



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

JAIANE ALVES BRASIL

Efeito *in vitro* do diclofenaco em combinação com fluconazol, voriconazol e anfotericina B frente a células planctônicas e biofilme de *Candida tropicalis*

FORTALEZA
2020

JAIANE ALVES BRASIL

Efeito *in vitro* do diclofenaco em combinação com fluconazol, voriconazol e anfotericina B frente a células planctônicas e biofilme de *Candida tropicalis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

**FORTALEZA
2020**

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

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

- B83e Brasil, Jaiane Alves.
Efeito *in vitro* do diclofenaco em combinação com fluconazol, voriconazol e anfotericina B frente a células planctônicas e biofilme de *Candida tropicalis* / Jaiane Alves Brasil. – 2020.
100 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Prof. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante. .
Coorientação: Prof. Dr. Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.
1. *Candida tropicalis*. 2. Antifúngicos. 3. Resistência. 4. Diclofenaco. 5. Sinergismo. I. Título.
CDD 610
-

JAIANE ALVES BARSIL

Efeito *in vitro* do diclofenaco em combinação com fluconazol, voriconazol e anfotericina B frente a células planctônicas e biofilme de *Candida tropicalis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina.

Aprovada em: 07 /07/2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, ao CNPQ e à FUNCAP pelo apoio financeiro para realização do mestrado.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) e a Universidade Federal do Ceará (UFC), pelo apoio e disponibilização do espaço, estrutura e recursos para concretização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pela dedicação e comprometimento com a pesquisa, e com o crescimento do CEMM.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela sua postura íntegra e idônea, que o diferencia de tantos outros. Pela determinação e destreza com que orienta os caminhos da pesquisa. Tem minha admiração.

À minha querida orientadora Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, serei eternamente grata pela oportunidade de entrar nesse universo da pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos, veemência e compromisso dedicados, e pelas muitas outras contribuições dessa trajetória de crescimento e amadurecimento acadêmico. Gratidão!

À Dra. Silviane Praciano Bandeira, pela valiosa ajuda nas imagens de Microscopia Eletrônica Confocal, sempre disposta a ajudar.

À Dra. Gláucia Morgana de Melo Guedes, pela amizade, e partilha de conhecimento. Sou grata pelas dicas e conselhos tão preciosos. Um exemplo de inspiração e admiração.

Aos professores do programa que contribuem imensamente com a formação dos alunos que passam pelo laboratório, e mantêm o CEMM na posição de referência e qualidade em pesquisa.

À Jonathas Sales de Oliveira – um pesquisador raiz. Muito obrigada pela paciência e gentileza em compartilhar o conhecimento. Obrigada pelo companheirismo nos experimentos, ensinamentos, construção e aprimoramento deste trabalho.

Aos amigos do CEMM, pela escuta sensível, laços de afeto e múltiplos ensinamentos nessa caminhada, de forma especial: Lívia, Gleiciane, Lana, Gerlane, Gessica, Fernando, Raissa, Renan, Juliana, Gyrliane, Lara, Xhulla, Ane, Raquel, Santiago e Bruno que se fizeram irmãos desde sempre.

Aos demais colegas do CEMM, que proporcionaram momentos de discussão e aprendizagem, fortalecendo o ambiente de trabalho.

À Terezinha de Jesus, pelo carinho e por tornar o CEMM harmonioso.

Às secretárias do PPGCM, Ivone e Rita, por serem tão prestativas e atenciosas.

À minha família, pelo o amor mútuo entre nós. Obrigada por vocês existirem.

Ao meu esposo Thiago, pelo companheirismo incondicional.

À Izabel pereira, pelo exemplo de mulher a ser seguido.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram até chegar a este momento. Meu muito obrigada.

À Deus pelas bênçãos na minha vida.

*“Até ali a tua mão me guiará e a tua
destra me susterá.”*

Salmo 139:10

RESUMO

A resistência antifúngica em *Candida* spp. constitui um grave problema de saúde pública. Assim, uma abordagem para potencializar a eficácia terapêutica dos antifúngicos é testá-los em combinações com outros compostos a fim de obter interações sinérgicas. O diclofenaco de sódio (DIC) é um anti-inflamatório com potencial antifúngico contra *Candida albicans*. Neste contexto, este estudo objetivou avaliar os efeitos da combinação do DIC com os antifúngicos fluconazol (FLC), voriconazol (VRC) e anfotericina B (AMB) frente a células planctônicas e biofilmes em formação das cepas clínicas de *Candida tropicalis*. As Concentrações Inibitórias Mínimas das drogas frente às formas planctônicas (CIM) e biofilme (CIMB) foram determinadas através dos testes de microdiluição em caldo. Já o potencial sinérgico entre o DIC e os antifúngicos foi avaliado pelo método do *checkerboard*. A interação entre as drogas foi definida pelo cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF). Ademais, a ultraestrutura e viabilidade dos biofilmes foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal. O DIC apresentou CIM de 1024 µg/mL em todos os isolados testados. Os antifúngicos FLC, VRC e AMB exibiram CIM de 0,25 a 128 µg/mL; 0,0625 a 64 µg/mL e 0,125 a 1 µg/mL, respectivamente. A combinação do DIC com FLC ou VRC contra células planctônicas resistentes aos azólicos reduziu a CIM do FLC de 8 a 32 vezes, e do VRC de 16 a 32 vezes ($p < 0,05$), apresentando, portanto, sinergismo. Nas cepas sensíveis ao VRC essa combinação de drogas apresentou redução da CIM de 0,5 a 2 vezes para o azólico, exibindo indiferença. A associação entre DIC e AMB em células planctônicas sensíveis demonstrou sinergismo em 2/10 cepas com redução da CIM em 4 vezes e interações indiferentes em 8/10 cepas. Em relação aos biofilmes em formação observou-se sinergismo com redução da CIMB em 8 vezes para as combinações de DIC com FLC ou VRC, e indiferença entre DIC e AMB. As imagens microscópicas dos biofilmes em formação expostos a combinação do DIC com FLC demonstraram redução no número de células e alteração na morfologia das células de leveduras. Em conclusão, o diclofenaco de sódio reduziu a CIM dos azólicos frente a células planctônicas e biofilme de *C. tropicalis* resistentes, sendo observado sinergismo destas combinações, e indiferença na combinação com AMB. Além disso, o DIC combinado com FLC reduziu a viabilidade e formação do biofilme em cepa resistente.

Palavras-chave: *Candida tropicalis*. Antifúngicos. Resistência. Diclofenaco. Sinergismo.

ABSTRACT

Antifungal resistance in *Candida* spp. constitutes a serious public health problem. Thus, an approach to enhance the therapeutic effectiveness of antifungals is to test them in compounds with other compounds in order to obtain synergistic interactions. Diclofenac sodium (DIC) is an anti-inflammatory with potential antifungal against *Candida albicans*. In this context, this study aimed to evaluate the effects of the combination of DIC with the antifungals fluconazole (FLC), voriconazole (VRC) and amphotericin B (AMB) against planktonic cells and biofilms forming the clinical strains of *C. tropicalis*. The Minimum Inhibitory Concentrations of the drugs against planktonic forms (CIM) and biofilm (CIMB) were determined from the microdilution testicles in broth. The synergistic potential between DIC and antifungals was assessed using the checkerboard method. The interaction between drugs was defined by calculating the Fractional Inhibitory Concentration Index (ICIF). Furthermore, the ultrastructure and viability of biofilms were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and confocal microscopy. The DIC presented MIC of 1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$ in all tested grants. The antifungals FLC, VRC and AMB exhibited MIC from 0.25 to 128 $\mu\text{g} / \text{mL}$; 0.0625 to 64 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 0.125 to 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. The combination of DIC with FLC or VRC against azole-resistant planktonic cells reduced the MIC of the FLC by 8 to 32 times, and of the VRC by 16 to 32 times ($p < 0.05$), therefore amusing synergism. In strains sensitive to VRC, this drug combination presents a MIC reduction of 0.5 to 2 times for azole, showing indifference. The association between DIC and AMB in planktonic cells altered as necessary synergism in 2/10 strains with reduction of MIC in 4 times and indifferent interactions in 8/10 strains. Regarding biofilms in formation, synergism was observed with a 8-fold reduction in CIMB to associate DIC with FLC or VRC, and indifference between DIC and AMB. The microscopic images of the biofilms in formation exposed to the combination of DIC and FLC demonstrated a reduction in the number of cells and changes in the morphology of yeast cells. In conclusion, sodium diclofenac reduced the MIC of azoles against planktonic cells and resistant *C. tropicalis* biofilm, with consolidated synergism and indifference in the combination with AMB. In addition, DIC combined with FLC reduces the viability and formation of biofilm in a resistant strain.

