



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

LÍVIA GURGEL DO AMARAL VALENTE SÁ

Avaliação da atividade antifúngica, sinérgica e antibiofilme do etomidato frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol

FORTALEZA

2020

LÍVIA GURGEL DO AMARAL VALENTE SÁ

Avaliação da atividade antifúngica, sinérgica e antibiofilme do etomidato frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

Coorientadora: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

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

- S113a Sá, Lívia Gurgel do Amaral Valente.
Avaliação da atividade antifúngica, sinérgica e antibiofilme do etomidato frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol / Lívia Gurgel do Amaral Valente Sá. – 2020.
107 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.
Coorientação: Profª. Dra. Cecília Rocha da Silva.
1. Etomidato. 2. *Candida* spp.. 3. Reposicionamento de fármacos. 4. Biofilmes. 5. Resistência. I. Título.

CDD 616.9

LÍVIA GURGEL DO AMARAL VALENTE SÁ

Avaliação da atividade antifúngica, sinérgica e antibiofilme do etomidato frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol

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

Data da defesa 20/08/2020.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Universidade Regional do Cariri (UFCA)

Profa. Dra Selene Maia De Moraes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Profa. Dra. Claudia Roberta de Andrade
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Profa. Dra Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus.

A minha família.

AGRADECIMENTO

A Deus, por me proporcionar perseverança durante toda a minha vida.

Aos meus pais, Ernesto Gurgel do Amaral Valente (*in memorian*) e Luiza de Marillac Dias Simões, por todo amor, incentivo e dedicação, a minha eterna gratidão. Aos meus irmãos, Helenita Gurgel do Amaral Valente e Ernesto Gurgel Valente Neto por todo apoio e torcida.

Ao meu querido esposo, José Gerardo da Silva Sá Filho, pelo seu carinho, apoio e incentivo diários, além da compreensão dos momentos que tive ausente. Às minhas filhas, Lia Gurgel do Amaral Sá e Lorena Gurgel do Amaral Sá, amores da minha vida e meus maiores incentivos.

À Universidade Federal do Ceará por me conceder redução de carga horária que me permitiram realizar o doutorado.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica e a todos os professores do programa, que com seus ensinamentos contribuíram para minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Junior pela orientação e confiança, sempre estimulando meu crescimento profissional com seus conselhos e palavras de incentivo.

Aos professores participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas e amigos do LABIMAM, pelas reflexões, críticas, sugestões e por sempre deixarem o ambiente de trabalho leve e agradável.

Aos Professores Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti e Dr Emmanuel Silva Marinho pelas contribuições na parte experimental deste trabalho.

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará pela colaboração na realização dos testes de Microscopia Eletrônica.

“Crê em ti mesmo, age e verás os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar.”

CHICO XAVIER

RESUMO

As candidemias estão relacionadas com altos gastos hospitalares, pacientes com candidemias geram mais custos para o sistema de saúde e ficam em média mais dias internados. *Candida* spp. está entre o quarto e sexto patógeno mais isolado de infecções da corrente sanguínea. O redirecionamento de fármacos surge como alternativa terapêutica para lidar com a resistência às drogas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do anestésico etomidato (ETO) isolado e associado à azólicos frente a cepas resistentes de *Candida* spp. na forma planctônica e em biofilme, além de investigar a produção de manoproteínas e a interação com ALS3 através de docagem molecular. Ademais, almejou-se investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos utilizando técnicas de citometria de fluxo. Para tanto, 11 cepas clínicas de *Candida* spp. foram submetidas aos testes de microdiluição em caldo utilizando etomidato isolado e associado ao fluconazol (FLC) e itraconazol (ITR). A avaliação da interação das drogas foi realizada através do Cálculo da Concentração Inibitória Fracionada (FICI). Foi verificado também o potencial do etomidato isolado frente aos biofilmes em formação, e sua atividade isolada e associado frente aos biofilmes formados.

As cepas de *Candida* spp. apresentaram CIM para o etomidato que variaram de 125 a 250 µg/mL. Em relação à combinação de drogas, etomidato e itraconazol demonstraram sinergismo para todas as cepas testadas. A combinação etomidato e fluconazol mostrou-se sinérgica para 36,4% das cepas. Não foi observado antagonismo em nenhuma das combinações. Para investigação dos possíveis mecanismos de ação, 1 cepas de *Candida albicans* foi submetida aos testes de integridade de membrana, avaliação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), detecção de espécies reativas de oxigênio, marcação por Anexina V e avaliação de dano ao DNA. O etomidato e suas associações apresentaram atividade frente ao biofilme formado reduzindo até 50% da viabilidade celular, mostrando efeito sinérgico também frente aos biofilmes. Em relação ao biofilme em formação, etomidato também demonstrou atividade e foi capaz de diminuir a produção de manoproteínas na superfície das células de *C. albicans*. Nos ensaios de docagem molecular, foi possível observar que o etomidato ficou na mesma região da hepta-threonine, ficando próximos ao resíduo Ser170 (tríade catalítica) e do resíduo de aminoácido que tem papel de adesão (Lys59). Os testes de citometria mostraram que o etomidato isolado e combinado aos azólicos testados provocaram diminuição da viabilidade celular, alteração do potencial de membrana e produção de espécies reativas de oxigênio, não foi verificado lesão no DNA.

Palavras-chave: *Candida* spp., Etomidato, Resistência, Biofilme.

ABSTRACT

Candidiasis is related to high hospital expenses, patients with candidiasis generate more costs for the health system and stay on average more days in hospital. *Candida* spp. is between the fourth and sixth most isolated pathogen from bloodstream infections. The redirection of drugs appears as a therapeutic alternative to deal with drug resistance. The present study aimed to evaluate the antifungal activity of anesthetic etomidate (ETO) isolated and associated with azoles against resistant strains of *Candida* spp. in planktonic form and biofilm, in addition to investigating the production of manoproteins and the interaction with ALS3 through molecular documentation. In addition, also investigate the possible mechanisms of action using flow cytometry techniques. Therefore, 11 clinical strains of *Candida* spp. were subjected to acid microdilution tests using etomidate alone and associated with fluconazole (FLC) and itraconazole (ITR). The evaluation of the interaction of drugs was performed through the Calculation of Fractional Inhibitory Concentration (FICI). It was also selected or potentially isolated from biofilms in formation, and its activity isolated and associated from biofilms formed. In order to investigate possible mechanisms of action, 1 *Candida albicans* head was subjected to membrane integrity tests, assessment of transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\psi_m$), detection of reactive oxygen species, annexing by annexin V and assessment of DNA damage. The strains of *Candida* spp. presented MIC for etomidate ranging from 125 to 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Regarding the combination of drugs, etomidate and itraconazole showed synergism for all strains tested. However, the combination of etomidate and fluconazole was shown to be synergistic for only 4 strains. No antagonism was observed in any of the combinations. Etomidate and its associations showed activity against the biofilm formed, reducing up to 50% of cell viability, showing a synergistic effect also against biofilms. Regarding the biofilm in formation, etomidate also showed activity and was able to decrease the production of manoproteins on the surface of *C. albicans* cells. In the molecular docking tests, it was possible to observe that the etomidate was in the same region as the heptathreonine, being close to the Ser170 residue (catalytic triad) and the amino acid residue that has an adhesion role (Lys59). Cytometry tests showed that etomidate alone and combined with the tested azoles caused a decrease in cell viability, alteration of the membrane potential and production of reactive oxygen species, no DNA damage was found.

Keywords: *Candida* spp., Etomidate, Resistance, Biofime.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estágios de formação de biofilme de <i>Candida albicans</i>	27
Figura 2 - Estrutura química do etomidato.....	40
Figura 3 - Fluxograma das metodologias empregadas	44
Figura 4 - Representação estrutural da ALS3 <i>Candida albicans</i>	51
Figura 5 - Resumo dos resultados obtidos.....	57
Figura 6 - Atividade do etomidato frente aos biofilmes em formação de <i>Candida spp</i>	62
Figura 7 - Microscopia eletrônica de biofilme de <i>C. albicans</i>	63
Figura 8 - Microscopia eletrônica de biofilme em formação de <i>C. albicans</i>	65
Figura 9 - ALS3 complexada com etomidato (A) Fluconazol (B) Hepta-threonine(C) e sitio de ligação a Etomidato, Fluconazol e Hepta-Threonina (D).....	67
Figura 10 - Interações entre o Etomidato e ALS3.....	68
Figura 11 - Análise por citometria de fluxo mostrando a ligação de conA-FITC à superfície de <i>C. albicans</i>	69
Figura 12 - Avaliação da viabilidade celular de células de <i>C. albicans</i> tratadas com etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação.....	70
Figura 13 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em cepa de <i>C. albicans</i> resistente ao FLC tratadas com etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação.....	71
Figura 14 - Avaliação da produção de EROs em <i>C. albicans</i> resistente ao fluconazol.....	72
Figura 15 - Externalização de fosfatidilserina em <i>C. albicans</i> resistentes ao fluconazol após exposição ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação.....	73
Figura 16 - Avaliação do índice de dano ao DNA em <i>C. albicans</i> resistentes ao fluconazol após exposição ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação.....	74
Figura 17 - Efeito do etomidato na proliferação de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79).	75
Figura 18 - Efeito do etomidato na viabilidade celular de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79).....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Espectro de atividade, mecanismos de ação e resistência dos principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento da candidíase invasiva 35

Tabela 2-Efeito antifúngico do etomidato (ETO), fluconazol (FLC), itraconazol (ITR) isolados e em combinação frente a cepas de *Candida* spp. 59

Tabela 3- Atividade antifúngica do etomidato (ETO), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITR) frente ao biofilme formado. 61

Tabela 4-Distâncias de resíduos ALS3 *Candida albicans*. 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALS3	<i>Agglutinin-like protein 3</i>
ANFO B	Anfotericina B
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AO	Solução aquosa de acridina-laranja
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CDR	<i>Candida Drug Resistance</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CVV	Candidíase vulvovagina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EB	Brometo de Etídio
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
E.P.M	Erro Padrão da Média
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ETO	Etomidato
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index
FITC	Fluoresceína
FLC	Fluconazol
H2DCFDA	Diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína
HEPES	N - (2-Hidroxietil) piperazina-N' - (ácido 2-etanosulfônico)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

LABIMAN	Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas
ITRA	Itraconazol
IND	Indiferente
ITS	<i>Internal Transcribed Spacers</i>
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic Acid
MTT	Brometo de difeniltetrazólio –[3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo]
NAOH	Hidróxido de Sódio
NACL	Cloreto de Sódio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PFPE	Eletroforese em Campo Pulsado
PH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Iodeto de Propídeo
PS	Fosfatidilserina
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RH123	Rodamina 123
RMSD	<i>Root Mean Square</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCIM	Concentração Inibitória Mínima em Biofilme
SIN	Sinergismo
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares

UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mL
UFC	Universidade Federal do Ceará
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
V79	Células de Fibroblastos de Pulmão de Hamster Chinês
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
$\Delta\psi_m$	Potencial Transmembrana Mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 O Gênero <i>Candida</i>	22
2.2 Patogênese	22
2.3 Fatores de Virulência	23
2.3.1 Capacidade de adesão	23
2.3.2 Morfogênese	25
2.3.3 Enzimas hidrolíticas	25
2.3.4 Biofilmes	26
2.4 Infecções causadas por <i>Candida</i> spp	28
2.5 Diagnóstico	30
2.6 Epidemiologia	31
2.7 Tratamento	32
2.7.1 Azólicos	32
2.7.2 Poliênicos	33
2.7.3 Equinocandinas	34
2.8 Resistência aos antifúngicos	34
2.9 Novas estratégias terapêuticas	37
2.9.1 Atividade antimicrobiana dos anestésicos	38
2.9.2 Etomidato	39
3.0 HIPÓTESES	42
4. OBJETIVOS	43
4.1. Objetivo Geral	43
4.2. Objetivos Específicos	43
5. METODOLOGIA	44
5.1 Recuperação das cepas	44
5.2 Fármacos	45
5.3 Testes de sensibilidade antifúngica	45
5.3.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das drogas isoladas	45
5.3.2 Teste do sinergismo pela técnica de microdiluição em caldo: checkerboard	46
5.3.3. Análise dos dados	46
5.4 Ensaios para determinação da atividade em biofilme	47
5.4.1. Crescimento dos isolados de <i>Candida</i> spp. no modo biofilme	47
5.4.2. Determinação da atividade do etomidato isolado e associado ao fluconazol e itraconazol sobre os biofilmes formados de <i>Candida</i> spp.	47
5.4.3. Determinação da atividade do etomidato sobre os biofilmes em formação de <i>Candida</i> spp.	48
5.4.4 Microscopia eletrônica de varredura em biofilme formado	49
5.4.5 Microscopia eletrônica de varredura em biofilme em formação	49
5.4.6 Docagem Molecular	50
5.4.6.1 Design dos Ligantes	50
5.4.6.2 Preparação do Receptor-Ligantes	50

5.4.6.3 Identificação da Enzima Alvo	50
5.4.7 Disponibilidade de manoproteínas na parede celular	51
5.4.7.1 Análise dos dados	51
5.5 Testes utilizando citometria de fluxo	52
5.5.1 Preparo das suspensões de células de <i>Candida albicans</i>	52
5.5.2 Tratamento das células de <i>Candida albicans</i>	52
5.5.3 Determinação da viabilidade celular em células de <i>Candida albicans</i>	52
5.5.4 Determinação do potencial transmembrânico ($\Delta\psi_m$) em células de <i>Candida albicans</i>	53
5.5.5. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) em células de <i>Candida albicans</i>	53
5.5.6. Determinação da externalização de fosfatidilserina em células de <i>Candida albicans</i>	53
5.5.7. Análise dos dados dos ensaios de citometria de fluxo	53
5.6 Ensaio Cometa	54
5.6.1. Análise dos dados obtidos pelo ensaio do cometa	55
5.7 Avaliação da citotoxicidade	55
5.7.1 Cultivo e manutenção da linhagem V79	55
5.7.2 Teste de exclusão do corante Azul de Tripán	55
5.7.3 Microscopia de fluorescência	55
6. RESULTADOS	57
6.1 Atividade antifúngica do etomidato frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao Fluconazol.....	57
6.2 Efeito da combinação do etomidato com azólicos (FLC e ITRA) frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes a azólicos	57
6.3 Avaliação da atividade antibiofilme do etomidato frente aos biofilmes de <i>Candida</i> spp.	60
6.3.1 Atividade do etomidato isolado e associado ao fluconazol e itraconazol frente aos biofilmes formados de <i>Candida</i> spp.	60
6.3.2 Atividade do etomidato frente aos biofilmes em formação de <i>Candida</i> spp.	62
6.3.3 Avaliação de biofilme formado de <i>C. albicans</i> tratados com etomidato isolado por MEV	62
6.3.4 Avaliação de biofilme em formação de <i>C. albicans</i> tratados com etomidato isolado por MEV	64
6.3.5 Avaliação da interação do etomidato com ALS3 através de docagem molecular	66
6.3.6 Avaliação da produção de manoproteínas.....	68
6.4. Avaliação do tipo de morte celular em <i>Candida albicans</i> após exposição ao etomidato	69
isolado e associado aos azólicos	69
6.4.1 Redução da viabilidade das células de <i>C. albicans</i> após exposição ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação	69
6.4.2 Despolarização mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em células de <i>C. albicans</i> provocados após exposição ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação	70
6.4.3 Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células de <i>C. albicans</i> após exposição ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação	71
6.4.4 Externalização de fosfatidilserina (PS) em células de <i>C. albicans</i> após exposição ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação	72
6.4.5 Avaliação de danos ao DNA de células de <i>C. albicans</i> resistentes ao fluconazol expostas ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação	73
6.5 Avaliação da citotoxicidade do etomidato frente a células V79	74
8. CONCLUSÃO.....	85

REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS.....	103

1 INTRODUÇÃO

No universo dos fungos, as espécies de *Candida* são patógenos oportunistas considerados os maiores causadores de morbidade e mortalidade em todo mundo, representando sério problema de saúde pública (PFALLER, et al., 2014). O gênero *Candida* inclui mais de 200 espécies de leveduras, sendo os mais comuns causadores de infecções fúngicas invasivas (PAPON et al., 2013). A espécie *Candida 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 (PFALLER; DIEKEMA, 2007; LIONAKIS; NETEA, 2013; WANG et al., 2016).

A candidemia é um problema crescente em hospitais terciários de todo o mundo (PFALLER; DIEKEMA, 2007; COLOMBO, et. al., 2014; PODDAR et al., 2017). 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). Sendo as espécies de *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* as espécies não-*albicans* mais frequentes isoladas no Brasil (NUCCI, et al., 2013).

Nos Estados Unidos da América (EUA), as candidemias estão relacionadas a um ônus econômico de aproximadamente 300 milhões de dólares por ano, devido aos gastos hospitalares de permanência em unidades de terapia intensiva e serviços hospitalares (KILIC et al., 2017). No período de 2014 a 2015, na unidade de emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, São Paulo, a incidência de candidemia foi de 1,52 casos/1000 admissões, e a taxa de mortalidade nesses pacientes foi aproximadamente de 52% (CANELA et al., 2018).

Entre os agentes antifúngicos disponíveis, os azóis são os medicamentos preferidos e mais frequentemente utilizados para o tratamento de infecções por *Candida* spp. Dependendo do tipo de infecção, do local anatômico em que ocorre e do perfil de sensibilidade das espécies, outros antifúngicos também podem ser utilizados. Entre esses, existem poliênicos, equinocandinas, análogos de nucleosídeos e alilaminas (PFALLER et al., 2010, 2013; PAPPAS et al., 2016). O fluconazol é frequentemente preferido nos tratamentos de infecções por *Candida* spp. devido ao seu baixo custo e toxicidade, além da disponibilidade em formulações variadas (PFALLER et al., 2010). No entanto, existem muitos relatos na literatura sobre o desenvolvimento de resistência entre espécies de *Candida*, principalmente em relação aos azóis. O problema da resistência é agravado devido à expressão de fatores de virulência, como a produção de biofilme por espécies

de *Candida*. Os biofilmes são capazes de resistir a altas concentrações de antifúngicos quando comparados a células planctônicas, sendo estes altamente associados às candidemias persistentes (LI et al., 2018).

O mundo está mobilizado contra a resistência microbiana, eleita pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das dez principais ameaças à saúde pública global. Sem o surgimento de novas drogas efetivas, estima-se que em 2050 ocorra, uma perda de 10 milhões de vidas em todo o mundo, e uma perda econômica de US \$ 100 trilhões (OMS, 2019).

Diante desse contexto, o reposicionamento de drogas surge como uma alternativa terapêutica econômica e rápida para o cenário mundial de resistência. O reposicionamento de drogas quando comparados com as metodologias tradicionais de busca de moléculas antimicrobianas possui diversas vantagens, como conhecimento sobre seus aspectos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos. Além disso, proporciona uma redução no tempo e nos custos de desenvolvimento de novos fármacos (MEHNDIRATTA et al., 2016; SERAFIN e HÖRNER, 2018). Dessa forma, os anestésicos têm sido descritos como potenciais agentes antimicrobianos isolados ou em associação com outros antimicrobianos (KAEWJIARANAI et al., 2018; ANDRADE-NETO et. al., 2020).

Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado o efeito antibacteriano dos fármacos anestésicos, tanto intravenosos quanto locais, como também seu efeito combinado com outras drogas (BEGEC et al., 2013). 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 antifúngico, Pinavaz, (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 à geração de dano na membrana da célula fúngica, bem como devido à inibição seletiva de canais de sódio (RODRIGUES, et al., 2000).

A atividade antimicrobiana de anestésicos intravenosos, tais como propofol, midazolam, tiopental, cetamina e etomidato têm sido descrita na literatura sobre vários microrganismos, tais como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (KELES et al., 2006; TULGAR et al., 2018; ANDRADE-NETO et. al., 2020). O Etomidato é um fármaco anestésico hipnótico de curta ação administrado por via endovenosa, geralmente utilizado

em indução de anestesia geral (DOENICKE, ET AL., 1994), e sua atividade antimicrobiana isolada e associada ao azólicos frente a isolados de *Candida* spp. tem sido pouco explorada, sendo um candidato promissor para estudos de resistência na área.

Diante do exposto, o presente trabalho procurou avaliar o efeito antifúngico do etomidato isolado e associado a dois azólicos, fluconazol e itraconazol, frente a células planctônicas e em biofilme formado de cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol. Através de ensaios que utilizam a citometria de fluxo, buscou-se compreender melhor os possíveis mecanismos de ação do etomidato sobre as células fúngicas. Além disso, foi investigado o papel do etomidato frente aos biofilmes em formação de *C. albicans* utilizando técnicas de docagem molecular e expressão de manoproteínas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Gênero *Candida*

Candida spp. é classificada taxonomicamente no reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcacea* (SIDRIM; ROCHA). O gênero *Candida* é o principal entre as leveduras patogênicas, compreendendo aproximadamente 200 espécies, sendo os causadores mais comuns de infecções fúngicas invasivas (PAPON et al., 2013).

São microrganismos comensais, que habitam primariamente o trato gastrointestinal, fazendo parte também da microbiota vaginal, da uretra e dos pulmões (ALONSO-VALLE et al., 2003). Entretanto, essas mesmas leveduras podem se tornar patogênicas, caso ocorra um desequilíbrio em sua relação com o hospedeiro, por isso são consideradas oportunistas. Essa transformação pode ser devida a comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro (extremos de idade, doença de base, imunossupressão) ou rompimento das barreiras anatômicas, como queimaduras, cateteres ou cirurgias invasivas (DIGNANI, 2003).

Dentre as espécies de *Candida* podemos citar: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa* e *C. norvegensis*. Dentre essas 15 espécies patogênicas, cerca de 95% das infecções são causadas por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (KATRAGKOU et al., 2015). E, uma nova espécie, *Candida auris*, foi identificada pela primeira vez no Japão em 2009.

2.2 Patogênese

As leveduras são encontradas em diversos sítios biológicos de homens e animais, em uma relação comensal com esses hospedeiros. Contudo, qualquer rompimento desse equilíbrio pode modificar essa relação harmônica e estabelecer outra, do tipo parasitário, que leva a infecções de diferentes gravidades (GIOLO; SVIDZINSKI. 2010).

As espécies de *Candida* são patógenos oportunistas e fazem parte da microbiota humana, sendo capazes de colonizar as membranas logo após o nascimento (KONDORI et al., 2019), colonizam também, pele, cavidade oral, orofarínge, trato respiratório inferior, trato

gastrointestinal e reprodutivo de humanos (KUHNBACHER et al., 2017; NEVILLE et al., 2015; ROMO; KUMAMOTO, 2020).

Inúmeros fatores ligados ao hospedeiro têm sido relacionados como facilitadores para o desenvolvimento de infecções fúngicas invasivas. Entre os mais importantes, estão uso de antibióticos de largo espectro, tempo prolongado de internação hospitalar, neutropenia, nutrição parental, sonda vesical, ventilação mecânica, cateter venoso central e colonização de vários sítios anatômicos por leveduras (GIOLO; SVIDZINSKI. 2010). Segundo Pappas e colaboradores (2003), além desses fatores, outros merecem ser destacados, como idade extrema, imunossupressão, insuficiência renal, diabetes, quimioterapia, radioterapia, lesão de mucosas, hemodiálise, cirurgia prévia e corticoterapia.

Além de fatores relacionados ao hospedeiro, tem sido postulado que existem diferenças na patogenicidade de isolados de *Candida* spp., há alguns fatores de virulência que lhes conferem a capacidade de produzir doença. Esses atributos incluem adesão a substratos inertes e biológicos, formação de tubo germinativo, variabilidade fenotípica (*switching*), variabilidade genotípica, produção de toxinas e enzimas extracelulares hidrolíticas, variabilidade antigênica, imunomodulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e hidrofobicidade de superfície celular, que constituem os fatores mais importantes para o desencadeamento de infecções (CALDERONE et al., 2001; SUDBERY et al., 2011).

2.3 Fatores de Virulência

A patogenicidade ou virulência de um microrganismo é definida como sua capacidade de causar doença, que é mediada por múltiplos fatores. Apesar de certos aspectos da virulência ser determinados geneticamente, eles são expressos pelos microrganismos apenas quando existem condições ambientais favoráveis, tais como teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. Essas condições são específicas para cada microrganismo e para cada isolado de determinado agente. Podem variar de hospedeiro para hospedeiro, e mesmo entre os diferentes tecidos de um mesmo hospedeiro (GHANNOUM e RADWAN,1990; ÁLVARES et al., 2007).

2.3.1 Capacidade de adesão

A adesão de *Candida* spp. aos tecidos ou aos dispositivos médicos é um pré-requisito para a colonização de um determinado sítio e formação do biofilme. Para que a adesão ocorra alguns fatores biológicos e não biológicos estão envolvidos. Entre os principais fatores não biológicos são reconhecidas as interações químicas que ocorrem entre as macromoléculas, como as forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de hidrogênio (DUNE, 2003). Em relação aos fatores biológicos, a adesão é mediada por mecanismos moleculares específicos, principalmente por meio de proteínas chamadas de adesinas (NOBILE et al., 2008; VILA et al., 2017).

As adesinas são sequências do tipo aglutinina e são membros de uma família de sete proteínas glicosiladas. As adesinas ALS1, ALS3 e ALS5 estão localizadas na superfície celular das hifas e ajudam na adesão às células epiteliais bucais do hospedeiro, colágeno, células endoteliais, fibronectina e laminina (HOYER, 2001). ALS4, ALS6 e ALS9 se ligam às células endoteliais, colágeno e laminina, enquanto que ALS5 está relacionada com agregação celular (VILA, et al., 2017; KARKOWSKA-KULETA et al., 2009).

A família de adesinas ALS é reconhecida por desempenhar papel importante no processo de adesão e etapas iniciais da formação de biofilmes (ROUDBARMOHAMMADI, et al., 2016). Cada gene ALS tem uma estrutura semelhante de três domínios, incluindo um domínio 5' de 1299-1308 pares de base que é 55–90% idênticos em toda a família; um domínio central de números variáveis de tandem, que são cópias repetidas com 108 pares de base. E um domínio 3' que é relativamente variável em comprimento e sequência em toda a família (MURCIANO, et al., 2012).

A proteína ALS3 possui múltiplas funções na formação do biofilme, podendo mediar à célula, alterar a carga superficial ou propriedades hidrofóbicas das hifas, ou ainda alterar as interações entre a matriz extracelular e os componentes celulares do biofilme (KIOSHIMA et al., 2019). No entanto, a deleção de *als3* leva à formação de biofilmes não estruturados (AOKI et al. 2012). KIOSHIMA e colaboradores (2019) verificaram que o bloqueio por compostos direcionados ao ALS3 foi capaz de reduzir a quantidade de biofilme formado, bem como reduzir a capacidade de adesão de *C. albicans*.

