamentos propostos no **item 5.4.2**, foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), incubadas com rodamina 123 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) (Sigma, USA) a 37 °C por 15 min no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas a 37 °C por 30 min. A fluorescência foi determinada por citometria de fluxo. Para cada experimento, 10000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

#### **5.4.5 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) em células de *Candida albicans***

Com o intuito de avaliar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) intracelular, utilizamos o marcador citofluométrico diacetato 2',7'- diclorodihidrofluoresceína ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ). Este corante reage com diferentes espécies reativas de oxigênio, sendo, no entanto, mais específica para os radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio.  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  se difunde prontamente através da membrana celular onde é hidrolisado por esterases intracelulares num composto não fluorescente, chamado de diclorofluoresceína (DCFH). O DCFH é facilmente oxidado em um composto altamente fluorescente denominado de 2',7'- diclorofluoresceína (DCF) (HEMPEL *et al.*, 1999). A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de EROS formado intracelularmente (LEBEL, ISCHIOPOULOS, BONDY, 1992). As células de *Candida* spp. tratadas foram incubadas com  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (20  $\mu\text{M}$ ) (Sigma, USA) por 30 min no escuro a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

#### **5.4.6 Determinação da externalização de fosfatidilserina em células de *Candida albicans***

A externalização da fosfatidilserina representa uma alteração celular que reflete uma morte celular por apoptose precoce. A sua detecção pode ser feita utilizando-se o marcador Anexina V, que se liga à fosfatidilserina com alta afinidade na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (PAROLIN; REASON, 2001). A conjugação da Anexina V com o FITC (Isotiocianato de fluoresceína) e o iodeto de propídeo (IP) possibilita uma quantificação das células apoptóticas, permitindo assim

uma diferenciação entre as células necróticas (iodeto de propídeo) e as células em apoptose primária ou secundária. Com isso, a detecção da externalização da fosfatidilserina foi realizada utilizando anexina V conjugada com a fluoresceína e IP. Após o tratamento, as células de *Candida albicans* foram coletadas por centrifugação e digeridas com Zymolyase 20T (2 mg/mL) (Seikagaku Corporation, Japão) em tampão fosfato de potássio (PPB) (1 M pH 6,0) durante 2 horas a 30 °C. Os protoplastos de *Candida* spp. foram ressuspensos em uma solução contendo anexina V-FITC (Guava Nexin Kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA) e PI (Sigma, USA) na ausência de luz e a 37 °C. Após 20 min. as suspensões foram analisadas por citometria de fluxo. Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados, e os restos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

## 5.5. Testes utilizando microscopia fluorescente

### 5.5.1 Ensaio do cometa

O ensaio em cometa alcalino foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Miloshev, Mihaylov e Anachkova (2002). Neste teste, as células de *Candida albicans*, foram centrifugadas durante 5 min, lavadas com água destilada, e ressuspensas em tampão S (1M de sorbitol, 25 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6,5). Alíquotas de aproximadamente  $5 \times 10^4$  células foram misturadas com agarose de baixo ponto de fusão (37 °C) contendo Zymolyase 20T (2 mg/ mL) e espalhadas sobre as lâminas. Em seguida foram cobertas com lamínulas e incubadas durante 20 min a 30 °C. Os ensaios foram feitos em uma câmara fria (8 a 10 °C) com o objetivo de reduzir a atividade enzimática intracelular. As lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em uma solução (30 mM de NaOH, 1M de NaCl, 0,1% laurilsarcosina, 50 mM de EDTA, pH 12,3) durante 1 h para lisar os esferoplastos. As lâminas foram lavadas três vezes em uma solução tampão (30 mM de NaOH, 10 mM de EDTA, pH 12,4) por 20 min e em seguida foram submetidas 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 em uma solução de Tris HCl (10 mM /pH 7,5) durante 10 min seguido por incubações consecutivas de 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 idênticas) foram analisadas para cada grupo experimental. A interpretação dos resultados é baseada em escores, conforme o tamanho da cauda gerada (de

não danificado - 0 a dano máximo - 4). Dessa forma, foi calculado um índice de dano para cada amostra de células, sendo que o índice de dano variou de 0 (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (COLLINS *et al.*, 2004).

### **5.5.2 Análise da oxidação de bases purinas do DNA**

No respectivo trabalho analisamos a oxidação das bases purinas do DNA. A metodologia empregada é semelhante a descrita no **item 5.5.1**, com a ressalva da utilização da enzima formamido-pirimidina-DNA glicosilase (FPG) (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) que detecta a oxidação de bases purinas. Resumidamente, as lâminas foram removidas da solução de lise, e lavadas três vezes em tampão enzima (40 mM de HEPES, 100 mM de KCl, 0,5 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 0,2 mg/mL de BSA, pH 8), secas, e incubadas com 70 µL de FPG por 30 min a 37 °C. Imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas idênticas) foram analisadas visualmente por grupo. A quantidade de purinas oxidadas (FPG - sensíveis) foi então determinada pela subtração da quantidade de quebras de fita (amostras incubadas somente com tampão) com a quantidade de quebras totais obtidas após incubação com FPG de acordo com Da SILVA JÚNIOR *et al.* (2011) e DA SILVA *et al.* (2016).

### **5.5.3 Análise de fragmentação de DNA**

Para a análise da fragmentação do DNA, utilizamos a técnica de marcação da extremidade de corte da dUTP mediada por desoxinucleotidil-transferase (TUNEL). Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante do kit (Roche, Suíça). As células tratadas foram fixadas em paraformaldeído a 7% à temperatura ambiente. As células fixas foram lisadas com Triton X-100 a 1% durante 10 min em gelo e depois incubadas com a mistura reacional TUNEL durante 1 h a 37. As células foram então examinadas usando um microscópio de fluorescência (Olympus, Tóquio, Japão). Duzentas células foram contadas por amostra para determinar a porcentagem de células positivas (Adaptado de NETO *et al.*, 2015; TIAN *et al.*, 2017).

## **5.6 Ensaio no biofilme formado**

### **5.6.1 Crescimento dos isolados de *Candida* spp. no modo biofilme**

A formação do biofilme foi realizada utilizando placas de microtitulação de acordo com as metodologias descritas por PIERCE *et al.* (2008) e DA SILVA *et al.*, (2016), com

pequenas modificações. Para esses testes, foram utilizadas 16 cepas de *Candida* spp. (4 *C. albicans*, 6 *C. tropicalis*, 3 *C. parapsilosis* e 1 *C. glabrata*) oriundas de amostras clínicas e identificadas molecularmente. As leveduras foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 horas. Em seguida, as cepas de *Candida* spp. foram suspensas em 5 mL de meio YNB (Yeast Nitrogen Base, Sigma-EUA) e reincubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e lavadas com PBS. Esse procedimento foi repetido três vezes. Em seguida foi feita uma suspensão com  $1 \times 10^8$  células/mL em meio RPMI. Seguidamente, foram dispensados 200 µL do inóculo em uma placa de 96 poços fundo chato. No poço 12 adicionou-se somente RPMI como controle de esterilidade. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. No dia seguinte, o sobrenadante foi aspirado e a placa foi lavada delicadamente com PBS por três vezes para remoção das células não aderentes. Por fim, pode-se visualizar a formação de biofilme no fundo de cada poço, estando estes apropriados para a etapa seguinte.

### **5.6.2 Determinação da atividade de Cetamina sobre biofilmes formados de *Candida* spp.**

A cetamina foi testada em concentrações variando de 0,93 a 37,3 mM, e fluconazol e itraconazol foram testados em concentrações que variaram de 16 a 512 µg / mL e 0,125 a 8 µg / mL, respectivamente. Para avaliar o sinergismo com o biofilme formado, os biofilmes foram tratados com cetamina (0,23 a 14,92 mM) mais fluconazol (0,125 a 256 µg / mL) e cetamina (0,23 a 14,92 mM) mais itraconazol (0,125 a 8 µg / mL). Cabe ressaltar, também, que um controle de 100% de crescimento celular foi adicionado (suspensão de células em RPMI sem fármaco). As placas foram incubadas a 35°C durante 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). Após incubação de 18 a 20 horas no escuro, o corante foi removido, os poços lavados 3x com PBS e adicionado DMSO (200 µL). Após 15 minutos, retirou-se 100 µL de cada poço e transferiu-se para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. A redução de crescimento foi comparada ao poço que corresponde a 100% de crescimento, livre de fármaco (PIERCE *et al.*, 2008). Os ensaios foram realizados em triplicata em dias diferentes (DA SILVA *et al.*, 2016).

## **5.7 Ensaios de citotoxicidade**

### **5.7.1 Cultivo de células L929 de Fibroblastos de Murinos**

As células L929 foram cultivadas sob condições padrão em meio essencial mínimo com sais de Earle. Todos os meios de cultura foram suplementados com soro bovino fetal a 10%, glutamina 2 mM, 100 µg / ml de penicilina e 100 µg / ml de estreptomicina, e as células foram cultivadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para avaliação dos efeitos citotóxicos, as células foram cultivadas durante 2 dias antes do tratamento com as substâncias de teste. Depois, o meio foi substituído por meio fresco contendo a substância de teste ou solução de dimetilsulfóxido (DMSO) como controle. A concentração final de DMSO no meio de cultura foi mantida constante a menos de 0,1% (vol / vol) (SILVA et al., 2016).

### **5.7.2 Inibição da proliferação celular de L929 usando o teste de MTT**

O crescimento celular foi quantificado com base na capacidade das células vivas de reduzir o corante amarelo MTT (Sigma-Aldrich) ao formazan. As células L929 foram plaqueadas em placas de 96 poços (0,3 x 10<sup>6</sup> células / poço) e com os compostos do teste (CET (3,73 mM), FLC (64 / mL), ITRA (0,5 / mL), CET (0,93 mM) + FLC (8 µg / mL), CET (0,70 mM) + ITRA (0,090 µg / mL) que foram adicionados a cada poço, seguido de incubação durante 24 h sob condições de cultivo padrão. Posteriormente, as placas foram centrifugadas e o meio foi substituído por meio fresco (150 µl) contendo 0,5 mg / mL de MTT. Três horas depois, o produto de formazan de MTT foi dissolvido em 150 µL de DMSO e a absorbância foi medida usando um leitor de multiplicação (SpectraCount; Packard, Canadá). Os efeitos das substâncias de teste foram quantificados como a redução percentual na absorbância do corante do controle a 595 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos três vezes (SILVA et al., 2016).

## **5.8 Ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade**

### **5.8.1 Produtos químicos**

O cloridrato de cetamina foi adquirido da Sigma Chemical (St. Louis, MO). Soro bovino fetal, fito-hemaglutinina, meio RPMI 1640, tripsina-EDTA, glutamina, penicilina e estreptomicina foram adquiridas da GIBCO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Agarose de baixo ponto de fusão e agarose foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). A glicosilase de DNA da formamidopirimidina (FPG, também conhecida como MutM) foi obtida da BioLabs

(New England, EUA). A ciclofosfamina foi da Asta Medica. A fração S9, preparada a partir dos fígados de ratos Sprague-Dawley pré-tratados com a mistura bifenil policlorada Aroclor 1254, foi adquirida à Molttox Inc. (Boone, NC, EUA). Colquicina, citocalasina-B (Cyt-B), L-histidina, biotina, aflatoxina B1, azida sódica, ido 4-nitroquinolina (4-NQO), metilmetanosulfonato (MMS) e doxorubicina (DXR) foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros produtos químicos e reagentes utilizados foram de grau analítico.

## **5.8.2 Ensaio com leucócitos do sangue periférico (PBLs)**

### **5.8.2.1 Isolamento de leucócitos do sangue periférico (PBLs)**

Amostras de sangue heparinizado foram coletadas de doadores saudáveis, não fumantes, que não haviam tomado nenhuma medicação pelo menos 15 dias antes da amostragem ou que não tinham histórico de exposição a substâncias potencialmente genotóxicas. Os PBLs foram isolados pelo método padrão de centrifugação em gradiente de densidade. As células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro bovino fetal, glutamina 2 mM, 100 U / mL de penicilina e 100 mg / mL de estreptomicina, a 37 sob 5% de CO<sub>2</sub>. A fitohemaglutinina (2,5%) foi adicionada no início da cultura. Após 24 horas de cultura, as células foram tratadas com as substâncias do teste.

### **5.8.2.2 Avaliação da viabilidade celular**

A viabilidade dos PBLs foi quantificada pela capacidade das células vivas de reduzir o corante amarelo brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiozolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) a um produto roxo, o sal de formazan (Mosmann, 1983). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1,5 x 10<sup>6</sup> células / mL). Após 48 h, as foram adicionadas a cada poço e as células incubadas por 24 h. As drogas foram testadas em concentrações variando de 0,2 a 25,53 mM para a CET, Doxorubicina e Metanossulfonato de metila (MMS) variaram de 5 a 50 µg / mL e foram usados como controles positivos. Posteriormente, as placas foram centrifugadas, e o meio foi substituído por meio fresco (150 mL) contendo 0,5 mg / mL de MTT. Três horas depois, o produto de formazano do MTT foi dissolvido em 150 µL de DMSO, e a absorbância foi medida usando um leitor de multiplicação (Spectra Count, Packard, Ontario, Canadá). O efeito do fármaco foi quantificado como a percentagem de absorbância de controle do corante reduzido a 595 nm.

### 5.8.2.3 Caracterização morfológica dos PBLs apoptóticos

Células com características morfológicas de apoptose (ou seja, pequeno volume celular, condensação periférica de cromatina, núcleo fragmentado e corpos apoptóticos) foram determinadas após cada tratamento (**ver item 5.9.2.1**) através da coloração com os corantes laranja de acridina (AO) / brometo de etídio (EB): 25 µL das células em suspensão foi misturada com 1 µl da solução corante (100 µg / mL AO + 100 µg / mL EB em PBS) e espalhadas sobre uma lâmina, onde foram contadas 300 células e o percentual de células apoptóticas foi calculada (MCGAHON et al., 1995).

### 5.8.2.4 Medidas de produção de nitrito / nitrato

A produção de nitrito / nitrato como resultado da liberação de óxido nítrico (NO) foi medida de acordo com GREEN et al. (1981). Após os tratamentos dos PBL (24 horas), 150 µL do sobrenadante da cultura celular foi adicionado a 150 µL do reagente Griess (1% sulfanilamida em 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / 0,1% N- (1-naftil) -etilenodiamina 1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> / água destilada, 1: 1: 1: 1) e a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 10 min. Uma curva padrão foi preparada com várias concentrações de NaNO<sub>2</sub> (variando de 0,75 a 100 µM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados adicionando 150 µL do reagente de Griess a 150 µL do meio de cultura sem drogas. A absorbância foi medida utilizando um leitor de multiplicação (Spectra Count, Packard, Ontario, Canadá) a 560 nm. As experiências foram realizadas em triplicata em três experiências independentes.

### 5.8.2.5 Mensuração da peroxidação lipídica (ensaio TBARS)

A extensão da peroxidação lipídica induzida pela cetamina foi determinada pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malondialdeído (MDA), um produto formado pela peroxidação lipídica (DRAPER e HADELY et al., 1990). O ensaio foi realizado de acordo com o descrito por SALGO e PRYOR (1996) com pequenas modificações. Os PBLs foram incubados com cetamina 24 h e depois lisados com Tris-HCl 15 mM durante 1 h. Dois mililitros de ácido tricloroacético (0,4 mg / mL) e HCl (0,25 M) foram adicionados ao lisado, o qual foi incubado com 6,7 mg / mL de TBA durante 15 min a 100. A mistura foi centrifugada a 750 x g durante 10 min. Como o TBA reage com outros produtos da peroxidação lipídica, além do MDA, os resultados são expressos em termos de espécies reativas ao tiobarbitúrico (TBARS), que são determinadas pela absorbância a 532 nm. O 1,1,3,3-tetrametoxipropano hidrolisado foi

utilizado como padrão. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína (LOWRY, 1951).

#### **5.8.2.6 Mensuração da oxidação de proteínas**

A oxidação intracelular de proteínas nos PBLs foi determinada medindo os grupos carbonilas gerados em algumas cadeias laterais de aminoácidos utilizando o método de derivatização do dinitrofenil-hidrazina (DNPH) (BUSS et al., 1997). O nível de grupos carbonilas das proteínas nas células tratadas com a Cetamina ou com 150  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mensurado durante 24 h. No final dos tratamentos, os PBL foram recolhidos e os lisados celulares foram preparados por ultrassons. A proteína presente nos lisados celulares foi quantificada usando o método de LOWRY (1951). As amostras de proteínas foram incubadas com ou sem solução de DNPH por 60 min a 37 ° C no escuro. A mistura reacional foi adicionada à 1 mL de ácido tricloroacético a 10% durante 25 min. A suspensão foi então centrifugada a 5.000 rpm durante 30 min e a fração do sobrenadante foi rejeitada. O sedimento foi lavado três vezes com etanol / acetato de etilo (1: 1, v / v), ressuspensas em tampão Tris-HCl (45 mM; pH 7,4) e incubado durante 10 min a 37. A proteína solubilizada no tampão foi normalizada para o teor de proteína (LOWRY, 1951) e a absorbância foi medida a 375 nm utilizando um espectrofotômetro (Spectra Count, Packard, Ontario, Canada). O teor total de carbonilação de proteínas foi determinado como nmol / mg de proteína.

#### **5.8.2.7 Ensaio cometa**

O ensaio padrão alcalino cometa (eletroforese em gel de célula única) foi realizado como previamente descrito nos **itens 5.5.1 e 5.5.2**, na presença ou não de um sistema de ativação metabólica exógeno de fígado de rato (fração S9). Após o tratamento (6 h), as células foram lavadas com PBS gelado, tripsinizadas e ressuspensas em meio completo. Todas as etapas acima foram realizadas sob luz amarela ou no escuro, a fim de evitar danos adicionais no DNA. As lâminas foram então neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5) e coradas utilizando o protocolo de coloração com prata descrito por NADIN et al. (2001). Após o passo de coloração, os géis foram deixados a secar à temperatura ambiente durante a noite e analisados sob um microscópio de luz. Cem células (50 células de cada uma das duas lâminas replicadas para cada tratamento) foram selecionadas e analisadas para a migração de DNA. Estas células foram visualmente pontuadas de acordo com o comprimento da cauda em cinco classes: classe 0: sem danos, sem cauda; classe 1: com uma cauda menor que o diâmetro do núcleo da cabeça; classe 2: com um

comprimento de cauda de 1-2x o diâmetro da cabeça; classe 3: com uma cauda maior que 2x o diâmetro da cabeça; e classe 4: cometas sem cabeça. O valor do índice de danos (DI) foi atribuído a cada amostra. DI é um escore arbitrário baseado no número de células nas diferentes classes de danos, que são visualmente pontuadas medindo o comprimento de migração de DNA e a quantidade de DNA na cauda. DI varia de 0 (sem cauda: 100 células x 0) a 400 (com migração máxima: 100 células x 4) (BURLINSON et al. 2007). MMS ( $4 \times 10^{-5}$  M), ciclofosfamida (50  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (150  $\mu\text{M}$ ) foram usados como controles positivos para todos os protocolos do ensaio cometa.