Keywords: *Candida tropicalis*. Antifungals. Resistance. Diclofenac. Synergism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Micromorfologia de *Candida tropicalis*. (A) Microcultivo de *C. tropicalis* em agar fubá acrescido de tween 80 visualizado em microscópio óptico de campo claro. Nota-se, a partir de pseudo-hifas (seta preta), a formação de blastoconídios em brotamento, em cadeia simples ou ramificada, comumente aos pares. (B) e (C) Microscopia eletrônica de varredura de *C. tropicalis*. (B) hifas (seta branca). (C) blastoconídios (seta vermelha) e pseudo-hifas representada por blastoconídios alongados em brotamento (seta branca). Aumento: (A) 400 X. (B) 8000X. (C) 5000X...
.....28
- Figura 2** - Etapas de formação do biofilme de *Candida* spp.....32
- Figura 3** - Microscopia confocal de varredura a laser (A) e Microscopia eletrônica de varredura(B) de biofilmes em formação de *Candida tropicalis*. Observa-se uma estrutura complexa composta de blastoconídios (setas vermelhas) e filamentos (setas brancas). Na imagem (A) as células em verde são células viáveis, já as células em vermelho são células mortas. Aumento: 400 x (A), 5.000 x. Espessura: 20 µm (A), 200 µm (B).....33
- Figura 4** - Mapa de calor projetado pelo software GraphPad Prism 7.0. Efeitos da interação medicamentosa entre o anti-inflamatório diclofenaco e os antifúngicos fluconazol (A), voriconazol (B) e anfotericina B (C) sobre células planctônicas de *Candida tropicalis* após 24 h de incubação à 35 ° C. O crescimento foi quantificado por espectrofotômetro a 492 nm.....65

Figura 5. Mapa de calor projetado pelo software GraphPad Prism 7.0. Efeitos da interação medicamentosa entre o anti-inflamatório diclofenaco e os antifúngicos fluconazol (A), voriconazol (B) e anfotericina B (C) sobre biofilme de *Candida tropicalis* após 24 h de incubação à 35 ° C. O crescimento foi quantificado por espectrofotômetro a 492 nm.68

Figura 6 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilmes de *Candida tropicalis* após 24 h de incubação. (A) Biofilmes em formação sem exposição às drogas (controle). (B) Biofilmes após exposição à FLC (64 µg / ml). (C) Biofilmes tratados com DIC (512 µg / ml). (D) Biofilme tratado com DIC (512 µg / ml) e FLC (64 µg / ml). Observa-se desestruturação de biofilmes expostos à FLC (B), DIC (C) e DIC / FLC (D).....70

Figura 7 - Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de biofilmes de *Candida tropicalis* cultivados na presença de diclofenaco e fluconazol após 24 h de incubação. (A) Biofilmes sem exposição a drogas (controle). (B) Biofilme cultivado na presença de fluconazol (64 µg / ml). (C) Biofilme cultivado na presença de diclofenaco (512 µg / ml). (D) Biofilme cultivado na presença de diclofenaco (512 µg / ml) e fluconazol (64 µg / ml). Observe que as células na presença de fluconazol e diclofenaco estão inchadas e uma redução da viabilidade é observada. Escala: 200 µm. Ampliação: 400x. Lasers: 488 nm (células viáveis, SYTO9), 561 nm (células danificadas, iodeto de propídio).....71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Efeito sinérgico da combinação de compostos com antifúngicos frente a cepas de <i>Candida tropicalis</i>	48
---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Códigos e espécime clínico de isolamento das cepas de *Candida tropicalis* utilizadas.....55
- Tabela 2** Concentração inibitória mínima de diclofenaco, fluconazol, voriconazol e anfotericina B frente a cepas planctônicas de *Candida tropicalis*.....62
- Tabela 3** Concentração inibitória mínima de diclofenaco, fluconazol, voriconazol e anfotericina B combinados, e índice de concentração inibitória fracionada frente a células planctônicas das espécies de *Candida tropicalis*.....64
- Tabela 4** Concentração inibitória mínima para biofilme de diclofenaco, fluconazol, voriconazol e anfotericina B isolados e combinados, e índice de concentração inibitória fracionada frente a biofilmes das espécies de *Candida tropicalis*.....67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA – Ácido Araquidônico
- ABC – *ATP-binding cassette*
- AINES – Antinflamatórios não- esteróide
- AMB – Anfotericina B
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- ATP – *Adenosine triphosphate* (trifosfato de adenosina)
- CI – Candidíase Invasiva
- CDR – *Candida drug resistance*
- CEMM – Centro Especializado em Micologia Médica
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CIMB– Concentração inibitória mínima em biofilme
- CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*
- CNA – *Candida não-albicans*
- DIC – Diclofenaco
- DMSO – Dimetilsufóxido
- DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- EUA – Estados Unidos da América
- FLC – Fluconazol
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- ICIF – Índice de concentração inibitória fracionada
- ITC – Itraconazol
- MDR – Multiple drug resistance*
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MOPS – Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico

MSF – *Major facilitator superfamily*

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PGs- Prostaglandinas

pH – Potencial hidrogeniônico

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

SDA – Ágar Sabouraud Dextrose

USA – United States of America

VRC – Voriconazol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Gênero <i>Candida</i>	21
2.2 Infecções por <i>Candida</i> spp.....	22
2.3 <i>Candida tropicalis</i>	27
2.3.1 Biofilmes	30
2.4 Tratamento das infecções por <i>Candida</i>	34
2.5 Resistência aos antifúngicos.....	36
2.6 Mecanismos de resistência aos antifúngicos.....	39
2.7 Interações entre fármacos.....	42
2.8 Diclofenaco	48
3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS	53
4. OBJETIVOS	54
4.1 Objetivo geral.....	54
4.2 Objetivos específicos.....	54
5. MATERIAL E MÉTODOS	55
5.1 Local de estudo	55
5.2 Microrganismos	55
5.3 Drogas	56
5.4 Sensibilidade antifúngica	56
5.5 Interação do diclofenaco com antifúngicos sobre células planctônicas.....	57
5.6 Análise da combinação de antifúngicos e diclofenaco contra biofilmes em formação	58
5.7 Microscopia eletrônica de varredura de biofilme em formação	59
5.8 Microscopia confocal de varredura a laser de biofilme em formação.....	60
5.9 Análise estatística.....	60
6.RESULTADOS	62
6.1 Sensibilidade antifúngica	62
6.2 Combinação de drogas frente células planctônicas de <i>Candida tropicalis</i>	63
6.3 Efeito da combinação do diclofenaco com antifúngicos sobre biofilme em formação	66
6.4 Análise de microscopia do biofilme em formação.....	69

7 DISCUSSÃO.....	72
8 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS	777
ANEXO A – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....	100

1. INTRODUÇÃO

Candida tropicalis, dentre as espécies de *Candida* não-*albicans*, é a causa mais frequente de candidemia e candidíase invasiva, sobretudo, em países da América Latina e Ásia, causando altas taxas de mortalidade principalmente entre idosos e pacientes com malignidades, como leucemia mieloide aguda (XIAO et al., 2019).

Essa levedura tem apresentado resistência aos azólicos (CHOI et al., 2016; FAN et al., 2017). A resistência a essa classe de antifúngicos deve-se principalmente à superexpressão de bombas de efluxo de drogas, ao aumento da expressão e / ou à mutação no gene ERG11, e às alterações no gene ERG3 (JIN et al., 2018; FAN et al., 2019; TEO et al., 2019), bem como a fatores de virulência como formação de biofilme (INÁCIO et al., 2019; NETT; ANDES, 2020).

Biofilmes têm sido considerados uma das principais causas de estabelecimento bem-sucedido da candidíase (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2014). Além disso, os biofilmes mostram diminuição da sensibilidade a drogas antifúngicas, o que dificulta o tratamento das infecções fúngicas (NETT; ANDES, 2020). Neste contexto, a busca por novas estratégias com potencial antifúngico, assim como as combinações entre fármacos com propósito de obter interações sinérgicas são necessárias.

O diclofenaco (Ácido 2- [2- (2,6-dicloroanilino) fenil] acético) tem sido relatado pelo seu potencial antifúngico frente a *Candida albicans* (ASHRAF et al., 2015). Esse medicamento é um anti-inflamatório não-esteróide (AINE) que atua inibindo as enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) bloqueando a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas (GAN, 2010).

Desse modo, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do diclofenaco combinado com antifúngicos fluconazol, voriconazol e anfotericina B, nas concentrações inibitórias mínimas, frente a células planctônicas e biofilme de *Candida*

tropicalis, bem como avaliar a estrutura da formação do biofilme de *C. tropicalis* expostos à combinação de diclofenaco e fluconazol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Candida*

Os primeiros achados sobre leveduras do gênero *Candida*, como patógenos humanos, foram descritos por Hipócrates (460 a 337 a.C.) ao observar placas esbranquiçadas presentes na cavidade oral de recém-nascidos e em pacientes enfermos. Adiante, Galeno (200 a 130 a.C.) relatou essas placas em crianças com candidíase oral, mais adiante, no século XVIII, a doença já se fazia frequente na Europa (SIDRIM, ROCHA, 2004).

Em 1839, o cirurgião alemão Bernhard von Langenbeck isolou pela primeira vez essas leveduras da cavidade oral de pacientes com tifo. Dessa forma, Langenbeck associou, erroneamente, o agente etiológico encontrado à doença, no qual descreveu com detalhes em seu trabalho intitulado "*Fungi find in the mucous membrane of the throat of a typhoid*" (HAZEN, 1995).

Já em 1842, David Gruby definiu a candidíase oral e classificou o agente da patogenia no gênero *Sporotrichum*. Berg, em 1846 através de estudos mais detalhados estabeleceu definitivamente a relação do patógeno com a doença, que mais tarde, em 1861, seria reportado por Zencker, através do primeiro relato de lesões cerebrais produzidas pelo fungo (WITTIG et al., 1973).

Mayer, em 1862, descreveu seis casos de candidíase vaginal, e Haussmann no ano de 1875, relatou sobre a existência de relação entre candidíase vaginal da mãe e candidose no bebê. A levedura recebeu diversas classificações, em 1853 foi reclassificada como *Oidium albicans*, por Charles Robin, e depois em *Monilia albicans* por Zopf, em 1890. No entanto, somente em 1923, Berkhout a classificou no gênero *Candida*, espécie *Candida albicans* (SIDRIM, ROCHA, 2004).

Candida spp. pertencem ao reino Fungi, divisão Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales (LEVETIN et al., 2016). O taxon é constituído por mais de 150 espécies, destas, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* são consideradas de importância médica, perfazendo 95% dos casos de candidíase humana (YAPAR, 2014).

As colônias cultivadas em ágar Sabouraud dextrose apresentam coloração de branca a creme, com superfície lisa, opaca ou seca. Ademais, a partir de análises microscópicas é possível observar que algumas espécies são pleomórficas, apresentando-se nas formas de hifas, pseudo-hifas e blastoconídios (SIDRIM, ROCHA, 2004). *C. albicans* e *C. dubliniensis* formam clamidoconídios terminais; *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. africana* formam hifas verdadeiras, já a espécie *C. tropicalis* formam blastoconídios, pseudo-hifas podendo formar hifas verdadeiras (WU et al., 2016a).