Estudos recentes mostram a busca por novos agentes terapêuticos e apontam a ALS3 como alvo promissor para novos agentes antifúngicos (HOSSEINI et al. 2019; KIOSHIMA et al., 2019).

2.3.2 Morfogênese

Candida spp. pode apresentar-se sob a forma arredondada denominada blastoconídio, ou formando pseudo-hifas ou hifas e micélios verdadeiros. Essas mudanças morfológicas são reversíveis e ocorrem durante o crescimento. Essa plasticidade contribui para a sua patogenicidade (VILA et al., 2017). As transições morfogenéticas nos fungos ocorrem em resposta a um estímulo externo, que pode ser encontrado em um hospedeiro humano, como temperatura corporal, pH, soro, nutrientes e suprimento de oxigênio e certos hormônios (BRAUN et al., 2001). Os blastoconídios são capazes de se disseminar com mais eficiência do que as formas filamentosas, que são bem adaptadas para penetração e danificação dos tecidos (SAVILLE et al., 2003; VILA et al., 2017). As transições morfológicas nas células de *Candida* spp. levam ao estabelecimento bem-sucedido da doença e maior progressão na forma de biofilmes. Portanto, esses fatores são bem aceitos como contribuintes para a patogenicidade em *Candida* spp. (PIERCE e LOPEZ-RIBOT, 2013; VILA et al., 2017).

2.3.3 Enzimas hidrolíticas

Enzimas hidrolíticas extracelulares destroem as membranas celulares do hospedeiro, favorecendo a invasão tecidual (PARK; JUNG, 2013). Algumas dessas importantes enzimas são lipases, fosfolipases e proteinases. Estudos relatam uma redução na virulência de *Candida* spp. devido à ausência ou expressão reduzida dessas enzimas hidrolíticas. Essas enzimas também ajudam as células de *Candida* spp. a sofrerem transições morfológicas, colonização e penetração dos tecidos hospedeiros (MATTEI et al., 2013; PARK ; JUNG, 2013).

As fosfolipases facilitam as células de *Candida* spp. na invasão dos tecidos hospedeiros através da hidrólise das ligações ésteres dos glicofosfolípides. Estudos mostram que a invasão das células de *Candida* spp. em direção aos tecidos epiteliais é facilitada pela maior produção de fosfolipases (YANH, 2003; MATTEI et al., 2013). Em *C. albicans*, quatro tipos de fosfolipases são categorizadas, fosfolipase A, B, C e D, dependendo da capacidade da enzima de clivar um éster específico (FAVERO et al., 2013). Ibrahim e colaboradores (1995) demonstraram que cepas invasivas de *C. albicans* produzem uma maior quantidade de fosfolipases em comparação com cepas não invasivas.

As aspartil proteinases secretadas (SAPs) desempenham papel central na patogenicidade de *Candida* spp. Essas proteinases destroem a membrana da célula hospedeira hidrolisando muitas proteínas teciduais, como albumina, colágeno, cistatina A, queratina, laminina e fibronectina, facilitando a adesão e a invasão tecidual. SAPs também digerem células e moléculas do sistema imunológico do hospedeiro, como IL-1 β , imunoglobulina A, mucina e lactoferina (NAGLIK et al., 2003).

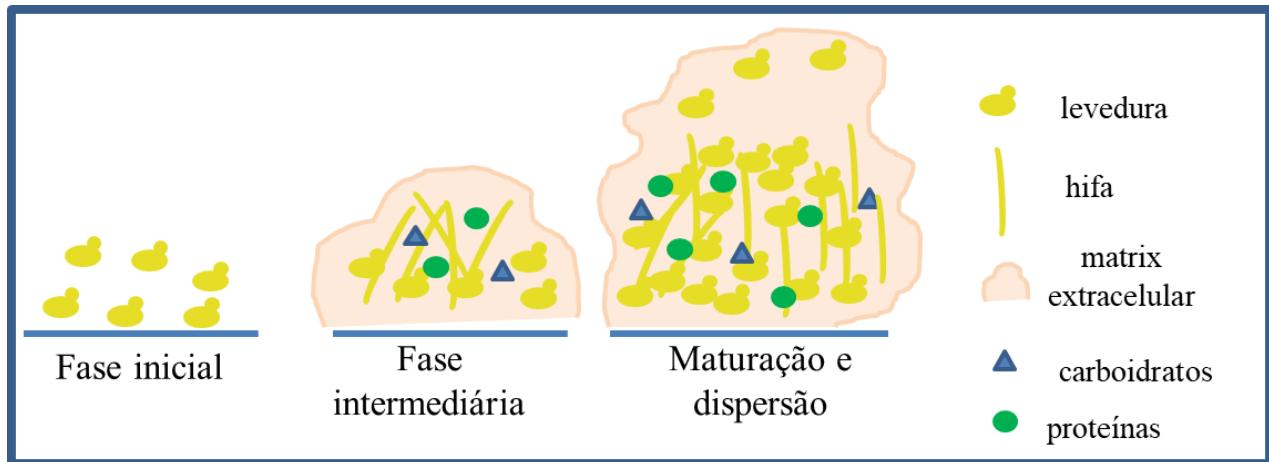
A hemolisina, uma manoproteína ligada à superfície celular, permite que *C. albicans* explore o ferro a partir de eritrócitos do hospedeiro (PAPPAS et al., 2003). O ferro é um cofator indispensável para várias proteínas e é um pré-requisito para vários processos metabólicos, como respiração celular e síntese de DNA. Portanto, é considerado um fator crucial de virulência em *C. albicans* (RAMAGE et al., 2001). Resende e colaboradores (2004) relataram que a colonização e a disseminação de células fúngicas são mais pronunciadas quando o ferro está facilmente disponível em uma quantidade ampla para o fungo.

2.3.4 Biofilmes

Biofilmes são comunidades de células microbianas, que são ligadas a superfícies e envoltas em uma substância protetora chamada matriz extracelular. Os biofilmes se formam prontamente em superfícies bióticas, como órgãos, camadas mucosas, dentes, e abióticas, como dentaduras, cateteres e materiais industriais (LOHSE et al., 2018). Esse modo de crescimento confere algumas vantagens aos seus membros, incluindo troca de substrato, resistência aos antimicrobianos, proteção contra o sistema imunológico, estresses mecânicos e ambientais, capacidade de adesão, fontes nutricionais e comunicação celular (DOS SANTOS et al., 2018).

A formação do biofilme é um processo multifacetado bem descrito para *C. albicans*. Nesse caso, a fase inicial da formação do biofilme começa com a adesão de células de levedura a uma determinada superfície, seguida pela formação de uma colônia discreta. Posteriormente, na fase intermediária, as células se organizam e começam a produzir e secretar substâncias poliméricas extracelulares (SPE). Esses componentes permitem a maturação de uma estrutura tridimensional, formando o biofilme maduro. Uma vez formado o biofilme maduro, ainda existe a possibilidade de disseminação das células da progênie que se destacam migrando para outros nichos para formar outros biofilmes (Figura 1) (CHANDRA; MUKHERJEE, 2015).

Figura 1-Estágios de formação de biofilme de *Candida albicans*.



Formação do biofilme de *C. albicans* mostrando as fases e as moléculas envolvidas em cada fase.

Fonte: Autor.

A etapa de adesão é crucial para a formação do biofilme, esse processo depende de várias proteínas da parede celular, chamadas adesinas, que promovem a ligação a outras células, tanto às células epiteliais quanto a outras células microbianas, ou superfícies abióticas, ligando-se a aminoácidos específicos ou resíduos de açúcar (VERSTREPEN, 2006).

Em *C. albicans*, várias adesinas pertencem à família ALS, essas adesinas se ligam a várias proteínas através de sua região C-terminal. Entre os 8 membros da família ALS, ALS3 tem o papel mais proeminente na formação de biofilme, pois sua exclusão leva a graves defeitos do biofilme quando comparado à linhagem parental do tipo selvagem (NOBILE et al., 2006). A proteína ALS3 é expressa em maior quantidade na superfície dos tubos germinativos e das hifas, e sua presença está intimamente associada à capacidade de *C. albicans* a aderir a várias superfícies, bem como a formar biofilme, medeia à invasão tecidual e induz dano às células epiteliais (LIU e FILLER 2011). Também foram descritas proteínas do tipo ALS presentes em outras espécies de *Candida*, como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*, embora ainda se saiba muito pouco sobre o papel dessas adesinas em cada espécie (GROOT et al., 2013).

Após a adesão, o desenvolvimento do biofilme continua através de modificações morfológicas, aumento do número de células e produção de matriz extracelular, influenciando a arquitetura final do biofilme (CAVALHEIRO; TEXEIRA, 2018).

Outro fator importante na formação do biofilme é o *quorum sensing*, esse processo compreende a produção e liberação de sinais químicos que permitem a regulação da expressão gênica de acordo com a densidade celular (ELIAS; BANIN, 2012). Essas moléculas acumulam-se

durante o crescimento celular e após atingir uma determinada concentração limite, induzem alterações na expressão de genes relacionados à virulência, morfologia das células, crescimento, formação do biofilme, resistência ao stress oxidativo e aos antifúngicos, alteração no metabolismo do ferro, alteração na resposta fagocítica, dentre outras (POLKE et al., 2017). Algumas moléculas são apontadas como autoindutoras e participam do sistema quórum-sensig, tais como, farnesol, tirosol, álcool feniletílico, ácido farnesóico e triptofol (KRUPPA, 2008).

Aproximadamente 80% das infecções microbianas estão associadas a biofilmes, exibindo altas taxas de mortalidade (SRINIVASAN et al., 2017). Infecções em dispositivos médicos ocorrem em 60% dos casos, e destes, *Candida* spp. é responsável por 20%, sendo as taxas de mortalidade em torno de 30%. *Candida albicans* pode formar biofilmes em vários dispositivos médicos, incluindo cateteres vasculares e urinários, próteses, válvulas cardíacas, dispositivos de derivação vascular artificial, marcapassos, dispositivos de assistência ventricular e *shunts* do sistema nervoso central. Dentre eles, as infecções relacionadas ao cateter são a principal causa de morbimortalidade entre pacientes hospitalizados, podendo levar a infecções da corrente sanguínea, com incidência aproximada de um episódio a cada 100 internações hospitalares (SARDI et al., 2013).

Do ponto de vista clínico, uma das características mais preocupantes de um biofilme é a capacidade de resistir a altos níveis de drogas antifúngicas em comparação com células planctônicas, biofilmes podem ser de 10 a 100 vezes mais resistentes que células planctônicas (LI et al., 2018). Estudos mostraram que a resistência dos biofilmes de *Candida* spp. aos antifúngicos correlacionam estreitamente com os polissacarídeos da matriz extracelular. A presença de β -1,3 glucana, β -1,6 glucana e α -1,2-ramificada α -1,6 manana contribuem para a resistência dos biofilmes de *Candida* spp. (DOMINGUEZ et al., 2018; DOMINGUEZ et al., 2019).

2.4 Infecções causadas por *Candida* spp.

O primeiro relato de leveduras do gênero *Candida* spp. como patógeno é atribuída a Langenbeck em 1839, onde observou e isolou, da cavidade oral de um paciente com afta bucal, um microrganismo, que atualmente é a mais importante levedura patogênica do homem, a *Candida albicans* (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A infecção fúngica mais frequente no mundo todo é a candidíase (FERREIRA et al., 2013; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013). As espécies de *Candida* podem causar vaginite, candidíase

oral, candidíase cutânea, onicomicose, candidemia e infecções sistêmicas (WÄCHTLER et al., 2012).

As espécies de *Candida* spp., patógenos oportunistas, são uma das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo e, portanto, representa uma séria ameaça à saúde pública (PFALLER et al., 2014; MATTHAIYOU et al., 2015; PAPPAS et al., 2016). Nas últimas duas décadas, as infecções fúngicas mostraram um incremento significativo. Esta alta incidência tem sido relacionada a fatores como o aumento do número de pacientes com sistema imunológico comprometido, o uso de cateteres e sondas, o crescente número de pacientes transplantados e outras doenças, como leucemia e diabetes (ORTEGA et al., 2010; JUNQUEIRA et al., 2012; LI et al., 2013; RAZZAGHI-ABYANEH et al., 2014; TERÇAS et al., 2017).

Candidemia é a infecção da corrente sanguínea causada por leveduras do gênero *Candida*. Essas infecções causadas por espécies de *Candida* são uma importante causa de morbidade e mortalidade hospitalar, principalmente em pacientes de unidades de terapia intensiva e pacientes com malignidade hematológica (OZ; GOKBOLAT, 2018). As candidemias possuem alta gravidade e acarretam aumento do tempo de internação hospitalar e conseqüentemente elevam os custos de hospitalização. Estudos estimam que a taxa de mortalidade da candidemia seja de 40% a 60% (COLOMBO, et al., 2003).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é ocasionada pelo crescimento anormal de fungos do tipo leveduras, a maioria deles pertencentes ao gênero *Candida*, na mucosa do trato genital feminino. Trata-se de uma infecção de vulva e vagina, causada por leveduras comensais que habitam a mucosa vaginal bem como as mucosas digestiva e respiratória. Essas leveduras podem-se tornar patogênicas quando o sítio de colonização do hospedeiro passa a ser favorável ao seu desenvolvimento (ZIARRUSTA, 2002).

A candidíase oral é a infecção fúngica bucal mais comum em humanos, causada por leveduras do gênero *Candida*, e pode se apresentar através de vários graus de severidade (NAVILLE, et. al., 2016). Em condições normais, é um organismo comensal e está presente em cerca de metade da população, não causando danos aparente nem induzindo inflamações nos tecidos adjacentes. Todavia, em determinadas condições do hospedeiro, o fungo multiplica-se, penetra nos tecidos, causa inflamação e torna-se patogênico. Dentre as espécies do gênero *Candida* encontradas nos seres humanos, a *Candida albicans* é a responsável pela maioria das infecções (MORAES, et. al., 2017).

A candidíase cutânea pode se apresentar de diferentes formas: intertrigo (localizado nas dobras da pele como axilas, virilha, sulco interglúteo, prega submamária, e em pessoas obesas na

prega suprapúbica), erosão interdigital, foliculite, onicomicose e paroníquia. Suas manifestações estão relacionadas, frequentemente, quando há condições de umidade, temperatura e pH propícias, como nas dobras da pele, embaixo das fraldas de recém nascidos, e em climas tropicais ou durante meses de verão. Diabetes *mellitus* e o HIV também estão associados à candidíase cutânea (YOSIPOVITCH, et al., 1993; OKEKE, et al., 2001).

2.5 Diagnóstico

A identificação de leveduras é baseada em métodos fenotípicos, que avaliam as características morfológicas e bioquímicas, como produção do tubo germinativo, microcultivo em ágar fubá-*tween* 80, assimilação de carboidratos ou de nitrogênio e fermentação dos carboidratos (LACAZ et al., 2002). Esses métodos clássicos são considerados padrão ouro para essa finalidade (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Na década de 1990, surgiram os meios de cultura cromogênicos que possibilitam a identificação presuntiva das espécies do gênero *Candida*, facilitando também o reconhecimento de culturas mistas (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Seu princípio baseia-se na produção de cor das colônias, por reações enzimáticas específicas, com um substrato cromogênico do meio. *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* geram, respectivamente, colônias de coloração verde, azul e rosa rugosa, e as demais, coloração branca a rosa (HOUANG et al., 1997).

Atualmente, existem métodos manuais e automatizados para identificação de leveduras. Os sistemas manuais mais conhecidos são o API 20 AUX®, o ID 32C®, e o AUXACOLOR®. Esses sistemas consistem em galerias plásticas contendo carboidratos desidratados, onde se inocula a suspensão da levedura, o resultado é verificado pela turvação das microcúpulas ou pela mudança de sua coloração, e comparado com um banco de dados fornecido pelo fabricante. Os métodos automatizados mais difundidos são o Microscan® e o Vitek®. Trata-se de sistemas controlados por computador, que incubam painéis contendo os substratos desidratados, os quais são reidratados com a suspensão da levedura, e os resultados das provas bioquímicas são automaticamente interpretados (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Técnicas moleculares também são utilizadas na identificação de leveduras, essas técnicas são mais rápidas e seguras quando comparadas aos testes fenotípicos tradicionais. Técnicas, como o PCR, o PCR *multiplex* e o *nested*-PCR, têm permitido identificar espécies de *Candida* através da amplificação, principalmente das regiões ITS1 e ITS2. Outras técnicas como electroforese em campo pulsado (PFGE), análise de fragmentos de genoma gerados pela amplificação aleatória de

DNA (RAPD), e digestão com endonucleases de restrição também são utilizadas (BORIOLLO et al., 2005; GAMARRA, et al., 2013; LEENA SANKARI et al., 2019).

2.6 Epidemiologia

As candidemias estão relacionadas com altos gastos hospitalares, pacientes com candidemias possuem gastos hospitalares maiores e ficam em média mais dias internados, gerando ônus consideráveis aos serviços hospitalares. Nos Estados Unidos, estima-se o ônus econômico de cerca de US \$ 300 milhões por ano (KILIC et al., 2017).

A espécie *C. albicans* é responsável por quase 50% das infecções invasivas causadas por *Candida*. No entanto, nos últimos anos vem ocorrendo um aumento no isolamento de espécies não-*albicans* em infecções na corrente sanguínea (BASSETTI et al., 2006; ALKHARASHI et al., 2019).

Um estudo multicêntrico realizado por Vincent e colaboradores (2009) com a participação de 75 países, demonstrou que infecções fúngicas constituíram 20,9% das culturas positivas em Unidades de Terapia Intensiva da Europa Ocidental. Outro estudo realizado nos Estados Unidos verificou que a candidemia foi a quarta causa de infecções nosocomiais de corrente sanguínea (WISPLINGHOFF et al., 2004).

No Brasil, Colombo e colaboradores (2006) detectaram uma incidência de 2,4 casos de candidemias\ 1000 admissões, índice cerca de 2 a 15 vezes maior que Estados Unidos e Europa. Na região Nordeste do Brasil, a incidência foi de 3,9 casos de candidemia\ 1000 admissões (MEDRANO et al., 2006; COLOMBO, et al., 2007).

Outro trabalho realizado por Canela e colaboradores (2018), em unidade de emergência do hospital das clínicas de Ribeirão Preto – SP, no período de 2014 a 2015, a incidência de candidemia foi de 1,52 casos/1000 admissões, com taxa de mortalidade de aproximadamente 52%. 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%).

Em estudo realizado no Hospital das Clínicas de Pernambuco, entre os anos de 2015 e 2016, a incidência de candidemia foi de 42,59 casos\1000 admissões na UTI. Destes, 86,6% permaneceram internados por período prolongado, sendo a média da permanência hospitalar de 31,7 dias. Dentre as leveduras diagnosticadas, as espécies de *Candida* não-*albicans* estiveram presentes em 60% casos, e *Candida albicans* em 38,4%, sendo 1,6% caso de candidemia mista, ou

seja, paciente infectado por *C. albican* e *C. não-albicans* concomitantemente. A taxa de mortalidade foi de aproximadamente de 80% (DA SILVA et al., 2019).

Em relação a CVV, sua incidência tem aumentado drasticamente, sendo a segunda infecção genital mais frequente nos Estados Unidos e no Brasil. A CVV representa 20% a 25% dos corrimentos vaginais de natureza infecciosa, precedida apenas pela vaginose bacteriana (CORSELLO et al., 2003). *C. albicans* é responsável por 85-90% dos casos sintomáticos de CVV (BABIC; HUKI, 2010). Espécies não-*albican*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, estão emergindo como causas identificáveis de CVV e diferem consideravelmente em relação à epidemiologia, virulência e suscetibilidade a medicamentos antifúngicos (ALFOUZAN et al., 2015).

2.7 Tratamento

O arsenal antifúngico disponível no mercado é muito limitado quando comparado a drogas antibacterianas, isso se deve a dificuldade de encontrar drogas que atuem em células fúngicas, que são eucarióticas, sem serem tóxicas para as células hospedeiras (COSTA-DE-OLIVEIRA; RODRIGUES, 2020; SILVA, et al., 2012).

As classes de antifúngicos diferem quanto ao mecanismo de ação, espectro, toxicidade e farmacocinética. Atualmente há 3 classes de antifúngicos, com um total de 8 drogas aprovadas pelo FDA (US Food and Drug Administration): polienos, triazóis e equinocandinas (LEPAK e ANDES, 2011).

No Brasil, segundo a Relação Nacional de Medicamentos Essências (RENAME, 2020), e, portanto disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS), estão elencados o fluconazol (oral e injetável), itraconazol (oral), anfotericina B (injetável), cetoconazol (xampu).

2.7.1 Azólicos

Os azólicos são antifúngicos caracterizados por um anel imidazólico na estrutura molecular, o qual pode conter três átomos de carbono e dois de nitrogênio (imidazólicos), ou dois de carbono e três de nitrogênio (triazólicos) (GROLL et al., 1998). Os imidazóis são representados pelo cetoconazol, miconazol, econazol e clotrimazol, já os triazóis pelo fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol (MALBON et al., 2014).

O mecanismo de ação dos azólicos consiste na inibição da enzima 14α -esterol demetilase, catalisada pelo gene ERG11, presente no citocromo P-450 da célula fúngica. Essas drogas inibem a demetilação do lanosterol em ergosterol levando a menor produção de ergosterol na membrana e a maior produção de intermediários metilados tóxicos, resultando na ruptura na membrana celular fúngica, e em alguns casos a morte da celular (tabela 1) (AKINS, 2005).

O primeiro imidazólico de ação tópica, clotrimazol, foi lançado em 1960 e ainda hoje é usado para candidíase superficial. O fluconazol é um dos agentes antifúngicos mais comumente utilizados, devido seu perfil de segurança, baixo custo e eficácia comprovada nos tratamentos de candidíase (MEYER et al., 2007). O voriconazol é um triazólico de segunda geração que possui amplo espectro de ação, é ativo contra todas as espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis* (ESPINEL-INGROFF et al., 2010; PAPPAS et al., 2016).

O fluconazol é a droga de escolha para a maioria das infecções por *Candida* (PFALLER et al., 2010) e é o antifúngico mais recomendado devido seu baixo custo e para o tratamento de candidíase invasiva (PARAMYTHIOTOU et al., 2014). Os antifúngicos azólicos têm limitações ao seu uso, embora geralmente sejam bem tolerados. As limitações incluem efeitos adversos como hepatotoxicidade e o surgimento de resistência entre isolados de fungos (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

2.7.2 Poliênicos

Os poliênicos pertencem a uma classe de compostos naturais que possuem uma molécula heterocíclica anfipática. Atuam como fungicida, ligam-se ao ergosterol da membrana fúngica criando poros que perturbam a integridade da membrana plasmática, permitindo que constituintes citoplasmáticos se difundam resultando na morte celular (tabela 1) (GALIS et al., 1990; PEMAN et al., 2009). Nistatina e anfotericina B pertencem a esse grupo.

A nistatina possui um espectro de atividade ligeiramente mais estreito que o da anfotericina B, mas é ativo contra várias espécies de leveduras (CHANDRASEKAR, 2011). O uso tópico da nistatina é considerado a via de administração mais comum e desempenha um papel importante na profilaxia da candidíase oral e sistêmica em recém-nascidos prematuros, lactentes e pacientes imunocomprometidos (HOWELL et al., 2009; GOTZSCHE; JOHANSEN, 2002).

A anfotericina B é considerada o padrão ouro no tratamento da maioria das infecções fúngicas, especialmente infecções invasivas graves. No entanto, a anfotericina é tóxica para as células dos mamíferos, causando principalmente nefrotoxicidade. Para superar sua toxicidade, uma variedade de versões reformuladas foi introduzida, como as formulações lipídicas de anfotericina B, que são mais bem toleradas, e o desoxicolato de anfotericina B (LACERDA e OLIVEIRA, 2013).

2.7.3 Equinocandinas

As equinocandinas são consideradas a terapia de primeira linha para infecções invasivas por *Candida* (PAPPAS et al., 2016). Atualmente, três agentes estão disponíveis para uso clínico: caspofungina, micafungina e anidulafungina. Elas inibem a β - (1,3) glucana sintase, um complexo enzimático localizado na membrana plasmática das células fúngicas (Tabela 1) (ESPINEL-INGROFF, 2010). Esta enzima possui duas subunidades, Fks1, a subunidade catalítica, e Rho, uma proteína de ligação a GTP que regula a atividade da glucana sintase. Essa enzima é responsável pela produção da β - (1,3) glucana, um dos principais componentes da parede celular dos fungos (PERLIN, 2007).

O perfil de segurança das equinocandinas é excelente, com poucos eventos adversos relatados e interações. Apesar de seu custo consideravelmente alto, as equinocandinas estão substituindo o fluconazol como antifúngico de escolha no ambiente da Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Estudos recentes mostraram que as equinocandinas são eficazes e seguras, apoiando a recomendação como opção de primeira linha em caso de infecções da corrente sanguínea (MEYER et al., 2007; IOANNIDIS et al., 2020).

2.8 Resistência aos antifúngicos

A resistência clínica pode ser definida como a persistência ou progressão de uma infecção, apesar da terapia antifúngica adequada com uma suscetibilidade *in vitro* do microrganismo (KANAFANI e PERFECT, 2008). A capacidade do patógeno de tolerar a droga em concentrações superiores aos valores da concentração inibitória mínima (CIM) é definida como tolerância antifúngica, que pode ocorrer devido à aquisição de mecanismos de resistência (DELARZE e SANGLARD, 2015).

O principal mecanismo de resistência aos azólicos é a superexpressão de bombas de efluxo na membrana fúngica (HOLMES et al., 2008). Duas classes de bombas de efluxo são responsáveis por diminuir a acumulação dos azólicos no interior da célula, translocando ativamente os compostos através da membrana celular: transportadores ABC e a superfamília do transportador principal (MFS) (SANGLARD et al., 2009; MORSCHHAUSER, 2010). Os genes CDR (*Candida* Drug Resistance) codificam os transportadores ABC, que promovem a resistência a vários azólicos, já o gene MDR (Multidrug Resistance) codifica a superfamília do transportador principal (MFS), que leva a resistência específica ao fluconazol (tabela 1). Membros da família ABC utilizam a energia da hidrólise do ATP para transporte ativo de fármacos, já a superfamília MFS usa energia proveniente de gradiente de prótons (NEVES- JÚNIOR et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016).