#### **5.8.2.8 Cinética de reparação das quebras de fita de DNA**

A versão alcalina ( $\text{pH} > 13$ ) do ensaio cometa sem mistura S9 foi aplicada para avaliar se o dano ao DNA induzido pela cetamina poderia ser reparado. Resumidamente, os PBLs foram expostos a cetamina (700  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) por 6 h. Após o tratamento, o composto foi removido e as culturas foram então reincubadas. Amostras de células tratadas foram coletadas em diferentes momentos (1, 3, 6 e 12 h), e o ensaio padrão do cometa foi realizado como descrito acima (**item 5.9.2.7**). MMS ( $4 \times 10^{-5}$  M), ciclofosfamida (50  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (150  $\mu\text{M}$ ) foram usados como controles positivos.

#### **5.8.2.9 Ensaio de micronúcleo (MN) com bloqueio de citocinese**

Após tratamento (24 horas) na presença ou não de um sistema de ativação metabólica exógeno de fígado de rato (fração S9), os PBLs foram lavados duas vezes com meio, e citocalasina-B (3  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) foi adicionado às culturas nas 44 h iniciais, como descrito por FENECH (2000). As células foram recolhidas 72 horas após o tratamento e ressuspensas numa solução de KCl 75 mM. Em seguida foram mantidas a 4°C durante 3 min (tratamento hipotônico rápido) e fixadas com uma solução fria de metanol/ácido acético (3: 1). Este passo de fixação foi repetido duas vezes e, finalmente, as células foram ressuspensas num pequeno volume de metanol / ácido acético e colocadas em lâminas limpas. As lâminas foram coradas com Giemsa a 10% ( $\text{pH} 6,8$ ) durante 6 min, montadas e codificadas antes da análise microscópica. Os micronúcleos foram contados em 2.000 células binucleadas (BNC) com citoplasma bem preservado. A identificação dos micronúcleos foi realizada de acordo com FENECH (2000). MMS ( $4 \times 10^{-5}$  M) e a ciclofosfamida (50  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) foram utilizados como controles positivos.

#### 5.8.2.10 Teste de aberrações cromossômicas (CAs)

Após o final do tratamento (24 horas), as células foram lavadas com PBS gelado e novamente cultivadas em meio RPMI completo durante 48 horas. Colchicina (0,0016%) foi adicionada 2 horas antes da fixação (72 h). Os cromossomas foram preparados de acordo com procedimentos padrão (MOORHEAD et al., 1960). O tratamento hipotônico com KCl (0,75 M, 37 ° C) foi aplicado por 15 min. As células foram fixadas com metanol e ácido acético (3: 1). As lâminas secas ao ar foram coradas com Giemsa (5%, pH 6,8) por 7 min e classificadas para o CAs de acordo com SAVAGE (1976). MMS ( $4 \times 10^{-5}$  M) e ciclofosfamida (50 µg / mL) foram utilizados como controle positivo. Apenas metáfases bem estabelecidas foram examinadas. Cento e cinquenta metáfases por cultura foram analisadas para a presença de aberrações cromossômicas. O índice mitótico foi determinado para 2.000 células e dado como o número de mitoses por 100 células (%) (ARNI e HERTNER, 1997).

#### 5.8.3 Ensaios Salmonella/microsoma para avaliação da mutagenicidade (Teste de Ames)

As cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA97a, TA100 e TA102 foram gentilmente cedidas por B. M. Ames (Universidade da Califórnia, Berkeley, CA, EUA). A mutagenicidade foi ensaiada pelo procedimento de pré-incubação. A mistura de ativação metabólica S9 (mistura S9) foi preparada de acordo com MARON e AMES (1983). Inicialmente, foi realizada uma suspensão bacteriana contendo de  $1 - 2 \times 10^9$  células / mL. As células bacterianas foram incubadas com diferentes concentrações da Cetamina na presença ou na ausência de uma mistura S9 durante 20 minutos, sem agitação. Em seguida, 2 mL de “soft agar” (0,6% de agar, 0,5% NaCl, 50 M de histidina, 50 M de biotina, pH 7,4, 42 ° C) foram adicionados aos tubos de ensaios e transferidos imediatamente para uma placa de “minimal agar” (meio Vogel-Bonner E, contendo 2% de glicose e 1.5% agar). A aflatoxina B1 (1 µg / placa) foi usada como controle positivo para todas as cepas (na presença de ativação metabólica com mistura S9), óxido 4-nitroquinolínico (4-NQO, 0,5 µg / placa) para TA97a, TA98 e TA102 e azida de sodio (1 / placa) para TA100 (ausência de mistura S9). As placas foram incubadas no escuro a 37° C por 48 h antes de contar as colônias revertentes.

### 5.9 Análise dos dados

Os testes de sensibilidade *in vitro* foram realizados em triplicata em diferentes dias. Portanto, as médias geométricas foram usadas estatisticamente para comparar os resultados do CIM. Os dados obtidos foram analisados a partir da média  $\pm$  erro padrão 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). Os dados de mutagenicidade de Salmonella / microssoma foram analisados utilizando o software Salmonel. Um composto foi considerado positivo para mutagenicidade somente quando: (a) o número de revertentes foi pelo menos o dobro do rendimento espontâneo ( $MI \geq 2$ ; IM = índice mutagênico: número de colônias induzidas na amostra / número de colônias espontâneas no controle negativo amostras); (b) uma resposta significativa foi obtida na análise de variância ( $p \leq 0,05$ ); e (c) uma dose-resposta positiva reprodutível ( $p \leq 0,01$ ) estava presente, conforme avaliado pelo software Salmonel.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Atividade antifúngica da Cetamina frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos

Os testes de sensibilidade para se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da Cetamina e dos derivados azólicos para cada cepa (itraconazol e fluconazol) foram avaliados através da técnica de microdiluição em caldo. Os testes realizados com os antifúngicos azólicos tiveram o intuito de avaliar a resistência. Os valores da CIM para as cepas de *Candida* spp. testadas frente aos derivados azólicos encontram-se na Tabela 1. Com a confirmação da resistência, foram utilizadas 16 cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol ( $CIM \geq 8 \mu\text{g/mL}$ ) divididas entre as principais espécies de relevância clínica. Apenas uma única cepa apresentou o fenótipo de resistência ao itraconazol ( $CIM \geq 1 \mu\text{g/mL}$ ). Após 24 horas de exposição a Cetamina, os isolados de *Candida* spp. apresentaram concentrações inibitórias mínimas de 1,87mM e 3,73 mM, demonstrando assim, uma atividade antifúngica significativa, como observado na Tabela 1.

### 6.2 Efeito da combinação entre os azólicos (FLC e ITRA) e a Cetamina frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos

Com o intuito de investigarmos um eventual efeito sinérgico da Cetamina com os derivados azólicos (FLC e ITRA), utilizamos o método do *checkerboard* para derivação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI). As 16 cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC do presente estudo foram selecionadas. Os resultados expressos na Tabela 1 revelaram que 62,5% dos isolados evidenciam um efeito sinérgico entre o fluconazol e a cetamina. Os

valores para esta combinação variaram de 0,47-1,4 mM para a Cetamina e de 2,7-8 µg/mL para o fluconazol. A Tabela 1 também revela que 81,25% dos isolados apresentaram sinergismo na combinação entre o itraconazol e a cetamina. Os valores para esta combinação variaram de 0,23-1,17 mM para a Cetamina e de 0,006-0,2 µg/mL para o itraconazol.

**Tabela 1: Efeito antifúngico da cetamina (CET), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITR) sozinhos e em combinação contra cepas de *Candida* spp. O sinergismo foi avaliado pelo método checkerboard para derivação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI).**

Cepas <sup>a</sup>	Nº GenBank	CIM <sup>b</sup>								
		Isolado <sup>c</sup>			Combinação <sup>d</sup>			Combinação <sup>e</sup>		
		CET	FLC	ITR	CET/FLC	FICI	Interpretação	CET/ITR	FICI	Interpretação
<i>C. albicans</i> 1	KJ740175	3.73	37	0.25	1.09/4.7	0.4	SYN	0.78/0.05	0,4	SYN
<i>C. albicans</i> 2*	KJ740179	3.73	75	0.50	0.93/8.0	0.4	SYN	0.70/0.09	0,4	SYN
<i>C. albicans</i> 3	KJ740174	3.73	32	0.25	0.78/3.3	0.3	SYN	1.09/0.08	0,6	IND
<i>C. albicans</i> 4	AB861479	3.73	75	1.00	1.24/21.3	0.6	IND	1.17/0.2	0,5	SYN
<i>C. tropicalis</i> 1	AB861490	3.73	27	0.25	0.93/4.0	0.4	SYN	0.93/0.06	0,5	SYN
<i>C. tropicalis</i> 2	KJ7400185	3.73	107	0.50	0.47/8.0	0.2	SYN	0.70/0.09	0,4	SYN
<i>C. tropicalis</i> 3	KJ740184	3.73	27	0.25	1.24/5.3	0.5	SYN	0.62/0.06	0,4	SYN
<i>C. tropicalis</i> 4	AB861493	3.73	13	0.08	0.93/2.0	0.4	SYN	0.23/0.03	0,4	SYN
<i>C. tropicalis</i> 5	KJ740181	3.73	59	0.25	1.40/6.0	0.5	SYN	0.23/0.06	0,5	SYN

<i>C. tropicalis</i> 6	AB861491	3.73	53	0.25	0.93/16.0	0.6	IND	0.23/0.06	0,5	SYN
<i>C. parapsilosis</i> 1	AB861487	3.73	43	0.25	1.24/10.7	0.6	IND	0.93/0.06	0,5	SYN
<i>C. parapsilosis</i> 2	KJ740186	3.73	16	0.13	1.40/3.0	0.6	IND	1.40/0.05	0,7	IND
<i>C. parapsilosis</i> 3	KJ740188	3.73	53	0.25	0.62/2.7	0.2	SYN	0.62/0.06	0,4	SYN
<i>C. glabrata</i> 1	AB861484	3.73	64	1.00	1.56/13.3	0.6	IND	0.93/0.2	0,5	SYN
CP	-	1.87	2	0.13	1.09/0.3	0.7	IND	0.93/0.03	0,7	IND
CK	-	3.73	21	0.25	0.62/2.7	0.3	SYN	0.47/0.03	0,2	SYN

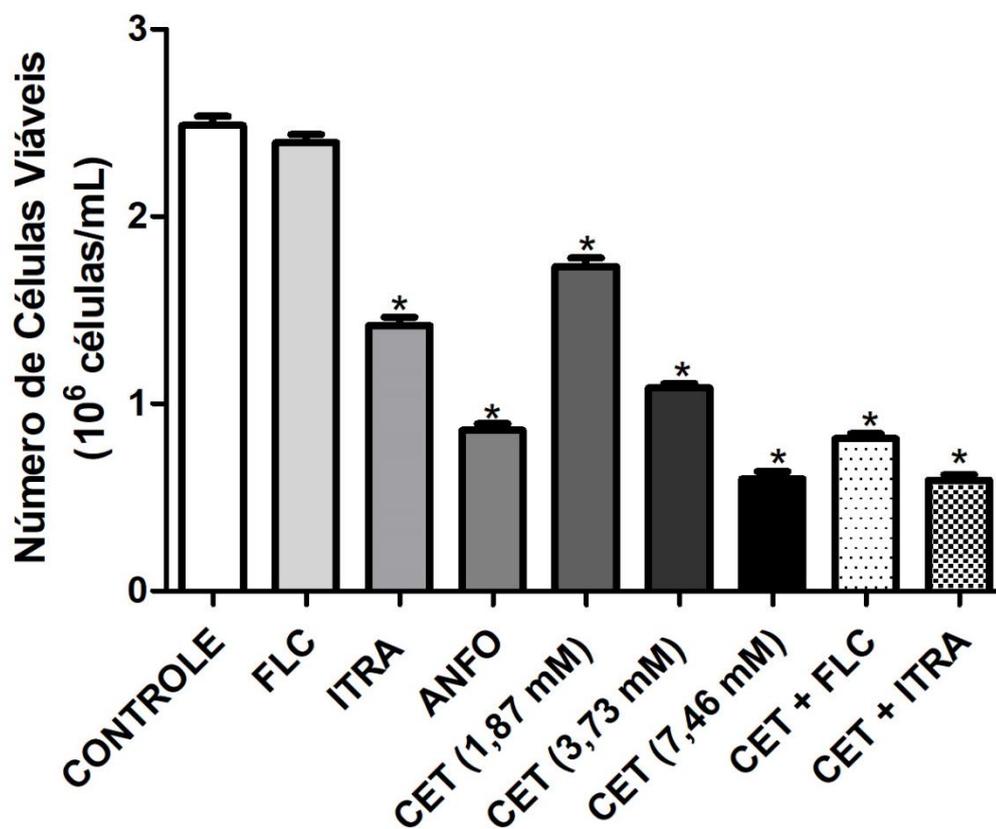
Cepas de levedura isoladas da coleção <sup>b</sup> MIC - Concentração Inibitória Mínima requerida para inibir o crescimento de 50% dos organismos após a incubação por 24 h. <sup>c</sup> o procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27-A3 do CLSI 2008 para antimicrobianos. <sup>d</sup> Combinação de cetamina com fluconazol. <sup>e</sup> Combinação de cetamina com itraconazol. Os valores são expressos em µg / mL para azóis (FLC e ITRA) e em mM para CET. (\*) Cepa selecionada para os experimentos utilizando experimentos de citometria de fluxo e biofilme. CET: cetamina; FLC: fluconazol; ITR: itraconazol.

### **6.3 Avaliação do tipo de morte celular em *Candida* spp. após exposição da Cetamina isolada e associada aos azólicos**

#### **6.3.1 Redução da viabilidade das células de *C. albicans* após o tratamento da Cetamina isolada e em combinação os azóis**

De acordo com a Figura 1, a exposição de cepas resistentes ao fluconazol ( $2,40 \times 10^6$  células  $\pm 0,11$ ) não causou uma redução significativa no número de células viáveis em comparação com o controle ( $2,49 \times 10^6$  células  $\pm 0,12$ ) ( $p < 0,05$ ). Contudo, o itraconazol foi capaz de reduzir significativamente o número de células viáveis ( $1,42 \times 10^6$  células  $\pm 0,11$ ), fato este justificado pela sensibilidade do micro-organismo a faixa testada. Como mostrado na Figura 1, a cetamina isolada foi capaz de reduzir o número de células nas diferentes concentrações (1,87 mM; 3,73 mM; 7,46 mM), as células de *C. albicans* ( $1,73 \times 10^6$  células  $\pm 0,11$ ;  $1,09 \times 10^6$  células  $\pm 0,06$ ;  $0,6 \times 10^6$  células  $\pm 0,10$ , respectivamente). Entretanto, as células tratadas com cetamina + fluconazol ( $0,59 \times 10^6$  células  $\pm 0,07$ ) e cetamina + itraconazol ( $0,81 \times 10^6$  células  $\pm 0,07$ ) por 24 h também demonstraram reduções significativas ( $p < 0,05$ ) em comparação com o controle. Os resultados indicam que a redução do número de células proporcionada pela combinação da cetamina com os azólicos foi maior (~ 4 vezes para CET+FLC; ~1,8 vezes para CET + ITRA) e em concentrações menores, com relação aos tratamentos dos respectivos antifúngicos isolados.

**Figura 1:** Avaliação por citometria de fluxo da redução no número de células viáveis, em uma única cepa representativa de *C. albicans* resistente ao FLC tratada com FLC (8 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL), ITRA (0,5 µg/mL), CET (1,87 mM), CET (3,73 mM), CET (7,46 mM), CET (0,93 mM) + FLC (8 µg/mL) e a CET (0,7 mM) + ITRA (0,093 µg/mL), por 24 horas de exposição



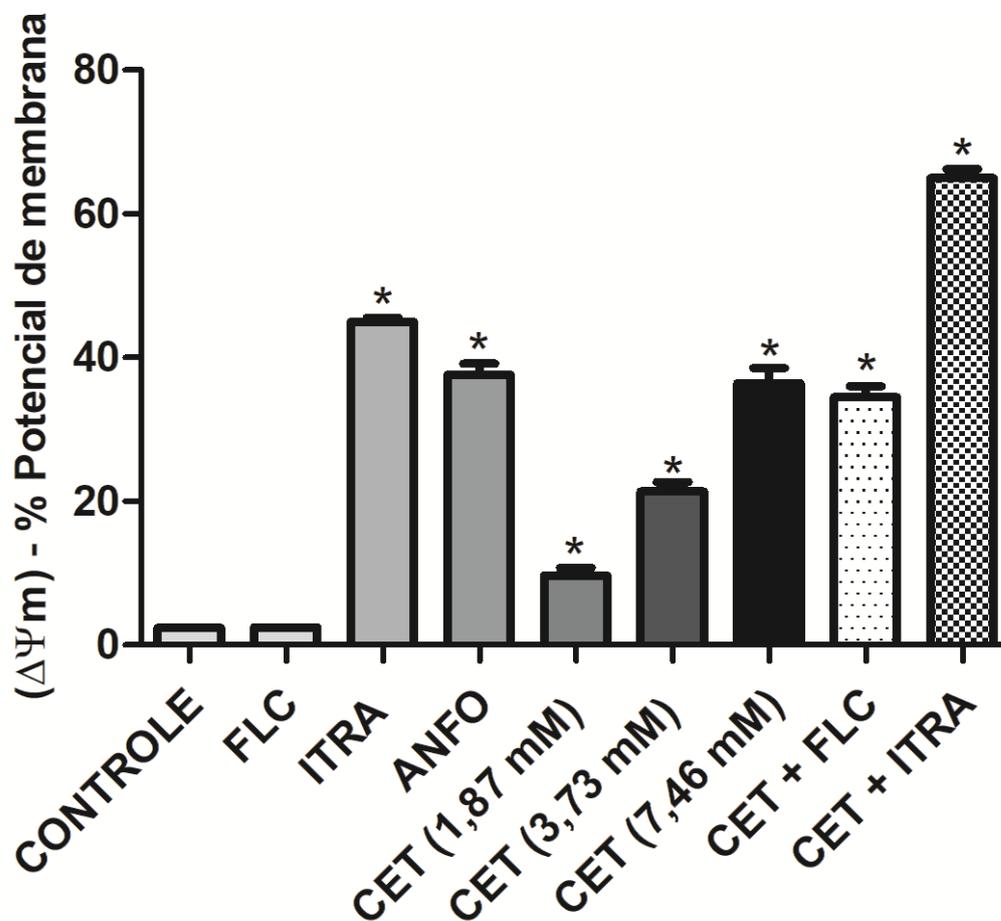
Os dados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M).