Essas leveduras já foram isoladas de ambientes aquáticos (MEDEIROS et al., 2008), bem como de sítios anatômicos de animais como cães (BRITO et al., 2009; BUFALARI et al., 2016), golfinhos (TAKAHASHI et al., 2010), calopsitas (BRILHANTE et al., 2010; SIDRIM et al., 2010), camarões (BRILHANTE et al., 2011) equinos (CORDEIRO et al., 2013b), porco-espinho (CASTELO-BRANCO et al., 2013), tartarugas (BRILHANTE et al., 2015a), macaco rhesus (PECORARO et al., 2019) e outros animais (BRILHANTE et al., 2015b).

Candida spp. é um fungo comensal da microbiota humana e de outros animais, coloniza a pele, trato gastrointestinal, urogenital e vias respiratórias. Por fazer parte da microbiota humana, as infecções por espécies do gênero *Candida* são, na grande maioria, de origem endógena (SULEYMAN; ALANGADEN, 2016; SAFAVIEH et al., 2017).

Os indivíduos predisponentes para infecções por leveduras do gênero *Candida* incluem imunossuprimidos; recém-nascidos prematuros; diabéticos; pacientes com câncer, em hemodiálise; transplantados ou em nutrição parenteral, além de idosos e indivíduos que fazem uso de dispositivos invasivos, como cateteres venosos centrais (ARMSTRONG-JAMES; HARRISON, 2012).

2.2 Infecções por *Candida* spp.

As notificações das infecções fúngicas têm aumentado desde a década de 1980 (FISHER et al., 2012). A doença vem afetando mais de 5,7 bilhões de pessoas, ou seja, 80 % da população mundial, causando mais de 1,5 milhões de mortes (BROWN et al., 2012b; BONGOMIN et al., 2017; DENNING, 2017).

Candida spp. são os principais agentes de infecções fúngicas em todo o mundo (REES et al., 2011). Nos EUA, essas leveduras são a quarta principal causa de infecções nosocomiais da corrente sanguínea (WISPLINGHOFF et al., 2004; DELALOYE; CALANDRA, 2014), com maior prevalência da espécie *C. albicans* com base em estudos epidemiológicos realizados no Oriente Médio (SHARIFZADEH et al., 2013), Continente Europeu (KLINGSPOR et al., 2015), Estados Unidos (CLEVELAND et al., 2015), Austrália, Japão, Coreia, Hong Kong, Malásia, Cingapura e Tailândia (WANG; XU; HSUEH, 2016).

As infecções causadas por *Candida* spp. constituem importante causa de morbidade e mortalidade em imunocomprometidos, sendo *C. albicans* a espécie mais comumente isolada na prática clínica, apesar do aumento no número dos isolados de *Candida* não-*albicans* (CNA). Dentre as CNA mais frequentemente isoladas, estão as espécies *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (BASSETTI et al., 2017).

Essas leveduras podem causar desde infecções superficiais da mucosa oral e vaginal, até infecções hematogênica e dos tecidos profundos (SINGH; FATIMA; HAMEED, 2015; DONDERS; SOBEL, 2017). As infecções superficiais causadas por *Candida* spp. como candidíase oral, orofaríngea, esofágica e vaginal, afetam milhões de pessoas no mundo, causando morbidade grave (MOYES; RICHARDSON; NAGLIK, 2015). A candidíase oral, principal infecção da cavidade bucal, acomete 90% de portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (THOMPSON et al., 2010) além de indivíduos com estomatite anêmica, exocrinopatia autoimune, penfigóide (grupo de doenças autoimunes).

Vale ressaltar, que a candidíase orofaríngea causada principalmente por *C. albicans*, apresenta risco substancial a portadores de próteses, usuários de corticosteróides, fumantes, além de indivíduos que estão fazendo uso de antibióticos de amplo espectro, agentes imunossupressores e quimioterápicos, pacientes com HIV, diabetes ou com doença autoimune (SWIDERGALL; FILLER, 2017).

A candidíase vaginal, por sua vez, atinge 75% das mulheres pelo menos uma vez na vida durante seu período fértil, sendo que deste percentual cerca de 6% a 9% sofrerão uma recidiva da doença (CASSONE, 2015; SILVA; OLIVEIRA, 2017), somando em torno de 30 milhões de infecções a cada ano (NAGLIK, 2014).

A candidíase invasiva (CI), condição grave de infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, é mais comum em pacientes hospitalizados, causando 40% de mortalidade, mesmo em indivíduos recebendo terapia antifúngica. Candidemia, infecção da corrente sanguínea, é o tipo mais comum de CI (KULLBERG, 2016), além infecção do trato urinário, endocardite, infecções do Sistema Nervoso Central e candidíase intra-abdominal (BOUZA et al., 2019), sendo *C. albicans* a principal espécie associada (KULLBERG, 2016).

Embora *C. albicans* seja a principal causadora de CI nosocomial no mundo, estudos têm demonstrado mudanças no perfil epidemiológico de espécies responsáveis pela doença (PFALLER et al., 2004; KULLBERG, 2016). Na Itália, as espécies do gênero *Candida* são a terceira principal causa de infecções em neonatos, perfazendo altas taxas de mortalidade. Um estudo conduzido durante quinze anos em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal no sul italiano, objetivando avaliar o perfil na distribuição dessas espécies, concluiu que houve um aumento de 71% dos isolados de CNA, em comparação com *C. albicans* (LOVERO et al., 2016).

Na China, um estudo realizado entre 2011 e 2017 em uma Unidade de Terapia Intensiva, os isolados causando candidemia perfaziam em maior número as espécies: *C. albicans* (46,3%), seguidos por *C. parapsilosis* (19,5%), *C. glabrata* (15,9%) e *C. tropicalis* (14,6%) (XIAO et al., 2019).

C. glabrata tem surgido como um importante patógeno no norte da Europa (MILAZZO et al., 2014), Estados Unidos e Canadá, frequentemente isolada de casos de candidemia (PFALLER; JONES; CASTANHEIRA, 2014; REMINGTON et al., 2018), já a espécie *C. parapsilosis*, é prevalente no sul da Europa, Ásia e América do Sul, com alta incidência na população pediátrica (KULLBERG, 2016).

C. tropicalis, por sua vez, é proeminente na região da Ásia-Pacífico, respondendo de 20% a 45% dos isolados de *Candida* spp. Esta levedura é considerada um patógeno oportunista e está associada a altas taxas de mortalidade (O'BRIEN; OLIVEIRA-PACHECO; BUTLER, 2019; SFEIR et al., 2020). Os fatores predisponentes à infecção por esta espécie incluem indivíduos neutropênicos e / ou com doença hematológica (CORNELLY et al., 2015; SFEIR et al., 2020), além de infectados pelo HIV ou que passaram por transplantes de órgãos (SINGH; FATIMA; HAMEED, 2015).

Há relatos dessa espécie, em hospedeiro humano, causando infecção cutânea primária (SINGH; FATIMA; HAMEED, 2015), co-infecção em prótese articular do quadril (SEBASTIAN et al., 2018) cistite (WANG et al., 2015), meningite (CECCARELLI et al., 2016), endoftalmite fúngica ocular (TANAKA et al., 2016), peritonite (GIACOBINO et al., 2016), microabcessos renais (ROSA DUQUE et al., 2019), abscesso renal (CHANDRA et al., 2019) além de celulite necrosante angioinvasiva em hospedeiro com defesas imunológicas comprometidas (KRISHNAN et al., 2020).

Na Coreia, durante um estudo multicêntrico realizado em sete hospitais do país, *C. tropicalis* foi a espécie de maior prevalência dentre as CNAs com apresentação clínica mais grave, além disso, a levedura foi responsável pela maior mortalidade entre 14 e 30 dias (KO et al., 2019). Estudos apontaram essa sendo a segunda espécie do gênero *Candida* mais isolada de portadores de Diabetes Melitus Tipo II, na Índia (SANDHYA et al., 2019). Já na Tailândia, foi a terceira espécie mais isolada em pacientes com candidíase oral (MUADCHEINGKA; TANTIVITAYAKUL, 2015).

No Brasil, assim como em outros países da América Latina, *C. tropicalis* é a segunda ou terceira espécie mais isolada dos casos de candidemia e candidúria (KULLBERG et al., 2017; PFALLER et al., 2010b). Um estudo epidemiológico realizado num hospital terciário no Brasil, durante um período de vinte e um anos, de 1996 a 2016, demonstrou maior prevalência de espécies CNAs causando candidemia, sendo 37.5% *C. albicans*, seguidas das espécies de CNAs : *C. tropicalis* (28.1%), *C. parapsilosis* (18.4%) e *C. glabrata* (6.9%) (BRAGA et al., 2018).

Outro estudo reunindo dados de 16 hospitais de cinco regiões brasileiras relatou que dentre os isolados de candidemia, 34.3% eram *C. albicans*, com as espécies de

CNAs perfazendo o maior número: *C. parapsilosis* (24.1%), *C. tropicalis* (15.3%) e *C. glabrata* (10.2%) (DOI et al., 2016).

C. tropicalis foi a segunda espécie mais prevalente tanto nos casos de candidúria, numa UTI em Cuiabá, Mato Grosso (MENOTTI et al., 2019) quanto nos casos de candidíase oral em pacientes transplantados renal de duas regiões geográficas do Brasil (Nordeste e Sul) (DA SILVA-ROCHA et al., 2014).

No nordeste brasileiro, apesar do baixo índice nos relatos de infecções por *C. tropicalis*, esta foi a espécie de CNA mais isolada de diferentes casos de infecções em Recife, segundo estudos realizados em hospitais terciários de Recife (HINRICHSEN et al., 2009). Em São Luiz, Maranhão, essa levedura foi isolada da mucosa oral de pacientes HIV positivo (TERÇAS et al., 2017).