Tabela 1-Espectro de atividade, mecanismos de ação e resistência dos principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento da candidíase invasiva

Classe antifúngica	Drogas antifúngicas	Espectro de atividade	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência
Azólicos	Fluconazol Itraconazol Voriconazol Posaconazol	Fungistático	Inibição da enzima 14 α -esterol demetilase, gerando acúmulo de intermediários tóxicos, resultando na ruptura da membrana celular fúngica	Superexpressão de bomba de efluxo e alteração no gene ERG 11
Poliênicos	Anfotericina B Nistatina	Fungicida	Ligam-se ao ergosterol da membrana fúngica criando poros, perturbando a integridade da membrana plasmática e gerando a morte celular	Alteração no gene ERG3
Equinocandidas	Casposfungina Anidulafugina Micafugina	Fungicida	Inibição de β - (1,3) glucano sintase	Mutações pontuais nos genes FKS1 e FKS2.

Fonte: Adaptação de Costa-de-Oliveira e Rodrigues, 2020.

Outros mecanismos responsáveis pela resistência aos azólicos são as mutações e o aumento da expressão do gene ERG11, gerando possíveis alterações tridimensionais da enzima lanosterol

14- desmetilase, alterando a afinidade desta enzima por azólicos reduzindo assim a biossíntese do ergosterol, e a produção exagerada da enzima alvo (tabela 1) (GONÇALVES et al., 2016).

Os polimorfismos genéticos do gene ERG11 devem ser considerados na investigação de novos medicamentos derivados do azóis, o mapeamento de todas as alterações de aminoácidos no gene ERG11, envolvidos na resistência ao azólicos, pode ajudar no desenvolvimento de novos antifúngicos com atividade contra cepas resistentes (SANTOS et al., 2018). Golabek e colaboradores (2015) verificaram 19 alterações na sequência do gene ERG11, onde cinco dessas alterações estavam presentes apenas em cepas resistentes a azóis (A530C, G622A, G1309A, A1167G e A1230G). Além disso, 33% das cepas resistentes aos azólicos foram caracterizadas pela presença simultânea das mutações A530C, G622A e A1167G. Caban e colaboradores (2016) identificaram 21 mutações específicas no Gene ERG11, duas das quais foram significativamente associadas a resistência a drogas: uma substituição nucleotídica na posição 798, que estava relacionada ao aumento da resistência e uma mutação de silenciosa na posição 1440, que diminuiu significativamente a chance de uma cepa ser resistente a drogas.

A resistência clínica aos azólicos tem se tornado um problema grave, principalmente em pacientes que necessitam de tratamento em longo prazo, e naqueles que recebem profilaxia antifúngica. Vem sendo descrito com frequência, a resistência generalizada aos azólicos em pacientes com AIDS e candidíase orofaríngea ou mucosa, e com menos frequência em infecções invasivas (ARENDRUP e PATTERSON, 2017).

Resistência intrínseca é uma característica de todos ou quase todos os representantes da espécie e é preditivo de falha clínica. *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol, e muitas cepas de *C. auris*, recentemente, foram associadas com surtos globais de infecção em ambientes de saúde, com concentrações inibitórias mínimas elevadas (CIMs) a várias classes de medicamentos antifúngicos, incluindo azóis, equinocandinas e polienos (WESTBROOK et al., 2007; SHASTRI et al., 2020).

A resistência à anfotericina B é bastante incomum, e geralmente resulta de mutações no gene ERG3, que codifica a C-5 esterol dessaturase, uma enzima envolvida na biossíntese de ergosterol, diminuindo a concentração de ergosterol na membrana fúngica (tabela 1) (VINCENT et al., 2013). A resistência à anfotericina B pode, também, estar associada ao aumento da atividade da catalase, com diminuição dos danos oxidativos (SOKOL-ANDERSON et al., 1996) Entre isolados de *C. albicans*, a resistência à anfotericina ainda é muito rara (CASTANHEIRA ET AL., 2017).

A resistência às equinocandinas em *Candida* spp. é atribuída a mutações nos genes FKS1 e FKS2, resultando em substituições de aminoácidos em regiões conservadas hot spot 1 (HS1) e hot spot 2 (HS2) (Tabela 1) (PARK et al., 2005). Essas mutações tornam a enzima mutante 50 a 3000 vezes menos sensível à droga (GARCIA-EFFRON et al., 2009). Um estudo realizado na Suíça mostrou que isolados de *C. albicans* e *C. glabrata* apresentam baixo nível de resistência às equinocandinas, apesar de um aumento significativo no seu uso. Este fato esteve relacionado principalmente com exposição individual as equinocandinas por períodos prolongados (KRITIKOS et al., 2018).

A resistência aos antifúngicos, especialmente em espécies de *Candida*, vem tornando-se cada vez mais importante no manejo de infecções fúngicas invasivas. Essas infecções estão associadas a altas taxas de morbimortalidade, e o surgimento de espécies MDR (Multi-drogas resistente) resistentes, como *C. glabrata* e *C. auris* muito comuns em centros médicos, apresentam desafios significativos 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).

2.9 Novas estratégias terapêuticas

A organização mundial de saúde divulgou um relatório em 2019 sobre a gravidade da resistência aos antimicrobianos. Atualmente, pelo menos 700.000 pessoas morrem a cada ano devido a doenças resistentes a medicamentos, até 2050 podem ocorrer até 10 milhões de mortes a cada ano se nenhuma providência for tomada, de acordo com o Grupo de Coordenação Ad hoc Interagências da ONU sobre Resistência Antimicrobiana. Dentre as medidas destacadas pela ONU está o investimento em pesquisa e desenvolvimento ambicioso para novas tecnologias para o combate a resistência antimicrobiana (WHO, 2019).

Diante desse cenário, algumas alternativas veem sendo exploradas, como o reposicionamento de drogas já utilizadas no mercado, o sinergismo de antifúngicos com drogas de outras classes farmacológicas, exploração da atividade antimicrobiana de produtos naturais e a utilização da docagem molecular através da busca de moléculas que possam atuar em sítios específicos (LU, et al., 2018; WANG, et al., 2018; KIOSHIMA, et. al., 2019; ANDRADE NETO, et al., 2019; ANDRADE-NETO, et al., 2020).

O reposicionamento de drogas se beneficia do uso de medicamentos clínicos já aprovados para sua aplicação contra novas patologias, reduzindo tempo e os custos necessários para o

desenvolvimento de novos medicamentos. O reposicionamento de fármacos quando comparado à busca tradicional de moléculas possui diversas vantagens, tais como a disponibilidade na literatura dos dados referentes aos aspectos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos (SERAFIN; HÖRNER, 2018). Muitas etapas são necessárias para garantir a eficácia e a segurança de um medicamento antes de ser aprovado. No melhor cenário, a média de custo para inserir um novo medicamento no mercado é em torno de U\$ 800.000.000 e um período de 12 a 15 anos. Além disso, de cada dez mil moléculas identificadas e submetidas aos ensaios pré-clínicos, apenas cinco são aprovadas para uso clínico (MATTHEWS, et al., 2016).

O sinergismo de drogas 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 (SERAFIN; HÖRNER, 2018). Claramente, a atual descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos não são suficientemente eficientes para combater os crescentes problemas de resistentes ao azólicos (HARVEY et al., 2015). A terapia combinada pode ser uma maneira eficaz de tratar infecções fúngicas graves e reduzir ou retardar a incidência indutora de cepas resistentes (PINA-VAZ et al., 2005; HOLMES et al., 2016). Assim, o uso combinado de drogas ou adjuvantes com azólicos é agora cada vez mais popular na pesquisa acadêmica para o tratamento da candidíase resistente a azólicos (XU, et al., 2019).

2.9.1 Atividade antimicrobiana dos anestésicos

Nos últimos anos, vem ocorrendo uma grande busca por novas moléculas antimicrobianas, e através do reposicionamento de drogas tem-se explorado essa atividade em várias classes terapêuticas (SILVA et. al., 2013; ROSE, et al., 2017; LIU, et al., 2016 ANDRADE-NETO et al., 2020).

As primeiras observações sobre o efeito antimicrobiano dos anestésicos locais foi relatado em 1909 (JONNESCO, 1909). Outros estudos se seguiram (ERLICH, 1961; MURPHY et al., 1955; KLEINFELD e ELLIS, 1966; SCHMIDT e ROSENKRANZ, 1970). Schmidt & Rosenkranz (1970) examinaram a atividade de lidocaína e procaína em 28 espécies bacterianas, bem como em *Candida* e *Cryptococcus*.

Numerosos estudos têm demonstrado a atividade antimicrobiana de vários anestésicos locais e intravenosos (AYDIN, et al., 2001; JOHNSON, et al., 2008; LU, et al., 2014; KELEŞ, et

al., 2006). Dentre os anestésicos locais, a atividade da lidocaína já foi bem explorada. Liu e colaboradores (2018) demonstrou atividade da lidocaína a 2% frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *S. pyogenes* e *C. albicans*.

Em relação à atividade antifúngica, Pinavaz, (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 à geração de dano na membrana da célula fúngica, bem como devido à inibição seletiva de canais de sódio (RODRIGUES, et al., 2000).

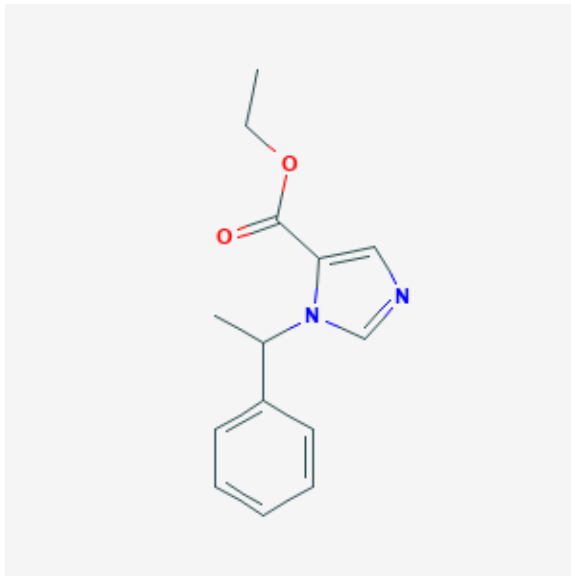
Outros anestésicos locais, como articaína, bupivacaína, mepivacaína e prilocaína, mostraram atividade frente à *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *C. albicans* (PELZ, et al., 2008).

A atividade antimicrobiana de anestésicos endovenosos também tem sido relatada. O midazolam reduziu a viabilidade celular de *S. aureus* após 30, 60, 120 e 240 minutos, e ainda inibiu completamente a viabilidade celular de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* após 240 minutos de contato com o anestésicos (KELEŞ, et al., 2006). Begec e colaboradores (2013) demonstraram a atividade da cetamina frente a *S. aureus* com CIM de 19,5 µg/mL, e de 312,5 µg/mL para *E. coli* e *P. aeruginosa*. Tulgar e colaboradores (2018) encontraram CIM de 512 µg/mL para *S. aureus* e *Acinetobacter baumannii*. Andrade-Neto e colaboradores (2020) demonstraram a atividade da cetamina frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol na forma planctônica e em biofilme, além de mostrar o efeito sinérgico do anestésico com os azólicos, fluconazol e itraconazol.

2.9.2 Etomidato

O etomidato (figura 2) é um anestésico não barbitúrico, intravenoso, com potente efeito sedativo e hipnótico, sem ação analgésica. É comumente usado na indução da anestesia geral e sedação. Sua ação farmacológica está relacionada com seu efeito sobre o receptor do ácido g-aminobutírico (GABA_A), o principal neurotransmissor inibitório no cérebro. Sua ação aumenta o efeito inibitório do GABA no sistema nervoso central, causando abertura do canal de cloreto que leva à hiperpolarização da membrana. (FORMAN, 2011).

Figura 2-Estrutura química do etomidato



Fonte: PubChem

O etomidato é um derivado do imidazol e é o éster etílico do ácido 1 - [(1R) -1-feniletil] - 1H-imidazol-5-carboxílico (PubChem, 2020). Sua nomenclatura de acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) é 3 - [(1R) -1-feniletil] imidazol-4-carboxilato de etila.

O anestésico foi descoberto em 1965 pela Janssen Pharmaceuticals (divisão da Ortho-McNeil-Janssen Pharmaceuticals, Titusville, Nova Jersey, EUA) por acaso, derivados imidazólicos foram sintetizados e testados em modelos animais durante um projeto de triagem para descoberta de um novo medicamento antifúngico. Alguns desses derivados (ésteres de arilalquil imidazol-5-carboxilato) apresentaram efeito sedativo, e após a triagem das propriedades anestésicas, um desses derivados, o etomidato (1- (1-etilfenil) imidazol-5-etil éster), foi selecionado. O enantiômero R do etomidato foi significativamente mais potente que o enantiômero S e foi desenvolvido e licenciado para sedação em 1972 (FORMAN, 2011).

Como agente de indução, as doses variam de 0,1 a 0,4 mg / kg de injeção intravenosa (OMOIGUI, 2012). Seu índice terapêutico é alto em comparação a outros anestésicos, a dose letal é cerca de 30 vezes maior do que a dose terapêutica, tornando-o um agente extremamente seguro (ZED et al.,2006).

A principal vantagem do etomidato em relação a outros anestésicos consiste no fato que esse fármaco possui poucos efeitos respiratórios e cardiovasculares, o que o torna desejável em pacientes com doenças preexistentes como a hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva ou

com histórico de infarto do miocárdio. Dentre os efeitos adversos mais comuns, estão dor na injeção, movimentos mioclônicos dose-dependente, náuseas, vômitos e supressão adrenal (SMITH, et al., 2000; TURNER, et al., 2005; KAY, 1977; WANSCHER, et al., 1985).

A atividade antimicrobiana do etomidato tem sido pouco explorada, diferente de outros anestésicos, como lidocaína, bupivacaína, propofol, tiopental, midazolam e cetamina, que demonstraram atividade frente a diversos microrganismos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* e *Candida* spp. (KAEWJIARANAI, et al., 2018; KELEŞ, et al., 2006; ANDRADE-NETO, 2020).

Dessa forma, diante da atividade antimicrobiana demonstrada por vários anestésicos frente aos mais variados microrganismos, o etomidato, anestésico pouco explorado quanto a sua atividade antimicrobiana, surge como uma droga com possível efeito antifúngico. O trabalho procurou investigar sua atividade antifúngica frente a isolados e aos biofilmes formados e em formação de *Candida* spp., bem como procurar entender seu mecanismo de ação.

3.0 HIPÓTESES

3.1. Etomidato apresenta atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol isolado e associado ao fluconazol e itraconazol.

3.2. Etomidato apresenta atividade frente ao biofilme formado de cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol isolado e associado ao fluconazol e itraconazol.

3.3 Etomidato inibe a formação de biofilmes através da interação com ALS3 ou pela subexpressão de manoproteínas.

3.4 Etomidato não apresenta atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, isolado e associado ao fluconazol e itraconazol, na forma planctônica e em biofilme.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Investigar a atividade do etomidato isolado e associado ao fluconazol frente a cepas clínicas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol na forma planctônica e biofilme.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do etomidato, fluconazol e itraconazol frente às cepas de *Candida* spp. na forma planctônica.

4.2.2. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (SCIM) do etomidato isolado e em combinação com o fluconazol e itraconazol frente ao biofilme formado de cepas de *Candida* spp..

4.2.3 Verificar a interação sinérgica entre etomidato e os azólicos testados frente às cepas de *Candida* spp. na forma planctônica e em biofilme formado.

4.2.4. Verificar a atividade do etomidato frente ao biofilme em formação de *Candida* spp..

4.2.5. Verificar a expressão de manoproteínas na superfície de células de *C. albicans* tratadas com etomidato.

4.2.6. Verificar a interação do etomidato com ALS3 através de técnicas de docagem molecular

4.2.7. Avaliar o efeito do etomidato sobre a inibição da proliferação celular de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79).

4.2.8 Investigar o possível mecanismo de ação antifúngico do etomidato através de citometria de fluxo.

5. METODOLOGIA

Figura 3-Fluxograma das metodologias empregadas



5.1 Recuperação das cepas

Foram utilizadas 11 cepas de *Candida* spp. (4 *C. albicans*, 4 *C. tropicalis* e 3 *C. parapsilosis*) oriundas de amostras clínicas e identificadas molecularmente. Ainda utilizamos 2 cepas padrão ATCC (*C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019). As cepas encontravam-se estocadas na micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC) em Sabouraud caldo (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e armazenadas a – 20 °C.

Inicialmente, as cepas foram ressuspensas em caldo Sabouraud (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a 35 °C. No dia seguinte, foram semeadas em Sabouraud dextrose ágar (HiMedia, Mumbai, Índia) e em meio cromogênico HiCrome *Candida* Differential Agar (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a 35 °C para checar a viabilidade e pureza das colônias (DA SILVA et al., 2013; A. NETO et al., 2014). Todo o procedimento foi realizado sob normas de biossegurança nível 2.

5.2 Fármacos

Os fármacos utilizados neste estudo foram o anestésico etomidato (ETO), e os antifúngicos fluconazol (FLC), itraconazol (ITR) e anfotericina B (AMB) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). As soluções de ITR, ETO e AMB foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). FLC foi diluído em água destilada. ETO foi testado na faixa de 1,95-1000 µg/mL. FLC foi testado na faixa de 0,125 a 64 µg/mL, e de 0,0313 a 16 µg/mL para ITR e AMB.

5.3 Testes de sensibilidade antifúngica

5.3.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das drogas isoladas

Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com o documento M27-A3 através da técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2008). Foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) (pH 7,0 ± 0,1) tamponado com 0,165 M ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA). Para realização dos testes foram utilizadas placas de poliestireno esteréis com 96 poços. A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade, sendo adicionado apenas o meio RPMI, a coluna 12 foi utilizada como controle de crescimento, sendo adicionado o meio RPMI e o inóculo. Da coluna 2 a 11 foi realizada diluição seriada da droga a fim de obter o intervalo desejado. O ETO foi utilizado no intervalo de 1,95-1000 µg/mL, FLC de 0,125 a 64 µg/mL, ITR e AMB de 0,0313 a 16 µg/mL. Os testes foram realizados a partir de culturas das cepas semeadas em Sabouraud dextrose ágar (HiMedia, Mumbai, Índia) incubadas por 24 horas a 35 °C. A partir dessas culturas foram produzidos inóculos iniciais de acordo com a escala 0,5 McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Em

seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI a fim de obter um inóculo final contendo $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Um volume de 100 μ L desse inóculo foi adicionado do poço 2 ao 12. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e após esse período realizada leitura visual. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração que inibiu 50% do crescimento fúngico comparando-se com o crescimento verificado no poço 12 (CLSI, 2008). *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram utilizadas como controle do teste. Os pontos de corte adotados para o fluconazol e itraconazol foram de acordo com o documento M27-S4. Para o itraconazol foi considerado a ocorrência de resistência com $CIM \geq 1$ μ g/mL, para o fluconazol $CIM \geq 8$ μ g/mL (CLSI, 2012). Os testes foram realizados em triplicata em dias diferentes.

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

Após a obtenção dos CIMs das drogas individualmente, os azólicos foram combinados com etomidato através da técnica do checkerboard (ODDS, 2003). A partir das CIMs do etomidato, fluconazol e itraconazol foram realizadas diferentes combinações a fim de se obter o maior número possível de combinações entre as drogas. Para isso, foram realizadas diluições sucessivas dos fármacos, a fim de se atingir uma concentração final que fosse 256 vezes menor que a CIMs dos fármacos isolado.

A interação entre os fármacos foi avaliada através da determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI) o qual é obtido pela soma do FIC de cada fármaco, obtido pela relação entre o CIM de cada fármaco utilizado em combinação e o CIM do mesmo fármaco utilizado isolado. Os resultados obtidos foram classificados de acordo com os seguintes parâmetros: $FICI \leq 0,5$: sinergismo, $> 4,0$: antagonismo e $0,5 < FICI < 4,0$: indiferente (ODDS, 2003).

5.3.3. Análise dos dados

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

5.4 Ensaios para determinação da atividade em biofilme

5.4.1. Crescimento dos isolados de *Candida* spp. no modo biofilme

A formação do biofilme foi realizada utilizando placas de microtitulação de acordo com a metodologia de Pierce et al. (2008), com pequenas modificações. Foram utilizadas 11 cepas de *Candida* spp. (4 *C. albicans*, 4 *C. tropicalis* e 3 *C. parapsilosis*) oriundas de amostras clínicas e identificadas molecularmente. As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 h. Em seguida, as leveduras foram suspensas em 5 mL de meio YNB e reincubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas com PBS por três vezes. As células foram ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland 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 h. 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.

5.4.2. Determinação da atividade do etomidato isolado e associado ao fluconazol e itraconazol sobre os biofilmes formados de *Candida* spp.

Os biofilmes formados de acordo com o **item 5.4.1** foram tratados com etomidato (125 a 1250 µg/mL), fluconazol (16 a 64 µg/mL) e itraconazol (0,5 a 2 µg/mL). Para avaliar o sinergismo frente aos biofilmes formados foram realizadas as seguintes combinações: etomidato (15,625 a 312,5 µg/mL) + fluconazol (4,0 a 40 µg/mL) e etomidato (15,625 a 312,5 µg/mL) + (itraconazol (0,03125 to 0,3125 µg/mL). Foi utilizado como controle negativo (poço sem formação de biofilme, apenas o RPMI 1640) e como controle de 100% de crescimento (suspensão de células em RPMI 1640 sem o fármaco). Aos biofilmes formados foram adicionados 200 µl de droga e incubado a 35 °C por 24 horas. Após esse período, os biofilmes foram lavados com PBS três vezes. Para se verificar a viabilidade celular foi utilizado o corante 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 3 vezes com PBS e adicionado 200 µL DMSO.

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). Para avaliar a ocorrência de sinergismo entre etomidato e os azólicos (FLC e ITRA) testados foi realizado a metodologia do checkerboard para derivação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI), como descrito por Ramage e colaboradores (2001). O SCIM_{50%} foi definido com a menor concentração de combinação das drogas necessária para reduzir 50% do biofilme formado quando comparado ao controle (RAMAGE, et al., 2001). Os ensaios foram realizados em triplicata em dias diferentes.

5.4.3. Determinação da atividade do etomidato sobre os biofilmes em formação de *Candida spp.*

Para avaliar a atividade do etomidato frente ao biofilme ainda em formação foram utilizadas três cepas de *Candida spp.* (1 *C. albicans*, 1 *C. parapsilosis* e 1 *C. tropicalis*). O etomidato foi utilizado nas concentrações de CIM/4, CIM/2, CIM, 2x CIM e 4x CIM. As cepas de *Candida spp.* foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 h. Em seguida, as leveduras foram suspensas em 5 mL de meio YNB e reincubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas com PBS por três vezes. As células foram ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI. Em seguida, foram dispensados 100 µL do inóculo e 100 µL da droga em uma placa de 96 poços de fundo chato. No poço 12 adicionou-se somente RPMI como controle de esterilidade. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h. No dia seguinte, o sobrenadante foi aspirado e a placa foi lavada delicadamente com PBS por três vezes. Para se verificar a viabilidade celular foi utilizado o corante 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 3 vezes com PBS e adicionado 200 µL DMSO. 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.

5.4.4 Microscopia eletrônica de varredura em biofilme formado

O efeito do etomidato isolado na morfologia e ultraestrutura do biofilme de *C. albicans* foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para realização do ensaio, foi seguido o protocolo de Brilhante e colaboradores (2016). Para a análise, os biofilmes foram formados em Thermanox® lâminas (Thermo Fisher Scientific, Nova Iorque, Estados Unidos da América) com um inóculo inicial de 3×10^6 células / mL em meio RPMI-1640 após 24 horas de incubação. Os biofilmes formados foram tratados com etomidato nas concentrações de CIM/4 (31,25 µg/mL), CIM (125 µg/mL) e 10x CIM (1250 µg/mL). Os biofilmes tratados foram fixados com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15 M contendo azul alciano (0,1%) e incubados durante a noite a 4 ° C. Posteriormente, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato 0,15 M por 5 min e sujeitos a desidratação alcoólica crescente em etanol [50, 70, 80, 95 e 100% (duas vezes), 10 min cada]. Em seguida, as lâminas foram secas com hexametildisilazano (Polysciences Europe, Alemanha) por 30 minutos e depois incubadas durante a noite em um dessecador. As lâminas Thermanox® foram revestidas com ouro de 10 nm (Emitech Q150T, Lewes, Reino Unido) e observadas em MEV (FEI Inspect S50, OR, Estados Unidos) no modo de alto vácuo a 15 kV.

5.4.5 Microscopia eletrônica de varredura em biofilme em formação

O efeito do etomidato isolado na morfologia e ultraestrutura do biofilme em formação de *C. albicans* foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para realização do ensaio, foi seguido o protocolo de Brilhante e colaboradores (2016). Para a análise, os biofilmes foram formados em Thermanox® lâminas (Thermo Fisher Scientific, Nova Iorque, Estados Unidos da América) com um inóculo inicial de 3×10^6 células / ml em meio RPMI-1640 após 48 horas de incubação com etomidato nas concentrações de MIC/4 (31,25 µg/mL), CIM/2 (62,5 µg/mL), CIM (125 µg/mL), 2x CIM (250 µg/mL) e 4x CIM (500 µg/mL). Os biofilmes tratados foram fixados com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15 M contendo azul alciano (0,1%) e incubados durante a noite a 4 ° C. Posteriormente, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato 0,15 M por 5 min e sujeitos a desidratação alcoólica crescente em etanol [50, 70, 80, 95 e 100% (duas vezes), 10 min cada]. Em seguida, as lâminas foram secas com hexametildisilazano (Polysciences Europe, Alemanha) por 30 minutos e depois incubadas durante a noite em um dessecador. As lâminas Thermanox® foram revestidas com

ouro de 10 nm (Emitech Q150T, Lewes, Reino Unido) e observadas em MEV (FEI Inspect S50, OR, Estados Unidos) no modo de alto vácuo a 15 kV.

5.4.6 Docagem Molecular

Para estudar a natureza das interações, modo de ligação e seletividade da interação entre o etomidato e a proteína adesina ALS3 de *Candida albicans*, foi utilizada a técnica de Docagem Molecular, uma sequencia de algoritmos que realizam uma simulação de encaixe molecular, tendo como base a teoria de campo de força clássica (FERREIRA et al., 2015).

5.4.6.1 Design dos Ligantes

As estruturas químicas do etomidato e fluconazol foram otimizadas utilizando o formalismo de campo de força clássico, utilizando o algoritmo Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94) (HALGREN, 1996), implantados do código de licença aberta Avogadro® (versão 1.2.0) (HANWELL et al., 2012), configurado para ciclos de 10 interações do algoritmo *steepest descente*.