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

### **6.3.2 Alterações sobre o potencial transmembrana mitocondrial das células de *C. albicans* são induzidas pelo tratamento com a cetamina isolada e associada com os antifúngicos azólicos**

Após 24 horas de exposição aos tratamentos propostos, as células de *C. albicans* foram marcadas com rodamina 123 a fim de se detectar o percentual de células com baixo potencial elétrico transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). A Figura 2 mostra que quando tratadas com a Cetamina nas diferentes concentrações (1,87 mM; 3,73 mM; 7,46 mM), as células de *C. albicans* ( $9,73 \pm 2,54$  %;  $21,40 \pm 3,16$  %;  $36,41 \pm 5,21$ ) apresentaram um aumento do percentual de células com baixo  $\Delta\Psi_m$  quando comparadas com o grupo controle ( $2,46 \pm 0,13$ %). Alterações no potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) não foram observadas nas células tratadas com o fluconazol, porém itraconazol exibiu alterações, indicando um provável comprometimento da organela citoplasmática. Contudo, assim como observamos na viabilidade celular, o Co tratamento da cetamina com os compostos azólicos (fluconazol e itraconazol) demonstrou haver um maior comprometimento mitocondrial, onde percentual de  $\Delta\Psi_m$  foi de 34,47% ( $\pm 3,76$ ) para CET + FLC e 64,95% ( $\pm 3,16$ ) para CET + ITRA, sugerindo que o tratamento induziu uma redução no potencial transmembrana mitocondrial (Figura 2).

**Figura 2:** Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) em cepa de *C. albicans* resistente ao FLC. As células foram marcadas com rodamina 123 (50 nM). O gráfico mostra as células tratadas com FLC (8  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), ANFO B (4  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), ITRA (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), CET (1,87 mM), CET (3,73 mM), CET (7,46 mM), CET (0,93 mM) + FLC (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a CET (0,7 mM) + ITRA (0,093  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por 24 horas de exposição.



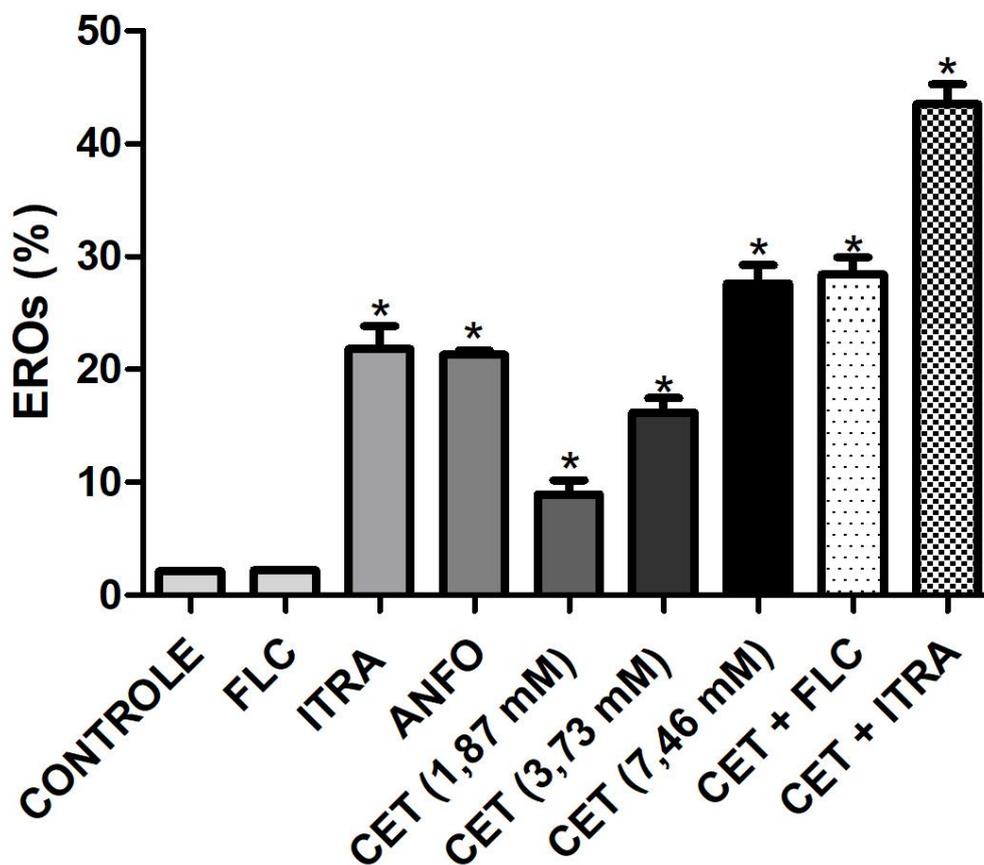
Os dados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M).

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

### **6.3.3 Aumento da geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células de *C. albicans* após o tratamento com a cetamina isolada e combinada aos azólicos**

O presente estudo investigou o efeito da cetamina na geração de espécies reativas de oxigênio utilizando o corante DCFH<sub>2</sub>DA. As células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol foram tratadas com cetamina por 24 h, e ficou evidente que este tratamento teve um impacto considerável ( $P < 0,05$ ) na geração de espécies reativas de oxigênio, como apresentado na Figura 3. O tratamento com o fluconazol não apresentou diferenças significativas no percentual de EROs ( $2,24\% \pm 0,08$ ). O tratamento com o itraconazol exibiu uma porcentagem de 21,81% ( $\pm 4,98$ ) nos níveis de EROs. Contudo, quando analisamos os efeitos da combinação, observamos que ambos os tratamentos cetamina + fluconazol ( $28,25\% \pm 0,07$ ) e cetamina + itraconazol ( $43,53\% \pm 4,26$ ) foram capazes de induzir aumentos significativos na produção intracelular de EROS em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Os níveis de EROs intracelular foram mais significativos nas células tratadas com a combinação da cetamina com o fluconazol (~ 12 vezes) e com o itraconazol (~ 2 vezes).

**Figura 3.** Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em uma cepa representativa de *C. albicans* resistente à azólicos por citometria de fluxo. As células foram tratadas com FLC (8  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), ANFO B (4  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), ITRA (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), CET (1,87 mM), CET (3,73 mM), CET (7,46 mM), CET (0,93 mM) + FLC (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a CET (0,7 mM) + ITRA (0,093  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por 24 horas.



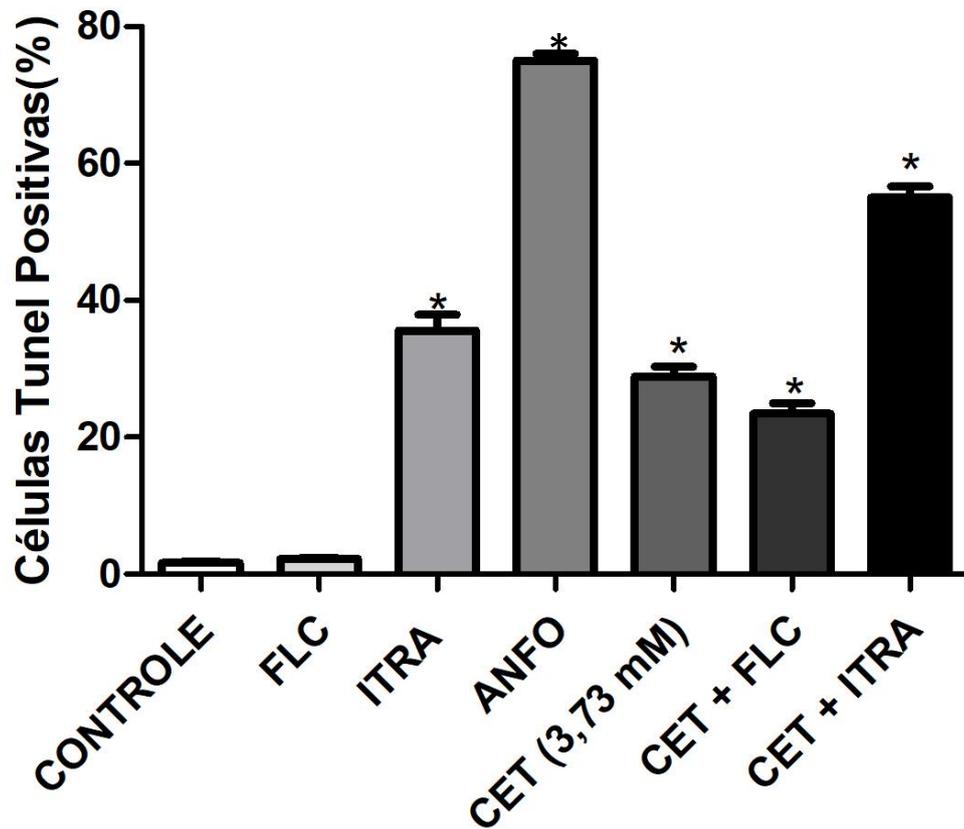
Os dados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M).

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

#### **6.3.4 A fragmentação do DNA é induzida pela cetamina isolada e em combinação com azóis em cepas de *C. albicans* detectadas pela técnica do TUNEL**

De acordo com a Figura 4, a exposição das células de *C. albicans* ao fluconazol ( $2,23 \% \pm 0,20$ ) não causou uma redução significativa no número de células com fragmentação no DNA em comparação com o grupo controle ( $1,66 \% \pm 0,16$ ) ( $p < 0,05$ ). Contudo, o itraconazol foi capaz de aumentar significativamente a fragmentação do DNA ( $35,56 \% \pm 4,63$ ). Além disso, a Figura 4 mostra que quando as células de levedura foram expostas ao co-tratamento com cetamina e azóis (itraconazol e fluconazol), houve um aumento na fragmentação do DNA. Uma vez que a TdT (terminal desoxinucleotidil transferase) atua seletivamente na extremidade 3'-OH do DNA, células TUNEL positivas tratadas com a cetamina + fluconazol ( $23,44\% \pm 3,10$ ) e cetamina + itraconazol ( $55,00\% \pm 3,26$ ) demonstraram possuir mais extremidades do que os antifúngicos isolados, demonstrando assim que os respectivos tratamentos podem levar a uma fragmentação do DNA ( $p < 0,05$ ).

**Figura 4.** Teste de TUNEL em uma única cepa representativa de *C. albicans* mostrando a fragmentação do DNA após a incubação com cetamina, fluconazol e itraconazol isolados e em combinação.



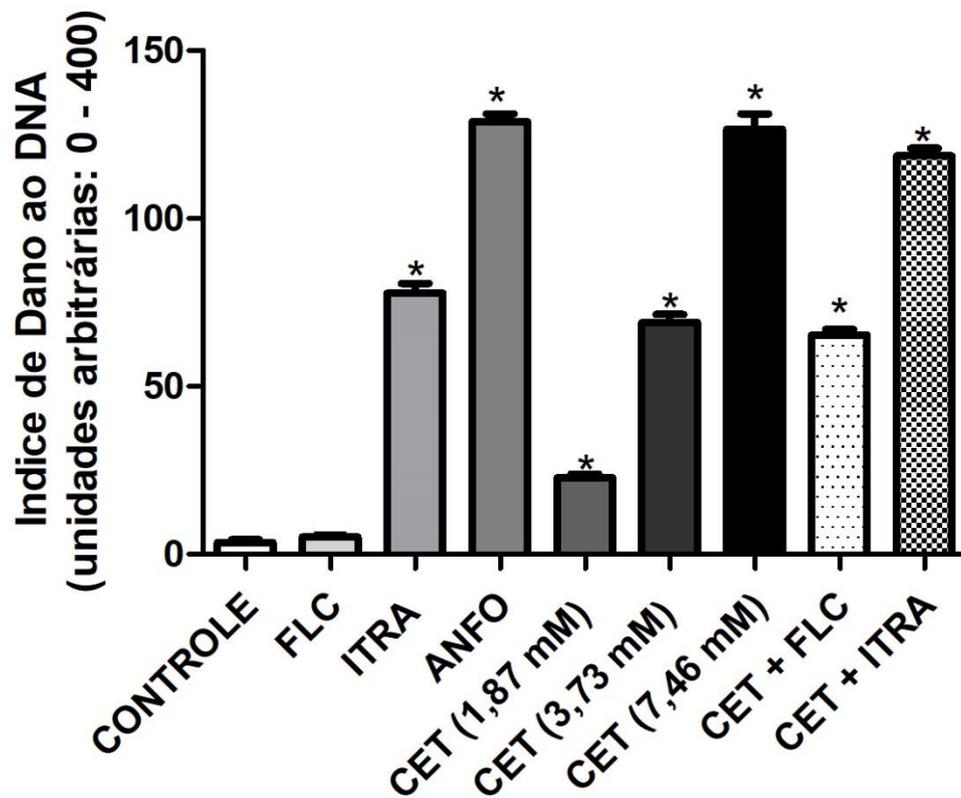
Os dados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M).

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

### 6.3.5 O Co tratamento da cetamina com os derivados azólicos promove danos no DNA das células de *Candida* spp.

Como mostrado na Figura 5, o fluconazol ( $7,13 \pm 3,27$ ) não induziu um aumento no dano ao DNA nas cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, em comparação com as células não tratadas. Conforme apontado na Figura 5, a Cetamina nas diferentes concentrações testadas (1,87 mM; 3,73 mM; 7,46 mM) foram capazes de induzir quebras totais nas fitas de DNA das células de *C. albicans* ( $22,75 \pm 3,28$ ;  $54,38 \pm 5,48$ ;  $126,63 \pm 12,86$ , respectivamente) quando comparadas com o grupo controle ( $7,25 \pm 3,81$ ). Além disso, a cetamina em combinação com os azóis testados também promoveu aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) nas quebras totais das fitas do DNA. O Co tratamento da cetamina com fluconazol apresentou um índice de dano ao DNA de  $81,17 \pm 6,68$ , enquanto que a combinação entre a cetamina e o itraconazol evidenciou um de  $95,83 \pm 5,88$  (Figura 5). Adicionalmente, as células também foram incubadas com a enzima FPG que reconhece purinas oxidadas no DNA, especialmente a 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua). A oxidação das bases nucleotídicas é tão importante quanto as quebras na cadeia de DNA para a função e sobrevivência celular. Na Figura 6 observamos que a cetamina em combinação com os azóis testados também promoveram um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na quantidade de purinas oxidadas. Cabe ressaltar que as lesões oxidativas no DNA, após o Co tratamento proposto, foram significativamente maiores do que quando comparadas com os valores de índice de dano dos experimentos realizados na ausência da enzima FPG. Os resultados indicam que a extensão do dano oxidativo ao DNA causado pela combinação da cetamina com os azólicos, reconhecidos pela enzima FPG em células de *Candida albicans*, foi de aproximadamente 1,4 vezes maior em relação células cultivadas sem a enzima FPG.

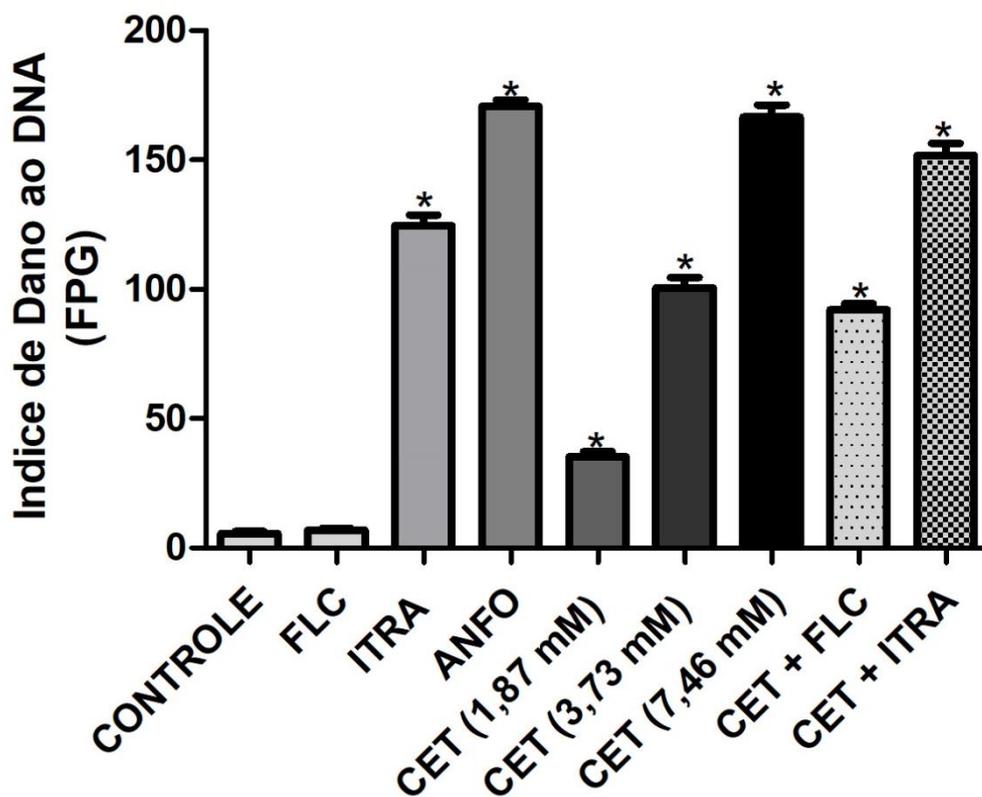
**Figura 5:** Avaliação do índice de dano ao DNA através da distribuição dos índices de danos, utilizando a versão alcalina do ensaio do cometa, em *C. albicans* resistente ao FLC. As leveduras foram expostas ao FLC (8 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL), ITRA (0,5 µg/mL), CET (1,87 mM), CET (3,73 mM), CET (7,46 mM), CET (0,93 mM) + FLC (8 µg/mL) e a CET (0,7 mM) + ITRA (0,093 µg/mL), por 24 horas de exposição.



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.

**Figura 6:** Avaliação do índice de dano ao DNA através da distribuição dos índices de danos, utilizando a versão alcalina do ensaio do cometa modificada (FPG), em uma cepa representativa de *C. albicans* resistente ao FLC. As leveduras foram expostas ao FLC (8 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL), ITRA (0,5 µg/mL), CET (1,87 mM), CET (3,73 mM), CET (7,46 mM), CET (0,93 mM) + FLC (8 µg/mL ) e a CET (0,7 mM) + ITRA (0,093 µg/mL), por 24 horas de exposição.