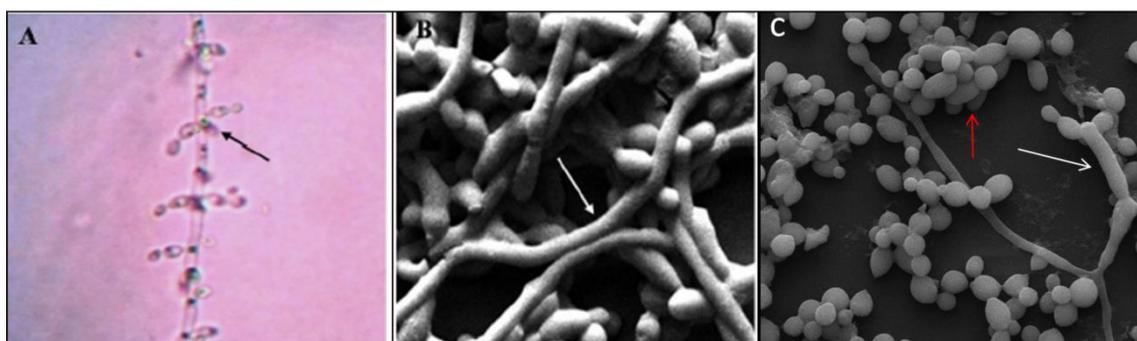
Já no Rio Grande Norte, na cidade de Natal, *C. tropicalis* foi a segunda espécie mais isolada dos quadros clínicos de candidemia, baseado em estudos realizados num hospital terciário desta região (ARAÚJO; DE MEDEIROS, 2019). No Ceará, a levedura foi a mais prevalente dentre as espécies de CNAs isoladas dos centros de saúde do estado, e a segunda dentre as espécies do gênero *Candida* (MENEZES,; CUNHA; CUNHA, 2012).

2.3 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis foi isolada pela primeira vez em 1910, de um indivíduo com bronquite fúngica, sendo classificada primeiramente como *Oidium tropicale* pelo patologista e bacteriologista italiano Aldo Castellani (CASTELLANI, 1912). As colônias cultivadas em ágar Sabouraud dextrose são indistinguíveis de outras espécies de *Candida*, podendo ser observado uma coloração de branca a creme, aspecto liso e textura cremosa, com bordas levemente enrugadas (SIDRIM, ROCHA, 2004;

SILVA et al., 2012); além disso, esta espécie pode apresentar variabilidade fenotípica (*switching*), com colônias que variam o fenótipo de branco a opaco (MANCERA et al., 2015).

Através do microcultivo dessas leveduras em ágar fubá acrescido de Tween 80, sob microscopia óptica e de varredura, como demonstrado na Figura 1, é possível observar leveduras apresentando-se na forma de blastoconídios esféricos ou ovoides dispostos em pares ou sozinhos, medindo de 4-8 e 5-11 μm de diâmetro; além de pseudo-hifa em cadeias ou ramificadas, hifas verdadeiras podem ser visualizadas (WU et al., 2016).



FONTE: CEMM

Figura 1. Micromorfologia de *Candida tropicalis*. (A) Microcultivo de *Candida tropicalis* em ágar fubá acrescido de tween 80 visualizado em microscópio óptico de campo claro. Nota-se, a partir de pseudo-hifas (seta preta), a formação de blastoconídios em brotamento, em cadeia simples ou ramificada, comumente aos pares. (B) e (C) Microscopia eletrônica de varredura de *Candida tropicalis*. (B) hifas (seta branca). (C) blastoconídios (seta vermelha) e pseudo-hifas representada por blastoconídios alongados em brotamento (seta branca). Aumento: (A) 400 X. (B) 8000X. (C) 5000X.

Candida tropicalis realiza reprodução assexuada, e embora essa levedura apresente núcleo diploide, alguns estudos têm relatado células tetraploide originárias da fusão de células diploides; as células tetraploides podem realizar o ciclo parasexual, mecanismo reprodutivo que origina células diploides sem ocorrência de meiose (SEERVAI et al., 2013). O genoma desta levedura foi sequenciado em 2009 (BUTLER et al., 2009) e possui um tamanho de 14,5 Mb, com 12 cromossomos e 6.258 genes

codificadores de proteínas (LI et al., 2014). Estudos da análise fenotípica e genética de isolados clínicos e ambientais de espécies de *Candida tropicalis* demonstraram um genoma estável com algumas diferenças fenotípicas quando expostos à estressores de parede celular, metais e drogas antifúngicas (BAUER et al., 2019).

Quanto ao habitat dessa levedura, pode ser encontrado na água (HAGLER; MENDONÇA-HAGLER; PAGNOCCA, 2017), solo (LAPPE-OLIVERAS; TORIELLO; TAYLOR, 2006), lodo (ZHU et al., 2015), nos frutos (GOMES et al., 2003) e em ambientes halotolerantes (ZAJC; ZALAR; GUNDE-CIMERMAN, 2017).

Embora *C. tropicalis* seja comensal da microbiota humana e animal, tendo sido isolada de vários sítios anatômicos humanos, como pele (DAS; DHAR; BEHERA, 2019), cavidade oral (SHETH et al., 2016; BAJRACHARYA; BHATTACHARYYA; POUDEL, 2019), trato genital feminino e masculino (ARIDOĞAN et al., 2005; BENTUBO et al., 2015) trato respiratório (OKSUZ et al., 2007) e trato gastrintestinal sem causar infecções (MADEEHA; IKRAM; IMRAN, 2016; YOWANG et al., 2019); há relatos desta levedura ocasionando infecções em indivíduos imunocompetentes (HAMILTON; LOCKHART; CRAIN, 2015).

O estabelecimento destas infecções no hospedeiro, depende, em parte, de características expressas pelo microrganismo, ou seja, dos fatores de virulência (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016). Dentre os fatores de virulência expressos por *Candida tropicalis*, podem ser citados produção de adesinas (YU et al., 2016) e enzimas hidrolíticas como fosfolipase e protease (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014), pleomorfismo (JIANG et al., 2016), *switching* fenotípico (MORALEZ et al., 2016) além de capacidade hemolítica (FURLANETO et al., 2015). Vale ressaltar, que a produção de biofilme pode ser considerada um importante fator de virulência (FURLANETO et al.,

2015), já que esta levedura é forte produtora de biofilme (PAIVA et al., 2012; UDAYALAXMI; JACOB; D'SOUZA, 2014).

2.3.1 Biofilmes

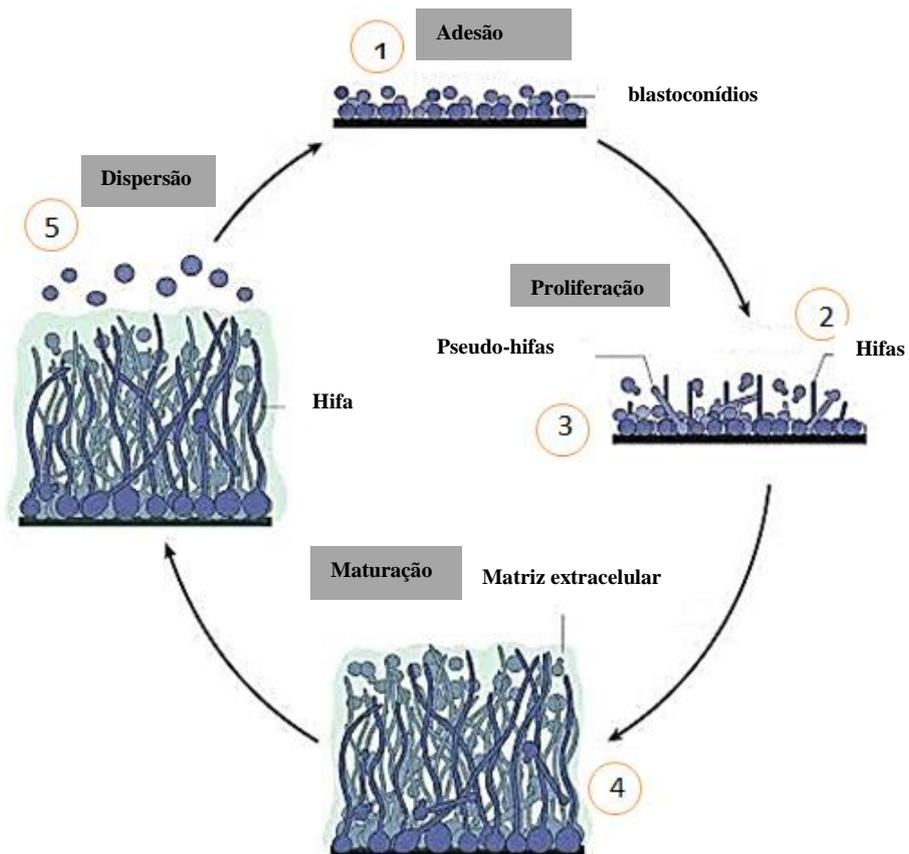
Biofilmes fúngicos são comunidades microbianas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas envolvidas por matriz extracelular polimérica. Essas estruturas complexas apresentam fenótipo que difere das células planctônicas quanto à taxa de crescimento, transcrição de genes e resistência antifúngica (KOLTER; GREENBERG, 2006; NOBILE, 2015); sua formação envolve uma cascata de mecanismos moleculares de sinalização e superexpressão de genes (SILVA; ARAÚJO; HENRIQUES, 2017).

Um estudo realizado por Galán-Ladero et al. (2019) relatou que a superexpressão dos genes *CTRG ALS* em *C. tropicalis* possui um papel importante na adesão e formação de biofilmes, além destes, destacam-se os genes *BCR1*, regulador das adesinas e parede celular, e os genes *UME6*, *NRG1*, reguladores transcricionais de dispersão celular (FINKEL; MITCHELL, 2011). Outro fator importante descoberto recentemente, é a adesão interespecie, ou seja, a interação de *C. tropicalis* com outras espécies oferece vantagens ao desenvolvimento e manutenção do biofilme (PATHIRANA et al., 2019).