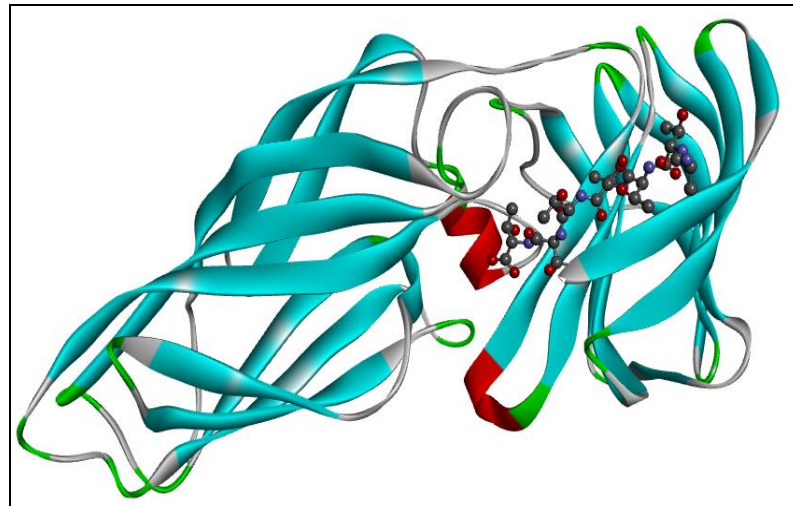
5.4.6.2 Preparação do Receptor-Ligantes

Na preparação da ALS3, o ligante hepta-threonine e as moléculas de água foram removidos da proteína original e os hidrogênios polares foram adicionados a enzima gerando o arquivo PDBQT por meio do AutoDockTools, sendo o arquivo utilizado o formalismo do algoritmo genético lamarckiano disponibilizado no código AutodockVina (TROTT; OLSON, 2010). As estruturas flexíveis do etomidato e fluconazol também foram preparadas no AutoDockTools. Para definição do espaço tridimensional da simulação foi definido os parâmetros de grid box: center_x = -1.055, center_y = -11.575, center_z = -15.43, size_x = 58, size_y = 54, size_z = 60, spacing = 0.375 e exhaustiveness = 8.

5.4.6.3 Identificação da Enzima Alvo

A estrutura da adesina ALS3 de *Candida albicans* em complexo com hepta-threonine (PDB ID: 4LEB) foi obtida no banco de dados de proteínas (Protein Data Bank) determinada a partir de difração de raio X com resolução de 1.4 Å (Figura 4) (LIN et al., 2014).

Figura 4-Representação estrutural da ALS3 *Candida albicans*.



5.4.7 Disponibilidade de manoproteínas na parede celular

A análise das variações na disponibilidade de manoproteínas na parede celular foi realizada por citometria de fluxo, conforme descrito por Curvelo et al. (2014). Resumidamente, 1×10^7 células de *C. albicans* tratadas 125 µg/mL de etomidato foram incubadas por 48 h a 35 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 10 mM, fixadas em paraformaldeído a 4%, bloqueadas com BSA a 5% e incubadas por 1 h com 2 mg/mL em uma diluição 1: 500 de concanavalina-A marcada com FITC (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). Um total de 10.000 eventos foram analisados com um citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) equipado com um laser de argônio de 15 mW e comprimento de onda de 488 nm.

5.4.7.1 Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados a partir da média \pm E.P.M de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelos

testes de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa GraphPad Prism versão 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.5 Testes utilizando citometria de fluxo

5.5.1 Preparo das suspensões de células de *Candida albicans*

Para os ensaios de citometria de fluxo foi utilizada a cepa de *C. albicans* 4. Essa cepa foi semeada 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. Posteriormente, as células centrifugadas (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) (DA SILVA et al., 2013; A. NETO et al., 2014).

5.5.2 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, células de *C. albicans* resistente ao fluconazol foram expostas ao fluconazol (64 µg/ml), itraconazol (0,25 µg/ml), anfotericina B (4 µg/mL), etomidato (125 µg/mL), etomidato (31,25 µg/mL) + fluconazol (4 µg/mL), e etomidato (15,6 µg/mL) + itraconazol (0,0312 µg/mL). O meio de cultura RPMI foi utilizado como controle negativo do teste e a anfotericina B foi usada como 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.

5.5.3 Determinação da viabilidade celular em células de *Candida albicans*

As células de *C. albicans* após exposição aos tratamentos citados no **item 5.5.2** foram marcadas com o marcador iodeto de propídeo (PI) e analisadas por citometria de fluxo. Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA et al., 2013).

5.5.4 Determinação do potencial transmembrânico ($\Delta\psi_m$) em células de *Candida albicans*

As células de leveduras após exposição aos tratamentos propostos no **item 5.5.2** foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e incubadas com rodamina 123 (1 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma, USA) a 37 °C por 15 min no escuro. Em seguida, 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; A. NETO et al., 2014).

5.5.5. Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) em células de *Candida albicans*

Para a detecção de EROs, as células de *Candida albicans* foram tratadas como citado no **item 5.5.2** e incubadas com H2DCFDA (20 μM) (Diacetato 2',7'- diclorodihidrofluoresceína) (Sigma, USA) por 30 min, no escuro, a 35 °C. Em seguida, as células foram colhidas, lavadas, ressuspensas em PBS, e analisadas por citometria de fluxo (DA SILVA et al., 2013; A. NETO et al., 2014).

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

As células de *C. albicans* após os tratamento descritos no **item 5.5.2** foram centrifugadas e digeridas com Zymolyase 20T (2 mg/ mL) (Seikagaku Corporation, Japão) em tampão fosfato de potássio (PBS) (1 M pH 6,0) durante 2 h a 30 °C. Os esferoplastos de *C. albicans* foram ressuspensos em uma solução contendo anexina V- FITC (Guava Nexin Kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA) e PI (Sigma, USA) na ausência de luz e a 37 °C. Após 20 min, a suspensão foi analisada por citometria de fluxo. Para cada experimento 10000 eventos foram avaliados, e os restos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA et al., 2013; A. NETO et al., 2014).

5.5.7. Análise dos dados dos ensaios de citometria de fluxo

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 utilizando a versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.6 Ensaio Cometa

O ensaio em cometa alcalino foi realizado essencialmente como descrito por MILOSHEV; MIHAYLOY; ANACHKOVA (2002). As células de *C. albicans* foram centrifugadas durante 5 min, lavadas com água destilada, e ressuspensas em tampão S (1M de sorbitol, 25 mM de KH_2PO_4 , pH 6,5). Alíquotas de aproximadamente 5×10^4 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 EDTA, pH 12,3) durante 1 h para lisar os esferoplastos. As lâminas foram lavadas três vezes durante 20 min cada em uma solução (30 mM de NaOH, 10 mM de EDTA e pH 12,4) para o desenrolamento do DNA e, em seguida, submetido a eletroforese no mesmo tampão. A eletroforese foi realizada por 20 min a 0,5 V/ cm e amperagem ajustada para 24 mA. Após eletroforese, os géis foram neutralizados por submersão das lâminas em 10 mM Tris HCl pH 7,5 durante 10 min seguido por incubações consecutivas por 10 min em etanol 76% e 96%. Finalmente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, coradas com brometo de etídio (1 mg/ mL) e visualizadas em microscópio de fluorescência. Todos os passos acima foram realizados no escuro para evitar danos adicionais no DNA. Imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas idênticas) foram analisadas para cada grupo experimental. A leitura é feita através de escores de acordo com o tamanho da cauda (de não danificado - 0 a dano máximo - 4), e o valor de índice de dano foi calculada para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de zero (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (COLLINS, 2004).

5.6.1. Análise dos dados obtidos pelo ensaio do cometa

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

5.7 Avaliação da citotoxicidade

Para os testes de citotoxicidade foram utilizados fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79) cedidos gentilmente pelo Dr. João Antônia Pêgas Henriques da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil).

5.7.1 Cultivo e manutenção da linhagem V79

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (75 cm², volume de 250 mL em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂, tendo sido observado o crescimento celular com a ajuda do microscópio de inversão a cada 24 horas.

5.7.2 Teste de exclusão do corante Azul de Tripán

Células V79 distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com etomidato nas concentrações de 125 µg/mL e 250 µg/mL durante 24 horas. Após a incubação, 10 µl do corante azul de tripan foram adicionados a 90 µl da suspensão de células em tubo Eppendorf. Células viáveis e não viáveis foram diferenciadas e contadas em uma câmara de Neubauer. Doxorubicina foi utilizada como controle positivo (VERAS, et al., 2004).

5.7.3 Microscopia de fluorescência

Para classificar as células como viáveis, apoptóticas ou necróticas, elas foram submetidas às concentrações de 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$ de etomidato e tratadas com 1 μl de solução aquosa de acridina-laranja / brometo de etídio (AO / EB, 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$), em seguida foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Tóquio, Japão). Trezentas células foram contadas por amostra. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo (MCGAHON, *et al.*, 1995).

6. RESULTADOS

Figura 5-Resumo dos resultados obtidos



6.1 Atividade antifúngica do etomidato frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao Fluconazol

A concentração inibitória mínima das cepas em estudo foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo. De acordo com a Tabela 2, podemos observar que todas as cepas mostraram-se resistentes ao fluconazol, mas nem todas foram resistentes ao itraconazol. O etomidato teve atividade antifúngica em todas as cepas testadas com CIM variado de 125 a 250 µg/ mL (tabela 2).

6.2 Efeito da combinação do etomidato com azólicos (FLC e ITRA) frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos

Em relação à interação do etomidato com os azólicos testados, a combinação do etomidato e fluconazol demonstrou sinergismo em 30,7 % das cepas testadas: 2 *C. albicans* e 2 *C.tropicalis*. Para a combinação do etomidato e itraconazol, o sinergismo foi observado em 100% dos isolados

testados ($FICI \leq 0,5$) (tabela2). O CIM do etomidato variou de 31,2 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ quando combinado ao fluconazol, apresentando uma redução de até 4 vezes quando comparado a sua concentração isolada. Para a combinação com itraconazol o CIM do etomidato variou de 3,9 a 31,2 $\mu\text{g/mL}$, apresentando uma redução de até 32 vezes quando comparado a sua concentração isolada. O CIM para o fluconazol variou de 4 a 8 $\mu\text{g/mL}$ e itraconazol de 0,0078 a 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 2). Não foi observado antagonismo em nenhum dos isolados testados.

Tabela 2-Efeito antifúngico do etomidato (ETO), fluconazol (FLC), itraconazol (ITR) isolados e em combinação frente a cepas de *Candida* spp.

Cepas ^a	CIM ^b (µg/ml)								
	Drogas isoladas ^c			Drogas combinadas ^d			Drogas combinadas ^e		
	ETO	FLC	ITR	ETO/FLC	FICI	Interpretação	ETO/ITR	FICI	Interpretação
<i>C. albicans</i> 1	125	32	0.25	31.2/8	0.5	SIN	31.2/0.0625	0.5	SIN
<i>C. albicans</i> 2	125	16	0.25	62.5/8	1	IND	31.2/0.0625	0.5	SIN
<i>C. albicans</i> 3	125	16	0.25	62.5/8	1	IND	15.6/0.0312	0.25	SIN
<i>C. albicans</i> 4 *	125	16	0.25	31.2/4	0.5	SIN	15.6/0.0312	0.25	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 1	125	16	1	62.5/8	1	IND	31.2/0.25	0.5	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 2	125	32	0.25	62.5/16	1	IND	31.2/0.0625	0.5	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 3	125	32	0.25	62.5/16	1	IND	31.2/0.0625	0.5	SIN
<i>C. tropicalis</i> 1	125	32	0.25	62.5/16	1	IND	31.2/0.0625	0.5	SIN
<i>C. tropicalis</i> 2	125	32	0.25	31.2/8	0.5	SIN	15.6/0.0312	0.25	SIN
<i>C. tropicalis</i> 3	250	32	0.25	250/32	2	IND	31.25/0.312	0.25	SIN
<i>C. tropicalis</i> 4	125	16	0.25	31.25/4	0.5	SIN	15.6/0.0312	0.25	SIN
<i>C. parapsilosis</i> ATCC2019	125	1	0.5	62.5/0.5	1	IND	3.9/0.0156	0.06	SIN
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	125	16	0.25	62.5/8	1	IND	3.9/0.0078	0.06	SIN

^a Cepas de *Candida* spp. isoladas de coleção. ^b CIM – Concentração Inibitória Mínima necessária para inibir 50 % do crescimento do microrganismo após 24 horas de incubação. ^c Procedimento realizado de acordo com o protocolo M27-A3 of CLSI 2008 para as drogas isoladas. ^d Combinação de etomidato com fluconazol. ^e Combinação de etomidato com itraconazol. (*) Cepas selecionada para os experimentos de citometria de fluxo. ETO: etomidato; FLC: fluconazol; ITR: itraconazol; SIN: sinergismo; IND: indiferente, FICI: Concentração Inibitória Fracionada.

6.3 Avaliação da atividade antibiofilme do etomidato frente aos biofilmes de *Candida* spp.

6.3.1 Atividade do etomidato isolado e associado ao fluconazol e itraconazol frente aos biofilmes formados de *Candida* spp.

Após verificar a atividade do etomidato e suas associações ao fluconazol e itraconazol, decidimos avaliar sua atividade frente aos biofilmes formados de *Candida* spp.. Na tabela 3, pode-se observar que a concentração inibitória mínima necessária para destruir 50% dos biofilmes formados (SCIM_{50%}) variou de 500 a 1250 µg/mL para o etomidato. O fluconazol e itraconazol isolados não demonstraram atividade frente aos biofilmes formados na faixa testada. Com o objetivo de avaliar o efeito sinérgico do etomidato 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 RAMAGE et al. (2001). A combinação etomidato e fluconazol demonstrou sinergismo em apenas duas cepas (1 *C. albicans* e 1 *C.tropicalis*), sendo necessário 125 µg/mL de etomidato e 16 µg/mL de fluconazol para destruir 50% do biofilme formado. Em relação à combinação etomidato e itraconazol, houve sinergismo em 100% dos isolados testados, onde a concentração necessária para destruir os biofilmes variou de 62,5 a 156,25 µg/mL para o etomidato e de 0,125 a 0,3125 µg/mL para o itraconazol.

Tabela 3- Atividade antifúngica do etomidato (ETO), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITR) frente ao biofilme formado.

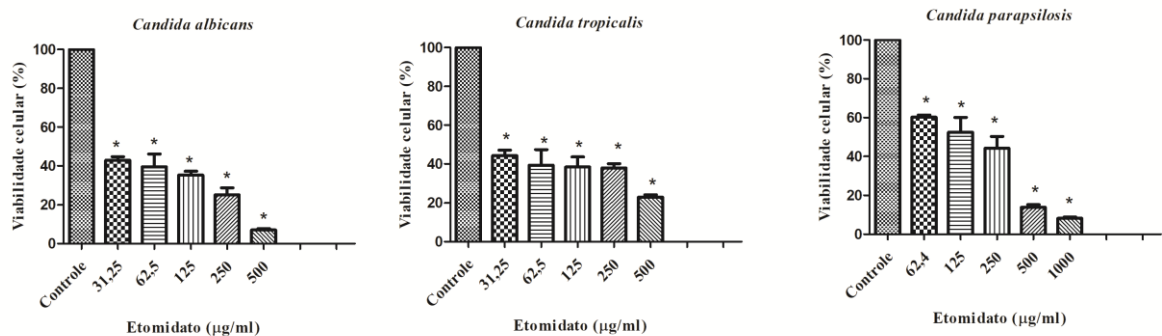
Cepas ^a	SCIM b (µg/ml)								
	Drogas isoladas			Drogas combinadas ^c			Drogas combinadas ^d		
	ETO	FLC	ITR	ETO/FLC	FICI	Interpretação	ETO/ITR	FICI	Interpretação
<i>C. albicans</i> 1	500	>64	>2	312,5/40	1,25	IND	156,25/0,3125	0,47	SIN
<i>C. albicans</i> 2	1250	>64	>2	312,5/40	1,25	IND	156,25/0,3125	0,47	SIN
<i>C. albicans</i> 3	500	>64	>2	125/16	0,5	SIN	62,5/0,125	0,19	SIN
<i>C. albicans</i> 4	500	>64	>2	312,5/40	1,25	IND	62,5/0,125	0,19	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 1	1250	>64	>2	312,5/40	1,25	IND	62,5/0,125	0,19	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 2	500	>64	>2	312,5/40	1,25	IND	156,25/0,3125	0,47	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 3	1250	>64	>2	312,5/40	1,25	IND	156,25/0,3125	0,47	SIN
<i>C. tropicalis</i> 1	500	>64	>2	312,5/40	1,25	IND	156,25/0,3125	0,47	SIN
<i>C. tropicalis</i> 2	500	>64	>2	125/16	0,5	SIN	156,25/0,3125	0,47	SIN
<i>C. tropicalis</i> 3	1250	>64	>2	312,5/40	1,25	IND	156,25/0,3125	0,47	SIN
<i>C. tropicalis</i> 4	500	>64	>2	312,5/40	1,25	IND	62,5/0,125	0,19	SIN

^a Cepas de *Candida* spp isoladas de coleção. ^bSCIM – Concentração Inibitória Mínima necessária para inibir 50% do biofilme formado. ^c Combinação de etomidato com fluconazol. ^d Combinação de etomidato com itraconazol. ETO: etomidato; FLC: fluconazol; ITR: itraconazol; SIN: sinergismo; IND: indiferente.

6.3.2 Atividade do etomidato frente aos biofilmes em formação de *Candida* spp.

Devido à importância da organização de microrganismos em biofilmes, decidimos testar a atividade do etomidato isolado frente aos biofilmes ainda em formação de *Candida* spp.. Para isso, foi selecionada uma cepa representativa de cada espécie utilizada nesse trabalho: 1 *C. albicans*, 1 *C. parapsilosis* e 1 *C. tropicalis*. De acordo com a figura 6, pode-se verificar que o etomidato foi capaz de inibir o biofilme em formação em todas as cepas testadas. As concentrações sub-inibitórias para *C. albicans* (CIM/4), *C. tropicalis* (CIM/4) e *C. parapsilosis* (CIM/2) foi capaz de reduzir 50% da viabilidade celular dos biofilmes em formação quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). A máxima concentração testada (4x CIM) foi capaz de inibir 93%, 77% e 92% da viabilidade celular dos biofilmes em formação para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* respectivamente (anexo I).

Figura 6-Atividade do etomidato frente aos biofilmes em formação de *Candida* spp.

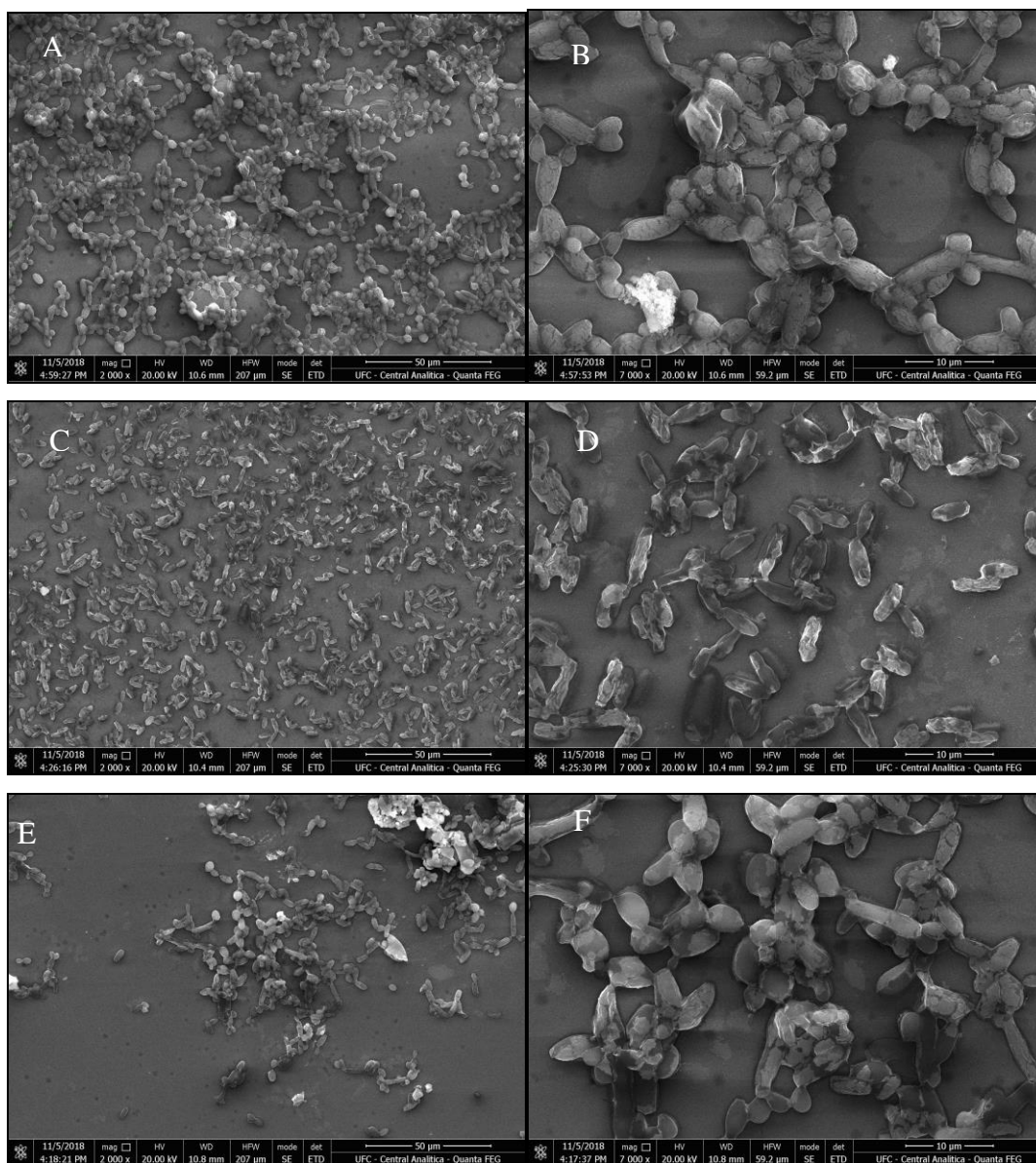


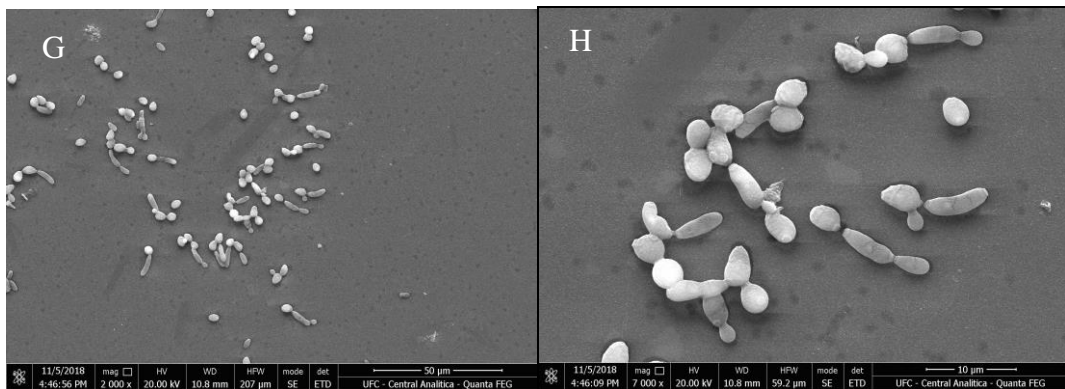
6.3.3 Avaliação de biofilme formado de *C. albicans* tratados com etomidato isolado por MEV

Imagens de MEV foram realizadas para mostrar as diferenças estruturais entre os biofilmes de *C. albicans* tratados com etomidato isolado (figura 7). No controle (Figura 7A e 7B) pode-se observar um grande número de blastoconídeos e algumas hifas. Nos biofilmes tratados com etomidato nas concentrações de MIC/4 (31,25µg/mL) (figura 7C e 7D), MIC (125 µg/mL) (figura 7E e 7F) e 10x MIC (1250 µg/mL) (figura 7G e 7H) pode-se observar

uma redução na quantidade de blastoconídeos e hifas a medida que maiores concentrações da droga são utilizadas quando comparadas ao controle..

Figura 7-Microscopia eletrônica de biofilme de *C. albicans*.