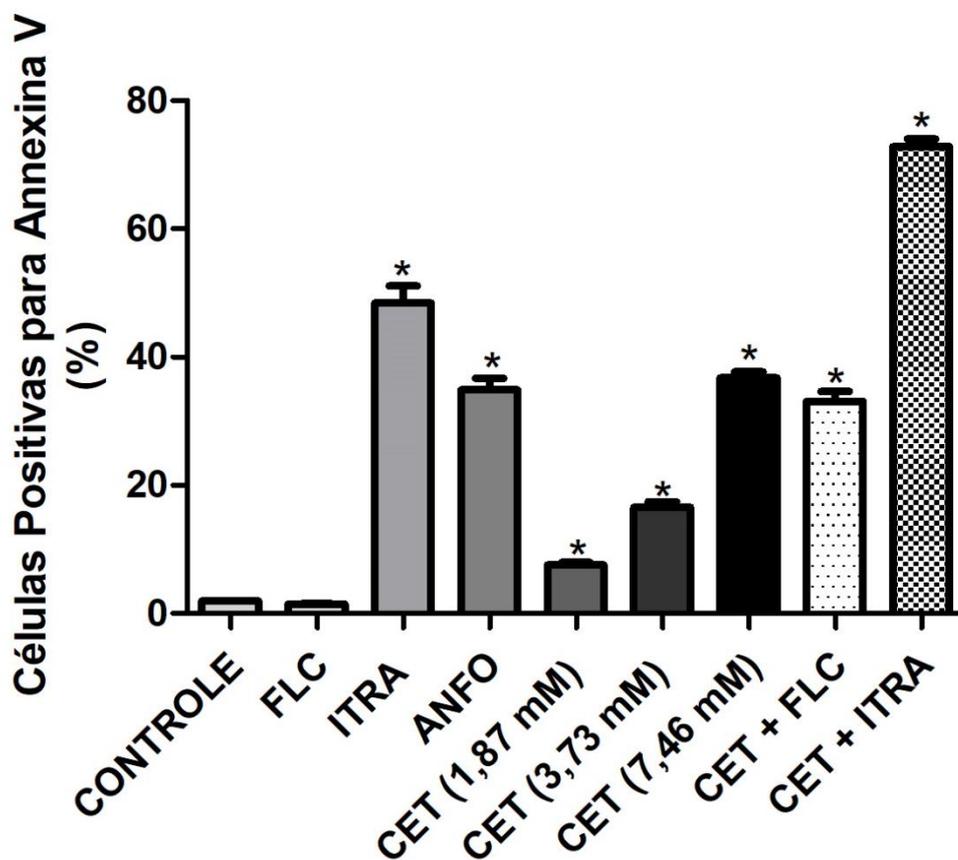
Os dados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M).

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

### **6.3.6 O Co tratamento da cetamina com os derivados azólicos promove a externalização da fosfatidilserina nas células de levedura**

A fosfatidilserina possui uma distribuição assimétrica na membrana plasmática das leveduras. Normalmente esse componente fosfolipídico se mantém no folheto interno da bicamada lipídica. A sua exposição para a superfície externa ocorre quando uma célula entra num processo de morte celular por apoptose, sendo que a fosfatidilserina é considerada um marcador precoce para este tipo de morte celular. Diante disso, resolvemos avaliar a extensão da externalização da fosfatidilserina nas células de *C. albicans* usando o ensaio anexina-V-FITC. Após 24 h de exposição, o percentual de células com a externalização da fosfatidilserina, que correspondeu a soma dos estágios de apoptose primária e secundária, após um único tratamento com fluconazol foi muito próxima da das culturas de controle negativo (Figura 7). Contudo, cabe destacar que após 24 h de incubação, as células leveduriformes tratadas com a cetamina associada ao fluconazol e ao itraconazol apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no percentual de células apoptóticas em comparação com o grupo controle:  $33,09 \pm 3,81\%$  e  $72,83 \pm 2,99\%$ , respectivamente (Figura 7). Vale ressaltar que o evento apoptótico observado foi detectado em concentrações inferiores aos tratamentos isolados e com um percentual maior de células positivas para anexina.

**Figura 7:** Externalização da fostatidilserina pela marcação com anexina V. A intensidade de fluorescência indica a quantidade de células com exposição da fosfatidilserina quando tratadas com o FLC (8  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), ANFO B (4  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), ITRA (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), CET (1,87 mM), CET (3,73 mM), CET (7,46 mM), CET (0,93 mM) + FLC (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a CET (0,7 mM) + ITRA (0,093  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por 24 horas de exposição.



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.

#### **6.4 Associação da cetamina com os derivados azólicos promove redução do biofilme formado**

Após verificarmos a ação da Cetamina isolada e em associação com os compostos azólicos, decidimos investigar seu efeito sobre o biofilme formado de oriundo de cepas de *Candida spp.* Foram utilizadas 14 cepas de *Candida spp.* divididas entre as principais espécies de relevância clínica. Após 24 horas de exposição a Cetamina, os biofilmes formados de *Candida spp.* apresentaram resultados equivalentes ao CIM 50 de 37,3 e 14,9 mM, como observado na Tabela 2. Com relação aos compostos azólicos, as reduções no biofilme formado ocorreram nas concentrações de 256 a 1024 µg / mL para o fluconazol e de 4 µg / mL para o itraconazol. Com o objetivo de avaliar o efeito sinérgico da Cetamina com os derivados azólicos (FLC e ITRA) frente ao biofilme, nos baseamos no método do *checkerboard* para derivação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI), como descrito por GAO et al. (2017). Os resultados expressos na Tabela 2 demonstraram que em 92,5% dos biofilmes formados, houve um efeito sinérgico entre o fluconazol e a cetamina. Os valores para esta combinação foram de 1,87-3,73 mM para a Cetamina e de 16-64 µg/mL para o fluconazol. A Tabela 2 também expressa os resultados da combinação entre a cetamina e o itraconazol, onde em 71,42% dos biofilmes formados houve sinergismo. Os valores para esta combinação variaram de 0,93-3,73 mM para a Cetamina e de 0,12-0,6 µg/mL para o itraconazol.

**Tabela 2.** Efeitos antifúngicos da cetamina (KET), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITRA) isolados e em combinação com biofilme formado por *Candida* spp avaliado pelo modo de concentração inibitória fracional (ICF).

Leveduras <sup>a</sup>	CIM <sup>b</sup>								
	Isolado <sup>c</sup>			Combinado <sup>d</sup>			Combinado <sup>e</sup>		
	CET (mM)	FLC (µg/mL)	ITRA (µg/mL)	CET/FLC	FICI	Interpretação	CET/ITRA	FICI	Interpretação
<i>C. albicans</i> 1	37.3	256	4	3.73/32	0,2	SYN	1.87/0.24	0.1	SYN
<i>C. albicans</i> 2	14.9	1024	4	3.73/32	0,3	SYN	7.46/0.5	0.6	IND
<i>C. albicans</i> 3	14.9	1024	4	3.73/32	0,3	SYN	3.73/0.6	0.4	SYN
<i>C. albicans</i> 4	37.3	1024	4	14.9/128	0,5	SYN	14.92/1.0	0.7	IND
<i>C. tropicalis</i> 1	37.3	512	4	3.73/32	0,2	SYN	1.87/0.24	0.1	SYN
<i>C. tropicalis</i> 2	14.9	1024	4	7.46/64	0,6	IND	7.46/0.5	0.6	IND
<i>C. tropicalis</i> 3	14.9	512	4	1.87/16	0,2	SYN	0.93/0.24	0.1	SYN
<i>C. tropicalis</i> 4	14.9	512	4	3.73/32	0,3	SYN	0.93/0.12	0.1	SYN
<i>C. tropicalis</i> 5	14.9	256	4	3.73/32	0,4	SYN	3.73/0.6	0.4	SYN

<i>C. tropicalis</i> 6	37.3	256	4	3.73/32	0,2	SYN	3.73/0.6	0.3	SYN
<i>C. parapsilosis</i> 1	14.9	512	4	3.73/32	0,3	SYN	3.73/0.6	0.4	SYN
<i>C. parapsilosis</i> 2	37.3	1024	4	3.73/32	0,1	SYN	14.92/1.0	0.7	IND
<i>C. parapsilosis</i> 3	37.3	1024	4	3.73/32	0,1	SYN	3.73/0.6	0.3	SYN

---

<sup>a</sup> Cepas de levedura isoladas da coleção. <sup>b</sup> MIC - Concentração Inibitória Mínima requerida para inibir o crescimento de 50% do biofilme após a incubação por 24 h. <sup>c</sup> Drogas isoladas. <sup>d</sup> Combinação de cetamina com fluconazol. <sup>e</sup> Combinação de cetamina com fluconazol. <sup>e</sup> Combinação de cetamina com itraconazol. Os valores são expressos em µg / ml para azóis (FLC e ITRA) e em mM para CET.

### **6.5 Atividade citotóxica de cetamina e azóis contra células L929 de mamíferos**

Notavelmente, a cetamina isolada ou em combinação com os compostos azólicos não mostrou citotoxicidade frente aos fibroblastos de camundongo da linhagem L929, com um intervalo de confiança de 95% de CIM no intervalo testado em comparação com células não tratadas ( $P < 0,05$ ) como analisado pelo ensaio de MTT (Tabela 3).

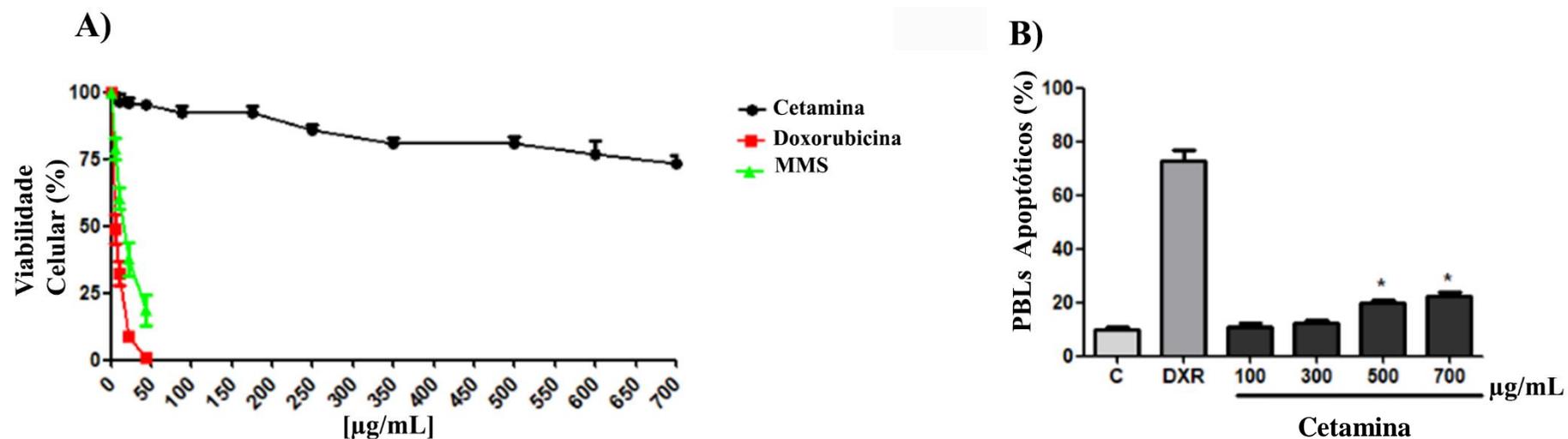
**Tabela 3:** Atividade citotóxica de cetamina (CET), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITR) isolada e em combinação em células L929. Os dados são apresentados como valores IC50 e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) a partir de três experiências independentes, realizadas em triplicado.

	CI 95%				
	Sozinha			Combinação	
	FLC	ITRA	KET	CET/ FLC	CET/ ITRA
Células L929 IC50	> 64 µg/mL	> 1.0 µg/mL	> 3.73 mM	> 1.86 mM/ 16 µg/mL	> 1.4 mM/ 0.18 µg/mL

## **6.6 A cetamina tem um potencial citotóxico fraco frente aos leucócitos de sangue periférico**

Após 24 h de exposição, o ensaio colorimétrico para avaliar a atividade metabólica celular mostrou que a cetamina possui um perfil de baixa citotoxicidade nas culturas de leucócitos estimulados por fitohemaglutinas em concentrações de até 700  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (2,55 mM). Utilizando culturas de controle negativo como referência, a substância testada não provocou citotoxicidade, tal como observado em células tratadas com cetamina, em todas as quase concentrações avaliadas (Figura 8A). Uma citotoxicidade fraca foi principalmente observada apenas quando as culturas de células foram expostas a altas concentrações (500-700  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) de cetamina com a porcentagem de células inviáveis variando de  $23,33 \pm 5,13$  a  $26,66 \pm 3,05\%$ . Em nossa análise morfológica, a viabilidade de PBLs não tratados e com cetamina (100 a 300  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) foi maior que 85%. No entanto, os anestésicos testados nas duas maiores concentrações (500 e 700  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) avaliaram a ocorrência de células que compartilham características morfológicas das células apoptóticas ( $p < 0,05$ ), como mostra a Figura 8B. A porcentagem de células que compartilham características apoptóticas foi de  $19,75 \pm 2,02$  e  $22,50 \pm 2,38\%$  para 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (1,82 mM) e 700  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (2,55 mM), respectivamente.

**Figura 8.** Avaliação da viabilidade celular, pelo teste do MTT (A) e características morfológicas apoptóticas em PBLs humanos tratados por 24 horas com cetamina (A) ou doxorubicina e MMS. Os dados são apresentados como valores médios de SD de três experiências independentes em triplicado.



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.

### **6.7 A cetamina apresenta um perfil pró-oxidante fraco**

Três ensaios indiretos baseados em três desfechos diferentes foram conduzidos para monitorar a capacidade dos efeitos pró-oxidantes da cetamina, em que todos eles revelaram a fraca capacidade deste anestésico para induzir liberação de óxido nítrico (NO), peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas em culturas PBLs. Como indicado na Tabela 4, a cetamina durante um período de 24 h de exposição promoveu a formação de nitrito / nitrato (um aumento fraco), uma oxidação de lipídios e proteínas de PBLs apenas nas concentrações mais altas estudadas (500 e 700  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .;  $p < 0,05$ ). A peroxidação lipídica expressa como equivalentes de MDA foi  $\sim 2,4$  vezes e  $\sim 4$  vezes, 500 e 700  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivamente, maiores que as culturas controle negativas. Além disso, o teor de proteína carbonilada foi mais pronunciado nos PBLs tratados com a cetamina a 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ( $\sim 2,4$  vezes) e 700  $\mu\text{g} / \text{mL}$  ( $\sim 4,2$  vezes) em comparação com o grupo de controle.

**Tabela 4.** Formação de nitratos, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas em leucócitos humanos de sangue periférico (PBLs) após 24h de exposição da cetamina.

Compostos	Tratamento	Nitrito/nitrato ( $\mu\text{M}$ )	Equivalentes de MDA (nmol/mL)	Carbonilação de Proteínas (nmol/mg proteína)
Veículo <sup>a</sup>	0.1%	$1.93 \pm 0.11$	$2.77 \pm 1.00$	$2.31 \pm 0.10$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>b</sup>	150 $\mu\text{M}$	$18.46 \pm 1.81$	$27.52 \pm 3.16$	$24.69 \pm 1.15$
Cetamina	0,364 mM	$2.16 \pm 0.10$	$2.58 \pm 0.55$	$2.27 \pm 0.21$
	1,09 mM	$2.30 \pm 0.15$	$3.41 \pm 1.10$	$2.43 \pm 0.10$
	1,82 mM	$4.84 \pm 0.10^*$	$6.75 \pm 1.15^*$	$5.68 \pm 0.50^*$
	2,55 mM	$6.22 \pm 0.15^*$	$11.16 \pm 0.50^*$	$9.81 \pm 1.10^*$

<sup>a</sup> DMSO; <sup>b</sup> Controle positivo; \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  DP para três experimentos independentes em triplicata.

## 6.8 A cetamina tem efeitos clastogênicos fracos

Nossos dados do ensaio padrão alcalino cometa (pH > 13), como mostrado na Figura 10 e na Tabela 5, apontam que os PBLs expostos à cetamina por 6 h não aumentam o padrão de migração de DNA após a eletroforese em culturas tratadas em concentrações que variam de 100 a 500 µg / mL na presença ou não da fração metabolizadora S9, conforme valores de índice de danos (DI). As quebras da fita de DNA mediadas pela exposição à cetamina em PBLs só foram confirmadas na concentração mais alta (p < 0,05), mesmo quando a fração S9 metabolizante exógena foi aplicada. Como esperado, os PBL tratados com  $4 \times 10^{-5}$  MMS ou 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exibiram danos graves no DNA na presença ou ausência de mistura S9, enquanto a ciclofosfamida (50 µ / mL) foi genotóxica para células cultivadas somente após a ativação pela fração S9, como demonstrado pelo aumento do índice de dano ao DNA (Tabela 5). Além disso, as lesões oxidativas ao DNA após o tratamento com a cetamina foram detectadas pelo ensaio cometa usando enzima bacteriana formamidopirimidina DNA-glicosilase (Fpg, também conhecida como MutM). A Tabela 5 mostra o dano médio ao DNA causado pela cetamina, expresso como índice de dano ao DNA (DI, sítios sensíveis ao Fpg) após o tratamento com a enzima de reparo do DNA Fpg. Notou-se que os dados de pós-incubação com a enzima mostram claramente uma migração aumentada no DNA dos PBLs humanos tratados com cetamina, exclusivamente a 700 µg / mL (2,55 mM) (p < 0,05). Os resultados indicam que a extensão do dano oxidativo ao DNA causado pela cetamina (700 µg / mL), reconhecido pela FPG em PBLs, foi ligeiramente maior (~ 1,6 vezes) em relação aos PBLs cultivados com 700 µg / mL de cetamina sem glicosilase de DNA Fpg.

**Tabela 5.** Determinação dos efeitos da cetamina sobre o índice de dano (DI) em leucócitos humanos de sangue periférico (PBLs) com e sem ativação metabólica (mistura S9) e na presença ou ausência da enzima FPG.