A capacidade de *C. tropicalis* formar biofilme em superfícies abióticas e bióticas, como por exemplo em células epiteliais do hospedeiro (NEGRI et al., 2012) depende, sobretudo, da aderência, hidrofobicidade da superfície celular (GALÁN-LADERO et al., 2013; GALÁN-LADERO et al., 2019) e pH do meio; este último potencializa a invasão e colonização tecidual quando o ambiente é neutro ou alcalino (FERREIRA et al., 2016).

As etapas de formação do biofilme (Figura 2), dividem-se em: (1) adesão e colonização de levedura na superfície; (2) proliferação de células e formação de microlônias na camada basal; (3) formação de multicamadas com pseudo-hifa e / ou hifa verdadeira com secreção da matriz extracelular exopolimérica; (4) maturação de microcolônias com leveduras e hifas envoltas por matriz extracelular; (5) dispersão de estruturas fúngicas. Além disso, organizam-se em três fases: inicial (0 - 6 horas); intermediária (7 -12 horas) e madura (13 – 48 horas) (GHANNOUM et al., 2015).

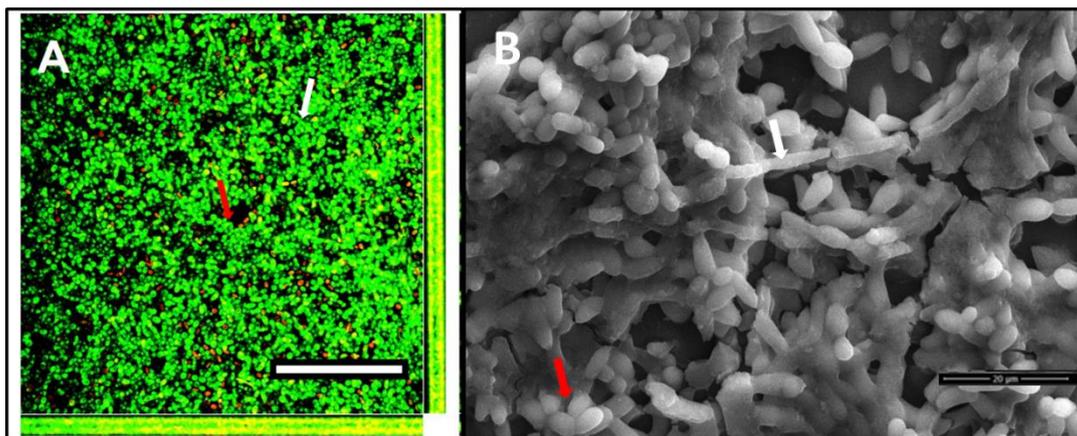
A arquitetura dos biofilmes de *Candida tropicalis*, como demonstrado na figura 3, constitui-se de uma complexa matriz de polissacarídeos com multicamadas compostas de blastoconídios e filamentos metabolicamente ativos (INÁCIO et al., 2019), no qual, após a fase madura as células fúngicas iniciam um novo processo de dispersão e colonização em outros locais (GHANNOUM et al., 2015).



FONTE: LOHSE et al., 2017, com adaptações.

Figura 2. Etapas da formação de biofilme em *Candida* spp.

Legenda: Etapas de formação do biofilme no gênero *Candida*. Adesão (1). Proliferação de células e formação de microcolônia basal (2). Formação de multicamadas de células e matriz exopolimérica (3). Maturação de células envolvidas por matriz extracelular (4). Dispersão de estruturas fúngicas (5).



FONTE: CEMM (2019)

Figura 3. Microscopia confocal de varredura a laser (A) e Microscopia eletrônica de varredura(B) de biofilmes em formação de *Candida tropicalis*. Observa-se uma estrutura complexa composta de blastoconídios (setas vermelhas) e filamentos (setas brancas). Na imagem (A) as células em verde são células viáveis, já as células em vermelho são células mortas. Aumento: 400 x (A), 5.000 x. Espessura : 20 μm (A), 200 μm (B).

Os biofilmes apresentam variações, a depender da espécie, quanto à estrutura e composição da matriz (JAIN et al., 2007). *Candida tropicalis* tem como principal componente da matriz exopolimérica a hexosamina (27 %), além de carboidratos, proteínas, fósforo e ácido urônico, em menor quantidade (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006). Os biofilmes possuem uma complexa organização metabólica e estrutural que mantém a integridade da colônia; ademais, a matriz exopolimérica funciona como uma barreira protetora contra drogas, estressores ambientais, células fagocitárias e outras defesas do hospedeiro (PIERCE et al., 2017).

A dispersão de células dos biofilmes promove a reinfeção no hospedeiro (AKBARI; KJELLERUP, 2015), favorecendo, assim, a intensificação de resistência antifúngica (SILVA et al., 2017) e possibilitando o sucesso no desenvolvimento e persistência das infecções (BORGHI et al., 2015), resultando em importante causa de recorrência da doença (SILVA-DIAS et al., 2015) perfazendo altas taxas de mortalidade (BUJDÁKOVÁ, 2016).

Biofilmes de *Candida tropicalis* têm sido encontrado em dispositivos médicos como cateter de pacientes com câncer (INÁCIO et al., 2019) e em desfibrilador cardioversor, neste último, causando endocardite infecciosa (ALEGRO; ARGENTINE; RUSSELL, 2019; BAUER et al., 2019b). Um estudo realizado num hospital de ensino rural na Índia, relatou infecções ocasionadas por *Candida tropicalis* associadas a estes objetos (DEORUKHKAR; SAINI, 2016); candidíase disseminada, decorrentes da liberação de células de biofilmes formadas em dispositivos hospitalares, tem sido extensivamente documentada (FANNING; MITCHELL, 2012). Vale destacar, que os biofilmes suportam altas concentrações de antifúngicos (DOMINGUEZ; ANDES, 2017), sendo, portanto, um intensificador de resistência antifúngica.

2.4 Tratamento das infecções por Candida

Os antifúngicos utilizados para tratar as infecções causadas por espécies de *Candida* spp. estão divididos em quatro classes principais: azólicos, polienos, equinocandinas e alilaminas; e atuam em diferentes alvos moleculares (PAPPAS et al., 2015). Os azólicos, grupo que inclui os triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol) e imidazólicos (cetaconazol e miconazol) têm como alvo a enzima 14- α -desmetilase (codificada pelo gene *ERG11*), esta enzima atua na síntese do ergosterol, um importante componente da membrana celular fúngica. Os azólicos inibem o crescimento fúngico pela depleção do ergosterol (SIDRIM, ROCHA, 2004).

Os poliênicos, por exemplo, se ligam ao ergosterol e induzem a formação de poros na célula, alterando, portanto, a permeabilidade da membrana celular pelo extravasamento de conteúdo intercelular, além disso, a anfotericina B podem levar ao

acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula fúngica, indução da apoptose e morte celular (BELENKY; CAMACHO; COLLINS, 2013).

As equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina), inibem a glicosiltransferase 1,3- β -D-glucana sintase (*FKS*), gene que codifica a enzima 1,3- β -D-glucano- sintase, molécula essencial à manutenção da parede celular fúngica; já as alilaminas atuam inibindo a enzima esqualeno epoxidase causando diminuição na concentração de ergosterol (DENNING; BROMLEY, 2015).

A terapia para as infecções ocasionadas por fungos do gênero *Candida* é determinada com base no paciente, considerando a intensidade da doença, comorbidades e exposição prévia a algum antifúngico; e com base nas espécies fúngicas envolvidas, visto que, o potencial invasivo, virulência e sensibilidade antifúngica das espécies desse gênero diferem entre si (PAPPAS et al., 2018).

De modo geral, as equinocandinas são as drogas de primeira linha utilizadas para tratar infecções por *Candida* spp., pois, estas apresentam-se mais seguras, eficazes e com interações medicamentosas limitadas (KULLBERG et al., 2018) comparadas aos azólicos e polienos (ANDES et al., 2012). Os azólicos possuem amplo espectro nestas infecções, sendo um medicamento de segunda linha utilizados em casos específicos como infecções no trato urinário, meningite e endoftalmite, nos quais as equinocandinas não são recomendadas, pois estas, não são eliminadas na urina e não atravessam totalmente a barreira hematoencefálica (KULLBERG et al., 2005). Alguns países utilizam o fluconazol como agente antifúngico de primeira linha para tratar pacientes com CI, contudo, sua indicação é ponderada, haja vista os relatos de aumento da resistência antifúngica por estas espécies (ID et al., 2019).

Os polienos comumente utilizados na clínica são a anfotericina B, a nistatina e a natamicina. Enquanto a natamicina e nistatina são utilizadas apenas como agentes

tópicos (CAMPOY; ADRIO, 2017); a anfotericina B é o poliênico mais utilizado no tratamento de infecções sistêmicas, considerada eficaz contra todas as *Candida* spp., com exceção de *Candida lusitanae*; contudo, este polieno possui nefrotoxicidade, além de efeitos adversos graves; portanto, seu uso é recomendado para casos de infecções profundas ou resistência do fungo a outras drogas (PAPPAS et al., 2018),

2.5 Resistência aos antifúngicos

Os protocolos padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ou pelo *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) possibilitam determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das drogas, e assim, classificar os microrganismos como resistentes ou sensíveis aos fármacos com base em pontos de corte pré-estabelecidos (JENSEN et al., 2016; CLSI, 2008a, 2008b). No entanto, esses testes de sensibilidade antifúngica, *in vitro*, para *Candida* spp. são padronizados para células planctônicas, e não para biofilmes.