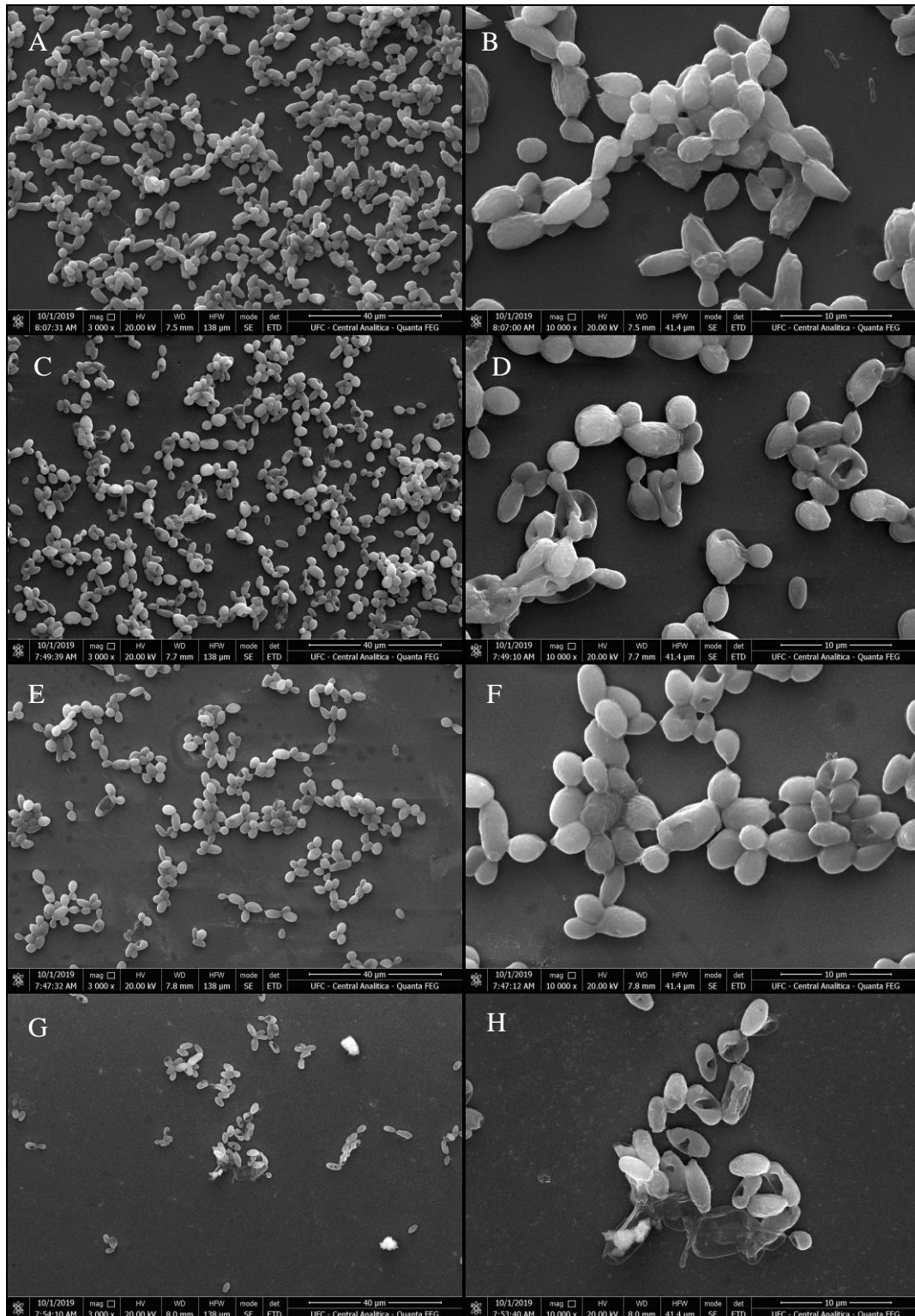


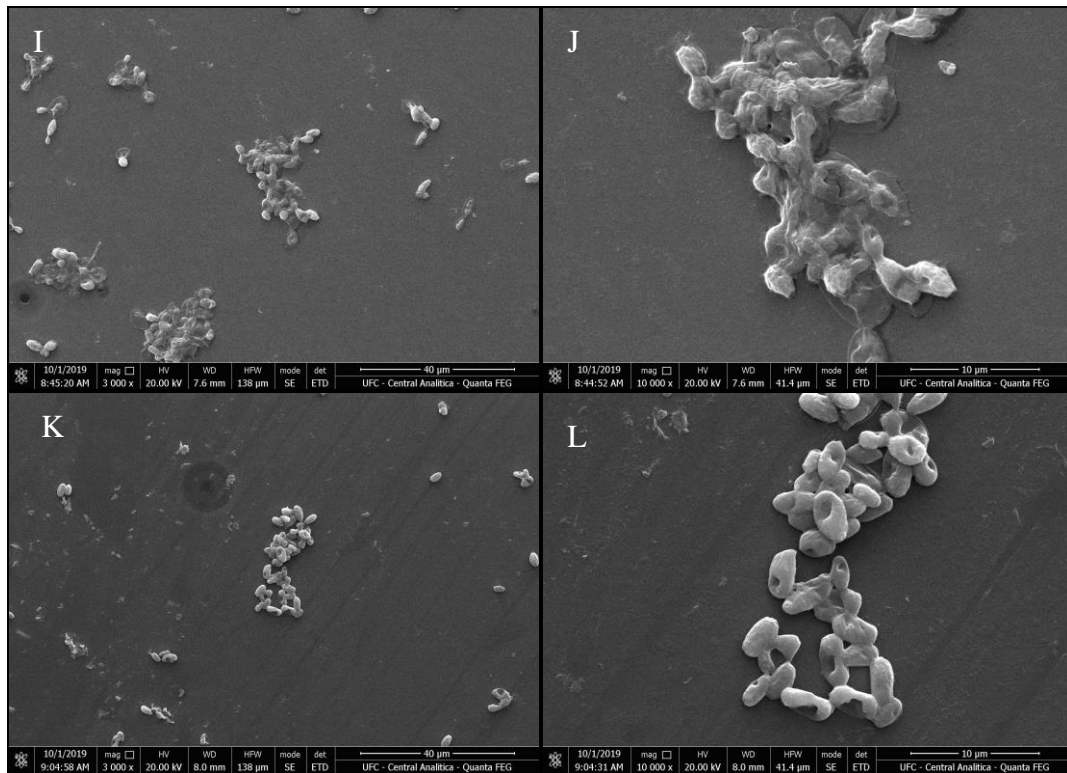
A e B: controle. C e D: Biofilme tratado com 31,25 µg/mL de etomidato, E e F: biofilme tratado com 125 µg/mL de etomidato, G e H: biofilme tratado com 1250 µg/mL de etomidato. Magnitude: 2000x e 7000x. Barra: 50 µm e 10 µm.

6.3.4 Avaliação de biofilme em formação de *C. albicans* tratados com etomidato isolado por MEV

Imagens de MEV foram realizadas para mostrar as diferenças estruturais entre os biofilmes em formação de *C. albicans* tratados com etomidato (Figura 8). No controle (Figura 8A e 8B) pode-se observar um grande número de blastoconídeos sem alterações na sua morfologia. Nos biofilmes tratados com etomidato nas concentrações de CIM/4 (31,25 µg/mL) (Figura 8C e 8D) pode-se observar uma redução na quantidade de blastoconídeos e alterações na morfologia das células. À medida que as concentrações aumentam CIM/2 (62,5 µg/mL) (Figura 8E e 8F), CIM (125 µg/mL) (Figura 8G e 8H), 2x CIM (250 µg/mL) (Figura 8I e 8J) e 4X CIM (500 µg/mL) (Figura 8K e 8L) pode-se observar uma maior redução na quantidade de blastoconídeos e um aumento nos danos na morfologia das células quando comparadas ao controle.

Figura 8-Microscopia eletrônica de biofilme em formação de *C. albicans*.





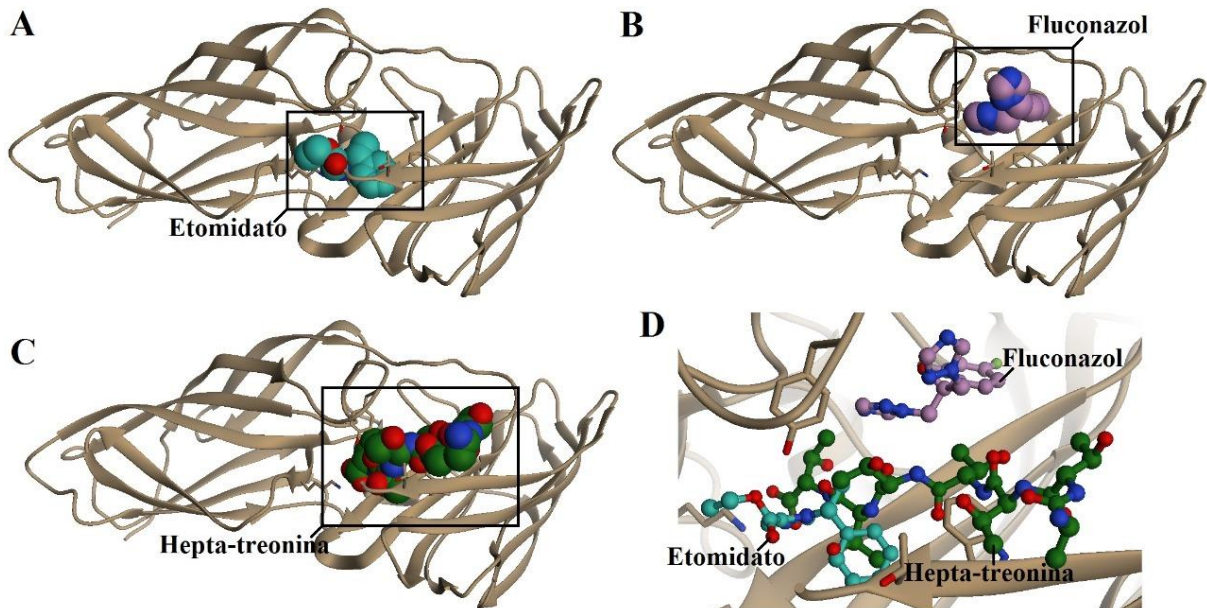
A e B: controle. C e D: biofilme tratado com 31,25 µg/mL de etomidato, E e F: biofilme tratado com 62,5 µg/mL de etomidato, G e H: biofilme tratado com 125 µg/mL de etomidato, I e J: biofilme tratado com 250, K e L: biofilme tratado com 500 µg/mL de etomidato. Magnitude: 3000x e 10000x. Barra:40µm e 10 µm.

6.3.5 Avaliação da interação do etomidato com ALS3 através de docagem molecular

Valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) e energia de afinidade são utilizados a partir do acoplamento molecular para a seleção das melhores conformações de docking. Os resultados revelaram que o etomidato e fluconazol apresentaram energia de ligação com variação de -5.8 kcal/mol a -6.0 kcal/mol, e RMSD variando de 1.704 Å para o fluconazol a 1.847 Å para o etomidato, ambos os valores estão dentro dos parâmetros de acoplamento molecular.

Na figura 9, o docking comparativo entre etomidato, fluconazol e adesina ALS3 de *Candida albicans* destacada em A, pode-se observar o etomidato acoplado na mesma região do ligante complexado na ALS3 (hepta-threonine) e em B o acoplamento do fluconazol próximo a hepta-threonine.

Figura 9-ALS3 complexada com etomidato (A) Fluconazol (B) Hepta-threonine(C) e sitio de ligação a Etomidato, Fluconazol e Hepta-Threonina (D).



Analisando as distâncias do etomidato e os resíduos de aminoácido, foi possível observar que o etomidato ficou na mesma região da hepta-threonine, ficando próximo ao resíduo Ser170 (tríade catalítica) e do resíduo de aminoácido que tem papel de adesão (Lys59), assim como de resíduos pertencentes ao PBC (Trp295, Gly297, Pro29 e Thr61), ficando a uma distância menor que o fluconazol nos resíduos Ala 116, Ser 170 e Lys 59 (tabela 4).

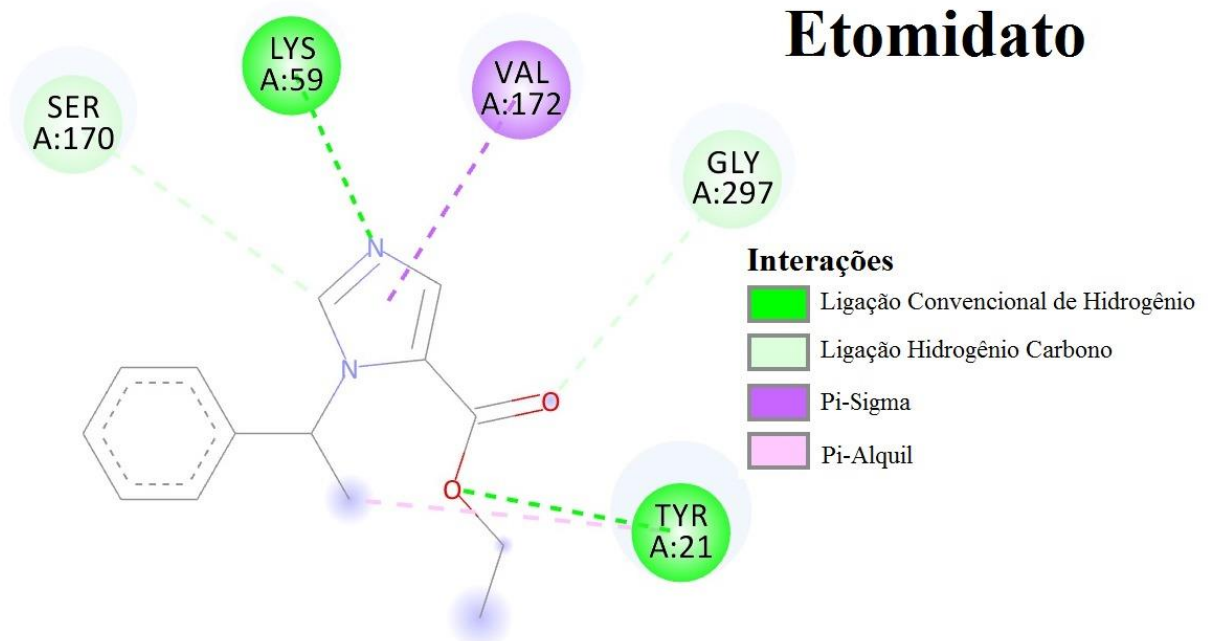
Tabela 4-Distâncias de resíduos ALS3 *Candida albicans*

Resíduos	Docking		Hepta-treonina
	Etomidato	Fluconazol	
Leu293	8.8 Å	7.1 Å	4.8 Å
Trp295	3.3 Å	4.7 Å	4.0 Å
Gly297	3.4 Å	10.1 Å	3.6 Å
Ala19	5.5 Å	8.2 Å	3.9 Å
<u>Ala116</u>	7.1 Å	9.4 Å	5.3 Å
Pro29	3.9 Å	6.3 Å	4.2 Å
Thr61	4.8 Å	11.4 Å	6.2 Å
Phe58	7.0 Å	11.0 Å	6.0 Å
<u>Ser170</u>	3.5 Å	4.4 Å	3.5 Å
<u>Lys59</u>	3.4 Å	8.4 Å	2.8 Å

Analisando as interações intermoleculares do etomidato e fluconazol com a ALS3 de *Candida albicans*, foram encontradas três interações com o etomidato, Lys59 (*Conventional Hydrogen*

Bond), Ser170 e Gly297 (*Carbon Hydrogen Bond*), sendo dois resíduos da tríade catalítica (Figura 10). Já o fluconazol não apresentou interações significativas com os resíduos de interesse.

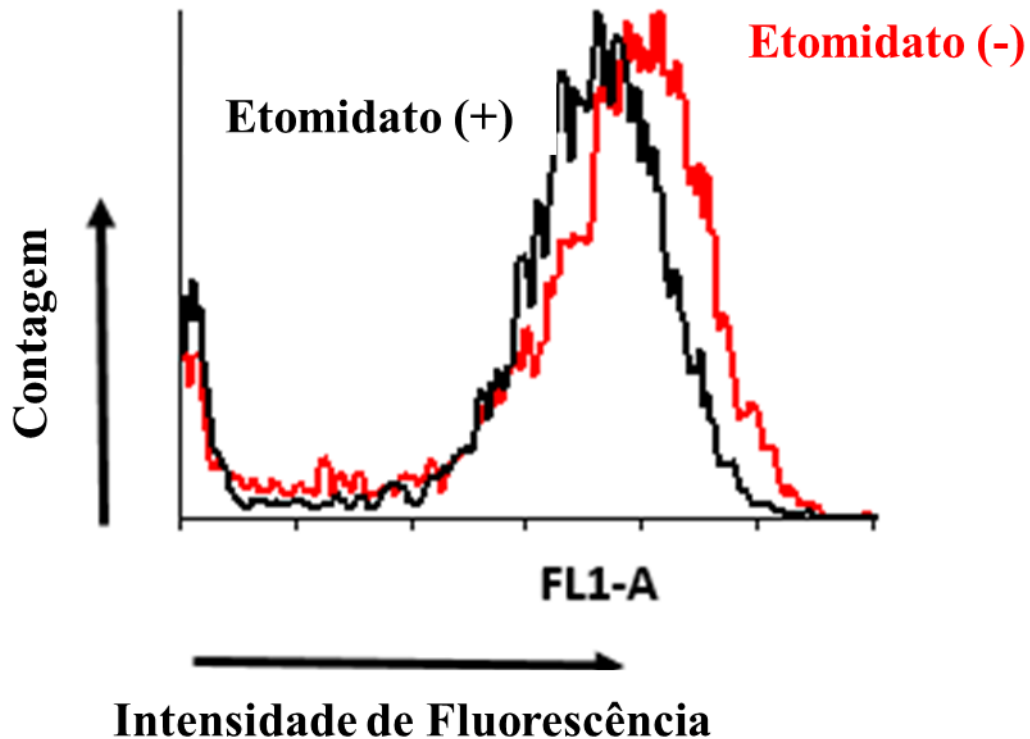
Figura 10-Interações entre o Etomidato e ALS3.



6.3.6 Avaliação da produção de manoproteínas

A Figura 11 mostra que o tratamento de células de *C. albicans* com etomidato diminuiu a fluorescência emitida por conA-FITC em 21%. Estes resultados mostram que o etomidato reduziu a disponibilidade de manoproteínas na superfície da parede celular de *C. albicans*.

Figura 11-Análise por citometria de fluxo mostrando a ligação de conA-FITC à superfície de *C. albicans*



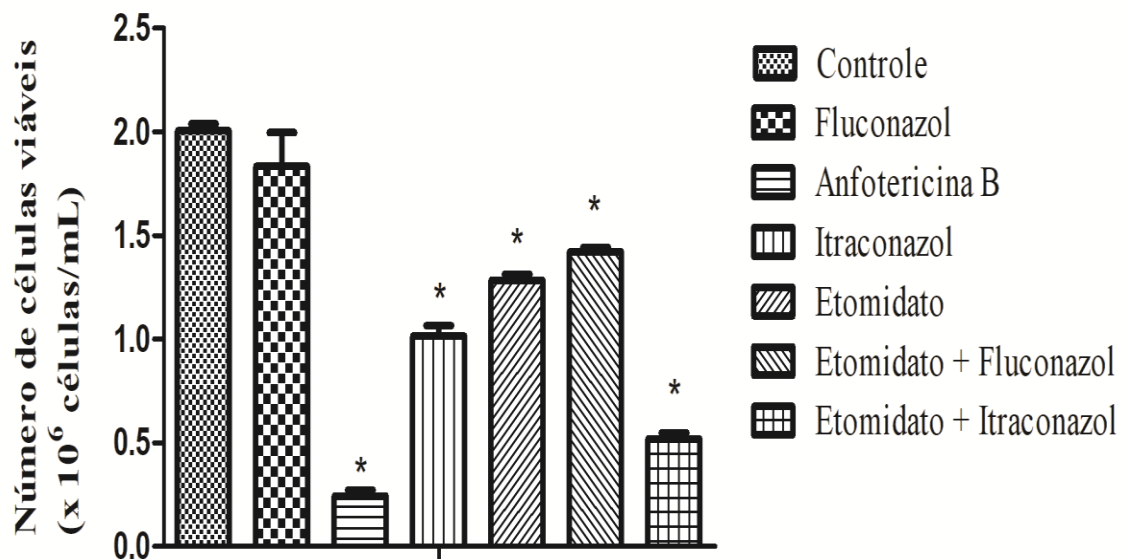
6.4. Avaliação do tipo de morte celular em *Candida albicans* após exposição ao etomidato isolado e associado aos azólicos

6.4.1 Redução da viabilidade das células de *C. albicans* após exposição ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação

A integridade da membrana celular foi avaliada através do corante iodeto de propídeo. De acordo com a figura 12, o tratamento de células de *C. albicans* com fluconazol (16 $\mu\text{g/mL}$) ($1,85 \times 10^6 \pm 0,39$) não provocou redução significativa do número de células viáveis quando comparadas ao controle ($2,00 \times 10^6 \pm 0,08$) ($p < 0,05$). O tratamento com itraconazol (0,25 $\mu\text{g/mL}$), etomidato (125 $\mu\text{g/mL}$), etomidato + fluconazol ($32,5 + 4 \mu\text{g/mL}$) e etomidato + itraconazol ($15,6 + 0,03 \mu\text{g/mL}$) provocaram uma redução significativa no número de células viáveis quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). Os resultados obtidos foram

respectivamente, $1,01 \times 10^6 \pm 0,12\%$, $1,28 \times 10^6 \pm 0,07\%$, $1,42 \times 10^6 \pm 0,05\%$ e $0,520 \times 10^6 \pm 0,07\%$, com $p < 0,05$. Para o tratamento com anfotericina B ($4,0 \mu\text{g/mL}$), utilizado como controle de morte, houve uma redução significativa no número de células viáveis ($0,24 \times 10^6 \pm 0,06$) quando comparadas ao controle ($p < 0,05$).

Figura 12-Avaliação da viabilidade celular de células de *C. albicans* tratadas com etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação.



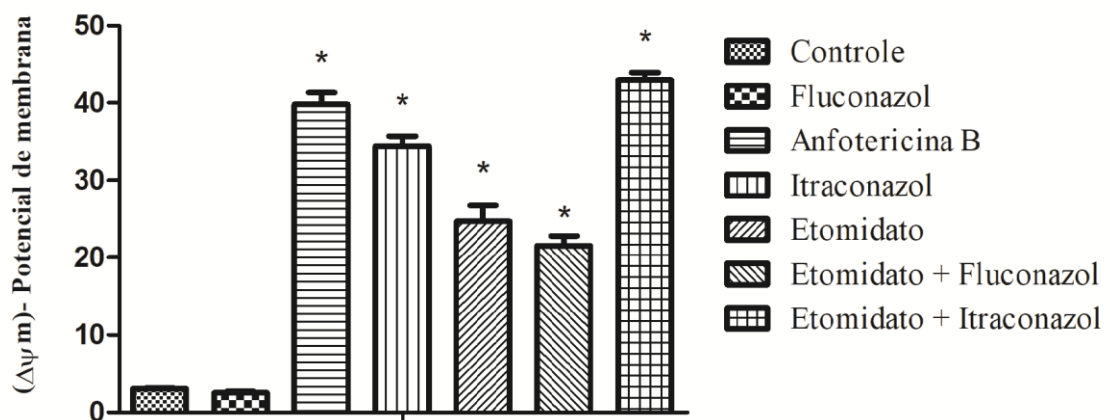
As células foram tratadas com ETO (CIM= $125 \mu\text{g/ml}$), FLC (CIM= $16 \mu\text{g/mL}$), ITRA (CIM= $0,25 \mu\text{g/ml}$), ETO+FLC (MIC= $31,2/4 \mu\text{g/mL}$), ETO+ITRA ($15,6/0,0312 \mu\text{g/mL}$), AMB (CIM= $4 \mu\text{g/mL}$; controle de morte) e RPMI (controle negativo) e, depois de 24 horas, foram corados com brometo de etídio e analisados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M) em três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.4.2 Despolarização mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em células de *C. albicans* provocados após exposição ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação

Para detectar o percentual de células com baixo potencial elétrico transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), as células foram marcadas com rodamina 123 após os tratamentos propostos. De acordo com a figura 13, as células de *C. albicans* tratadas com fluconazol ($16\mu\text{g/mL}$) ($2,51 \times 10^6 \pm 0,51\%$) não sofreram alteração significativamente estatística no seu

potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) quando comparadas ao controle ($3,0 \times 10^6 \pm 0,25\%$). Já o tratamento realizado com itraconazol ($0,25\mu\text{g/mL}$), etomidato ($125\mu\text{g/mL}$), etomidato + fluconazol ($31,25 + 4 \mu\text{g/mL}$) e etomidato + itraconazol ($15,6+0,0312 \mu\text{g/mL}$) demonstraram um aumento do percentual de células com baixo potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$); $34,4 \times 10^6 \pm 3,1\%$; $24,6 \times 10^6 \pm 5,0\%$, $21,5 \times 10^6 \pm 3,0\%$ e $42,9 \times 10^6 \pm 2,3\%$ respectivamente quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). Para a anfotericina B ($4\mu\text{g/mL}$), utilizada como controle positivo foi observado um aumento do percentual de células com baixo potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$) $39,7 \times 10^6 \pm 3,7\%$ quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Figura 13-Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em cepa de *C. albicans* resistente ao FLC tratadas com etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação



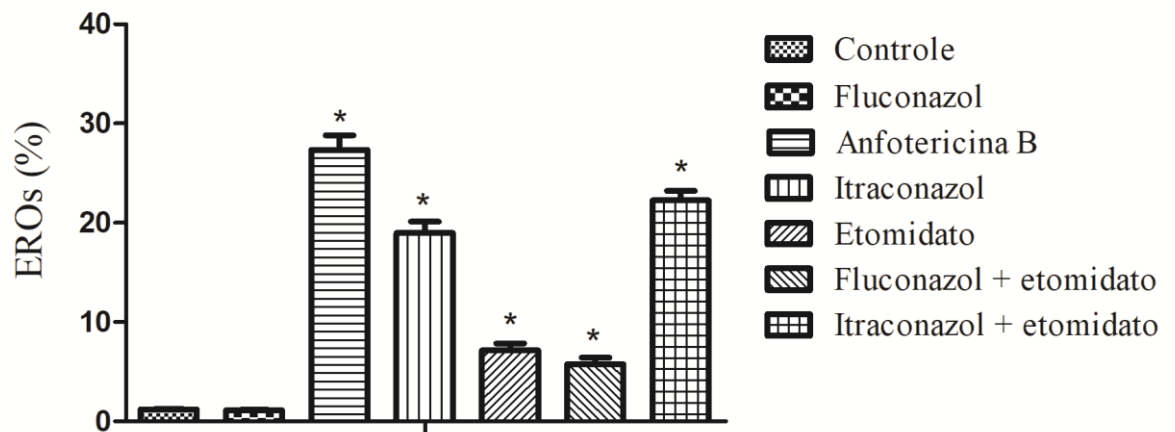
As células foram tratadas com ETO (CIM= 125 $\mu\text{g/ml}$), FLC (CIM=16 $\mu\text{g/mL}$), ITRA (CIM= 0,25 $\mu\text{g/ml}$), ETO+FLC (CIM=62,5/8 $\mu\text{g/ml}$), ETO+ITRA (CIM = 15,6/0,0312 $\mu\text{g/ml}$), AMB (CIM= 4 $\mu\text{g/mL}$; controle de morte), and RPMI (controle negativo) e depois de 24 horas, corados com rodamina 123 e analisado por citometria de fluxo. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.4.3 Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células de *C. albicans* após exposição ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação

Para investigar a geração de espécies reativas de oxigênio com os tratamentos propostos foi utilizado o corante DCFH2DA. De acordo com a figura 14, as células de *C. albicans* tratadas com fluconazol ($16\mu\text{g/mL}$) ($1,22 \times 10^6 \pm 0,05$) não apresentaram alteração

na produção de EROS quando comparadas ao controle ($1,20 \times 10^6 \pm 0,09$). Já os tratamentos itraconazol ($0,25\mu\text{g/mL}$), etomidato ($125\mu\text{g/mL}$), etomidato + fluconazol ($31,25 + 4 \mu\text{g/mL}$) e etomidato + itraconazol ($15,6+0,0312 \mu\text{g/mL}$) foram capazes de aumentar significativamente a produção de EROS ($p<0,05$), $18,9 \times 10^6 \pm 2,7\%$, $7,1 \times 10^6 \pm 1,7\%$, $5,7 \times 10^6 \pm 1,6\%$, $22,2 \times 10^6 \pm 2,3\%$ respectivamente, quando comparadas ao controle ($p<0,05$). Para a anfotericina B ($4\mu\text{g/mL}$), utilizada como controle positivo foi observado um aumento da produção de EROs $27,3 \times 10^6 \pm 3,6\%$ quando comparado ao controle ($P<0,05$).

Figura 14-Avaliação da produção de EROs em *C. albicans* resistente ao fluconazol.