Compostos	Tratamento	DI (-S9)	DI (+S9)	DI (enzima FPG)
Veículo <sup>a</sup>	0.1%	3.75 ± 0.15	5.57 ± 0.21	7.16 ± 0.10
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>b</sup>	150 µM	117.40 ± 2.61*	123.85 ± 4.29*	283.52 ± 3.58* <sup>#</sup>
MMS <sup>b</sup>	4 x 10 <sup>-5</sup> M	316.84 ± 7.10*	307.52 ± 4.13*	322.06 ± 5.41*
Ciclofosfamida <sup>b</sup>	50 µg/mL	6.39 ± 0.20	187.43 ± 2.16* <sup>'''</sup>	6.24 ± 0.15
Cetamina	0,364 mM	2.19 ± 1.13	3.63 ± 0.40	3.71 ± 0.75
	1,09 mM	3.86 ± 1.07	5.22 ± 1.10	4.59 ± 0.91
	1,82 mM	2.43 ± 0.88	4.94 ± 1.15	12.86 ± 0.33* <sup>#</sup>
	2,55 mM	26.39 ± 0.75*	21.48 ± 0.11*	41.26 ± 2.25* <sup>#</sup>

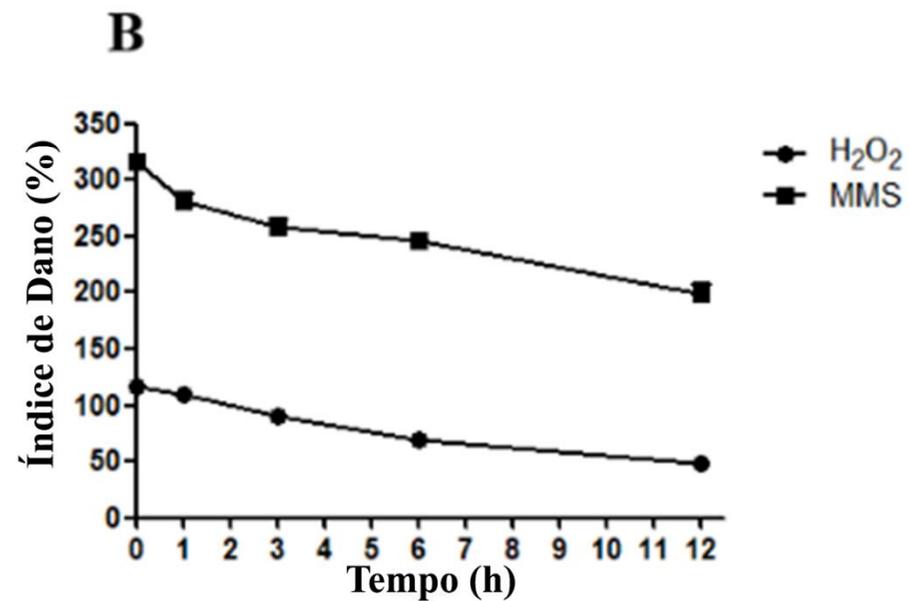
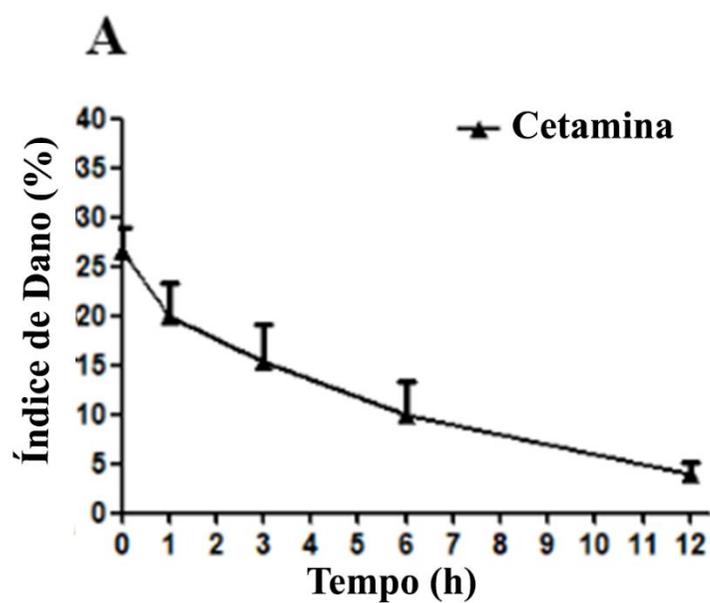
<sup>a</sup> DMSO; <sup>b</sup> Controles positivos; \* p <0,05 comparado ao grupo salina por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os dados são apresentados como médias ± DP para três experimentos independentes em triplicata; <sup>'''</sup> p <0,05 comparado aos experimentos realizados na presença ou ausência da S9 por ANOVA seguido do teste de Tukey. Os dados são apresentados como médias ± DP para três experimentos independentes em triplicata. <sup>#</sup>p <0,05 em comparação com experimentos realizados na presença ou ausência S9 e enzima FPG por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os dados são apresentados como médias ± DP para três experimentos independentes em triplicata.

Em geral, a cetamina pode ser considerada um fraco indutor de genotoxicidade. A Figura 9 mostra a cinética de junção de quebras de DNA medidas pelo ensaio cometa alcalino em PBLs humanos tratados com a maior concentração de cetamina. A curva cinética da ligação das fitas de DNA mostrou que após 6 h de tempo de retorno, quase 62% das quebras de fita de DNA foram reparadas, com um pico de ~ 85% após 12 horas de tempo de reparo em culturas tratadas com cetamina.

Nossos dados obtidos a partir do teste do micronúcleo de citocalasina-B (Tabela 6) mostram claramente que a cetamina não diminuiu significativamente a frequência das células binucleares (BNC) em nenhuma das concentrações avaliadas experimentalmente (condições -S9 e + S9), o que significa tecnicamente que a Cetamina não possui citotoxicidade após 24 horas de tratamento em PBLs humanas.

As análises da indução de micronúcleos em PBLs, na presença ou ausência do metabolizante exógeno S9 foram negativas (Tabela 6), reforçando a tese de que a cetamina não tem potencial mutagênico nas condições experimentais aplicadas no presente estudo. A Tabela 7 mostra que a cetamina não demonstrou efeitos na indução de aberrações numéricas e cromossômicas em PBLs cultivados na presença ou na ausência da fração S9. Os Cromossomos e as rupturas de cromátides, bem como variação do conteúdo de ploidia e endoreduplicação observadas em culturas experimentais não diferiram estatisticamente dos grupos de controle negativos. Além disso, a cetamina não tem potencial citotóxico em PBLs cultivados em nossas condições experimentais (condições -S9 e + S9) porque não diminui o índice mitótico (Tabelas 7 e 8)

**Figura 9.** Cinética de reparo das quebras da fita de DNA, avaliada pelo ensaio alcalino cometa em PBLs humanos tratados por 6 h com cetamina a 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  A) ou 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $4 \times 10^{-5}$  MMS (B) e analisados 1, 3, 6 e 12 h após a exposição. Os dados são apresentados como valores médios  $\pm$  DP de três experiências independentes em triplicado.



**Tabela 6.** Efeitos da cetamina sobre a frequência de células micronucleadas de PBLs humanos no teste do micronúcleo (MN) com e sem ativação metabólica (mistura S9).

Compostos	Tratamento	-S9		+S9	
		% BNC	MN por 2.000 BNC <sup>c</sup>	% BNC	MN por 2.000 BNC <sup>c</sup>
Veículo <sup>a</sup>	0.1%	87.53 ± 2.16	4.60 ± 0.75	82.03 ± 1.11	2.91 ± 1.06
MMS <sup>b</sup>	4 x 10 <sup>-5</sup> M	38.24 ± 4.96*	65.14 ± 2.55*	43.17 ± 3.25*	69.38 ± 1.80*
Ciclofosfamida <sup>b</sup>	50 µg/mL	82.41 ± 0.22	5.39 ± 1.27*	58.72 ± 2.10* <sup>#</sup>	33.15 ± 4.07* <sup>#</sup>
Cetamina	0,364 mM	82.46 ± 3.15	3.72 ± 0.10	86.24 ± 0.22	3.55 ± 0.10
	1,09 mM	81.30 ± 1.17	4.05 ± 0.22	81.42 ± 1.05	4.13 ± 0.81
	1,82 mM	83.51 ± 1.15	4.78 ± 0.10	80.77 ± 0.45	3.82 ± 0.13
	2,55 mM	79.54 ± 0.55	5.81 ± 0.27	76.38 ± 1.15	4.16 ± 1.10

<sup>a</sup> DMSO; <sup>b</sup> Controle positivo; A frequência de <sup>c</sup> MN é expressa por 2.000 células binucleadas (BNC); \* p < 0,05 comparado ao grupo salina por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os dados são apresentados como médias ± DP para três experimentos independentes em triplicata; #p < 0,05 comparado a experimentos conduzidos na ausência de mistura S9 por ANOVA seguido do teste de Tukey. Os dados são apresentados como médias ± DP para três experimentos independentes em triplicata.

**Tabela 7.** Índice mitótico, frequência de aberrações cromossômicas e alterações numéricas em PBLs cultivados após a exposição da cetamina sem ativação metabólica (fração S9).

Compostos	Fração S9	Tratamento	Índice de Mitose (%) <sup>c</sup>	Número de Aberrações <sup>d</sup>			Células Aberrantes (%) <sup>e</sup>
				R	P	E	
Veículo <sup>a</sup>	-	0.1%	8.25 ± 0.71	3	1	0	1.33 ± 0.57
MMS <sup>b</sup>	-	4 x 10 <sup>-5</sup> M	2.81 ± 0.33*	27	0	0	9.00 ± 3.46*
Ciclofosfamida <sup>b</sup>	-	50 µg/mL	7.46 ± 0.20*	1	0	1	0.66 ± 0.57
Cetamina	-	0,364 mM	8.10 ± 0.50	4	0	0	1.33 ± 0.57
	-	1,09 mM	7.34 ± 0.20	0	0		0.0
	-	1,82 mM	7.71 ± 0.11	0	0	0	0.0
	-	2,55 mM	7.65 ± 0.55	4	0	2	2.00 ± 1.00

<sup>a</sup>DMSO; <sup>b</sup>Controles positivos; <sup>c</sup>determinado para 2.000 células (média ± SD); número de aberrações por 150 metáfases analisadas: R, rupturas (cromossomo e cromátide); P, células poliplóides; Endoreduplicação); <sup>e</sup> percentual de células com pelo menos uma aberração; \* p <0,05 comparado ao grupo salina por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os dados são apresentados como médias ± DP para três experimentos independentes em triplicata. Os dados são apresentados como médias ± DP para três experimentos independentes em triplicata.

**Tabela 8.** Índice mitótico, frequência de aberrações cromossômicas e alterações numéricas em PBLs cultivados após a exposição da cetamina com ativação metabólica (fração S9).

Compostos	Fração S9	Tratamento	Índice de Mitose (%) <sup>c</sup>	Número de Aberrações <sup>d</sup>			Células Aberrantes (%) <sup>e</sup>
				R	P	E	
Veículo <sup>a</sup>	+	0.1%	7.49 ± 0.15	4	0	0	1.33 ± 0.57
MMS <sup>b</sup>	+	4 x 10 <sup>-5</sup> M	3.16 ± 0.22*	31	0	0	10.33 ± 1.15*
Ciclofosfamida <sup>b</sup>	+	50 µg/mL	3.24 ± 0.10*	23	3	4	10.00 ± 2.00* <sup>#</sup>
Cetamina	+	0,364 mM	8.10 ± 0.25	0	0	2	0.66 ± 0.57
	+	1,09 mM	8.01 ± 0.11	2	0	0	0.66 ± 0.57
	+	1,82 mM	7.43 ± 0.15	3	0	1	1.33 ± 0.57
	+	2,55 mM	7.52 ± 0.22	0	0	0	0.0

<sup>a</sup>DMSO; <sup>b</sup>Controles positivos; <sup>c</sup>determinado para 2.000 células (média ± SD); número de aberrações por 150 metáfases analisadas: R, rupturas (cromossomo e cromátide); P, células poliplóides; E, Endoreduplicação); <sup>e</sup> percentual de células com pelo menos uma aberração; \* p < 0,05 comparado ao grupo salina por ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os dados são apresentados como médias ± DP para três experimentos independentes em triplicata; #p < 0,05 comparado a experimentos conduzidos na ausência de mistura S9 por ANOVA seguido do teste de Tukey. Os dados são apresentados como médias ± DP para três experimentos independentes em triplicata.

### **6.9 A Cetamina não demonstrou efeitos mutagênicos em bactérias**

A Cetamina foi testada pela primeira vez para a toxicidade da estirpe TA100 em concentrações de 8-5000  $\mu\text{g}$  / placa no ensaio Salmonella / microsoma. Como parâmetro de análise, a substância-teste seria considerada tóxica se o índice mutagênico (contagem de colônias na placa de teste / contagem média nas placas de controle negativo; MI) fosse inferior a 0,60 em pelo menos duas das concentrações testadas. Os intervalos de das concentrações testadas para o teste de mutagenicidade foram os mais elevados possíveis, sendo estes baseados na solubilidade da molécula. Os resultados do nosso ensaio indicaram que não houve citotoxicidade em nenhuma das concentrações avaliadas. Além disso, a cetamina não aumentou o número de colônias revertentes (os índices mutagênicos após tratamentos não diferiram do controle negativo), mesmo na maior concentração estudada, destacando a ausência de efeito mutagênico nos sistemas bacterianos na presença ou não de fração S9 (Tabelas 9 e 10).

**Tabela 9.** Indução de revertentes *his+* para duas linhagens de *S. typhimurium* (TA100 e 102) para a avaliação da mutagenicidade da Cetamina, com (S9) e sem (S9) ativação metabólica.

		<i>S. typhimurium</i>							
		TA 100				TA 102			
Compostos	Tratamentos	-S9		+S9		-S9		+S9	
		Rev/placa <sup>c</sup>	MI <sup>d</sup>						
Veículo <sup>a</sup>	0.1%	110.93 ± 19.35	-	137.24 ± 10.56	-	359.62 ± 21.15	-	472.31 ± 33.72	-
PC <sup>b</sup>		1837.84 ± 68.21*	16.56	1628.52 ± 74.10*	11.86	1948.11 ± 46.74*	5.41	1934.29 ± 55.08*	4.09
Cetamina	1,82 mM/placa	127.40 ± 16.20	1.14	139.61 ± 8.35	1.01	348.15 ± 55.16	0.96	481.36 ± 75.11	1.01
	3,64 mM/ placa	116.48 ± 4.92	1.05	147.58 ± 11.27	1.07	351.84 ± 48.39	0.97	495.83 ± 63.59	1.04
	9,1 mM/ placa	105.21 ± 10.47	0.94	142.26 ± 13.04	1.03	339.22 ± 61.47	0.94	480.21 ± 37.21	1.01
	18,2 mM/ placa	113.39 ± 15.26	1.02	135.70 ± 16.11	0.98	355.37 ± 28.25	0.98	517.39 ± 48.15	1.09

<sup>a</sup>DMSO; <sup>b</sup> Controle positivo: (-S9) 1-oxido de 4-nitroquinolina (0,5 / placa); (+ S9) aflatoxina B1 (1 µg / placa); Número de revertentes / placa apresentados como médias ± DP para três experimentos independentes em triplicata; dMI: índice mutagênico (número de suas colônias + induzidas na amostra / número de espontâneas + colônias no controle negativo). \* p <0,05 comparado ao grupo de veículo.

**Tabela 10.** Indução de revertentes *his+* para duas linhagens de *S. typhimurium* (TA98 e 97a) para a avaliação da mutagenicidade da Cetamina, com (S9) e sem (S9) ativação metabólica.

		<i>S. typhimurium</i>							
		TA98				TA97a			
Compostos	Tratamentos	-S9		+S9		-S9		+S9	
		Rev/placa <sup>c</sup>	MI <sup>d</sup>						
Veículo <sup>a</sup>	0.1%	21.86 ± 4.39	-	33.17 ± 1.25	-	41.70 ± 2.18	-	68.17 ± 5.42	-
PC <sup>b</sup>		415.28 ± 35.68*	18.99	769.61 ± 41.29*	23.20	891.55 ± 63.72*	21.38	1749.24 ± 88.35*	25.65
Cetamina	1,82 mM/placa	15.37 ± 1.36	0.70	38.44 ± 1.00	1.15	35.18 ± 4.15	0.84	60.83 ± 1.10	0.89
	3,64 mM/ placa	24.13 ± 2.77	1.10	32.19 ± 2.11	0.97	30.04 ± 2.25	0.72	67.94 ± 5.15	0.99
	9,1 mM/ placa	19.60 ± 2.20	0.89	30.28 ± 4.18	0.91	25.17 ± 0.10	0.60	69.51 ± 1.21	1.01
	18,2 mM/ placa	22.05 ± 3.15	1.00	32.53 ± 0.55	0.98	31.53 ± 3.17	0.75	73.10 ± 0.75	1.07

<sup>a</sup> DMSO; <sup>b</sup> Controle positivo: (-S9) 1-óxido de 4-nitroquinolina (0,5 / placa); (+ S9) aflatoxina B1 (1 µg / placa); Número de revertentes / placa apresentados como médias ± DP para três experimentos independentes em triplicata; dMI: índice mutagênico (número de suas colônias + induzidas na amostra / número de espontâneas + colônias no controle negativo). \* p < 0,05 comparado ao grupo de veículo.

## 7. DISCUSSÃO

Atualmente, o aumento das estirpes de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, bem como a limitação do arsenal antifúngico, tem tornado as candidemias um problema desafiador para a medicina clínica (ARENDRUP & PATTERSON, 2017; WIEDERHOLD, 2017). Dessa forma, o redirecionamento de drogas surge como uma alternativa terapêutica importante para o tratamento das infecções pelo gênero *Candida*. Segundo STRITTMATTER et al. (2014), o reaproveitamento de drogas é uma metodologia importante para se obter um certo grau de eficiência na descoberta de novos agentes terapêuticos. Vale ressaltar que esses fármacos já possuem propriedades farmacológicas e toxicológicas bem caracterizadas, fato este que já reduz seus custos e o tempo para o desenvolvimento de um novo medicamento.

No presente trabalho nossos resultados mostraram um efeito sinérgico entre a cetamina e dois agentes antifúngicos, o fluconazol e o itraconazol. A atividade antimicrobiana da cetamina foi descrita por GOCMEN et al. (2008) onde foi evidenciada uma atividade antibacteriana *in vitro* frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, em concentrações que variaram entre 500-2.000 µg/mL. Em um outro estudo feito por BEGEC et al. (2013), foi investigada a atividade antimicrobiana da cetamina isolada e combinada com o propofol. Os seus dados revelaram uma atividade antimicrobiana frente a cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Porém, de acordo com a Antifungal Synergistic Drug Combination Database (ASDCD) não há relatos de trabalhos anteriores que demonstrem o efeito sinérgico da cetamina com compostos azólicos (CHEN et al., 2014).

Nas leveduras, o método mais comum para monitorar a integridade da membrana celular é o iodeto de propídio (PI). O PI é um intercalador de ácido nucleico fluorescente que só pode entrar em células com uma membrana celular rompida, e pode ser empregado rotineiramente em formatos de baixo e alto rendimento (CARMONA-GUTIERREZ et al., 2018). Quando as células foram expostas ao tratamento combinado entre a cetamina e os antifúngicos azólicos, fluconazol e itraconazol, foi possível observar um aumento no número de células PI positivos em comparação ao grupo controle. O aumento da captação de PI nas células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol tratadas, demonstra que essas combinações podem alterar a estrutura da membrana celular, resultando na perda da integridade da membrana plasmática das células fúngicas, bem como no aumento da permeabilidade. Os danos na membrana plasmática podem levar a

formação de poros, ocasionando um colapso no potencial eletroquímico, resultando em falhas nos transportes de íons pela membrana, tornando as células microbianas incapazes de se autorregular e levando a morte celular (DAS et al. 2015; 2016; CARMONA-GUTIERREZ et al., 2018).