A resistência antifúngica consiste na perda ou inexistência da sensibilidade do microrganismo a uma determinada droga antifúngica observada em teste de sensibilidade *in vitro* na qual a concentração inibitória mínima do antifúngico excede o ponto de corte de sensibilidade estabelecido para o fungo. A resistência microbiana pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela que existe naturalmente entre os microrganismos que não foram expostos aos fármacos, como *C. krusei* resistentes ao fluconazol, e *C. auris* com CIMs aumentadas para azólicos, equinocandinas e polienos. Já a resistência adquirida, desenvolve-se em fungos previamente sensíveis após exposição às drogas, como por exemplo, o surgimento de cepas resistentes de *C. glabrata* ao serem expostas ao fluconazol, e de *C.*

parapsilosis em regiões onde houve aumento do uso de equinocandinas (LORTHOLARY et al., 2011).

Um estudo global conduzido pelo programa de vigilância antifúngica ARTEMIS DISK, envolvendo quarenta e um países relatou um aumento da resistência ao fluconazol, sobretudo nas espécies de *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. sake*, *C. pelliculosa*, *C. inconspicua*, *C. rugosa* e *C. norvegensis*. As espécies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. lipolytica*, *C. pelliculosa*, *C. Apicola*, *C. haemulonii*, *C. Humicola*, *C. lambica* e *C. ciferrii*, mantiveram-se sensíveis ao voriconazol, com algumas espécies resistentes (< 5,0%) (PFALLER et al., 2010a). A resistência, de células planctônicas do gênero *Candida*, aos antifúngicos da classe dos polienos, como anfotericina B, permanece incomum (KANAFANI; PERFECT, 2008).

A epidemiologia das infecções por *Candida* spp. vem sofrendo alterações, e esta mudança deve-se, sobretudo, ao uso de antifúngicos que têm como consequência a seleção de espécies menos sensíveis (PFALLER et al., 2011; VERGIDIS P, CLANCY CJ, 2016). 1,4% de cepas de *C. albicans* apresentam resistência ao fluconazol, seguidos de *C. parapsilosis* (3,6%) e *C. tropicalis* (4,1%) (PFALLER et al., 2010a). A resistência aos azólicos tem sido relatada também nas espécies *C. ciferrii*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. humicola*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. palmioleophila*, *C. rugosa* e *C. valida* (CHEN et al., 2009).

Nos EUA, cepas de *C. albicans* na forma planctônica possuem uma taxa de 0,5% a 2% de resistência ao fluconazol, já as espécies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* possuem resistência de 2% a 6%, 4% a 9%, e 11% a 13%, respectivamente (CLEVELAND et al., 2012). No entanto, nenhuma espécie tem superado *C. auris* com 93% de resistência ao fluconazol (LOCKHART et al., 2017). *Candida auris* foi relatada

a princípio em 2009, esse patógeno possui resistência intrínseca a múltiplas drogas (SATOH et al., 2009; RHODES et al., 2018).

Estudos têm relatado cepas de *C. krusei* apresentando 78,3% de resistência intrínseca global ao fluconazol, e *C. glabrata* demonstrando uma sensibilidade reduzida, com 15,7% de resistência global (PFALLER et al., 2010a). Resistência adquirida ao fluconazol e equinocandinas tem sido observada em cepas de *C. glabrata* expostas anteriormente a estas drogas, sendo relatada sensibilidade reduzida aos azólicos em isolados previamente expostos a esta classe de compostos (JENSEN et al., 2016).

De modo semelhante, estudos têm demonstrado cepas de *C. tropicalis*, na forma planctônica, apresentando resistência adquirida à equinocandinas (GROSSET et al., 2016; PRISTOV; GHANNOUM, 2019; SFEIR et al., 2020b). Além disso, isolados desta espécie antes considerados sensíveis aos azólicos (ANN CHAI; DENNING; WARN, 2010) tem apresentado aumento de resistência a essa classe de drogas, sobretudo ao fluconazol, itraconazol e voriconazol (CHEW et al., 2017; XISTO et al., 2017; FAN et al., 2017b; GHANNOUM, 2019; HII et al., 2019).

A propagação hematogênica de *C. tropicalis* resistente a fluconazol foi comparada entre indivíduos com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e indivíduos sem DPOC, essa espécie prevaleceu em 53,3 % e 100 % das amostras de sangue e escarro, respectivamente, entre os pacientes com DPOC, contra 12,5 % e 33 % dessas mesmas amostras, respectivamente, em pacientes sem DPOC (BANERJEE, PAMELA; DAS, 2019).

Ademais, estudos realizados por Forastiero et al. (2013) relataram resistência cruzada entre azólicos e anfotericina B frente a células planctônicas de *C. tropicalis*. De modo semelhante, outros estudos têm demonstrado resistência cruzada entre os azólicos frente a cepas desta mesma espécie (CHEN et al., 2019; TEO et al., 2019; HII et al.,

2019). Desse modo, entender os mecanismos subjacentes à resistência antifúngica por cepas de *C. tropicalis* é de suma importância para aprimorar as terapias antifúngicas (ARASTEHFAR et al., 2017).

2.6 Mecanismos de resistência aos antifúngicos

Os mecanismos que podem levar *Candida* spp. a serem resistentes aos azólicos incluem superexpressão de bombas de efluxo e consequente diminuição na concentração de derivados azólicos no meio intracelular; aumento na expressão do gene *ERG11*; modificação na via de síntese do ergosterol após exposição aos azólicos, bem como, diminuição da expressão de genes *ERG3* (produz esterol tóxico no meio intracelular). Vale ressaltar que esses mecanismos podem ocorrer simultaneamente ou de forma isolada (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; TEO et al., 2019).

Barchiesi et al. (2000), pela primeira vez, investigaram os mecanismos que levavam cepas de *C. tropicalis* serem resistentes a azólicos. No estudo, ao induzir resistência *in vitro* ao fluconazol os pesquisadores observaram aumentos de CIMs para fluconazol, itraconazol e terbinafina na cepa de *C. tropicalis* (ATCC 750), sendo detectada superexpressão nos genes *CDR1* e *MDR1*, genes codificadores de bombas de efluxo.

As bombas de efluxo são proteínas da membrana celular fúngica, classificadas em *ATP-binding cassette (ABC)* ou *major facilitator superfamily (MFS)*, que atuam transportando ativamente do meio intracelular para o meio extracelular, entre outras moléculas, alguns antifúngicos, não em quantidades suficientes para causar resistência. Em algumas cepas de *Candida* spp. o aumento na quantidade dessas bombas de efluxo causa diminuição na concentração de moléculas antifúngicas no meio intracelular, acarretando, portanto, resistência nessas leveduras (*MFS*) (AKINS, 2005).

Em *Candida* spp. as bombas de efluxo do grupo ABC são codificadas pelos genes *Candida drug resistance 1* (*CDR1*) e *Candida drug resistance 2* (*CDR2*), essas bombas não apresentam especificidade e utilizam como fonte de energia para bombear drogas e outras moléculas para o meio extracelular a hidrólise do ATP. As bombas de efluxo do grupo MFS, superfamília do principal facilitador, são mais específicas comparadas às do grupo ABC. Entre os membros da MFS o gene *multidrug resistance 1* (*MDR1*) codifica proteínas transportadoras que agem especificamente expulsando o fluconazol, a superexpressão desse gene implica na resistência ao azólico (ALARCO; RAYMOND, 1999; KANAFANI; PERFECT, 2008; BERKOW; LOCKHART, 2017).

Os mecanismos de expressão de ambas as bombas são complexos e envolvem multifatores. O fator de transcrição Tac1 medeia a regulação dos genes *CDR1* e *CDR2* (ZNAIDI et al., 2007); já o fator de transcrição *MDR1* é o regulador central da bomba de efluxo codificada por *MDR1*, portanto, controla a expressão de *MDR1* e medeia a resistência a múltiplas drogas (MORSCHHÄ USER et al., 2007; ZNAIDI et al., 2007).

Um estudo realizado entre 2012 e 2015, no qual avaliou os mecanismos moleculares de resistência aos azólicos detectou superexpressão dos genes *CDR1* e *MDR1* em *C. tropicalis* resistentes (TEO et al., 2019), sendo observado, ainda, que a deleção destes genes ocasionou diminuição de resistência a esses azólicos (TSAO; RAHKHOODAEI; RAYMOND, 2009; TEO et al., 2019). Outro estudo, com isolados desta espécie resistentes à equinocandinas, relatou mutação no gene *FKS* (codifica a enzima beta-glucansintase), na posição S645P (GROSSET et al., 2016); mutações no gene *FKS* desencadeiam maior risco de falha terapêutica (LACKNER et al., 2014).

Jiang et al. (2012), Chew et al. (2017) e Teo et al. (2019), durante seus estudos, identificaram em cepas de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol, mutações no gene *ERG11* nas posições Y132F (substituição de tirosina por fenilalanina) e S154F

(substituição de serina por fenilalanina); essas mutações causaram diminuição da afinidade de azólicos à molécula alvo. Resultados semelhantes foram obtidos por FAN et al. (2019) após estudo realizado em dez hospitais por um período de cinco anos, na China; no estudo, os autores concluíram que apesar da superexpressão dos genes *ERG11*, *CDR1* e *MDR1*, as mutações no gene *ERG11* foram os principais responsáveis pela resistência ao azólico em cepas desta espécie.

Pandey et al. (2020) durante estudos com células planctônicas de *C. tropicalis* resistentes a fluconazol observaram tanto superexpressão nos genes *MDR1*, *ERG11* e *CDR1* dessas cepas, quanto mutações que ocasionaram a substituição dos aminoácidos Ct 10 (Glycine464Serine) e Ct 16 (Tirocina132Phenylalanine; Serine154Phenylalanine), ambas, associadas à resistência ao fluconazol. Da mesma forma, Bizerra et al. (2008) observaram superexpressão nos genes *MDR1* e *ERG11* nas células de biofilme de *C. tropicalis* resistentes a fluconazol.