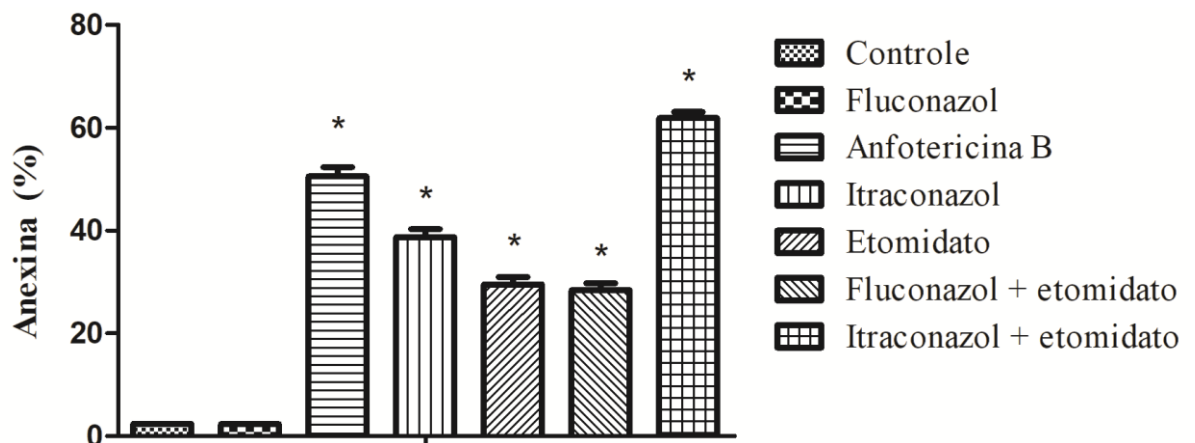
Células foram tratadas com ETO (CIM= $125 \mu\text{g/ml}$), FLC (CIM= $16 \mu\text{g/mL}$), ITRA (CIM= $0,25 \mu\text{g/ml}$), ETO+FLC (CIM = $31,25/4 \mu\text{g/ml}$), ETO+ITRA (CIM= $15,6/0,0312 \mu\text{g/ml}$), AMB (CIM= $4 \mu\text{g/mL}$; controle de morte) e RPMI (controle negativo) por 24 horas. * $p<0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.4.4 Externalização de fosfatidilserina (PS) em células de *C. albicans* após exposição ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação

Células de *C. albicans* foram tratadas com anexina V, proteína com alta afinidade por PS, com o intuito de avaliar a porcentagem de células com PS externalizado sobre a superfície da membrana celular. De acordo com a figura 15, as células de *C. albicans* expostas ao fluconazol ($16 \mu\text{g/mL}$) ($2,34 \times 10^6 \pm 0,18\%$) não apresentaram aumento na frequência de células com PS externalizado quando comparadas ao controle ($2,4 \times 10^6 \pm 0,10\%$). Para os outros tratamentos, itraconazol ($0,25\mu\text{g/mL}$), etomidato ($125\mu\text{g/mL}$), etomidato + fluconazol

(31,25 + 4 µg/mL) e etomidato + itraconazol (15,6+0,0312) µg/mL, todos provocaram um aumento da frequência de células com PS externalizado quando comparados ao controle. Os resultados obtidos foram, respectivamente, $38,7 \times 10^6 \pm 3,8\%$, $29,5 \times 10^6 \pm 3,5\%$, $28,4 \times 10^6 \pm 3,2\%$, $61,8 \times 10^6 \pm 3,0\%$, com $p < 0,05$. Para a anfotericina B (4µg/mL), usada como controle positivo, o percentual de células com PS externalizado foi de $50,5 \times 10^6 \pm 4,4\%$.

Figura 15-Externalização de fosfatidilserina em *C. albicans* resistentes ao fluconazol após exposição ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação.



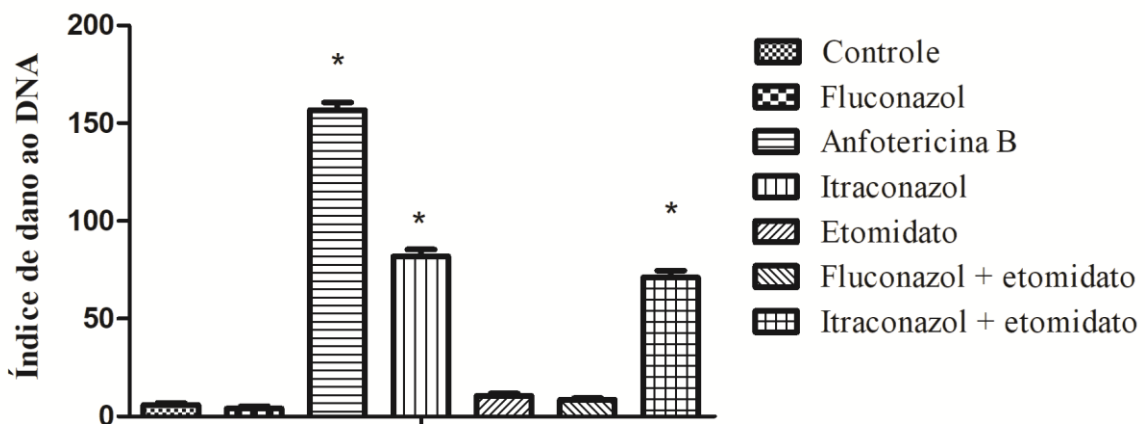
As células foram tratadas com ETO (CIM= 125 µg/ml), FLC (CIM=16 µg/mL), ITRA (CIM= 0,25 µg/ml), ETO+FLC (CIM=31,5/4 µg/ml), ETO+ITRA (CIM=15,6/0,0312 µg/ml), AMB (CIM= 4 µg/mL; controle positivo), e RPMI (controle negativo) and corado com Annexin V-FITC e analisado por citometria de fluxo. .* $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.4.5 Avaliação de danos ao DNA de células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol expostas ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação

O ensaio do cometa na versão alcalina foi utilizado para verificar a ocorrência de quebras no DNA em *C. albicans*. De acordo com a figura 16, as células de *C. albicans* tratadas com fluconazol (16 µg/mL) ($4,0 \times 10^6 \pm 3,1\%$) não apresentaram uma redução significativa no número de células com fragmentação no DNA em comparação com o grupo controle ($5,8 \times 10^6 \pm 2,6$) ($p < 0,05$). O mesmo comportamento foi observado para os tratamentos com etomidato (125 µg/mL) e etomidato+ fluconazol (31,25 + 4 µg/mL), respectivamente $10,5 \times 10^6 \pm 3,1\%$ e $8,5 \times 10^6 \pm 2,4\%$, nos quais não foram observadas

reduções significativas no número de células com fragmentação no DNA quando comparadas ao controle. Contudo, itraconazol (0,25µg/mL) e etomidato+ itraconazol (15,6+0,0312 µg/mL) provocaram um aumento significativo no número de células com fragmentação de DNA, respectivamente $81,8 \times 10^6 \pm 8,9\%$ e $71 \times 10^6 \pm 8,8\%$, quando comparadas ao controle. Para a anfotericina B (4µg/mL), usada como controle positivo, o percentual de células com fragmentação de DNA foi de $156,8 \times 10^6 \pm 9,0\%$.

Figura 16-Avaliação do índice de dano ao DNA em *C. albicans* resistentes ao fluconazol após exposição ao etomidato, fluconazol e itraconazol isolados e em associação.

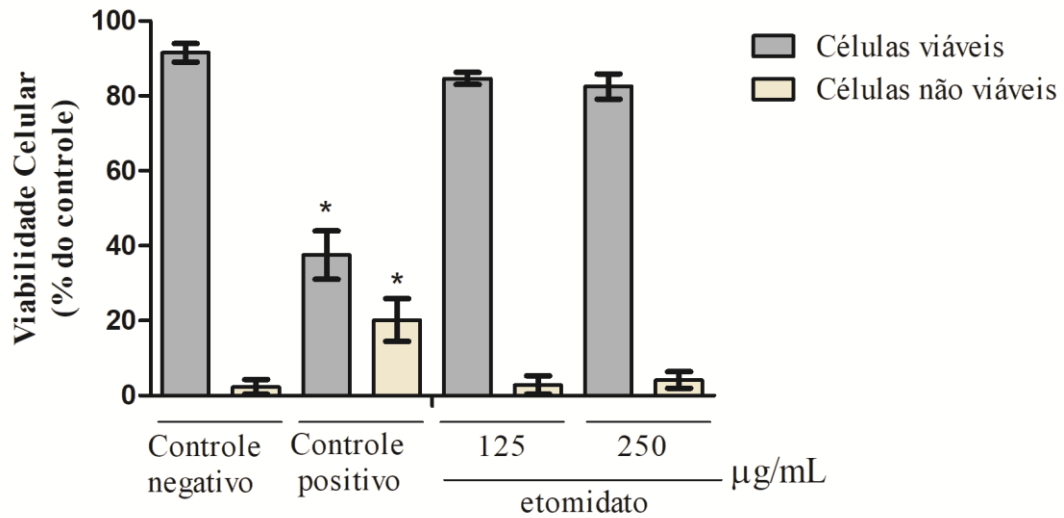


Células foram tratadas ETO (CIM= 125 µg/ml), FLC (CIM=16 µg/mL), ITRA (CIM= 0,25 µg/ml), ETO+FLC (CIM=62,5/8 µg/ml), ETO+ITRA (CIM=15,6/0,0312 µg/ml), AMB (CIM= 4 µg/mL; controle positivo) and RPMI (controle negativo) por 24 horas. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.5 Avaliação da citotoxicidade do etomidato frente a células V79

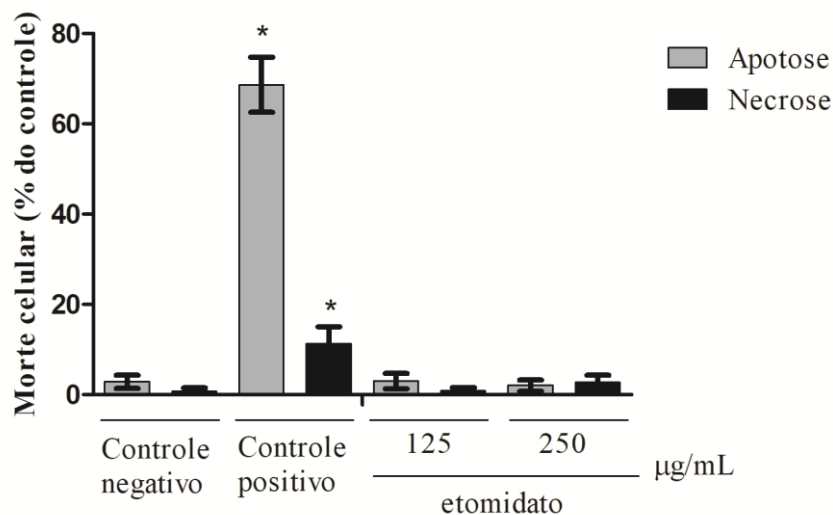
Fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79) foram tratados com 125 e 250 µg/mL de etomidato por 24 horas e analisados por duas metodologias diferentes: o azul de Tripam e laranja de acridina/ brometo de etídio. Não foi observado alteração na viabilidade celular na maior concentração testada (Figura 17). A doxorubicina, utilizada como controle positivo, foi capaz de reduzir a viabilidade das células V79. As células coradas e tratadas com laranja de acridina/brometo de etídio não apresentaram morfologia de células apoptóticas (figura 18).

Figura 17- Efeito do etomidato na proliferação de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79).



A inibição da proliferação de células foi determinada usando o método de exclusão com azul de tripan após 24 horas de incubação. O controle negativo foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) no qual a substância foi diluída. Doxorrubicina foi usada como controle positivo. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M) em três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls

Figura 18- Efeito do etomidato na viabilidade celular de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79).



A viabilidade celular (células viáveis-barra branca; células apoptóticas-barra cinza e células necróticas-barra preta) foram determinadas por microscopia de fluorescência usando laranja de acridina/ brometo de etídio após 24 horas de incubação. O controle negativo foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) no qual a substância foi

diluída. Amsacridina (m-AMSA, 0,3 mg/mL) foi utilizada como controle positivo. Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M) em três experimentos independentes realizados em duplicata.* $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

7. DISCUSSÃO

Devido à atual situação epidemiológica da candidíase, a problemática da resistência e a dificuldade no tratamento, principalmente contra infecções causadas por microrganismos resistentes, esforços têm sido lançados para obter diferentes estratégias terapêuticas, e nesse contexto, surge o reposicionamento de fármacos e as técnicas de docagem molecular (KIOSHIMA et al., 2019). Essas estratégias buscam reduzir custos e tempo na produção de novas alternativas farmacológicas quando comparadas às metodologias tradicionais.

O reposicionamento de drogas se beneficia do uso de medicamentos clínicos já aprovados para sua aplicação contra novas patologias, poupando a maior parte do tempo e os custos necessários para o desenvolvimento de novos medicamentos. 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;; ANDRADE-NETO et al., 2020) Uma variedade de compostos, tais como antiarrítmicos, antiparasitários, β -bloqueadores, imunossupressores, antidepressivos antipsicóticos, anestésicos que são relacionados ao tratamento de doenças com etiologia não infecciosa, tem demonstrado atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias e outros microorganismos (GUO et al., 2008; KRUSZEWSKA et al., 2010; DA SILVA, et al., 2013; ROSE et al., 2017; MINAEI et al., 2018; ANDRADE-NETO et al., 2019; ANDRADE-NETO et al., 2020). Outra vertente, também tem sido amplamente investigada, o avanço nas técnicas e hardware de computadores por métodos *in silico* que permitem acelerar a identificação e otimização de possíveis moléculas para alvos específicos (KIOSHIMA et al., 2019).

No presente trabalho, nossos resultados mostraram a atividade do etomidato isolado e associado com azólicos, fluconazol e itraconazol, frente a isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, tanto em sua forma planctônica como em biofilme. A atividade do etomidato frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol ainda não foi relatado na literatura. De acordo com a *Antifungal Synergistic Drug Combination Database* (ASDCD) não há relatos de trabalhos anteriores que demonstrem o efeito sinérgico do etomidato com compostos azólicos (CHEN et al., 2014). Porém, outros anestésicos, como midazolam, propofol, tiopental, cetamina, lidocaína tem demonstrado atividade em diversos microrganismos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Acinetobacter Baumannii*, *E. coli* ESBL e *Candida* spp. (BEGEC et al., 2006; PINA-VAZ et al., 2000; RAZAVI et al., 2019; ANDRADE-NETO et al., 2020).

Keleş e colaboradores (2006) observaram que o midazolam reduziu a viabilidade celular de *S. aureus* em 30, 60, 120 e 240 min, essa redução foi de até 10 vezes em 60 min e 100 vezes menor em 240 min. Midazolam também foi ativo contra *E. coli* e *E. coli* ESBL reduzindo o número de células em até 100 vezes após 60 minutos. *P. aeruginosa* e *A. baumannii* foram eliminadas após 30 minutos de exposição ao midazolam.

Begeg e colaboradores (2008) demonstraram a atividade antimicrobiana da cetamina isolada e associada ao propofol *in vitro* frente a *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. A cetamina apresentou CIM de 312,5 µg/mL, 19,5 µg/mL; 312,5 µg/mL e 156 µg/mL respectivamente. Quando associada ao propofol, os CIMs apresentaram-se mais altos, variando de 625 a 1250 µg/mL, além de não ter apresentado atividade frente a *S. aureus*. Em 2008, também, Gocmen e colaboradores publicaram estudo *in vitro* mostrando que cetamina tinha atividade antimicrobiana contra algumas espécies *Streptococos*, *Estafilococos*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, em concentrações entre 500-2.000 µg/mL.

O etomidato é um anestésico não barbitúrico, intravenoso, com potente efeito sedativo e hipnótico, sem ação analgésica e que possui ação em doses que variam de 0,1 a 0,4 mg / kg de injeção intravenosa (GOODMAN e GILMAN, 2012). Nossos resultados mostraram atividade do anestésico frente a espécies de *Candida* com CIMs que variaram de 125 a 250 µg/mL, concentrações cerca de 56 vezes menor que a dose necessária para se atingir os efeitos tradicionais do anestésico considerando um adulto de 70 kg. O etomidato apresenta alto índice terapêutico quando comparado a outros anestésicos, a dose letal é cerca de 30 vezes maior do que a dose terapêutica, tornando-o um agente extremamente seguro (ZED et al., 2006).

Em relação a sua estrutura química, o etomidato é um derivado imidazólico (FORMAN, 2011) assim como os azólicos utilizados em nosso estudo, fluconazol e itraconazol. A presença do anel imidazólico em compostos bioativos tem sido reconhecida como fator importante para a promoção de suas atividades. Para compostos contendo o anel imidazólico já foram descritas as atividades: anti-inflamatória (CUADRADO-BERROCAL et al., 2015), anti-hipertensiva (NAVARRETE-VÁZQUEZ et al., 2010), antineoplásica (BELLINA et al., 2015), antifúngica (HEERES et al., 1979), antibacteriana (GEORGE et al., 1982), anti-helmíntica (KHARB et al., 2012), anti-úlceras (YAMMAMOTO et al., 1984,

antiviral (ZHU et al., 2000) e antitripanossômica (KEMMERLING et al., 2014). É provável que a atividade antifúngica apresentada pelo etomidato seja devido a essa semelhança estrutural. Outra relação interessante entre os azólicos e o etomidato, é o fato do etomidato inibir a enzima 11- β -hidroxilase, envolvida na síntese de esteróis nas supra-renais (ATUCHA, et al., 2009), assim como os azólicos que inibem a 14 α -demetilase alterando a produção de esteroides na membrana fúngica.

Outro achado interessante em nosso trabalho foi o sinergismo apresentado pelo etomidato com azólicos, fluconazol e itraconazol. Muitos autores têm citado a combinação de azólicos com fármacos de outras classes farmacológicas como uma alternativa para superar a resistência aos antifúngicos (DA SILVA, et al., 2013; LIU, et al., 2016; SUN et al., 2018; ANDRADE-NETO et al., 202). Liu e colaboradres (2016) relataram um efeito sinérgico de fluconazol e bloqueadores dos canais de cálcio em cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol. SUN e colaboradores (2018) demonstraram o sinergismo da dexametasona em combinação com fluconazol contra *C. albicans* resistente ao fluconazol. Em estudos realizados por Sharifzadeh e colaboradores (2017) foi demonstrado interações sinérgicas entre mentol / itraconazol e mentol / nistatina. Nossos resultados mostraram uma interação sinérgica mais proeminente entre o etomidato e o itraconazol do que com o etomidato e o fluconazol. Outros trabalhos também tem demonstrado uma frequência maior da interação sinérgica com o itraconazol do que com o fluconazol (ANDRADE-NETO et al., 2020; WANG et al., 2018; DENARDI et al., 2015).

A formação de biofilme é um importante fator de virulência determinante na infecção por espécies do gênero *Candida* (UPPULURI et al., 2010). Nossos dados mostraram que o etomidato isolado e associado aos azólicos, fluconazol e itraconazol, foi capaz de inibir a formação de biofilme. Até o presente momento, não existem relatos na literatura da atividade do etomidato frente a biofilmes. A atividade de outro anestésico, cetamina, foi recentemente descrita por Andrade-Neto e colaboradores (2020) frente a biofilmes de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, demonstrando também sua atividade sinérgica com os azólicos, fluconazol e itraconazol, corroborando com os achados do presente estudo. Kathwate & karuppayil (2016), também avaliaram a propriedade antifúngica de anestésicos, e observou que o tramadol foi capaz de inibir a formação de biofilmes em concentrações próximas de 8 mg/mL.

Os antimicrobianos são, geralmente, menos eficazes ou, em alguns casos, até mesmo ineficazes frente aos biofilmes. Do ponto de vista clínico, uma das características mais preocupantes dos biofilmes é sua capacidade de resistir a níveis mais altos de medicamentos antifúngicos em comparação com as células planctônicas. (MORSCHHÄUSER, 2010; LI et al. 2018). O etomidato apresentou atividade frente aos biofilmes de *Candida* spp. na faixa de concentração de 500 a 1250 µg/mL, concentração apenas 3 vezes maior que a CIM para células planctônicas. Para a associação com os azólicos, essas concentrações foram ainda menores, reforçando a importância do etomidato como um possível coadjuvante nos tratamentos das candidemias.

A capacidade de adesão e produção de biofilme por *Candida* spp. está entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de candidíase invasiva (KULLBERG et al. 2015). A família de genes ALS presente em *C. albicans* codifica proteínas da superfície celular que têm a função de adesão (HOYER E COTA 2016). A presença de ALS3 está intimamente associada à capacidade de *C. albicans* aderir a várias superfícies, bem como formar biofilmes.

O etomidato mostrou atividade promissora contra os biofilmes de *Candida* e foi acoplado à mesma região do ligante complexo ALS3 (hepta-treonina), já o fluconazol, que não possui atividade frente a biofilmes, estava apenas próximo à hepta-treonina. Além disso, o etomidato esteve muito próximo dos resíduos da tríade catalítica (Ser170) e do resíduo de aminoácido com papel de adesão (Lys59), enquanto o fluconazol apresentou maiores distâncias de todos esses resíduos. Nossos dados corroboram aos encontrados por Nadaf e colaboradores (2019), que demonstraram a ligação a Lys59 de oito compostos extraídos de *Hymenocallis littoralis* com atividade contra biofilmes de *C. albicans*. Kioshima e colaboradores 2019 demonstraram atividade antibiofilme de 24 compostos contra *C. albicans*, e os cinco compostos que apresentaram a melhor atividade *in vitro* contra biofilmes também mostraram as melhores interações com Lys59 por meio de acoplamento molecular. Essa ligação de Lys59 com etomidato poderia possivelmente inibir o processo de adesão e a formação de biofilmes em *C. albicans*.

Técnicas de docagem molecular têm sido usadas para acelerar o processo de desenvolvimento de medicamentos, focados nas proteínas essenciais ou importantes na patogenicidade de agentes infecciosos (RODRIGUES VENDRAMINI et al. 2019; ROZADA

et al. 2019; KIOSHIMA et al., 2019). Nesse contexto, as proteínas envolvidas no estabelecimento da infecção por *C. albicans*, como fatores de virulência associados à capacidade de adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro, são promissoras. Nossos resultados mostraram, através de técnicas de ancoragem, que o etomidato se liga a resíduos importantes da proteína ALS3, e esses achados foram corroborados com os resultados encontrados nos testes antimicrobianos *in vitro*.

Importante analisado no nosso estudo relacionado à adesão foi a redução das manoproteínas da parede celular de *C. albicans* tratadas com etomidato. As manoproteínas da parede celular de *C. albicans* desempenham um papel importante na adesão celular do hospedeiro, portanto são importantes fatores de virulência na formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas (MODRZEWSKA et al., 2015). Rio e colaboradores (2019) demonstraram resultados semelhantes aos nossos, onde a lecitina *Helianthus annuus* foi capaz de inibir biofilme e interagir com manoproteínas de *C. albicans*. Essas substâncias que podem afetar o potencial de *C. albicans* em promover patogênese, diminuir a expressão ou atividade de glicoconjugados podem ser consideradas alvos farmacológicos extremamente relevantes (MORAES et al., 2018).

A fim de elucidar os possíveis mecanismos de ação do etomidato, foram realizados testes de viabilidade celular, alteração do potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio, danos no DNA e externalização de fosfatidilserina. O teste do Iodeto de Propídeo (PI) é utilizado para avaliar a integridade da membrana celular, sendo capaz de marcar com fluorescência células com dano de membrana (CARMONAGUTIERREZ et al., 2018). Nossos resultados mostraram que células de *C. albicans* tratadas com etomidato isolado e associado aos azólicos, fluconazol e itraconazol, foram marcadas com PI quando comparadas ao controle, demonstrando que ocorreu algum dano na estrutura da membrana celular, já que o PI é um marcador hidrofílico e só consegue penetrar em células com algum tipo de dano. Wang e colaboradores (2016) encontraram resultados semelhantes quando trataram células Eahy926 endoteliais com etomidato, observando uma redução significativa na viabilidade celular. Anestésicos locais, bem como outras moléculas lipofílicas, podem promover danos na membrana e demonstram atividade antifúngica (PINA-VAZ et al., 2000). Da mesma forma que a anfotericina B (BEGGS, 1994),

azóis lipofílicos (SUD e FEINGOLD, 1981) butenafina (IWATANI et al., 1993) e fenotiazinas (WOOD e NUGENT, 1985).

A função mitocondrial é reduzida pela despolarização e desenergização das mitocôndrias (EMAUS e GRUNWALD, 1986). Essa falha no potencial transmembranar mitocondrial pode gerar fatores pró-apoptóticos no citosol, levando à morte da célula (A. NETO et al., 2014). Nossos dados mostraram que células de *C. albicans* tratadas com etomidato isolado e associado aos azólicos, fluconazol e itraconazol, alteraram o potencial transmembranar mitocondrial quando comparadas aos controles. Essa alteração foi ainda mais exacerbada nas associações com os azólicos do que com o etomidato isoladamente. Chen e colaboradores (2018) demonstraram que o tratamento com etomidato, também, levou à perda do potencial da membrana mitocondrial em células de tumor cerebral N2a. Além disso, as mitocôndrias atuam como um canal de energia necessário para muitos processos celulares, incluindo a biossíntese de ergosterol, esse alvo poderia ser responsável pelo sinergismo de medicamentos específicos com triazóis (SUN et al., 2013).

As espécies reativas de oxigênio atuam como transdutores de sinal, acumulam-se no interior da célula na forma de peróxido de hidrogênio, radicais superóxidos e hidroxilas. Essas moléculas são consideradas reguladores essenciais do envelhecimento e têm sido relatadas como elementos importantes no processo de apoptose fúngica (DA SILVA et al., 2013; ANDRADE-NETO, et al., 2018). No presente trabalho, as células de *C. albicans* tratadas com etomidato isolado e associado aos azólicos, fluconazol e itraconazol, apresentaram níveis aumentados de EROS quando comparadas ao controle. Nossos dados corroboram com os achados de CHEN e colaboradores (2018) e Wang e colaboradores (2014), que demonstraram a capacidade do etomidato de gerar EROS em células de tumor cerebral N2a e nas células Eahy926 endoteliais humanas.

Nas fases iniciais do processo apoptótico, ocorre redistribuição de fosfolipídios na membrana plasmática resultando na exposição de fosfatidilserina (PS) na superfície externa da membrana celular (MARTIM et al., 1995). As células de *C. albicans* tratadas com etomidato isolado e associado aos azólicos, fluconazol e itraconazol, demonstraram um aumento na externalização de PS, que reforça a participação da via apoptótica no processo de morte celular. A capacidade do etomidato em desencadear apoptose foi descrita em um estudo recente de Chen e colaboradores (2018), em que o etomidato induziu apoptose em células N2a

de maneira dependente da concentração. Além disso, estudos mostraram que o etomidato produz proteínas pró-apoptóticas em células eucarióticas, como Fas, citocromo c, AIF, Endo G, polimerase ADP-ribose (PARP), PARP clivada, caspase-9 e procaspase-3 (SUN et al., 2013; WU et al., 2011).