Em um estudo feito por PINA VAZ et al. (2000), foi avaliado o efeito antifúngico de anestésicos frente a cepas de *Candida* spp. onde foi evidenciado que as células que foram expostas a concentrações fungicidas dos fármacos tornaram-se rapidamente permeáveis ao PI, indicando que provavelmente o mecanismo de ação fungicida destas moléculas seriam por meio de danos diretos à membrana citoplasmática. Contudo, em um estudo mais recente realizado por UESONO et al., 2016, foi demonstrado que os anestésicos parecem afetar vários alvos da membrana das leveduras, porém as suas interações com a membrana parecem ser não específicas. Dentro desse ponto de vista, fez-se necessário avaliar o envolvimento de outros compartimentos celulares nas leveduras após a exposição com esses compostos.

No presente trabalho, as células de leveduras tratadas com as combinações do sinergismo proposto demonstraram níveis aumentados de ROS, levando à geração de radicais hidroxila. Diversos autores apontam para cetamina como uma molécula indutora de ROS em células eucarióticas (SHAN et al., 2018; ITO et al., 2015). Segundo ITO et al., (2015), doses elevadas de cetamina podem promover a fissão e degradação mitocondrial, resultando na perda do potencial de membrana mitocondrial e geração intracelular de ROS, onde essas alterações podem induzir a ativação de caspases.

Embora os ROS atuem como transdutores de sinal, quando acumulados nas células na forma de peróxido de hidrogênio, os radicais superóxido e hidroxila ROS são considerados reguladores essenciais do envelhecimento e têm sido relatados como elemento chave no processo de apoptose fúngica (SILVA et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2018). Além disso, é importante destacarmos que as mitocôndrias representam a principal fonte de produção de ROS intracelular (TIAN et al. 2012).

Durante os estágios iniciais da apoptose, alterações no  $\Delta\psi_m$  são seguidas pela geração de ROS (KOBAYASHI et al. 2002). As dinâmicas e funções mitocondriais possuem um papel crucial em diversos processos biológicos, tais como envelhecimento e morte celular programada (PCD) (MAZZONI et al., 2013). O colapso do  $\Delta\psi_m$  pode ser induzido por vários fatores e é um evento celular importante durante a apoptose, pois pode levar a abertura de poros transitórios na membrana mitocondrial, ocasionando à

liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol (SILVA et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2018). Nossos achados sugerem que a combinação da cetamina com os azólicos, fluconazol e itraconazol, afetam a função respiratória mitocondrial, impedindo que o Rh123 se acumule nas mitocôndrias.

O colapso do  $\Delta\psi_m$  está intrinsicamente associado a uma série de eventos, tais como a condensação e a fragmentação do DNA (HWANG et al. 2012a; TIAN et al., 2017). A condensação e a fragmentação do DNA são características que representam um passo irreversível na condução da morte celular (HWANG et al., 2012b). As colorações de TUNEL e o ensaio do cometa na versão alcalina nos nossos ensaios revelaram que os tratamentos das células de *C. albicans* com os azólicos e a cetamina, induziram danos ao DNA, bem como fragmentação nuclear e condensação. Contudo, modificações estruturais podem ocorrer nas bases nucleotídicas como resultado do estresse oxidativo. De acordo com BJELLAND & SEEBERG (2003), processos oxidativos nas bases nucleotídicas são extremamente importantes para a homeostasia celular e sobrevivência, bem como a quebra das cadeias de DNA. As endonucleases mais comumente usadas no ensaio do cometa modificado são a glicosilase de DNA da formamidopirimidina (FPG, também conhecida como MutM) e a endonuclease III (ENDOIII, também conhecida como NTH), onde a FPG é específica para purinas oxidadas enquanto que a ENDOIII reconhece pirimidinas oxidadas (SILVA et al., 2011)

Nossos achados evidenciaram que após a incubação com a enzima FPG, houve um claro aumento na migração de DNA das células tratadas com os tratamentos sinérgicos propostos. Os resultados revelaram uma extensão do dano oxidativo do DNA nas bases de purinas através das EROs, levando à ruptura do filamento. Esses dados corroboram com os de LEFFA et al. (2016), onde foi demonstrado que a cetamina promove danos ao DNA por meio do estresse oxidativo, onde o excesso de EROs pode perturbar a manutenção do status normal de adenina e do nucleotídeo piridínico, o que pode afetar a viabilidade do DNA.

De acordo com TIAN et al., (2017), a condensação e a fragmentação do DNA são características morfológicas típicas de células apoptóticas durante os estágios finais da apoptose. Outro achado para o mecanismo de morte celular por apoptose é avaliado pelo número de células marcadas pela co-coloração do FITC-conjugado Anexina V com o PI. Esse marcador na presença do íon  $Ca^{2+}$ , liga-se com elevada afinidade a fosfatidilserina presente nas membranas das células apoptóticas (HWANG et al., 2012a). De uma forma geral, nossos resultados sugerem que as células de *C. albicans* expostas à

cetamina e os azólicos exibiram as características morfológicas de um processo apoptótico, indicando que as combinações provavelmente exercem suas atividades antifúngicas através de mecanismos de indução de apoptose. Além disso, segundo TIAN et al. (2017), o fato de drogas antifúngicas induzirem apoptose é extremamente importante, em decorrência da elevada taxa de mortalidade da candidíase invasiva.

Na presença do biofilme fúngico, os antifúngicos são geralmente menos eficazes ou, em alguns casos, até mesmo ineficazes. De acordo com TAFF et al., (2013), para superar este grave problema clínico, novas estratégias na prevenção do biofilme estão começando a explorar o uso combinado de diferentes compostos com antimicrobianos, a fim de aumentar sua eficácia. Os resultados deste estudo mostraram que os tratamentos sinérgicos propostos podem inibir a viabilidade do biofilme formado de *C. albicans*. É importante ressaltar que nossos dados revelam que a concentração da associação da cetamina com o itraconazol foi semelhante tanto para inibir tanto as células planctônicas quanto as células de biofilme pré-formadas. Num estudo realizado por KATHWATE & KARUPPAYIL (2016), onde avaliou-se a propriedade antifúngica de anestésicos, foi observado que o tramadol foi capaz de inibir a formação de biofilme formado e em formação em concentrações próximas de 8 mg/mL. Nossos achados tornam-se relevantes porque os biofilmes estão frequentemente associados à sensibilidade reduzida aos antimicrobianos convencionais (SILVA et al., 2016; KATHWATE & KARUPPAYIL, 2016).

A cetamina é um anestésico amplamente utilizado na prática clínica e já existem relatos na literatura da sua capacidade em induzir uma neurotoxicidade, além de promover um efeito modulador nas células do sistema imunológico (PAVLOVIC et al., 2018). Contudo, a descrição do seu mecanismo de toxicidade ainda permanece incerta. Diante destas observações, resolvemos avaliar a citotoxicidade da Cetamina frente a células L929 e dos leucócitos humanos de sangue periférico (PBLs).

O uso da cetamina sozinha ou associada aos azólicos não causou nenhum efeito citotóxico nas células L929 cultivadas ( $IC_{50} > 100$ ) nas concentrações propostas. Segundo BACKER et al., (2016), a toxicidade induzida pela cetamina frente a células humanas está associada a elevadas concentrações do fármaco ( $> 1$  mM). Num outro estudo conduzido por HILLS et al., (2013), foi evidenciado que cetamina promoveu uma redução no número de células epiteliais humanas do túbulo proximal após a exposição por 48 horas na concentração de aproximadamente 3.8 mM da droga. De acordo com os achados de ROBINSON et al. (2017), o cloridrato de cetamina induziu citotoxicidade,

sem mortalidade, em embriões de peixe zebra, somente em concentrações próximas de 2 mM após 72 horas de exposição.

No presente estudo, nos baseamos no ensaio metabólico para avaliar a viabilidade dos PBLs. De acordo com os resultados obtidos, a cetamina demonstrou citotoxicidade apenas em altas concentrações (Figura 1A e 1B. Até onde sabemos, não há na literatura, dados disponíveis sobre os efeitos citotóxicos do cloridrato de cetamina sobre os leucócitos humanos em cultura. BRAUN et al. (2010) relataram que a cetamina em concentrações milimolares (~2mM), é capaz de induzir a apoptose pela via mitocondrial (avaliada por citometria de fluxo usando coloração com Anexina V), em células T linfoblásticas, Jurkat. Além disso, PAVLOVIC et al. (2018) mostraram que a cetamina também induziu apoptose em timócitos de rato, principalmente através da indução de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Vale ressaltar que outros estudos mostraram que um aumento na produção intracelular de EROs e alterações no potencial de transmembrana mitocondrial em células não imune, após a exposição da cetamina (BOSNJAK et al., 2012; ITO et al., 2015).

Diante disso, medimos indiretamente o potencial pró-oxidante da cetamina através de três metodologias distintas baseadas na detecção da formação de nitritos / nitratos como produto da degradação do NO e nos níveis de oxidação de lipídios e proteínas. Nossos dados apresentados na Tabela 3 concordam com a literatura em que a citotoxicidade da cetamina *in vitro* e *in vivo* é mediada pela formação de EROS que desencadeiam a apoptose como um mecanismo comum envolvido na toxicidade induzida (BRAUN et al., 2010; BOSNJAK et al., 2012; ITO et al. al., 2015; YAN et al., 2014; PAVLOVIC et al., 2018). Sobre a indução de apoptose, nossos dados mostraram que a Cetamina induziu alterações morfológicas celulares compatíveis com células submetidas à morte celular apoptótica em concentrações mais altas (Figura 1B), o que corrobora com o nosso ensaio de viabilidade celular (Figura 1A).

Segundo a EMCDDA (2002), os dados publicados sobre os testes de genotoxicidade da cetamina, na sua forma racêmica, são insuficientes e não permitem uma avaliação razoável do seu potencial genotóxico. No presente estudo, a cetamina não foi capaz de induzir quebras *in vitro* no DNA dos PBLs, após a avaliação do ensaio padrão do cometa alcalino (pH > 13) em concentrações variando de 100 µg / mL a 500 µg / mL (0,36mM - 1,82 mM), mesmo quando a fração S9 foi usada (Tabela 4). Apenas 700 µg / mL de cetamina alteraram o padrão de migração do DNA devido à indução de pequenos níveis de lesões de DNA. No entanto, como mostrado na Figura 9, mais de 80% das

quebras da fita de DNA foram reparadas, atingindo o valor DI próximo ao controle negativo.

Diversas enzimas de reparo do DNA possuem uma atividade potencializada nas células proliferativas, quando comparadas com as em repouso (SIROVER, 1990). Os linfócitos não estimulados têm uma capacidade de reparo de DNA menor do que os proliferativos estimulados pelo agente mitogênico (KAMINSKAS e LI, 1991). As observações de LAVIN e KIDSON (1977) corroboram com essas colocações, onde em seu estudos foi relatado que os linfócitos estimulados por fitohemaaglutinina também eram mais proficientes que os linfócitos não estimulados na reparação de danos no DNA induzidos pela irradiação com raios X e por irradiação UV (LEWENSOHN et al., 1979; FREEMAN e RYAN, 1988).

Com relação aos danos oxidativos ao DNA, nossos dados do ensaio de cometa modificado empregando a proteína FPG (Tabela 4) evidenciaram locais sensíveis no ácido nucleico ao FPG, após a exposição dos PBLs a doses elevadas da cetamina. Locais susceptíveis a esta enzima são principalmente regiões do DNA que apresentam bases purinas oxidadas, incluindo principalmente a 8-oxo-7,8-dihidroguanina. O DNA é vulnerável a modificações deletérias induzidas pelas EROs. Danos irreparáveis ao DNA podem levar a mutações causadoras de doenças (ou seja, câncer) ou podem ativar mecanismos específicos de morte celular por apoptose. Os linfócitos em proliferação repararam as lesões de DNA induzidas por ROS mais rapidamente do que os linfócitos quiescentes (KAMINSKAS e LI, 1991). Esses dados são corroborados pelos ensaios de CAVALCANTI, et al. (2010), onde os respectivos autores demonstraram que os linfócitos humanos em proliferação eram capazes de reparar rapidamente as lesões de DNA induzidas pela geração de EROs após a exposição a um composto naftoquinona (CAVALCANTI, et al., 2010). Como os danos ao DNA induzidos pela cetamina foram quase completamente reparados, nossos achados nos permitem pensar que a geração de EROs pela cetamina (1,82 mM e 2,55 mM) podem estar ativando uma ou mais vias específicas ligadas aos seus efeitos citotóxicos em PBLs humanos.

A Cetamina metabolizada ou não pelo emprego da fração metabolizante exógena S9 não demonstrou uma redução na frequência das células binucleadas ou no índice mitótico (indicando que os tratamentos não interferiram na proliferação de PBLs), bem como não induziu quaisquer anormalidades citogenéticas em PBLs, como avaliado pelo teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN) (Tabela 5) e ensaios de CA (Tabela 6). Estes resultados corroboram com os dados do nosso ensaio cometa

(Tabela 4), uma vez que a maior parte das quebras de fita de DNA detectadas foram reparadas, o que resultou em nenhuma aberração cromossômica ou numérica. Além disso, nossos dados do micronúcleo *in vitro* corroboram com os de TOYAMA et al. (2006) que relataram que a cetamina não aumentou significativamente a frequência dos fibroblastos micronucleados de hamster chinês (CHL / UI) após exposição contínua (sem fração S9) durante 24, 48 ou 72h em uma concentração variando (50 a 500 µg / mL) semelhante aos tratamentos avaliados durante o presente estudo. Em contraste, as células CHL / IU tratadas com cetamina, na presença ou não da mistura S9, induziram frequências elevadas de células micronucleadas no tratamento a curto prazo (6h de exposição seguidas por períodos de recuperação sem fármaco) mas apenas em concentrações iguais ou maiores que 1600 µg / mL (TOYAMA et al., 2006), que corresponde a uma concentração maior que o dobro da concentração máxima de cetamina usada na presente avaliação. Segundo ainda TOYAMA et al., (2006, apud YANAGIHARA et al., 1999) em um estudo clínico com voluntários saudáveis determinaram que a concentração máxima de cetamina plasmática era de aproximadamente 40 ng / ml após comprimidos orais contendo 50 mg de cetamina. Assim, as concentrações de cetamina avaliadas em nossos experimentos genotóxicos / mutagênicos são extremamente maiores que suas concentrações encontradas no sangue de pacientes humanos. Por outro lado, ADHVARYU et al., (1986) indicaram a indução da troca de cromátides irmãs dependente de dose (SCE) em células de ovário de hamster chinês (CHO) tratadas com cetamina em concentrações muito baixas (5 a 15 µM). Nossos dados citogenéticos conflitam com a indução de SCE pela cetamina (ADHVARYU et al., 1986), porém os efeitos observados no estudo SCE foram apenas fracos (ou seja, menos que o dobro dos valores de controle) e, portanto, a significância deste achado é insuficiente para concluir o seu potencial genotóxico.

Por último, a cetamina (8 a 5.000 µg / placa) após 48 h de incubação na presença ou ausência da mistura S9 não induziu efeitos mutagênicos nas cepas de *S. typhimurium* capazes de detectar as mutações do tipo “frameshift” (TA97a e TA98) e substituição nos pares de bases (TA100 e TA102 mutações (Tabelas 9 e 10). De acordo com nossos dados, WASKELL (1978) mostrou cetamina (10 mg / placa), na presença e ausência da fração S9 de fígado de rato, não induziu mutações do tipo “frameshift” (TA98) e substituição de pares de bases (TA100) em *Salmonella* / ensaio de mutagenicidade microssoma. Além disso, a cetamina (1mg) não inibiu o crescimento de cepas deficientes em reparo de DNA de *S. typhimurium* (TS24, TA2322 e TA1950) em

relação a uma cepa com reparo normal de DNA (WASKELL, 1978) indicando que cetamina não induz dano ao DNA em bactérias.

É importante ressaltar que no nosso trabalho, as concentrações encontradas da na combinação da cetamina com os azólicos são inferiores as descritas como mutagênicas e genotóxica as descritas no respectivo trabalho e encontradas na literatura. Contudo, GOCMEN et al (2008) resalta que o poder anestésico da cetamina é alcançado com concentrações sanguíneas de cerca de 2 µg/mL, sendo que desta forma uma atividade antimicrobiana não poderia ser vista em humanos durante a anestesia. Todavia, as concentrações descritas de cetamina no presente trabalho podem ser obtidas localmente. Essa afirmação é corroborada pelos ensaios de LYNCH et al. (2005), onde 21 pacientes foram submetidos a um tratamento tópico com cetamina a 1% (~35.9 mM) por um período de 6 a 12 meses. Ao final do seu experimento foi possível observar que o uso tópico da cetamina foi bem tolerado e que não houve absorção sistêmica significativa do fármaco.

De uma forma geral os nossos resultados sugerem que a cetamina pode ser utilizada como um agente adjuvante em combinação com antifúngicos azólicos para o tratamento das candidíases. Em conclusão, a combinação da cetamina com os azólicos, fluconazol e itraconazol, demonstrou uma atividade antifúngica contra células planctônicas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol *in vitro* e ao biofilme formado de *Candida* spp. Apesar destes tratamentos terem alterado a integridade da membrana mitocondrial e do plasma, o sinergismo também parece interagir com o DNA, levando à morte por apoptose, devido ao acúmulo intracelular de EROs.

## 8. CONCLUSÃO

Portanto, o presente estudo permitiu uma possível compreensão dos mecanismos de ação do efeito sinérgico da cetamina com derivados azólicos (Fluconazol e Itraconazol) sugerindo que esta combinação tem potencial para agir como potencial tratamento antifúngico com atividade apoptótica. Além disso, a combinação demonstrou ser capaz de diminuir a viabilidade do biofilme formado *in vitro*, em isolados de *Candida* spp. resistentes a azólicos. Além do mais, a cetamina mostrou ter um baixo efeito citotóxico nos PBLs após 24 horas de exposição. As lesões oxidativas no DNA foram detectadas, mas reparadas significativamente, o que refletiu a ausência de efeitos clastogênicos / aneugênicos em PBLs e ausência de mutagênese no teste AMES (Salmonella / Microsoma).