Já os primeiros relatos de *C. tropicalis* apresentando resistência a derivados poliênicos surgiram na década de 1970. Esses estudos demonstraram que as cepas apresentavam alterações no conteúdo de esteróis da membrana, constituindo pouco ou quase nenhum ergosterol. Forastiero et al. (2013) relataram que a baixa sensibilidade de *C. tropicalis* a anfotericina B está relacionada a deleções ou substituições nos genes *ERG11* ou *ERG3*, visto que esses genes codificam enzimas da via de biossíntese do ergosterol; alterações nesses genes podem causar modificações na estrutura ou redução do ergosterol de membrana, reduzindo a ação dos poliênicos e até azólicos (EDDOUZI et al., 2013).

Estudos demonstraram que *C. tropicalis* resistentes à anfotericina B apresentam modificações na taxa respiratória e no potencial de membrana mitocondrial (MESA-ARANGO et al., 2014). Ademais, Mesa-Arango et al. (2016) reportaram que níveis

elevados de β -1,3-glucano na parede celular do fungo, provavelmente, estão relacionados com a resistência à anfotericina B.

Uma das estratégias que visam superar os mecanismos de resistência que desencadeiam baixa sensibilidade de cepas de *Candida tropicalis* aos antifúngicos comumente utilizados, é a busca por fármacos no qual quando combinados com antifúngicos atuem de modo sinérgico contra estas espécies, resultando, portanto, em alteração do fenótipo de resistência.

2.7 Interações entre fármacos

O aumento de infecções causadas por *Candida* spp., bem como, a resistência ao limitado arsenal de drogas antifúngicas disponíveis têm incentivado a busca por novas estratégias terapêuticas (LIU et al., 2016a). A combinação de drogas tem sido considerada promissora para combater infecções fúngicas invasivas (SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017). A combinação de dois compostos em um ensaio de sensibilidade *in vitro* frente a um determinado microrganismo, pode resultar em efeito sinérgico, indiferente ou antagônico (ODDS, 2003).

Para tanto, é necessário determinar a concentração inibitória mínima dos diferentes fármacos em associação, e isto pode ser obtido pelos métodos de cinética de morte (do inglês *time-kill*), E-test (do inglês *Epsilometer Strip Test*), e método de *checkerboard*, este último tem sido o mais comumente utilizado (ODDS, 2003).

Para o método de *checkerboard* utilizam-se diluições seriadas de duas drogas associadas. A forma de combinação dessas drogas deu origem ao nome da técnica: tabuleiro de xadrez (O'SHAUGHNESSY et al., 2006). Esse método é utilizado interpretando-se o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) (do inglês *Fractional Inhibitory Concentration Index*). Desse modo, o método de *checkerboard*

determina a concentração inibitória fracionada (CIF) de cada combinação de droga testada, definida pela relação entre o CIM da droga usada em combinação e o CIM da mesma droga usada isoladamente, onde o ICIF é considerado a soma das CIFs de cada droga testada (ODDS, 2003). Segue a equação para o cálculo da soma dos CIFs:

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_{C_1} + \text{CIF}_{C_2} = \frac{C_{C_1}}{\text{CIM}_{C_1}} + \frac{C_{C_2}}{\text{CIM}_{C_2}}$$

Nesta, a CIM_{C_1} e CIM_{C_2} constituem CIMs da droga 1 e droga 2, respectivamente, testadas de forma isolada; C_{C_1} é a CIM da droga 1 testada em combinação com a droga 2; C_{C_2} é a CIM da droga 2 testada em combinação com a droga 1 (O'SHAUGHNESSY et al., 2006).

ODDS (2003), com o propósito de manter uma padronização da interpretação dos resultados sugeriu uma classificação para a interação das drogas com base nos intervalos de ICIF obtidos. Assim, as interações foram consideradas sinérgicas se $\text{ICIF} \leq 0,5$; indiferentes se $0,5 < \text{ICIF} < 4$ e antagônica se $\text{ICIF} \geq 4$.

Desse modo, pode-se considerar que o efeito sinérgico ocorre quando a combinação de duas drogas atuam significativamente melhor do que a resposta de cada uma delas isoladamente. Já a interação indiferente é aquela na qual o resultado da combinação de duas drogas é semelhante ao resultado da droga de forma isolada. A interação antagônica é obtida quando o resultado das duas drogas combinadas é significativamente pior do que a resposta de cada uma delas utilizadas separadamente (ODDS, 2003).

Embora o método de *checkerboard* seja uma técnica originada, a princípio, para estudos com células planctônicas, pesquisas recentes a utilizam para análise dos efeitos

da combinação de drogas frente a biofilmes (MARCOS-ZAMBRANO et al., 2016) (KRAUSE et al., 2017).

Vale ressaltar, que as combinações sinérgicas podem proporcionar diversas vantagens terapêuticas, tais como: potencializar a eficácia da ação terapêutica de alguns fármacos; reduzir a dose da droga amenizando sua toxicidade, além de reduzir o surgimento de resistência às drogas. Assim sendo, a combinação de drogas com diferentes mecanismos de ação poderá agir de modo mais eficaz contra os microrganismos (CHOU, 2006).

Diversos compostos utilizados comumente na clínica têm sido testados, *in vitro*, em combinação com outros fármacos a fim de potencializar os efeitos de antifúngicos sobre cepas de *Candida* spp. resistentes (DONGLIANG et al., 2019). A combinação de azólicos com diversos outros fármacos demonstrando potente sinergismo vem sendo documentado há décadas (MARCHETTI et al., 2000).

Em 1991, estudos demonstraram que a combinação *in vitro* de FLC, cetoconazol e tioconazol com o antibiótico nikkomycin X / Z frente às espécies resistentes do gênero *Candida* resultou em efeito sinérgico (MILEWSKI; MIGNINI; BOROWSKI, 1991). A combinação da molécula de ácido cis-2-decenóico (BDSF) com FLC ou ITR frente a cepas de *Candida albicans* resistentes também apresentaram sinergismo; além disso, os ensaios de qRT-PCR demonstraram que a interação entre essas drogas causou inibição na expressão dos genes *CDR1* e *MDR1*; os genes *ERG1*, *ERG11* e *UPC2* estavam expressos em níveis baixos, possivelmente, as combinações entre essas moléculas e os azólicos não influenciaram nos níveis de ergosterol (DONGLIANG et al., 2019).

Diversos estudos têm relatado a ocorrência de efeitos sinérgicos decorrentes da combinação de antifúngicos azólicos com lactoferrina e seus peptídeos frente a cepas de

Candida spp. Wakabayashi et al. (1996), por exemplo, pode observar que a combinação destes compostos frente a células planctônicas de *Candida albicans* resultou em sinergismo. De modo semelhante, estudos realizados por Lupetti et al. (2003) demonstraram que a combinação de fluconazol com lactoferrina humana frente á células planctônicas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* resistentes à fluconazol resultou em sinergismo.

A fluvastatina, um medicamento utilizado para reduzir os níveis de colesterol, quando combinada com fluconazol ou itraconazol frente a células planctônicas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* resistentes a fluconazol, também demonstrou sinergismo (CHIN; WEITZMAN; DELLA-LATTA, 1997). Barchiesi et al.(1997) relataram a existência de interação sinérgica, desta vez, na combinação de terbinafina com fluconazol ou itraconazol frente a cepas de *C. albicans* com sensibilidade reduzida aos azólicos.

Outros estudos relataram efeito sinérgico *in vitro* do fluconazol combinado com cloreto de berberina (QUAN et al., 2006) ou honokiol, um composto extraído de plantas do gênero *Magnolia* (JIN et al., 2010) ou amiodarona frente a células planctônicas de *C. albicans* resistentes a fluconazol (GUO et al., 2008).

A combinação entre diferentes compostos e antifúngicos frente a cepas de *Candida tropicalis* resistentes a azólicos tem sido investigada, a fim de obter alteração do fenótipo de resistência nesta espécie (Quadro 1). Dentre as diversas substâncias analisadas destacam-se os extratos de plantas, bem como uma diversidade de drogas não antifúngicas.

Em 2012, um estudo desenvolvido na China utilizando extratos da medicina tradicional do país, demonstrou que o extrato pseudolarico B quando combinado com FLC age sinérgicamente frente a *C. tropicalis* (YAN et al., 2012). A associação de

outros compostos frente a esta espécie também resultou em efeitos sinérgicos, como a combinação de FLC ou cetoconazol com alicina, um composto derivado do alho (KHODAVANDI et al., 2009), e de glabridina, um isoflavano isolado do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*). A combinação entre glabridina e FLC causou dano ao envelope celular, o qual pode ter contribuído para o efeito sinérgico observado (LIU et al., 2014).

O peptídeo *tionina-like peptide*, semelhante a família de peptídeos antimicrobianos de plantas, quando combinado com FLC frente a células planctônicas de *C. tropicalis* resistentes apresentou atividade antifúngica causando permeabilização da membrana plasmática e indução de estresse oxidativo; além disso, a interação destes compostos resultou em sinergismo (TAVEIRA et al., 2016). A combinação entre FLC e berberina, um alcaloide natural sintetizado por algumas plantas como a uva-espina (*Berberis Vulgaris*), causou redução na expressão dos genes *ERG11*, *CDR1* e *MDR1* em células planctônicas *C. tropicalis* resistentes sendo relatado também a ocorrência de sinergismo (SHI et al., 2017).

O potencial efeito antifúngico sobre cepas de *C. tropicalis* tem sido demonstrado pelos óleos essenciais (OEs) o qual incentivou pesquisadores a utilizá-los em combinação com os antifúngicos (SOUZA et al., 2016; TULLIO et al., 2019 ; SAHAL et al., 2020). O óleo essencial de *Hymenaea rubriflora* (EOHr), por exemplo, quando combinado com FLC apresentou efeito sinérgico contra cepas resistentes de *C. tropicalis* na forma planctônica (DA SILVA et al., 2020).