Em decorrência dos achados microbiológicos, houve a necessidade de se avaliar a toxicidade do etomidato. Para isso, foram realizados os testes de azul de tripan e laranja de acridina. Em ambos os testes não foi verificada alteração na viabilidade celular até a maior concentração utilizada nos experimentos microbiológicos. A baixa citotoxicidade do etomidato foi demonstrada em células de adenocarcinoma de pulmão A549 humano (CHU et al., 2019). Além disso, Harman e colaboradores (2012) demonstraram a atividade neuroprotetora do etomidato no cérebro de ratos fetais em um modelo de isquemia-reperfusão.

Em relação aos danos de DNA, as células de *C. albicans* tratadas com etomidato e etomidato associado ao fluconazol não apresentaram dano, apenas a associação do etomidato com itraconazol apresentou alteração, esses danos provavelmente se devem ao itraconazol presente na associação. Não existem relatos na literatura sobre a ocorrência de danos no DNA causado pelo etomidato.

Diante dos promissores achados microbiológicos encontrados no presente trabalho, poderia se vislumbrar uma outra aplicação para o etomidato. O uso tópico do anestésico isolado e associado aos antifúngicos testados nos tratamentos de candidíase vulvovaginal poderia ser uma aplicação completamente viável, visto que a concentração utilizada do anestésico seria inferior às necessárias para se obter os efeitos tradicionais do fármaco, além da aplicação tópica favorecer a não ocorrência de efeitos sistêmicos. Estudos com outro anestésico já corroboram esse fato, Lynch et al. (2005) submeteram 21 pacientes 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.

Assim, os resultados do presente trabalho sugerem que o etomidato poderia ser utilizado como adjuvante nos tratamentos de candidíase. Sua atividade frente aos biofilmes reforça sua aplicação nesses tratamentos, visto que, clinicamente, a formação de biofilmes está diretamente relacionada com a resistência apresentada por cepas de *Candida* spp.. Em relação ao mecanismo de ação pelo qual o etomidato age frente a *C. albicans* mais estudos

precisam ser realizados. Pois, apesar de ter ocorrido alteração na permeabilidade da membrana, produção de espécies reativas de oxigênio, alterações no potencial de membrana mitocondrial e exposição de fosfatidilserina, não se pode afirmar qual evento ocorreu primeiro. Podemos concluir, apenas, que processos iniciais de apoptose foram ativados, não sendo possível afirmar se o dano em membrana foi provocado diretamente pelo etomidato, ou se, esse dano foi gerado em consequência da apoptose.

8. CONCLUSÃO

- Etomidato apresentou atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol isolado e associado ao fluconazol e itraconazol.
- Etomidato apresentou atividade antifúngica frente aos biofilmes de cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol isolado e associado ao fluconazol e itraconazol.
- Etomidato reduziu a produção de manoproteínas, importantes para adesão, na membrana celular de *C. albicans*
- Etomidato, provavelmente, é um potencial inibidor da proteína ALS3.
- Etomidato não apresentou efeito citotóxico frente a células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79).
- Etomidato isolado e associado com fluconazol e itraconazol promovem produção de espécies reativas de oxigênio, alteração do potencial mitocondrial e externalização de fosfatidilserina, gerando alterações na membrana celular e apoptose em células de *Candida albicans*.

REFERÊNCIAS

- AL-DORZI, Hasan M. et al. Invasive Candidiasis in Critically Ill Patients: a prospective cohort study in two tertiary care centers. **Journal Of Intensive Care Medicine**, v. 35, n. 6, p. 542-553, 8 abr. 2018. <http://dx.doi.org/10.1177/0885066618767835>.
- ALKHARASH, Nawaf et al. Infecção da corrente sanguínea por *Candida* : mudança no padrão de ocorrência e suscetibilidade a antifúngicos por mais de 10 anos em um hospital saudita de atendimento terciário. **Can J Infect Dis Med Microbiol**, p. 2015692, 17 dec. 2019. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/2015692>.
- A. NETO, João B. et al. Antifungal Activity of Naphthoquinoidal Compounds In Vitro against Fluconazole-Resistant Strains of Different *Candida* Species: a special emphasis on mechanisms of action on candida tropicalis. **Plos One**, v. 9, n. 5, p. e93698, 9 maio 2014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093698>
- ANDRADE NETO, João Batista de et al. A mechanistic approach to the in-vitro resistance modulating effects of fluoxetine against meticillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, p. 335-340, fev. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.056>
- ANDRADE NETO, João Batista de et al. Synergistic effects of ketamine and azole derivatives on *Candida* spp. resistance to fluconazole. **Future Microbiology**, v. 15, n. 3, p.177-188, 20 fev. 2020. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2019-0082>.
- AOKI W, Kitahara N et al. Perfil de propriedades adesivas da família de proteínas de sequência semelhante à aglutinina (ALS), um atributo virulento de *Candida albicans* . **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 65, n.1, p. 121–124, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00941.x>
- AKINS, Robert A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 43, n. 4, p.285-318, jan 2005. <http://dx.doi.org/10.1080/13693780500138971>.
- ATUCHA, Erika et al. Structure–activity relationship of etomidate derivatives at the GABAA receptor: comparison with binding to 11 β -hydroxylase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 15, p. 4284-4287, ago. 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.05.065>.
- AYDIN, O. N. et al. Antimicrobial activity of ropivacaine and other local anaesthetics. **European Journal Of Anaesthesiology**, v. 18, n. 10, p. 687-694, out. 2001. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2346.2001.00900.x>.
- BASSETTI, Matteo et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **Bmc Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 21, 10 fev. 2006. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-6-21>.

BEGEC, Zekine et al. Efeitos antimicrobianos de cetamina em combinação com propofol: um estudo in vitro. **Brazilian Journal Of Anesthesiology**, v. 63, n. 6, p. 461-465, nov. 2013.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjan.2012.09.003>.

BEGGS, W H. Physicochemical cell damage in relation to lethal amphotericin B action. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 38, n. 2, p.363-364, fev. 1994.

<http://dx.doi.org/10.1128/aac.38.2.363>.

BELLINA, F et al. Imidazole analogues as resveratrol: synthesis and cancer cell growth evaluation. **Tetrahedron**. v. 71, p. 2298-2305. 2015.

BORIOLLO, Marcelo Fabiano Gomes. Análise da diversidade genética de amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças saudáveis por eletroforese de enzima multiloco. 2004. 195 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, SP. Disponível em:

<<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/289362>>. Acesso em: 15 fev. 2020.

BRAUN, B. R.. NRG1, a repressor of filamentous growth in *C.albicans*, is down-regulated during filament induction. **The Embo Journal**, v. 20, n. 17, p. 4753-4761, 3 set. 2001.

<http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.17.4753>.

BRILHANTE, Raimunda Sâmia Nogueira et al. *Candida tropicalis* from veterinary and human sources shows similar in vitro hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*. **Veterinary Microbiology**, v. 192, p. 213-219, ago. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.07.022>.

CABAN, Monika et al. Principles of a New Protocol for Prediction of Azole Resistance in *Candida albicans* Infections on the Basis of ERG11 Polymorphisms. **Current Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 172-182, 23 abr. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-016-1039-3>.

CANELA, Heliara Maria Spina et al. 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, jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/myc.12695>.

CASTANHEIRA, Mariana et al. Monitoring Antifungal Resistance in a Global Collection of Invasive Yeasts and Molds: Application of CLSI Epidemiological Cutoff Values and Whole-Genome Sequencing Analysis for Detection of Azole Resistance in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 61, n. 10, p.e00906-17, 22 set. 2017. <http://dx.doi.org/10.1128 / AAC.00906-17>.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev. Esp. Quimioter**.v. 19, n. 2, p. 130–139, jun. 2006.

CHANDRA, Jyotsna et al. *Candida* Biofilms: development, architecture, and resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 4, p. 2-2, 6 ago. 2015.

<http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0020-2015>.

CHANDRASEKAR, P.. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 457-465, 14 dez. 2010.

<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq479>.

CHEN, Hong-Tao et al. Anesthetic agent etomidate induces apoptosis in N2a brain tumor cell line. *Molecular Medicine Reports*, p. 3137-3142, 19 jul. 2018.

<http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2018.9298>.

CHU, Chin-Nan et al. Etomidate Suppresses Invasion and Migration of Human A549 Lung Adenocarcinoma Cells. *Anticancer Research*, v. 39, n. 1, p. 215-223, 27 dez. 2018.

<http://dx.doi.org/10.21873/anticancer.13100>.

CORSELLO, Salvatore et al. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology*, v. 110, n. 1, p.66-72, 10 set. 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-2115\(03\)00096-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-2115(03)00096-4).

COLOMBO, Arnaldo Lopes et al. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 5, p. 599-607, out. 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822003000500010>.

COLOMBO, Arnaldo Lopes et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive Care Medicine*, v. 40, n. 10, p.1489-1498, out. 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-014-3400-y>.

COSTA-DE-OLIVEIRA, Sofia et al. *Candida albicans* Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: the triad yeast-host-antifungal. *Microorganisms*, v. 8, n. 2, p. 154, 22 jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8020154>.

CUADRADO-BERROCAL, I et al. Biological evaluation of angular disubstituted naphthoimidazoles as anti-inflammatory agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 25, p. 4210-4213. 2015

DELARZE, Eric; SANGLARD, Dominique. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. *Drug Resistance Updates*, v. 23, p. 12-19, nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2015.10.001>

DENARDI, Laura Bedin et al. Synergistic effects of tacrolimus and azole antifungal compounds in fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida glabrata* isolates. *Brazilian Journal Of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 125-129, maio 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-838246120120442>.

DOMINGUEZ, E et al. Conservação e divergência na estrutura, função e controle genético do complexo manano-glucano da matriz de biofilme da espécie *Candida*. *MBio*, v. 9, p. e00451-18, 2018.

DOMINGUEZ, EG et al. Papel conservado para polissacarídeos da matriz de biofilme na resistência a drogas de *Candida auris*. *MSphere*, v.4, p. e00680-18, 2019.

DIGNANI, MC et al. *Candida*. In: Anaissie, EJ, Mcginnis, MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. 2nd ed., Amsterdam: 2009.

- DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p.155-166, abr. 2002. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.15.2.155-166.2002>.
- ELIAS, Sivan; BANIN, Ehud. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. **Fems Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p.990-1004, set. 2012. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x>.
- EMAUS, Ronald K. et al. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 850, n. 3, p. 436-448, jul. 1986. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2728\(86\)90112-x](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2728(86)90112-x)
- ERLICH, H. Bacteriologic solutions and effects of anesthetic solutions on bronchial secretions during bronchoscopy. **Am Rev Respir Dis**, v. 84,p. 414–421, set. 1961. [http://dx. doi: 10.1164 / arrd.1961.84.3.414](http://dx.doi: 10.1164 / arrd.1961.84.3.414).
- ESPINEL-INGROFF, A. et al. Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for the Triazoles and Six *Aspergillus* spp. for the CLSI Broth Microdilution Method (M38-A2 Document). **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3251-3257, 30 jun. 2010. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00536-10>.
- FAVERO, Daniel et al. Hemolytic Factor Production by Clinical Isolates of *Candida* Species. **Current Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 161-166, 19 set. 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-013-0459-6>.
- FERREIRA, Leonardo et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p.13384-13421, 22 jul. 2015. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- FORMAN, Stuart A.. Clinical and Molecular Pharmacology of Etomidate. **Anesthesiology**, v. 114, n. 3, p. 695-707, mar. 2011. <http://dx.doi.org/10.1097/aln.0b013e3181ff72b5>.
- GARCIA-EFFRON, Guillermo et al. Correlating Echinocandin MIC and Kinetic Inhibition of fks1 Mutant Glucan Synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 112-122, 27 out. 2008. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01162-08>.
- GEORGE, WL et al .Intravenous Metronidazole for Treatment of Infections Involving Anaerobic Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. v. 21, 3, p. 441-449. 1982. <http://dx. doi: 10.1128 / aac.21.3.441>.
- GAMARRA, Soledad et al. Molecular tools for cryptic *Candida* species identification with applications in a clinical laboratory. **Biochemistry And Molecular Biology Education**, v. 41, n. 3, p. 180-186, 27 abr. 2013. <http://dx.doi.org/10.1002/bmb.20692>.
- GIOLO, Muriel Padovani et al. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, jun. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442010000300009>.

GOCMEN, Sedef et al. *In Vitro* Investigation of the Antibacterial Effect of Ketamine. **Upsala Journal Of Medical Sciences**, v. 113, n. 1, p. 39-46, jan. 2008.

<http://dx.doi.org/10.3109/2000-1967-211>.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

GONÇALVES, Sarah Santos et al. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. **Mycoses**, v. 59, n. 4, p.198-219, abr. 2016.

<http://dx.doi.org/10.1111/myc.12469>.

GØTZSCHE, Peter C et al. Nystatin prophylaxis and treatment in severely immunodepressed patients. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, p.CD002033, 21 out. 2002. John Wiley & Sons, Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd002033>.

GROOT, Piet W. J. de et al. Adhesins in Human Fungal Pathogens: glue with plenty of stick. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 4, p. 470-481, 8 fev. 2013. <http://dx.doi.org/10.1128/ec.00364-12>.

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

HANWELL, Marcus D et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal Of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p.17-17, 13 ago. 2012. <http://dx.doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.

HARMAN, Ferhat et al. Neuroprotective effects of propofol, thiopental, etomidate, and midazolam in fetal rat brain in ischemia-reperfusion model. **Child's Nervous System**, v. 28, n. 7, p.1055-1062, jul. 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00381-012-1782-0>.

HEERES, J et al. Part 4. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole , a new potent orally active broad spectrum antifungal agent. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 22, p. 1003-1005. ago.1979. [http://dx. doi: 10.1021 / jm00194a023](http://dx.doi: 10.1021 / jm00194a023)

HOUANG, ETS et al. Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. **J Clin Pathol**, v.50, p. 563-565, jul. 1997. <http://dx.doi: 10.1136 / jcp.50.7.563>.

HOYER, Lois L. The ALS gene family of *Candida albicans*. **Trends In Microbiology**, v. 9, n. 4, p.176-180, abr. 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)01984-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x(01)01984-9).

HOYER, Lois L.; COTA, Ernesto. *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p.280-280, 15 mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00280>.

HOLMES, Ann R *et al*. Targeting efflux pumps to overcome antifungal drug resistance. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1485-1501, ago. 2016. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc-2016-0050>.

HOLMES, Ann R. *et al*. ABC Transporter Cdr1p Contributes More than Cdr2p Does to Fluconazole Efflux in Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Clinical

Isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 3851-3862, 18 ago. 2008. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00463-08>

HOSSEINI, Seyededeh Sedigheh et al. Zinc Oxide Nanoparticles Inhibition of Initial Adhesion and ALS1 and ALS3 Gene Expression in *Candida albicans* Strains from Urinary Tract Infections. *Mycopathologia*, v. 184, n. 2, p. 261-271, 22 mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-019-00327-w>.

A HOWELL, et al. Oral nystatin prophylaxis and neonatal fungal infections. **Archives Of Disease In Childhood - Fetal And Neonatal Edition**, v. 94, n. 6, p. 429-433, 25 mar. 2009. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.2008.157123>.

IOANNIDIS, Konstantinos et al. Do we need to adopt antifungal stewardship programmes? **European Journal Of Hospital Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 14-18, 28 jun. 2018. <http://dx.doi.org/10.1136/ejhpharm-2017-001467>.

IWATANI, W et al. Two mechanisms of butenafine action in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 37, n. 4, p. 785-788, 1 abr. 1993. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.37.4.785>.

JOHNSON, Svena M. et al. Local Anesthetics as Antimicrobial Agents: a review. **Surgical Infections**, v. 9, n. 2, p. 205-213, abr. 2008. <http://dx.doi.org/10.1089/sur.2007.036>.

JONNESCO, T.. Remarks ON GENERAL SPINAL ANALGESIA. **Bmj**, v. 2, n. 2550, p.1396-1401, 13 nov.1909. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.2.2550.1396>.

JUNQUEIRA, Juliana C. et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 1, p. 17-24, fev. 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652012000100004>.

GOLABEK, K et al. Selected mechanisms of molecular resistance of *Candida albicans* to azole drugs. **Acta Biochim. Pol.** v.62, p.247–251, 21 abr. 2015. http://dx.doi: 10.18388/abp.2014_940

GROLL, Andreas H et al. Clinical Pharmacology of Systemic Antifungal Agents: A Comprehensive Review of Agents in Clinical Use, Current Investigational Compounds, and Putative Targets for Antifungal Drug Development. **Advances In Pharmacology**, p.343-500, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/s1054-3589\(08\)60129-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1054-3589(08)60129-5).

KAEWJIARANAI, Thanawat; et al. The efficiency of topical anesthetics as antimicrobial agents: A review of use in dentistry. **Journal Of Dental Anesthesia And Pain Medicine**, v. 18, n. 4, p.223, ago. 2018. <http://dx.doi.org/10.17245/jdapm.2018.18.4.223>.

KANAFANI, Z. A. et al. Resistance to Antifungal Agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 1 jan. 2008. <http://dx.doi.org/10.1086/524071>.

KARKOWSKA-KULETA, J; RAPALA-KOZIK, M; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochim.**v.56, n.2,p. 211–224, 18 jun. 2009.

KATHWATE, Gunderao Hanumantrao; KARUPPAYIL, S. Mohan. Tramadol, an Opioid Receptor Agonist: An Inhibitor of Growth, Morphogenesis, and Biofilm Formation in the Human Pathogen, *Candida albicans*. **Assay And Drug Development Technologies**, v. 14, n. 10, p.567-572, dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.1089/adt.2016.760>.

KATRAGKOU Aspasia et al. In vitro interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. **J Antimicrob Chemother.** v. 70, p. 470-478, fev. 2015. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku374>.

KELEŞ, G. T. et al. Comparison of antimicrobial effects of dexmedetomidine and etomidate-lipuro with those of propofol and midazolam. **European Journal Of Anaesthesiology**, v. 23, n. 12, p. 1037-1040, dez. 2006. <http://dx.doi.org/10.1017/s0265021506000949>.

KHARB, R et al. Synthesis, spectral characterization and antihelmintic evaluation of some novel imidazole bearing triazole derivatives. **Der Pharmacia Lettre.** v. 4, p. 652-657. 2012.

ZHU, Z et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Tricyclic Nucleosides (Dimensional Probes) as Analogues of Certain Antiviral Polyhalogenated Benzimidazole Ribonucleosides. **Journal of Medicinal Chemistry.** v. 43, p. 2430-2437. 2000.

KIOSHIMA, Erika Seki et al. Selection of potential anti-adhesion drugs by in silico approaches targeted to ALS3 from *Candida albicans*. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 12, p.1391-1401, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-019-02747-6>.

KILIC, Aysegul Ulu et al. Epidemiology and cost implications of candidemia, a 6-year analysis from a developing country. **Mycoses**, v. 60, n. 3, p.198-203. mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/myc.12582>.

KLEINFELD, J.; ELLIS, P. P.. Effects of Topical Anesthetics on Growth of Microorganisms. **Archives Of Ophthalmology**, v. 76, n. 5, p.712-715, nov 1966. <http://dx.doi.org/10.1001/archoph.1966.03850010714017>.

KRITIKOS, A. et al. Accuracy of Sensititre YeastOne echinocandins epidemiological cut-off values for identification of FKS mutant *Candida albicans* and *Candida glabrata*: a ten year national survey of the fungal infection network of switzerland (funginos). **Clinical Microbiology And Infection**, v. 24, n. 11, p. 1214.e1-1214.e4, nov. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2018.05.012>

KRUPPA, Michael. Quorum sensing and *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 52, n. 1, p.1-10, 18 out. 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01626.x>.

KULLBERG, Bart Jan; ARENDRUP, Maiken C.. Invasive Candidiasis. **New England Journal Of Medicine**, v. 373, n. 15, p.1445-1456, 8 out. 2015. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra1315399>.

LACAZ, C. S. et al. Tratado de micologia médica: LACAZ. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 34, 125.

- LACERDA, João F.; OLIVEIRA, Carlos Meneses. Diagnosis and Treatment of Invasive Fungal Infections Focus on Liposomal Amphotericin B. **Clinical Drug Investigation**, v. 33, n. 1, p.5-14, fev. 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s40261-012-0023-3>.
- LEENA SANKARI S et al. Meio cromogênico versus PCR-RFLP na especiação de *Candida*: um estudo comparativo. **BMC Res Notes** . v.12, n.1, p. 681, 22 out. 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-019-4710-5>.
- LEPAK, Alexander; ANDES, David. Fungal Sepsis: Optimizing Antifungal Therapy in the Critical Care Setting. **Critical Care Clinics**, v. 27, n. 1, p.123-147, jan 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2010.11.001>.
- LI, Yu-Ye et al. Asymptomatic oral yeast carriage and antifungal susceptibility profile of HIV-infected patients in Kunming, Yunnan Province of China. **Bmc Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 46, 28 jan. 2013. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-46>.
- LIN, Jing et al. The Peptide-binding Cavity Is Essential for Als3-mediated Adhesion of *Candida albicans* to Human Cells. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 289, n. 26, p.18401-18412, 27 jun. 2014. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m114.547877>.
- LI, Wei-sin et al. The Impact of Biofilm Formation on the Persistence of Candidemia. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p. 1196, 4 jun.2018. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01196>.
- LIONAKIS, Michail S.; NETEA, Mihai G.. *Candida* and Host Determinants of Susceptibility to Invasive Candidiasis. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003079, jan. 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003079>.
- LIU, Shuyuan et al. Synergistic Effect of Fluconazole and Calcium Channel Blockers against Resistant *Candida albicans*. **Plos One**, v. 11, n. 3, p.e0150859, 17 mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150859>.
- LOHSE, Matthew B et al. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p.19-31, jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>.
- LU, Cheng-wei et al. 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, p.598-601, nov. 2014. <http://dx.doi.org/10.1097/sap.0b013e318276d8e7>.
- LU, Mengjiao et al. Gentamicin synergises with azoles against drug-resistant *Candida albicans*. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 1, p.107-114, jan 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.012>.
- LYNCH, Mary Elizabeth et al. Topical Amitriptyline and Ketamine in Neuropathic Pain Syndromes: An Open-Label Study. **The Journal Of Pain**, v. 6, n. 10, p.644-649, out. 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2005.04.008>.

MAGILL, Shelley S et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. **New England Journal Of Medicine**, v. 370, n. 13, p.1198-1208, mar. 2014. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1306801>.

MATTEI, Antonella Souza et al. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p.340-342, jun. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0045-2013>.

MATTHEWS, Holly; HANISON, James; NIRMALAN, Niroshini. “Omics”-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, Challenges and Future Perspectives. **Proteomes**, v. 4, n. 3, p.28, set. 2016. <http://dx.doi.org/10.3390/proteomes4030028>.

MAUBON, Danièle et al. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now?. **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 9, p.1241-1255, set. 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-014-3404-7>.

MCGAHON, Anne J et al. The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis *in Vitro*. **Cell Death**, p.153-185, 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61929-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61929-9).

MEDRANO, Delia Jessica Astete et al. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p.17-20, mar 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652006000100004>.

MEHNDIRATTA, Man Mohan et al. Drug repositioning. **International Journal Of Epilepsy**, v. 03, n. 02, p.091-094, jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijep.2016.09.002>.

MEYER, Elisabeth et al. Antifungal use in intensive care units. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p.619-624, set. 2007. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm255>.

MINAEI, Samad et al. Propranolol efficacy as a novel adjuvant for immunization against *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Experimental Parasitology**, v. 194, p.60-66, set. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2018.09.014>.

MODRZEWSKA, Barbara.; KURNATOWSKI Piotr. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. **Ann Parasitol**. v.61, p.3-9, 2015.

MORAES, Cristyana Vieira.; ALBUQUERQUE, Luana Cardoso.; CHEVITARESE, Leila. A importância da odontogeriatria para a oferta de cuidados bucais em idosos. **Rev Rede Cuidados Saúde**. v.10, n.1 p.9, 2017.

MORAES, D. C et al. β -lapachone and α -nor-lapachone modulate *Candida albicans* viability and virulence factors. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 2, p.314-319, jun 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.03.004>.

MORSCHHÄUSER, Joachim. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genetics And Biology**, v. 47, n. 2, p.94-106, fev. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2009.08.002>.

MURCIANO C et al. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. **PLoS One**. v.7, p. e33362, 2012.

MURPHY, John T. PREPARATION, STERILIZATION, AND PRESERVATION OF OPHTHALMIC SOLUTIONS. A.m.a. **Archives Of Ophthalmology**, v. 53, n. 1, p.63, 1955. <http://dx.doi.org/10.1001/archoph.1955.00930010065006>.

NADAF, Naiem H et al; Biofilm inhibition mechanism from extract of *Hymenocallis littoralis* leaves. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 222, p.121-132, 10 ago. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.031>.

NAGLIK, Julian R. et al. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 400-428, set. 2003. <http://dx.doi.org/10.1128/membr.67.3.400-428.2003>.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Etomidate, CID=667484, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/667484> (accessed on July 27, 2020)

NAVARRETE-VÁZQUEZ, G et al. Synthesis, vasorelaxant activity and antihypertensive effect of benzo[d]imidazole derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 18, p. 3985–3991. 2010.

NEVES-JUNIOR, Athayde et al. Prevalence and Fluconazole Susceptibility Profile of *Candida* spp. Clinical Isolates in a Brazilian Tertiary Hospital in Minas Gerais, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p.1349-1359, ago. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140717>.

NEVILLE, B.; DAMM, D.; ALLEN, C.; BOUQUOT, J. Patologia oral e maxilofacial. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.

NOBILE, Clarissa J et al. Critical Role of Bcr1-Dependent Adhesins in *C. albicans* Biofilm Formation *In Vitro* and *In Vivo*. **Plos Pathogens**, v. 2, n. 7, p.e63, jul. 2006. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0020063>.

NOBILE, Clarissa J et al. Complementary Adhesin Function in *C. albicans* Biofilm Formation. **Current Biology**, v. 18, n. 14, p.1017-1024, jul. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.034>.

NUCCI, Marcio et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. e59373, 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059373>.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p.1-1, jul. 2003. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg301>.

OKEKE, C. N. et al. Quantification of *Candida albicans* Actin mRNA by the LightCycler System as a Means of Assessing Viability in a Model of Cutaneous Candidiasis. **Journal Of**

Clinical Microbiology, v. 39, n. 10, p. 3491-3494, 1 out. 2001.
<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.39.10.3491-3494.2001>.

OMOIGUI S. Sota omoigui's anesthesia drugs. 4th edition. Hawthore (CA): Stateof-the-Art-Technologies; 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Resistência antimicrobiana é ameaça global- 2019. Disponível em: <<http://www.direitoshumanos.usp.br/index.php/OMS-Organiza%C3%A7%C3%A3o-Mundial-da-Sa%C3%BAde/constituicao-da-organizacao-mundial-da-saude-omswho.html>>. Acesso em: 12 outubro 2019.