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. ADHVARYU, S. G.; TRIVEDI, A. H.; JANI, K. H.; VYAS, R. C.; DAVE, B. J. Genotoxic effects of ketamine on CHO cells. **Archives of Toxicology**, v. 59, p. 124-125, 1986.
2. ADLER, D. M. T.; DAMBORG, P.; VERWILGHEN, D. R. The antimicrobial activity of bupivacaine, lidocaine and mepivacaine against equine pathogens: An investigation of 40 bacterial isolates. *The Veterinary Journal*, v. 223, p. 27–31, 2017.
3. AFELTRA, J.; VITALE, R.G.; MOUTON, J.W.; VERWEIJ, P.E. Potent Synergistic *In Vitro* Interaction between Nonantimicrobial Membrane-Active Compounds and Itraconazole against Clinical Isolates of *Aspergillus fumigatus* Resistant to Itraconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1335–1343, 2004.
4. AHMED, A.; AZIM, A.; BARONIA, A. K.; MARAK, K.; GURJAR, M. Risk prediction for invasive candidiasis. *Indian J Crit Care Med*, v. 18, n. 10, p. 682–688, 2014.
5. AL-DORZI, M. et al. Invasive Candidiasis in Critically Ill Patients: A Prospective Cohort Study in Two Tertiary Care Centers. **Intensive Care Medicine**, p. 1-12, 2018.
6. ANDRADE NETO et al., Screening of Antimicrobial Metabolite Yeast Isolates Derived Biome Ceará against Pathogenic Bacteria, Including MRSA: Antibacterial Activity and mode of Action Evaluated by Flow Cytometry International. *Journal of Current Microbiology Applied and Science*, v. 4, n. 5, p. 459-472, 2015.
7. ANDRADE NETO, J.B., et al. A mechanistic approach to the in-vitro resistance modulating effects of fluoxetine against meticillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Microbial Pathogens*, v. 127, p. 335-340, 2019.
8. ANDRADE NETO, J.B., et al. Action mechanism of naphthofuranquinones against fluconazole-resistant *Candida tropicalis* strains evidenced by proteomic analysis: The role of increased endogenous ROS. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 32-42, 2018.
9. ARENDRUP, M.C.; PATTERSON, T.F. Multidrug-Resistant Candida: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. **Current Infectious Disease Reports**, v. 216, n. 2, p. S445–S451, 2017.

10. ARNI P, HERTNER T. Chromosomal aberrations in vitro induced by aneugens, *Mutation Research*, v. 379, p. 83-93, 1997.
11. AYDIN ON.; EYIGOR M.; AYDIN N. Antimicrobial activity of ropivacaine and other local anaesthetics. *Eur J Anaesthesiol* v. 18, n. 10, p. 687-94, 2001.
12. BAILLY, S.; MAUBON, D; FOURNIER, P.; PELLOUX, H.; SCHWEBEL, C.; CHAPUIS, C.; FORONI, L.; CORNET, M.; TIMSIT, J.F. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. – Trends over 10 years. **Journal of infection**, v. 72, n. 1, p. 103–111, 2016.
13. BAKER, S.C.; SHABIR, S.; GEORGOPOULOS, N.T.; SOUTHGATE, J. Ketamine-Induced Apoptosis in Normal Human Urothelial Cells: A Direct, N-Methyl-d-Aspartate Receptor-Independent Pathway Characterized by Mitochondrial Stress. *Am Journal of Pathology*, v. 186, n. 5, p. 1267-1277, 2016.
14. BASSETTI, M.; GARNACHO-MONTERO, J.; CALANDRA, T.; KULLBERG, B.; DIMOPOULOS, G.; AZOULAY, E.; CHAKRABARTI, A.; KETT, D.; LEON, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; SANGUINETTI, M.; TIMSIT, J.F.; RICHARDSON, M.D.; SHORR, A.; CORNELLY, O.A. Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 9, p. 1225-1238, 2017.
15. BEGEC, Z.; YUCEL, A.; YAKUPOGULLARI, Y.; ERDOGAN, M.A.; DUMAN, Y.; DURMUS, M.; ERSOY, M.O. The antimicrobial effects of ketamine combined with propofol: an in vitro study. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 63, n. 6, p. 461-465, 2013.
16. BERBERI, A., NOUJEIM, Z., & AOUN, G. Epidemiology of Oropharyngeal Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome Patients and CD4+ Counts. *Journal of international oral health: JIOH*, 7(3), 20–23, 2015.
17. BERLINCK, R.G.S., et al. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (PORIFERA) from the southeastern brazilian coast, *Comparative Biochemical and Physiology*, v.115C, p. 155-163, 1996.
18. BIBI MARJAN RAZAVI; SEDIGHEH FAZLY BAZZAZ. A review and new insights to antimicrobial action of local anesthetics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-03460-4> 2019, 2019.

19. BJELLAND, S.; SEEBERG, E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. **Mutation Research**, v. 531, p.37-80, 2003.
20. BOSNJAK, Z.J. et al. Ketamine induces toxicity in human neurons differentiated from embryonic stem cells via mitochondrial apoptosis pathway. **Current Drug Safety**, v. 7, p. 106-119, 2012.
21. BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação nacional de medicamentos essenciais: **RENAME** 2017. Brasília, DF, 2017.
22. BRAUN, S.; GAZA, N.; WERDEHAUSEN, R.; HERMANN, H.; BAUER, I.; DURIEUX, M. E.; HOLLMANN, M. W.; STEVENS, M.F. Ketamine induces apoptosis via the mitochondrial pathway in human lymphocytes and neuronal cells. **British Journal of Anaesthesia**, v. 105, p. 347-354, 2010.
23. BRILHANTE, R. S. N.; FECHINE, M. A. B.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; MONTEIRO, ANDRÉ JALLES; CAMARGO, Z.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. capsulatum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p.3978-3979, 2010.
24. BURLINSON B, et al. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research*, v. 627, p.31-35, 2007.
25. BUSS, H.; CHAN, T.P.; SLUIS, K.B.; DOMIGAN, N.M.; WINTERBOURN, C.C. Protein carbonyl measurement by a sensitive Elisa method. *Free Radical Biology Medical*, v. 23, p. 361-366, 1997.
26. CALDERONE RA, Clancy CJ. *Candida and Candidiasis*:ASM Press, Washington, DC, 2012.
27. CANELA, S.; CARDOSO, B.; VITALI, H.; COELHO, C.; MARTINEZ, R.; FERREIRA, S. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 1, p. 11 – 21, 2018.
28. CARMONA-GUTIERREZ, D.; BAUER, M.A.; ZIMMERMANN, A.; AGUILERA, A. et. al. Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature. **Microbiology Cell**, v. 5, n. 1, p. 4-31, 2018.
29. CASTANHEIRA, M.; MESSER, S.A.; RHOMBERG, P.R.; PFALLER, M.A. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 85, n., p. 200-204, 2016.

30. CAVALCANTI, B.C.; et al. Preclinical genotoxicology of nor- $\beta$ -lapachone in human cultured lymphocytes and chinese hamster lung fibroblasts. **Chemical Research Toxicology**, v. 24, p. 1560-1574, 2011.
31. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Fungal Diseases, 2015. Disponível em: [www.cdc.gov.com](http://www.cdc.gov.com). Acesso em 31 mar.2019.
32. CHEN, X.; REN, B.; CHEN, M.; LIU, M.X.; REN, W.; WANG, Q.X.; ZHANG, L.X.; YAN, G.Y. ASDCD: antifungal synergistic drug combination database. **PLoS One**. 24;9(1): e86499, 2014.
33. CHENG-WEI LU.; TZU-YU LIN.; Jiann-Shing Shieh.; Ming-Jiuh Wang.; Kuan-Ming Chiu. Antimicrobial Effect of Continuous Lidocaine Infusion in a Staphylococcus aureus-Induced Wound Infection in a Mouse Model. *Annals of Plastic Surgery* v. 73, n. 5,2014.
34. CHONG, C.R.; SULLIVAN, D.J. New uses for old drugs. **Nature**, v. 448, p. 645-646, 2007.
35. 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.
36. 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.
37. COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*, v. 26, p.249-261, 2004.
38. COLOMBO, A.L.; ALMEIDA JÚNIOR, J.N.; GUINEA, J. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. **Current Opinion Infection Disease**, v. 30, n. 6, p.528-538, 2017.
39. COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; SUKIENIK, T.; PASQUALOTTO, A.C.; ANDREOTTI, R.; QUEIROZ-TELLES, F. et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter centers sequentially conducted over a 9-year Period. *M. Journal of Intensive Care Medicine*, v. 40, n. 10, p. 1489–98, 2014.
40. COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D.A. et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a

- nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–23, 2006.
41. COSTA SILVA, et al. *In vitro* anti-Candida activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. **Microbial Pathogens**, v. 107, p. 341-348, 2017.
  42. DA SILVA JÚNIOR, E.N. et al. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. *European Journal Medical Chemistry*, v. 46, n. 1, p.399-410, 2011.
  43. Da SILVA, A. R. et al. Berberine Antifungal Activity in Fluconazole-resistant Pathogenic Yeasts: Action Mechanism Evaluated by Flow Cytometry and Biofilm Growth Inhibition in *Candida* spp. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 60, p. 3551-7, 2016.
  44. DA SILVA, C.R.; DE ANDRADE NETO, J.B.; SIDRIM, J.J.; ANGELO, M.R.; MAGALHÃES, H.I.; CAVALCANTI, B.C.; BRILHANTE, R.S.; MACEDO, D.S.; DE MORAES, M.O.; LOBO, M.D.; GRANGEIRO, T.B.; NOBRE JÚNIOR, H.V. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691-1700, 2013.
  45. DAS, B. et al.. Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage- Associated Antibacterial Activity Against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, 2016 <https://doi:10.4137/idrt.s31741>.
  46. DAS, B. et al.. Green synthesized silver nanoparticles destroy multi drug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015 <http://doi:10.1016/j.arabjc.2015.08.008>.
  47. DE MEDEIROS, AP, et al. Genetic relatedness among vaginal and anal isolates of *Candida albicans* from women with vulvovaginal candidiasis in north-east Brazil. **Journal Medical Microbiology**, v. 63, p. 1436-45, 2014.
  48. DOI, A.M.; PIGNATARI, A.C.C.; EDMOND, M.B.; MARRA, A.R.; CAMARGO, L.F.A.; SIQUEIRA, R.A., et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of

- Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS ONE*, v. 11, (1): e0146909, 2016.
49. DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-93, 2002.
  50. DRAPER, H.H.; HADELY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation, *Methods Enzymology*, v. 186, p. 421-43, 1990.
  51. DRGONA, L.; KHACHATRYAN, A.; STEPHENS, J.; CHARBONNEAU, C.; KANTECKI, M.; HAIDER, S.; BARNES, R. Clinical and economic burden of invasive fungal diseases in Europe: focus on pre-emptive and empirical treatment of *Aspergillus* and *Candida* species. **European Journal Clinical Microbiology Infection Disease**, v. 33, p. 7–21, 2014.
  52. EMCDDA, Report on the risk assessment of ketamine in the framework of the joint action on new synthetic drugs. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Luxembourg, **Office for Official Publications of the European Communities**. 2002.
  53. FENECH, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.
  54. FEUERSCHUETTE, O. H. M. et al. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **FEMINA**, v. 38, n. 2, 2010.
  55. FILIPPIN, B.; SOUZA, L. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 2, v. 42, 2006.
  56. FREEMAN, S.E.; RYAN, S.L. Excision repair of pyrimidine dimers in human peripheral blood lymphocytes: comparison between mitogen stimulated and unstimulated cells, **Mutation Research**, v. 194, p. 143-150, 1988.
  57. GAO, L.; SUN, Y.; HE, C.; ZENG, T.; LI, M. Synergistic Effects of Tacrolimus and Azoles against *Exophiala dermatitidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 22, 2017.
  58. GOCMEN, S.; BUYUKKOCAK, U.; CAGLAYAN, O. *In vitro* investigation of the antibacterial effect of ketamine. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 113, n. 1, 2008.
  59. GOODMAN, L.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.
  60. GRAY, K.C.; PALACIOS, D.S.; DAILEY, I.; ENDO, M.M.; UNO, B.E.; WILCOCK, B.C.; M.D. BURKE, M.D. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 109, p. 2234-2239, 2012.

61. GREEN LC, et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 78, p. 7764-7768, 1981.
62. GRIMMOND, T.; BROWNRIDG, P. Antimicrobial Activity of Bupivacaine and Pethidine. *Anaesth Intens Care* v.14, p. 418-420, 1986.
63. GUO, Q.; SUN, S.; YU, J.; LI, Y.; CAO, L. Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 457-462, 2008.
64. HEMPEL, S.L. et al. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 27, p.146-159, 1999.
65. HILLS, C.E.; JIN, T.; SIAMANTOURAS, E.; LIU, I.K.; JEFFERSON, K.P.; SQUIRES, P.E. 'Special k' and a loss of cell-to-cell adhesion in proximal tubule-derived epithelial cells: modulation of the adherens junction complex by ketamine. *PLoS One*, v. 8, n. 8: e71819.
66. HOLANDA, A.A.R.; FERNANDES, A.C.S.; BEZERRA, C.M.; FERREIRA, M.A.F.; HOLANDA, M.R.R.; HOLANDA, J.C.P.; MILAN, E.P. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n.1, p. 3-9, 2007.
67. HWANG JH, HWANG IS, LIU QH, WOO ER, LEE DG (2012) (+)-Medioresinol leads to intracellular ROS accumulation and mitochondria-mediated apoptotic cell death in *Candida albicans*. *Biochimie* 94(8):1784–1793
68. HWANG, I.; LEE, J.; JIN, H.G.; WOO, E.R.; LEE DG. Amentoflavone Stimulates Mitochondrial Dysfunction and Induces Apoptotic Cell Death in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 173: 207–218, 2012.
69. ITO, H.; UCHIDA, T.; MAKITA, K. Ketamine causes mitochondrial dysfunction in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. **PLoS One**, v. 28, 10(5): e0128445, 2015.
70. KAMINSKAS, E.; LI, J. C. Repair of DNA damage induced by oxygen radicals in human non-proliferating and proliferating lymphocytes. **Mutation Research**, v. 274, p. 103-110, 1992.

71. KATHWATE, G.H.; KARUPPAYIL, S.M. Tramadol, an Opioid Receptor Agonist: An Inhibitor of Growth, Morphogenesis, and Biofilm Formation in the Human Pathogen, *Candida albicans*. **Assay Drug Development Technology**, v. 14, n. 10, p. 567-572, 2016.
72. KOBAYASHI, D.; KONDO, K.; UEHARA, N.; OTOKOZAWA, S.; TSUJI, N.; YAGIHASHI, A.; WATANABE, N. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n.10, p. 3113–3117, 2002.
73. KOTHAVADE, M.M.; RAJENDRA, J.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 873–880, 2010.
74. KRUSZEWSKA, H; ZAREBA, T; TYSKI, S. Examination of antimicrobial activity of selected non-antibiotic products. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 6, p. 733–6, 2010.
75. LAVIN, M.F.; KIDSON, C. Repair of ionizing radiation induced DNA damage in human lymphocytes, **Nucleic Acids Research.**, v. 4, p. 4015-4022, 1977.
76. LEBEL, C.P.; ISCHIOPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2, 7-dichlorofluorescein as indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, v.5, p. 227-31, 1992.
77. LEFFA, D.D.; BRISTOT, B.N.; DAMIANI, A.P.; BORGES, G.D.; DAUMANN, F.; ZAMBON, G.M.; FAGUNDES, G.E.; DE ANDRADE, V.M. Anesthetic Ketamine-Induced DNA Damage in Different Cell Types *In Vivo*. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 8, p. 5575-81.
78. LEPAK, A.; ANDES, D. Fungal sepsis: optimizing antifungal therapy in the critical care setting. **Critical Care Clinical**, v. 27, n.1, p. 123-147, 2011.
79. LEWENSOHN, R.; KILLANDER, D.; RINGBORG, U.; LAMBERT, B. Increase of UV-induced DNA-repair synthesis during blast transformation of human lymphocytes. **Experimental Cell Research**, v. 123, p.107-110, 1979.
80. LIMA, G.M.E.; NUNES, M.O.; CHANG, M.R.; TSUJISAKI, R.A.S.; NUNES, J.O.; TAIRA, C.L.; THOMAZ, D.Y.; NEGRO, G.M.B.D.; MENDES, R.P.; PANIAGO, A.M.M. Identification and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from

- the urine of patients in a university hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 21, n. 59:e75, 2017.
81. LIONAKIS, M.S.; NETEA, M.G. Candida and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. **PLoS Pathogens**, v. 9: e1003079, 2013.
  82. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
  83. LYNCH, M.E.; CLARK, A.J.; SAWYNOK, J.; SULLIVAN, MJ. Topical amitriptyline and ketamine in neuropathic pain syndromes: an open-label study. *Journal of Pain*. 6(10):644-9, 2005.
  84. MAERTENS, J.A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology Infection**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2004.
  85. MAGILL, S.S.; EDWARDS, J.R.; BAMBERG, W.; BELDAVS, Z.G.; DUMYATI, G.; KAINER, M.A., et al. Emerging infections program healthcare-associated infections and antimicrobial use prevalence survey team. **New England Journal Medical**, v. 370, n.13, p.1198–208, 2014.
  86. MAÑAS, A.; et al. Epidemiology and prevalence of oropharyngeal candidiasis in Spanish patients with head and neck tumors undergoing radiotherapy treatment alone or in combination with chemotherapy. **Clinical Translation Oncology**, v. 14, n. 10, p. 740-746, 2012.
  87. MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, 113:173-215, 1983.
  88. MÁRQUEZ, F.; ITURRIETA, I.; CALVO, M.; URRUTIA, M.; GODOY-MARTÍNEZ, P. Epidemiology and antifungal susceptibility of species producing candidemia in Valdivia, Chile. **Revista chilena de infectología**, v. 34, n. 5, p. 441-446, 2017.
  89. MAYER, F.L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.
  90. MAZZONI, C.; GIANNATTASIO, S.; WINDERICKX, J.; LUDOVICO, P. Yeast Stress, Aging, and Death. **Oxidative Medical Cell Longev.** 684395, 2013. doi: 10.1155/2013/684395.
  91. MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. J.; BISSONNETTE, R.P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R.J.; NISHIOKA, W.K.; GREEN, D.R. Chapter 9 The End of the (Cell)

- Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro, *Methods in Cell Biology*, v. 46, p.153-185,1995.
92. MEHNDIRATTA, M.M.; WADHAI, S.A.; TYAGI, B.K.; GULATI, N.S.; SINHA M. Drug repositioning. **International Journal Epilepsy**, v. 3, p. 91-94, 2016.
93. MENEZES, E.A.; BARBOSA, A.C.; CUNHA, M.C.; MENDES, L.G.; CUNHA, F.A. Suscetibilidade a antifúngicos e fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas em Russas, Ceará. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, p. 33-38, 2016.
94. MESA-ARANGO, A.C; et, al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627-6638, 2014.
95. MILOSHEV, G.; MIHAYLOV, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell electrophoresis on yeast cells. *Mutation Research*, v. 513, p. 69-74, 2002.
96. MOORHEAD, P.S., et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood, *Experimental Cell Research*, v. 20, p. 613-616, 1960.
97. MORETTI, M.L.; TRABASSO, P.; LYRA, L.; FAGNANI, R.; RESENDE, M.R.; DE OLIVEIRA CARDOSO, L.G.; SCHREIBER, A.Z. Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p.225-230, 2013.
98. MORGAN, C. J., CURRAN, H. V. Ketamine use: a review. **Addiction**, v. 107, n. 1, p.27-38, 2012.
99. MORGAN, J.; MELTZER, M.I.; PLIKAYTIS, B.D.; SOFAIR, A.N.; HUIE-WHITE, S.; WILCOX, S.; HARRISON, L.H.; SEABERG, E.C.; HAJJEH, R.A.; TEUTSCH, S.M. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case–control study using data from population-based candidemia surveillance. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 26:540–7.23, 2005.
100. NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M., CIOCCA, D.R. A silver staining method for single-cell gel assay. *Journal Histochemical and Cytochemistry*, v. 49, p.1183-1186, 2001.
101. NETT, J.E.; ANDES, D.R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin North Am*, v. 30, n. 1, p. 51-83, 2016.

102. NOGUEIRA et al., Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.18, n.2, p.511-523, 2016.
103. NUCCI, M.; QUEIROZ, F.; ALVARADO, T.; TIRABOSCHI, I.N.; CORTES, J.; ZURITA, J. et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS One**, v. 8:e59373, 2013.
104. ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, n. 1, 2003.
105. OLIVEIRA, Ana S et al. Anti- *Candida* Activity of Fluoxetine Alone and Combined with Fluconazole? a Synergistic Action against Fluconazole-Resistant Strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 58, n. 7, p. 4224-26. 2014.
106. OSTROSKY-ZEICHNER, L.; HARRINGTON, R.; AZIE, N.; YANG, H.; LI, N.; ZHAO, J.; KOO, V.; WU, E.Q. A Risk Score for Fluconazole Failure among Patients with Candidemia. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 61, n. 5, 2017.
107. OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J.H.; PAPPAS, P.G.; HAMILL, R.J.; LARSEN, R.A.; HOROWITZ, H.W.; POWDERLY, W.G.; HYSLOP, N.; KAUFFMAN, C.A.; CLEARY, J.; MANGINO, J.E.; LEE, J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3149-3154, 2003.
108. OZ, Y.; GOKBOLAT, E. Evaluation of direct antifungal susceptibility testing methods of *Candida* spp. from positive blood culture bottles. **Journal of Clinical Laboratorial Analyses**, v. 32, n. 3, 2018.
109. PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M.; BENNETT, R.J. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLoS Pathogens**, v. 9: e1003550, 2013.
110. PAPPAS, P.G.; et al. Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infection Disease**, v. 48, p. 503-535, 2009.
111. PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M. Apoptose Como Mecanismo De Lesão Nas Doenças Hepatobiliares. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 38, n. 2, 2001.
112. PAVLOVIC, S. et al. Modulatory effect of curcumin on ketamine-induced toxicity in rat thymocytes: Involvement of reactive oxygen species (ROS) and the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway. **Bosnian Journal Basic Medical Science**, v. 18, p. 320-327, 2018.

113. PERLIN, D.S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERD, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **Lancet Infection Disease**, v. 17: e383–92, 2017.
114. PFALLER, M.A.; CASTANHEIRA, M. Nosocomial Candidiasis: antifungal stewardship and the importance of rapid diagnosis. **Medical Mycology**, v. 54:1–22.30, 2016.
115. PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; MEIS, J.F.; GOULD, I.M., et al. Global Antifungal Surveillance Study. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **Journal Clinical Microbiology**, v. 45, n.6, p. 1735–45, 2007.
116. PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J., et al. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. **Journal Clinical Microbiology**, v. 47, n.10, p. 3185-3190, 2009.
117. PIERCE, C. G. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **NHI Public Access**, v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008.
118. PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.; SANSONETTY, F. et al. Antifungal activity of local anesthetics against *Candida* species. **Infect Dis Obstet Gynecol** v. 8 p. 124–137, 2000.
119. PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RICARDO, E.; MÅRDH, P.A. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 678-685, 2005.
120. PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RICARDO, E.; MÅRDH, P.A. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 678-685, 2005.
121. RANG, H.P., DALLE, M., RITTER, J.M. **Rang & Dale: Farmacologia**, 8ed., Elsevier, 2016.
122. ROBINSON, B.L.; DUMAS, M.; ALI, S.F.; PAULE, M.G.; GU, Q., KANUNGO J. Cyclosporine exacerbates ketamine toxicity in zebrafish: Mechanistic studies on

- drug-drug interaction. *J Appl Toxicol*, v. 37, n.12, p. 1438-1447.
123. RODRIGUES A.; PINA-VAZ C.; MARDH, P. et al. Inhibition of germ tube formation by *Candida albicans* by local anesthetics: an effect to ionic channel blockade. *Curr Microbiol* v. 40, p. 145–148, 2000.
  124. RUHNKE, M. Skin and mucous membrane infections. In: Calderone RA, ed. *Candida and Candidiasis: ASM Press*, Washington, DC, pp. 307-325., 2002.
  125. SALGO, M. G.; PRYOR, W. A. Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Archives Biochemical and Biophysical*, v. 333, p. 482-488, 1996.
  126. SARDI, J.C. *et al.* *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p.10-24, 2013.
  127. SAVAGE, J.R.K. Classification and relationship of induced chromosome structural changes, *Journal of Medical Genetics*, v. 13, p.103-122, 1976.
  128. SAVOIA, D. New Antimicrobial Approaches: Reuse of Old Drugs. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 6, p. 731-738, 2016.
  129. SCHELENZ, S.; HAGEN, F.; RHODES, J.L.; ABDOLRASOULI, A.; CHOWDHARY, A.; HALL, A.; RYAN, L.; SHACKLETON, J.; TRIMLETT, R.; MEIS, J.F.G.M.; ARMSTRONG-JAMES, D.; FISHER, M.C. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. **Antimicrobial Resistant Infection Control**, v. 5, n. 35, p. 2-7, 2016.
  130. SCHUETZER-MUEHLBAUER, M.; WILLINGER, B.; EGNER, R.; ECKER G.; KUCHLER K. Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p. 291-300, 2003.
  131. SCHWARTZ, I.S.; PATTERSON, T.F. The Emerging Threat of Antifungal **Resistance in Transplant Infectious Diseases**. *Current Infection Disease Report*, v. 20, n. 2, p., 2018.
  132. SENEVIRATNE, C.J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L.P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v. 14, n. 7, p. 582-590, 2008.
  133. SERAFIN, M.B.; HÖRNER, R. Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. **Brazilian Journal Infection Disease**, v. 22, n. 3, p. 252-256, 2018.

134. SHAN, Z.; WEI, L.; YU, S.; JIANG, S.; MA, Y.; ZHANG, C.; WANG, J.; GAO, Z.; WAN, F.; ZHUANG, G.; WU, J.; LIU, D. Ketamine induces reactive oxygen species and enhances autophagy in SV-HUC-1 human uroepithelial cells. **Journal Cell Physiology**, v. 234, n. 3, 2018.
135. SIDRIM, J.J.C. et al. Aspectos clínico-laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. *Micologia médica à luz dos autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 4, p.135-161.
136. SILVA, A. R., et al. 2016. Berberine Antifungal Activity in Fluconazole-resistant Pathogenic Yeasts: Action Mechanism Evaluated by Flow Cytometry and Biofilm Growth Inhibition in *Candida* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 3551-7.
137. 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. 1468-1478, 2014.
138. 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.
139. SILVA, J.R.; CAVALCANTI, B.C.; GUIMARÃES, T.T.; PINTO, M.C.F.R.; CABRAL, I.O. et al. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. **European Journal Medical Chemistry**, v.46, p. 399-410, 2011.
140. SIROVER, M.A. Cell cycle regulation of DNA-repair enzymes and pathways, in: G.P. Milo and B.C. Casto (Eds.), *Transformation of Human Fibroblasts*, CRC, Boca Raton, pp. 29-54, 1990.
141. SRISATJALUK R.L.; KLONGNOI B.; WONGSIRICHAT, N. Antimicrobial effect of topical local anesthetic spray on oral microflora. *J Dent Anesth Pain Med* v. 16, p. 17–24, 2016.
142. STRITTMATTER, S.M. Overcoming Drug Development Bottlenecks with Repurposing: Old drugs learn new tricks. *Natural Medicine*, v. 20, n.6, p. 590-591, 2014.
143. TAFF, H.T.; MITCHEL, K.F.; EDWARD, J.A.; ANDES, D.R. Mechanisms of

- Candida biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n.10, p.1325-37, 2013.
144. TERÇAS, A.L.; MARQUES, S.G.; MOFFA, E.B.; ALVES, M.B.; DE AZEVEDO, C.M.; SIQUEIRA, W.L.; MONTEIRO, C.A. Antifungal Drug Susceptibility of Candida Species Isolated from HIV-Positive Patients Recruited at a Public Hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 2; n.8: 298, 2017.
145. TIAN, H.; QU, S.; WANG, Y.; LU, Z.; ZHANG, M.; GAN, Y.; ZHANG, P.; TIAN, J. Calcium and oxidative stress mediate perillaldehyde-induced apoptosis in *Candida albicans*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 101, n. 8, 2017.
146. TIAN, J. et al. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.
147. TIAN, J.; BAN, X.Q.; ZENG, H.; HE, J.S.; CHEN, Y.X.; WANG, Y.W. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. **PLoS ONE**, v. 7, n.1, 2012.
148. TOBUDIC S, KRATZER C, PRESTERL E. Azole-resistant *Candida* spp. - emerging pathogens? **Mycoses**, v. 55, n. 1, p. 24-32, 2012.
149. TOYAMA; Y. et al. Genotoxic effects of N-nitrosoketamine and ketamine as assessed by in vitro micronucleus test in Chinese hamster lung fibroblast cell line. **Environmental Health Prevent Medicine**, v. 11, p. 120-127, 2006.
150. TSAY, S.; WELSH, R.M.; ADAMS, E.H., et al. Notes from the field: on going transmission of *Candida auris* in health care facilities—United States, June 2016—May 2017. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 66, n. 19, p. 514–515, 2017.
151. TUR, M. C.; DELGADO, R. C.; ARMENGOL, E. D.; GARCIA, E. M.; ESCORIZA, J. C M.; GIL- ANTUNÃO, S. P.; RODRIGUEZ, J. M. T. La vulvovaginitis candidiásica recurrente. **Prog Obstet Ginecol.**, v. 56, n. 2, p. 108-116, 2013.
152. UESONO, Y.; TOH-E, A.; KIKUCHI, Y.; ARAKI, T.; HACHIYA, T.; WATANABE, C.K.; NOGUCHI, K.; TERASHIMA, I. Local Anesthetics and Antipsychotic Phenothiazines Interact Nonspecifically with Membranes and Inhibit Hexose Transporters in Yeast. **Genetics**, v. 202, n. 3, p. 997-1012, 2016.

153. ULU KILIC, A.; ALP, E.; CEVAHIR, F.; TURE, Z.; YOZGAT, N. Epidemiology and cost implications of candidemia, a 6-year analysis from a developing country. **Mycoses**, v. 60, n. 3, p. 198-203, 2017.
154. UPPULURI, P.; et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathog** , v. 6:e100082, 2010.
155. WANG, H.; XU, Y.C.; HSUEH, P.R. Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility in invasive *Candida* species in the Asia-Pacific region. **Future Microbiology**, v. 11, p. 1461-1477, 2016.
156. WASKELL L. A study of the mutagenicity of anesthetics and their metabolites. **Mutation Research**, v. 57, p. 141-153, 1978.
157. WHALEY, S.G.; BERKOW, E.L.; RYBAK, J.M.; NISHIMOTO, A.T.; BARKER, K.S.; ROGERS, P.D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 7: 2173, 2017.
158. WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance.2014. Available from: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. Accessed April 12, 2018.
159. WIEDERHOLD, N.P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, n., p. 249-259, 2017.
160. WOOLLEY, D. W. 1944. Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. **Journal Biological Chemistry**, v. 152, p.225-232, 1944.
161. WÜST, H.J.; LENNARTZ, H. Miconazole in systemic candidiasis. **Journal of the Royal Society of Medicine.**, v. 70, p. 18-19, 1977.
162. YAN, J.; HUANG, Y.; LU, Y.; CHEN, J.; JIANG, H. Repeated administration of ketamine can induce hippocampal neurodegeneration and long-term cognitive impairment via the ROS/HIF-1 $\alpha$  pathway in developing rats. **Cell Physiology Biochemical**, v. 33, p. 1715-1732, 2014.
163. ZEKINE BEGECA; AYTAC YUCELA; YUSUF YAKUPOGULLARIB; MEHMET ALI ERDOGANA; YUCEL DUMANB; MAHMUT DURMUSA; M. OZCAN ERSOY. The antimicrobial effects of ketamine combined with propofol: An in vitro study. *Rev Bras Anesthesiol* v. 63, n. 6, p. 461–465, 2013.

## 10. ANEXOS

**Anexo I.** Redução no número de células viáveis, em uma única cepa representativa de *C. albicans* resistente ao FLC tratada com FLC (8 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL), ITRA (0,5 µg/mL), CET (1,87 mM), CET (3,73 mM), CET (7,46 mM), CET (0,93 mM) + FLC (8 µg/mL) e a CET (0,7 mM) + ITRA (0,03 µg/mL), por 24 horas de exposição.

<b>Tratamento</b>	<b>Viabilidade (%) Média ± E.P.M (n=3)</b>
CONTROLE	2,49 ± 0,12
FLC	2,40 ± 0,11
ITRA (MIC)	1,42 ± 0,11*
ANFO	0,86 ± 0,09*
CETA (1,87 mM)	1,73 ± 0,11*
CETA (3,73 mM)	1,09 ± 0,06*
CETA (7,46 mM)	0,60 ± 0,10*
CET + ITRA	0,81 ± 0,07*
CET + FLC	0,59 ± 0,07*

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

**Anexo II.** Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) em cepa de *C. albicans* resistente ao FLC. As células foram marcadas com rodamina 123 (50 nM). O gráfico mostra as células tratadas com FLC (8  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), ANFO B (4  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), ITRA (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), CET (1,87 mM), CET (3,73 mM), CET (7,46 mM), CET (0,93 mM) + FLC (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a CET (0,7 mM) + ITRA (0,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por 24 horas de exposição.

<b>Tratamento</b>	<b>Viabilidade (%) Média <math>\pm</math> E.P.M (n=3)</b>
CONTROLE	2,46 $\pm$ 0,13
FLC	2,49 $\pm$ 0,08
ITRA (MIC)	44,94 $\pm$ 1,51
ANFO	37,61 $\pm$ 3,81
CETA (1,87 mM)	9,73 $\pm$ 2,54
CETA (3,73 mM)	21,40 $\pm$ 3,16
CETA (7,46 mM)	36,41 $\pm$ 5,21
CET + ITRA	64,95 $\pm$ 3,16
CET + FLC	34,47 $\pm$ 3,76

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

**Anexo III.** Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em uma cepa representativa de *C. albicans* resistente à azólicos por citometria de fluxo. As células foram tratadas com FLC (8 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL), ITRA (0,5 µg/mL), CET (1,87 mM), CET (3,73 mM), CET (7,46 mM), CET (0,93 mM) + FLC (8 µg/mL ) e a CET (0,7 mM) + ITRA (0,03 µg/mL), por 24 horas

<b>Tratamento</b>	<b>Viabilidade (%) Média ± E.P.M (n=3)</b>
CONTROLE	2,13 ± 0,08
FLC	2,24 ± 0,08
ITRA (MIC)	21,81 ± 4,98*
ANFO	21,31 ± 0,94*
CETA (1,87 mM)	8,92 ± 3,05*
CETA (3,73 mM)	16,19 ± 3,21*
CETA (7,46 mM)	27,64 ± 3,96*
CET + ITRA	43,53 ± 4,26*
CET + FLC	28,45 ± 3,61*

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

**Anexo IV.** Teste de TUNEL em uma única cepa representativa de *C. albicans* mostrando a fragmentação do DNA após a incubação com cetamina, fluconazol e itraconazol isolados e em combinação

<b>Tratamento</b>	Viabilidade (%) Média ± E.P.M (n=3)
CONTROLE	1,66 ± 0,16
FLC	2,23 ± 0,20
ITRA (MIC)	35,56 ± 4,63*
ANFO	75,00 ± 1,73*
CETA (3,73 mM)	28,89 ± 2,80*
CET + FLC	23,44 ± 3,10*
CET + ITRA	55,00 ± 3,26*

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

**Anexo V.** Avaliação do índice de dano ao DNA através da distribuição dos índices de danos, utilizando a versão alcalina e modificada (FPG) do ensaio do cometa, em *C. albicans* resistente ao FLC. As leveduras foram expostas ao FLC (8 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL), ITRA (0,5 µg/mL), CET (1,87 mM), CET (3,73 mM), CET (7,46 mM), CET (0,93 mM) + FLC (8 µg/mL ) e a CET (0,7 mM) + ITRA (0,03 µg/mL), por 24 horas de exposição.

<b>Tratamento</b>	<b>Viabilidade (%)</b> Média ± E.P.M (n=3)	
	<b>FPG (-)</b>	<b>FPG (+)</b>
CONTROLE	3,50 ± 2,17	5,50 ± 2,26
FLC	5,17 ± 1,72	6,83 ± 1,94
ITRA (MIC)	77,83 ± 6,85	124,67 ± 9,93
ANFO	128,83 ± 5,71	170,83 ± 5,78
CETA (1,87 mM)	22,75 ± 3,28	35,25 ± 3,28
CETA (3,73 mM)	69,00 ± 6,07	100,50 ± 9,81
CETA (7,46 mM)	126,63 ± 12,86	166,63 ± 12,93
CET + ITRA	118,67 ± 5,43	151,67 ± 11,69
CET + FLC	65,33 ± 4,18	92,00 ± 6,10

**Anexo VI.** Externalização da fosfatidilserina pela marcação com anexina V. A intensidade de fluorescência indica a quantidade de células com exposição da fosfatidilserina quando tratadas com o FLC (8  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), ANFO B (4  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), ITRA (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), CET (1,87 mM), CET (3,73 mM), CET (7,46 mM), CET (0,93 mM) + FLC (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a CET (0,7 mM) + ITRA (0,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por 24 horas de exposição

<b>Tratamento</b>	Viabilidade (%) Média $\pm$ E.P.M (n=3)
CONTROLE	1,94 $\pm$ 0,18
FLC	1,49 $\pm$ 0,16
ITRA (MIC)	48,41 $\pm$ 6,64
ANFO	34,91 $\pm$ 4,36
CETA (1,87 mM)	7,59 $\pm$ 0,84
CETA (3,73 mM)	16,55 $\pm$ 2,10
CETA (7,46 mM)	36,79 $\pm$ 2,24
CET + ITRA	72,83 $\pm$ 2,99
CET + FLC	33,09 $\pm$ 3,81