ORTEGA, M. et al. *Candida* spp. bloodstream infection: influence of antifungal treatment on outcome. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 562-568, 18 jan. 2010.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp495>

YASEMIN Oz, GOKBOLAT Egemen. Evaluation of direct antifungal susceptibility testing methods of *Candida* spp. from positive blood culture bottles. **Journal of Clinical Laboratorial Analyses**, v. 32, n. 3, mar. 2018. [http:// dx. doi: 10.1002 / jcla.22297](http://dx.doi.org/10.1002/jcla.22297).

PAPPAS, Peter. G. *et al.* A Prospective Observational Study of Candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 5, p. 634-643, 1 set. 2003. <http://dx.doi.org/10.1086/376906>.

PAPPAS, Peter G et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, p. e1-50, fev. 2016.
<http://dx.doi.org/10.1093/cid/civ933>.

PAPON, Nicolas et al. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003550. 26 set. 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003550>.

PARAMYTHIOTOU, Elisabeth et al. Invasive Fungal Infections in the ICU: How to Approach, How to Treat. **Molecules**, v. 19, n. 1, p.1085-1119, out. 2014.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules19011085>.

PARK, S. et al. Specific Substitutions in the Echinocandin Target Fks1p Account for Reduced Susceptibility of Rare Laboratory and Clinical *Candida* sp. Isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3264-3273, ago. 2005.
<http://dx.doi.org/10.1128/aac.49.8.3264-3273.2005>.

PARK, Minji et al. Lipolytic Enzymes Involved in the Virulence of Human Pathogenic Fungi. **Mycobiology**, v. 41, n. 2, p.67-72, jun. 2013.
<http://dx.doi.org/10.5941/myco.2013.41.2.6>.

PELZ, Klaus et al. Analysis of the antimicrobial activity of local anaesthetics used for dental analgesia. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 88-94, 1 jan. 2008.
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47339-0>.

PEMÁN, Javier; CANTÓN, Emilia; ESPINEL-INGROFF, Ana. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Review Of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 4, p.453-460, out. 2009. <http://dx.doi.org/10.1586/eri.09.18>.

PERLIN, David S.. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. **Drug Resistance Updates**, v. 10, n. 3, p.121-130, jun. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2007.04.002>.

PETIT, Patrice X.. Flow Cytometric Analysis of Rhodamine 123 Fluorescence during Modulation of the Membrane Potential in Plant Mitochondria. **Plant Physiology**, v. 98, n. 1, p.279-286, 1992. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.98.1.279>.

PFALLER, M. A. *et al.* Epidemiology of Invasive Candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, jan. 2007. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00029-06>.

PFALLER, Michael A. *et al.* Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 68, n. 3, p.278-283, nov. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.06.015>.

PFALLER, Michael A. *et al.* Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008. **Plos One**, v. 9, n. 7, p.2-3, jul. 2014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101510>.

PIERCE, Christopher G *et al.* A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **NHI Public Access**, v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008. <http://dx.doi.org/10.1038/nport.2008.141>.

PIERCE, Christopher G; LOPEZ-RIBOT, Jose L. Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. **Expert Opinion On Drug Discovery**, v. 8, n. 9, p.1117-1126, set. 2013. <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2013.807245>.

PINA-VAZ, Cidália *et al.* Antifungal Activity of Local Anesthetics Against *Candida* Species. **Infectious Diseases In Obstetrics And Gynecology**, v. 8, n. 3-4, p.124-137, 2000. <http://dx.doi.org/10.1155/s1064744900000168>.

PINA-VAZ, Cidália *et al.* Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p.678-685, out. 2005. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki264>.

PODDAR, Banani *et al.* External validation of risk prediction scores for invasive candidiasis in a medical/surgical intensive care unit: an observational study. **Indian Journal Of Critical Care Medicine**, [S.L.], v. 21, n. 8, p. 514-520, 2017. Jaypee Brothers Medical Publishing. http://dx.doi.org/10.4103/ijccm.ijccm_33_17.

POLKE, Melanie; LEONHARDT, Ines; KURZAI, Oliver; JACOBSEN, Ilse D.. Farnesol signalling in *Candida albicans*– more than just communication. **Critical Reviews In Microbiology**, v. 44, n. 2, p.230-243, jun. 2017. <http://dx.doi.org/10.1080/1040841x.2017.1337711>.

RAMAGE, Gordon *et al.* Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2475-2479, 1 set. 2001. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.45.9.2475-2479.2001>

RAZAVI, Bibi Marjan; BAZZAZ, Bibi Sedigheh Fazly. A review and new insights to antimicrobial action of local anesthetics. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p.991-1002, 24 jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-018-03460-4>.

RAZZAGHI-ABYANEH, M. *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 24, n. 2, p. 43-50, jun. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.004>

RESENDE, Juliana Campos de Pinho *et al.* Phenotypic and genotypic identification of *Candida* spp. isolated from hospitalized patients. **Rev Iberoam Micol**, v.21,;p.24-28, mar. 2004.

RIO, Marianela del *et al.* Effects of the binding of a *Helianthus annuus* lectin to *Candida albicans* cell wall on biofilm development and adhesion to host cells. **Phytomedicine** v. 58, p. 152875, maio 2019.. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152875>

RODRIGUES, Acácio AG *et al.* Inhibition of Germ Tube Formation by *Candida albicans* by Local Anesthetics: An Effect Related to Ionic Channel Blockade. **Current Microbiology**, v. 40, n. 3, p.145-148, mar. 2000. <http://dx.doi.org/10.1007/s002849910030>.

RODRIGUES-VENDRAMINI, Franciele Abigail Vilugron *et al.* Promising New Antifungal Treatment Targeting Chorismate Synthase from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p.e010978, jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01097-18>.

ROMO, Jesus A.; KUMAMOTO, Carol A. On Commensalism of *Candida*. **Journal Of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 16, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/jof6010016>.

ROZADA, Andrew Mf *et al.* Novel 4-methoxynaphthalene-N-acylhydrazones as potential for paracoccidioidomycosis and tuberculosis co-infection. **Future Microbiology**, v. 14, n. 7, p.587-598, maio 2019. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2018-0357>.

ROUDBARMOHAMMADI S *et al.* ALS1 and ALS3 gene expression and biofilm formation in *Candida albicans* isolated from vulvovaginal candidiasis. **Adv Biomed Res.** v.5, p105, 2016.doi:10.4103/2277-9175.183666.

SANTOS, Giselle C. de Oliveira et al. *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Frontiers In Microbiology*, v. 9, p. 1351, 3 jul. 2018. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01351>.

SANGLARD, Dominique; COSTE, Alix; FERRARI, Sélène. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *Fems Yeast Research*, v. 9, n. 7, p.1029-1050, set. 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00578.x>.

SANTOS, André Luis Souza dos et al. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 9, p.e180212, 26 jul. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760180212>.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal Of Medical Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 10-24, 1 jan. 2013. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>

SAVILLE, Stephen P et al. Engineered Control of Cell Morphology In Vivo Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida albicans* during Infection. *Eukaryotic Cell*, v. 2, n. 5, p.1053-1060, out. 2003. <http://dx.doi.org/10.1128/ec.2.5.1053-1060.2003>.

SCHMIDT, R. M. et al. Antimicrobial Activity of Local Anesthetics: lidocaine and procaine. *Journal Of Infectious Diseases*, [S.L.], v. 121, n. 6, p. 597-607, 1 jun. 1970. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/121.6.597>.

SERAFIN, Marissa Bolson; HÖRNER, Rosmari. Drug repositioning, a new alternative in infectious diseases. *The Brazilian Journal Of Infectious Diseases*, v. 22, n. 3, p.252-256, jun. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2018.05.007>.

SHARIFZADEH, Aghil et al. Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical *Candida glabrata* and *Candida krusei* isolates. *Microbial Pathogenesis*, v. 107, p.390-396, jun. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.021>.

SHASTRI, Prakash S et al. *Candida auris* candidaemia in an intensive care unit – Prospective observational study to evaluate epidemiology, risk factors, and outcome. *Journal Of Critical Care*, v. 57, p.42-48, jun. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2020.01.004>.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 21, 266.

SILVA, Cecília Rocha da et al. Synergistic Effects of Amiodarone and Fluconazole on *Candida tropicalis* Resistant to Fluconazole. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 57, n. 4, p.1691-1700, abr. 2013. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00966-12>.

SILVA, Anderson Ramos da 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 And Chemotherapy*, v. 60, n. 6, p.3551-3557, jun. 2016. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01846-15>.

SILVA, Renata Baltarda et al. Candidemia in a public hospital in Northeastern Brazil: Epidemiological features and risk factors in critically ill patients Candidemia en un hospital público del noreste de Brasil: aspectos epidemiológicos y factores de riesgo en los pacientes críticos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.36, n. 4, p. 181-185, nov. 2019.

SILVA, Rose Anny Costa et al. In vitro anti-*Candida* activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p.341-348, jun. 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.008>.

SMITH, Daniel C et al. A trial of etomidate for rapid sequence intubation in the emergency department. **The Journal Of Emergency Medicine**, v. 18, n. 1, p.13-16, jan. 2000.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0736-4679\(99\)00154-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0736-4679(99)00154-7).

SOKOL-ANDERSON, M. L. et al. Amphotericin B-Induced Oxidative Damage and Killing of *Candida albicans*. **Journal Of Infectious Diseases**, v. 154, n. 1, p. 76-83, 1 jul. 1986.
<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/154.1.76>.

SRINIVASAN, Anand et al. NBio Chip, a Lab-on-a-Chip Platform of Mono- and Polymicrobial Biofilms for High-Throughput Downstream Applications. **Mosphere**, v. 2, n. 3, p.e00247-17, jun. 2017. <http://dx.doi.org/10.1128/msphere.00247-17>.

SUD, I J *et al.* Heterogeneity of action of mechanisms among antimycotic imidazoles. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 20, n. 1, p. 71-74, 1 jul. 1981.
<http://dx.doi.org/10.1128/aac.20.1.71>.

SUN, Nuo et al. Azole Susceptibility and Transcriptome Profiling in *Candida albicans* Mitochondrial Electron Transport Chain Complex I Mutants. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p.532-542, nov. 2012. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01520-12>.

TERÇAS, Ana L et al. 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. 8, p.298, mar.2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00298>.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J.. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal Of Computational Chemistry**, p.455-461, jan 2009.
<http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21334>.

TULGAR, Serkan; ALASEHIR, Elcin Akduman; SELVI Onur. A atividade antimicrobiana de efedrina e da combinação de efedrina e propofol: um estudo *in vitro*. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v.68, n. 1, p.69-74, jan. 2018.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjan.2017.08.001>.

TURNER, Brian Keith et al. Neuroprotective effects of thiopental, propofol, and etomidate. **AANA J**, v. 73, n.4, p. 297-302, ago.2005.

UPPULURI, Priya et al. Dispersion as an Important Step in the *Candida albicans* Biofilm Developmental Cycle. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 3, p.e1000828, mar. 2010.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>.

VERAS, Maria Leopoldina et al. Cytotoxic Epimeric Withaphysalins from Leaves of *Acnistus arborescens*. **Planta Medica**, v. 70, n. 6, p.551-555, jun. 2004. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2004-827156>.

VERSTREPEN, K. J. et al. Yeast flocculation: what brewers should know. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 61, n. 3, p. 197-205, 25 jan. 2003.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-1200-8>.

VINCENT, Benjamin Matteson et al. Fitness Trade-offs Restrict the Evolution of Resistance to Amphotericin B. **Plos Biology**, v. 11, n. 10, p.1001692-1001692, out. 2013.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001692>.

VILA, Taissa et al. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. **Virulence**, v. 8, n. 2, p.150-158, jun. 2016.

<http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1197444>.

WÄCHTLER, Betty et. al. *Candida albicans*-Epithelial Interactions: Dissecting the Roles of Active Penetration, Induced Endocytosis and Host Factors on the Infection Process. **Plos One**, v. 7, n. 5, p.e36952, 14 maio 2012. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0036952>.

WANG, Xiaodong et al. Etomidate deteriorates the toxicity of advanced glycation end products to human endothelial EaHy926 cells. **The Journal Of Toxicological Sciences**, v. 39, n. 6, p.887-896, 2014. <http://dx.doi.org/10.2131/jts.39.887>.

WANG, He et al. Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility in invasive *Candida* species in the Asia-Pacific region. **Future Microbiology**, v. 11, n. 11, p.1461-1477, out. 2016. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2016-0099>.

WANG, Tianming et al. Strong Synergism of Palmatine and Fluconazole/Itraconazole Against Planktonic and Biofilm Cells of *Candida* Species and Efflux-Associated Antifungal Mechanism. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p.2892, 3 dez. 2018.

<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.02892>.

WANSCHER, M. et al. Etomidate Infusion and Adrenocortical Function. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 29, n. 5, p. 483-485, jul. 1985.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-6576.1985.tb02238.x>.

WESTBROOK, Steven D et al. *Candida krusei* sepsis secondary to oral colonization in a hemopoietic stem cell transplant recipient. **Medical Mycology**, v. 45, n. 2, p.187-190, mar. 2007. <http://dx.doi.org/10.1080/13693780601164306>.

WOOD, N C et al. Inhibitory effects of chlorpromazine on *Candida* species. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 27, n. 5, p. 692-694, 1 maio 1985.

<http://dx.doi.org/10.1128/aac.27.5.692>.

WU Rick Sai-Chuen et al. Etomidate induces cytotoxic effects and gene expression in a murine leukemia macrophage cell line (raw264.7). **Anticancer Res**, v.31, n.6, p.2203-8, jun. 2011.

Xing Chen et al. ASDCD: Banco de Dados de Combinação de Medicamentos Sinérgicos Antifúngicos. MAIS UM. 2014 9 (1): e86499 (SCI 3,73).

XU, Jiali et al. Enhances the Antifungal Effect of Fluconazole on Fluconazole-Resistant *Candida albicans* by Competitively Inhibiting Efflux Pump. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 9, p.211-211, 9 jun. 2019.
<http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2019.00211>.

YAMMAMOTO, O; OKADA, Y; OKABE, S. Effects of a Proton Pump Inhibitor, Omeprazole, on Gastric Secretion and Gastric and Duodenal Ulcers or Erosions in Rats. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 29, p. 394-401. 1984

YANG, YL. Virulence factors of *Candida* species. **J. Microbiol**, v. 36, n.4,p. 223–228, 2003.

YOSIPOVITCH, G. et al. Skin Surface pH in Intertriginous Areas in NIDDM Patients: possible correlation to candidal intertrigo. **Diabetes Care**, v. 16, n. 4, p. 560-563, 1 abr. 1993.
<http://dx.doi.org/10.2337/diacare.16.4.560>

ZED, Peter J et al. Etomidate for rapid sequence intubation in the emergency department: Is adrenal suppression a concern?. **Cjem**, v. 8, n. 05, p.347-350, set. 2006.
<http://dx.doi.org/10.1017/s1481803500014044>.

ZIARRUSTA, GB. Vulvovaginitis candidiásica. **Rev Iberoam Micol**, v. 19, p. 22-4, 2002.

ANEXOS

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

Cepas	% de Viabilidade celular				
	CIM/4	CIM/2	CIM	2x CIM	4x CIM
<i>C. albicans</i>	42,9 ±1,7*	39,6±6,5*	35,3±1,9*	25,2±3,5*	7,0±0,7*
<i>C. tropicalis</i>	44,3±2,2*	39,3±8,1*	38,5±5,2*	38,0±2,1*	22,9±1,2*
<i>C. parapsilosis</i>	60,3±1,0*	52,5±7,5*	44,2±6,0%	13,8±1,39*	8,10±0,7*

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

Anexo II. Redução no número de células viáveis, em cepa de *C. albicans* resistente ao FLC tratada com Fluconazol (16 µg / mL), Anfotericina B (4 µg / mL), Itraconazol (0,25 µg/mL), Etomidato (125 µg/mL), Etomidato (31,25 µg/mL) + Fluconazol (4 µg/mL) e Etomidato (15,6 µg/mL) + Itraconazol (0,0312 µg/mL), após 24 horas de exposição.

Tratamento	Viabilidade (%) Média ± E.P.M (n=3)
Controle	2,00 x 10 ⁶ ± 0,08%
Etomidato	1,28 x 10 ⁶ ± 0,07%
Fluconazol	1,85 x 10 ⁶ ± 0,39%
Itraconazol	1,01 x 10 ⁶ ± 0,12%
Etomidato+ Fluconazol	1,42 x 10 ⁶ ± 0,05%
Etomidato+Itraconazol	0,52 x 10 ⁶ ± 0,07%
Anfotericina b	0,24 x 10 ⁶ ± 0,06%

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 III. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em cepa de *C. albicans* resistente ao FLC tratada Fluconazol (16 $\mu\text{g} / \text{mL}$), Anfotericina B (4 $\mu\text{g} / \text{mL}$), Itraconazol (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Etomidato (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Etomidato (31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Fluconazol (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Etomidato (15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Itraconazol (0,0312 $\mu\text{g}/\text{mL}$), após 24 horas de exposição.

Tratamento	Viabilidade (%) Média \pm E.P.M (n=3)
Controle	$3,0 \times 10^6 \pm 0,25\%$
Etomidato	$24,6 \times 10^6 \pm 5,0\%$,
Fluconazol	$2,51 \times 10^6 \pm 0,51\%$
Itraconazol	$34,4 \times 10^6 \pm 3,1\%$;
Etomidato+ Fluconazol	$21,5 \times 10^6 \pm 3,0\%$
Etomidato+Itraconazol	$42,9 \times 10^6 \pm 2,3\%$
Anfotericina b	$39,7 \times 10^6 \pm 3,7\%$

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 IV. Avaliação da produção de EROs em *C. albicans* resistente ao fluconazol tratada Fluconazol (16 $\mu\text{g} / \text{mL}$), Anfotericina B (4 $\mu\text{g} / \text{mL}$), Itraconazol (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Etomidato (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Etomidato (31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Fluconazol (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Etomidato (15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Itraconazol (0,0312 $\mu\text{g}/\text{mL}$), após 24 horas de exposição.

Tratamento	Viabilidade (%) Média \pm E.P.M (n=3)
Controle	$1,20 \times 10^6 \pm 0,09\%$
Etomidato	$7,1 \times 10^6 \pm 1,7\%$,
Fluconazol	$1,22 \times 10^6 \pm 0,05\%$
Itraconazol	$18,9 \times 10^6 \pm 2,7\%$
Etomidato+ Fluconazol	$5,7 \times 10^6 \pm 1,6\%$
Etomidato+Itraconazol	$22,2 \times 10^6 \pm 2,3\%$
Anfotericina b	$27,3 \times 10^6 \pm 3,6\%$

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 V. Externalização de fosfatidilserina em *C. albicans* resistentes ao fluconazol tratada Fluconazol (16 µg / mL), Anfotericina B (4 µg / mL), Itraconazol (0,25 µg/mL), Etomidato (125 µg/mL), Etomidato (31,25 µg/mL) + Fluconazol (4 µg/mL) e Etomidato (15,6 µg/mL) + Itraconazol (0,0312 µg/mL), após 24 horas de exposição.

Tratamento	Viabilidade (%) Média ± E.P.M (n=3)
Controle	$2,4 \times 10^6 \pm 0,10\%$
Etomidato	$29,5 \times 10^6 \pm 3,5\%$
Fluconazol	$2,34 \times 10^6 \pm 0,18\%$
Itraconazol	$38,7 \times 10^6 \pm 3,8\%$
Etomidato+ Fluconazol	$28,4 \times 10^6 \pm 3,2\%$
Etomidato+Itraconazol	$61,8 \times 10^6 \pm 3,0\%$
Anfotericina b	$50,5 \times 10^6 \pm 4,4\%$

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 VI. Avaliação do índice de dano ao DNA em *C. albicans* resistentes ao fluconazol tratada Fluconazol (16 µg / mL), Anfotericina B (4 µg / mL), Itraconazol (0,25 µg/mL), Etomidato (125 µg/mL), Etomidato (31,25 µg/mL) + Fluconazol (4 µg/mL) e Etomidato (15,6 µg/mL) + Itraconazol (0,0312 µg/mL), após 24 horas de exposição.

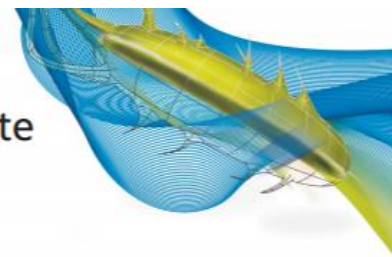
Tratamento	Viabilidade (%) Média ± E.P.M (n=3)
Controle	$5,8 \times 10^6 \pm 2,6\%$
Etomidato	$10,5 \times 10^6 \pm 3,1\%$
Fluconazol	$4,0 \times 10^6 \pm 3,1\%$
Itraconazol	$81,8 \times 10^6 \pm 8,9\%$
Etomidato+ Fluconazol	$8,5 \times 10^6 \pm 2,4\%$
Etomidato+Itraconazol	$71 \times 10^6 \pm 8,8\%$
Anfotericina b	$156,8 \times 10^6 \pm 9,0\%$

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.

AnexoVII. Artigo publicado na revista Future Microbiology, qualis A2, fator de impacto: 3.190.

Synergistic anticandidal activity of etomidate and azoles against clinical fluconazole-resistant *Candida* isolates



Livia G do AV Sá^{1,2}, Cecília R da Silva^{1,2}, Rosana de S Campos^{1,2,3}, João B de A Neto^{1,2,3}, Letícia S Sampaio^{1,2}, Francisca BSA do Nascimento^{1,2}, Fátima DD Barroso^{1,2}, Lisandra J da Silva^{1,2}, Helaine A Queiroz^{1,2}, Thiago M Cândido^{1,2,3}, Daniel S Rodrigues^{1,2}, Amanda C Leitão^{1,2}, Manoel O de Moraes², Bruno C Cavalcanti² & Hélio VN Júnior^{*,1,2}

¹Department of Clinical & Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Laboratory of Bioprospection in Antimicrobial Molecules (LABIMAN), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60430-1160, Brazil

²Drug Research & Development Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60430-276, Brazil

³University Center Christus, Fortaleza, CE, 60160-230, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +55 85 3366 8274; Fax: +55 85 3366 8257; helioufc@gmail.com.br

Aim: The purpose of this study was to evaluate the effect of etomidate alone and in combination with azoles on resistant strains of *Candida* spp. in both planktonic cells and biofilms. **Materials & methods:** The antifungal activity of etomidate was assessed by the broth microdilution test; flow cytometric procedures to measure fungal viability, mitochondrial transmembrane potential, free radical generation and cell death; as well detection of DNA damage using the comet assay. The interaction between etomidate and antifungal drugs (itraconazole and fluconazole) was evaluated by the checkerboard assay. **Results:** Etomidate showed antifungal activity against resistant strains of *Candida* spp. in planktonic cells and biofilms. Etomidate also presented synergism with fluconazole and itraconazole in planktonic cells and biofilms. **Conclusion:** Etomidate showed antifungal activity against *Candida* spp., indicating that it is a possible therapeutic alternative.

First draft submitted: 12 March 2019; Accepted for publication: 6 December 2019; Published online: 9 January 2020


Keywords: azoles • biofilm • *Candida* spp. • etomidate • synergism

Candida species pose a serious threat to public health, being recognized as opportunistic pathogens that cause increasing rates of morbidity and mortality worldwide [1–3]. Invasive fungal infection caused by *Candida* species can affect up to 15% of blood infections and this species is isolated in 50–70% of systemic fungal infections [4–6]. Azoles are the first line of antifungal drugs for the treatment of *Candida* infections. In relation to candidemia treatment, fluconazole is the drug of choice, both for prophylaxis and therapy.

Anexo VIII. Artigo aceito na revista *Journal Medical Microbiology*, qualis B2, fator de impacto: 1,926.

**JOURNAL
OF MEDICAL
MICROBIOLOGY**

SHORT COMMUNICATION
Gurgel do Amaral Valente Sá et al., *Journal of Medical Microbiology*
DOI: 10.1099/jmm.2021.241



Antifungal activity of etomidate against growing biofilms of fluconazole-resistant *Candida* spp. strains, binding to mannoproteins and molecular docking with the ALS3 protein


Lívia Gurgel do Amaral Valente Sá^{1,2*}, Cecília Rocha da Silva^{1,2}, João Batista de Andrade Neto^{1,2}, Francisca Bruna Stefany Aires do Nascimento^{1,2}, Fátima Daiana Dias Barroso^{1,2}, Lisandra Jovêncio da Silva^{1,2}, Vitória Pessoa de Farias Cabral^{1,2}, Amanda Dias Barbosa^{1,2}, Jacilene Silva¹, Emmanuel Silva Marinho¹, Manoel Odorico de Moraes¹, Maria Erivanda França Rios², Bruno Coêlho Cavalcanti¹, Iri Sandro Pampolha Lima² and Hélio Vitoriano Nobre Júnior²

Abstract

This study evaluated the effect of etomidate against biofilms of *Candida* spp. and analysed through molecular docking the interaction of this drug with ALS3, an important protein for fungal adhesion. Three fluconazole-resistant fungi were used: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. Growing biofilms were exposed to etomidate at 31.25–500 µg ml⁻¹. Then, an ALS3 adhesive protein from *C. albicans* was analysed through a molecular mapping technique, composed of a sequence of algorithms to perform molecular mapping simulation based on classic force field theory. Etomidate showed antifungal activity against growing biofilms of resistant *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* at all concentrations used in the study. The etomidate coupling analysis revealed three interactions with the residues of interest compared to hepta-threonine, which remained at the ALS3 site. In addition, etomidate decreased the expression of mannoproteins on the surface of *C. albicans*. These results revealed that etomidate inhibited the growth of biofilms.

Anexo XIX. Artigo aceito na revista *Toxicology in Vitro*, qualis B1, fator de impacto: 3.170

Toxicology in Vitro 68 (2020) 104946

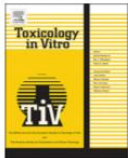


ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit



Etomidate is devoid of genotoxicity and mutagenicity in human lymphocytes and in the *Salmonella typhimurium*/microsomal activation test

Bruno Coêlho Cavalcanti^{a,b,*}, Lívia Gurgel do Amaral Valente Sá^{a,d},
João Batista de Andrade Neto^{a,c,d}, Antônio Adailson de Sousa Silva^b,
Maria Erivanda França Rios^a, Francisco Stefânio Barreto^b, José Roberto de Oliveira Ferreira^c,
Cecília Rocha da Silva^{a,d}, Fátima Daiana Barroso^d, Hemerson Iury Ferreira Magalhães^f,
Hélio Vitoriano Nobre Jr^{a,d}, Manoel Odorico de Moraes^{a,b}