O antifúngico terbinafina quando combinado com FLC ou VRC também apresentou sinergismo frente a células planctônicas de *C. tropicalis* resistentes (CANTÓN et al., 2005). Resultados semelhantes foram observados nas combinações de medicamentos não antifúngicos com antifúngicos como: etomidato com FLC ou ITR (DO AV SÁ et al., 2019) e *Thymus vulgaris* e timol com FLC (JAFRI; AHMAD, 2020).

Ademais, atividade anti-biofilme contra essa levedura tem sido relatada nas combinações de anfotericina B com tirosol (SHANMUGHAPRIYA et al., 2014), bem como FLC ou ITRC com etomidato (DO AV SÁ et al., 2019).

A amiodarona, um medicamento utilizado para tratar fibrilação atrial em pacientes com arritmia, quando combinada com FLC frente a células planctônicas de *C.tropicalis* resistentes resultou em sinergismo. Para os autores essa interação ocorreu, provavelmente, devido as alterações na integridade da membrana celular da levedura e geração de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, e danos ao DNA que levaram à morte celular por apoptose (DA SILVA et al., 2013).

Outros fármacos têm apresentado sinergismo com azólicos frente a células planctônicas de *C. tropicalis* resistentes, são eles: ibuprofeno, um anti-inflamatório não esteróide que age inibindo bombas de efluxo (SHARMA et al., 2015) e cloroquina, uma droga utilizada para tratar a malária (LI et al., 2015).

Jia et al. (2019) analisaram os possíveis danos fúngicos provenientes das interações sinérgicas entre FLC e a geldanamicina, antibiótico antineoplásico da benzoquinona isolado da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, com potente atividade antifúngica sobre cepas de *C. tropicalis* resistentes a azóis e AMB. Os autores demonstraram que esta interação medicamentosa causou diminuição na taxa de crescimento e sobrevida dessa levedura, sendo observada despolarização mitocondrial, interrupção da integridade da membrana plasmática e células multinucleadas.

Quadro 1. Efeito sinérgico da combinação de compostos com antifúngicos frente a cepas de *Candida tropicalis*.

Compostos combinados	Forma	Referência
Fluconazol + lactoferrina	Planctônica	LUPETTI ET AL. (2003)
Fluconazol /Itraconazol + fluvastatina	Planctônica	CHIN; WEITZMAN; DELLA-LATTA, 1997
Fluconazol + pseudolarico B	Planctônica	YAN et al., 2012
Fluconazol/ cetoconazol + alicina	Planctônica	KHODAVANDI et al., 2009
Fluconazol/ cetoconazol + glabridina	Planctônica	LIU et al ., 2014
Fluconazol + <i>tionina-like peptide</i>	Planctônica	TAVEIRA et al., 2016
Fluconazol + berberina	Planctônica	SHI et al., 2017
Fluconazol + <i>Hymenaea rubriflora</i> (EOHr)	Planctônica	DA SILVA et al., 2020
Fluconazol / Voriconazol + terbinafina	Planctônica	CANTÓN et al., 2005
Fluconazol / Itraconazol + etomidato	Planctônica	DO AV SÁ et al., 2019
Fluconazol + <i>Thymus vulgaris</i> / timol	Planctônica	JAFRI; AHMAD, 2020
Fluconazol / Itraconazol + etomidato	Biofilme	DO AV SÁ et al., 2019
Anfotericina B + tirosol	Biofilme	SHANMUGHAPRIYA et al., 2014
Fluconazol + amiodarona	Planctônica	DA SILVA et al., 2013
Fluconazol + geldanamicina	Planctônica	JIA et al., 2019

FONTE: BRASIL, J.A. (2020)

2.8 Diclofenaco

O diclofenaco (Ácido 2- [2- (2,6-dicloroanilino) fenil] acético), introduzido pela primeira vez em 1974, no Japão, é um anti-inflamatório não-esteróide (AINE) sintético derivado do ácido benzenoacético que possui ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética, sendo utilizado para tratar dores agudas ou crônicas (GAN, 2010). O mecanismo de ação desse AINE consiste em se ligar a duas enzimas: ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2), bloqueando a conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (VANE; BOTTING, 1987).

O ácido araquidônico é um ácido graxo que faz parte da estrutura da membrana celular, e está ligado aos fosfolípidios (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). A cascata do AA é fundamental para a atividade biológica da célula e exerce um importante papel na morfogênese e crescimento fúngico (LIU et al., 2016b). O AA é o principal precursor dos eicosanóides e pode ser liberado a partir de fosfolípidios da membrana (DENNIS et al., 2011).

Este ácido araquidônico, uma vez metabolizado, pode se converter em vários tipos de eicosanóides, biologicamente ativos (CLARIA, 2005; PETERS-GOLDEN; HENDERSON, 2007; SPECTOR, 2009). A infecção por *C. albicans* em tecidos humanos causa a liberação do ácido araquidônico, eicosanóides e outros mediadores inflamatórios pelas células hospedeiras. Além disso, essa levedura produz e responde à prostaglandinas imunomoduladores, estas moléculas revelam-se importantes fatores de virulência com implicações na compreensão dos mecanismos de infecção fúngica (NOVERR et al., 2001).

As prostaglandinas de *Candida albicans* são ácidos graxos poliinsaturados biologicamente ativos em células de mamíferos, e com importantes funções de sinalização e imunomodulação (FUNK, 2001). As prostaglandinas podem ser

produzidas tanto por células planctônicas quanto por biofilmes de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (ALEM; DOUGLAS, 2005; GRÓZER et al., 2015). Em células sesséis essas moléculas estão em maior quantidade (ALEM; DOUGLAS, 2005). Estudos realizados por ELLS et al. (2011) demonstraram que as prostaglandinas aumentam significativamente a produção do tubo germinativo em *C. albicans* e *C. dubliniensis*. O aumento dessas prostaglandinas durante a infecção por leveduras do gênero *Candida* pode ser um fator essencial na colonização e desenvolvimento da infecção fúngica (ALEM; DOUGLAS, 2005).

Estudos têm relatado que o diclofenaco demonstrou potente atividade antifúngica frente biofilmes de *Aspergillus fumigatus* (NARGESI; REZAIE, 2018), bem como, contra cepas de *C. albicans* resistentes na forma planctônica e de biofilme(ASHRAF et al., 2015; RUSU et al., 2017). Ademais, Yucesoy; Oktem e Gulay (2000) relataram que a combinação desse AINE com FLC frente células planctônicas de *C. albicans* sensíveis resultou em sinergismo. No entanto, Ahangarkani et al (2019) detectaram efeito indiferente da combinação de DIC com FLC contra células planctônicas de *C. tropicalis* resistentes. Contudo, não há relatos sobre a combinação de DIC com antifúngicos frente a biofilmes de *C. tropicalis* resistentes e sensíveis.

Sabe-se que os efeitos do diclofenaco no metabolismo da via do (AA) e na via da lipoxigenase incluem inibição dessas vias, com consequente redução da produção de leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano, que são mediadores inflamatórios da célula (KU; WSVARY; CASH, 1975; KU et al., 1985; KU et al., 1986). Ademais, Alem e Douglas (2005) reportaram que o diclofenaco reduz os níveis de prostaglandinas em *C. albicans*, isto pode explicar a inibição da viabilidade de células planctônicas (ELENA et al., 2009), da transição dimórfica (filamentação) (RASHKI GHALEHNOO et al., 2010) e da formação de tubo germinativo por este

AINE (ELENA et al., 2009; ABDELMEGEED; SHAABAN, 2013; RUSU et al., 2014).

BINK et al. (2012b) observaram que o diclofenaco potencializa a atividade antifúngica, *in vivo*, da caspofungina contra biofilmes de *C. albicans*. Ademais, imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que o diclofenaco a 1 mM causa degradação celular em *C. albicans*, observando-se alterações na parede celular e plasmalema; lise das estruturas citoplasmáticas, como o vacúolo, mitocôndrias e núcleo, além de numerosos grânulos de glicogênio caracterizando a formação de células senescentes ou necróticas (ELENA; AVRAM; VASSU, 2017).

Além de alterar a ultraestrutura celular de *C. albicans*, o diclofenaco nas concentração de 1 mM também inibe a adesão e formação de biofilmes nesta espécie (ABDELMEGEED; SHAABAN, 2013; ASHRAF et al., 2015). Observou-se, ainda, sinergismo na combinação deste anti-inflamatório com fluconazol frente biofilmes de *C. albicans* resistentes (ABDELMEGEED; SHAABAN, 2013) e *Trichosporon asahii* (YANG et al., 2016); este tipo de interação, sinérgica, foi encontrado também na associação do diclofenaco com a equinocandina anidulafungina (ANF) contra biofilmes de *C. albicans*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata* (ROSATO et al., 2016).

O reposicionamento de drogas tem se mostrado uma estratégia promissora para superar a resistência antifúngica contra leveduras do gênero *Candida* (MORAES; FERREIRA-PEREIRA, 2019). Além disso, as combinações de drogas com efeitos sinérgicos podem proporcionar benefícios terapêuticos tais como: melhor eficácia do fármaco; redução da dosagem da droga, além de redução do surgimento de resistência medicamentosa. Desse modo, a utilização de drogas com diferentes mecanismos de ação, podem apresentar melhor eficácia contra microrganismos, uma vez que poderão atingir vários alvos (YIN et al., 2014).

Neste contexto, diante do aumento no surgimento de cepas de *C. tropicalis* resistentes aos antifúngicos, e considerando a capacidade desta espécie em formar biofilmes, sobretudo, em dispositivos médicos o qual tem sido comumente associado à diminuição da sensibilidade antifúngica; além disso, considerando o potencial antifúngico do DIC contra leveduras patogênicas, conforme descrito na literatura, surge a iniciativa de investigar a combinação entre DIC e antifúngicos frente a células planctônicas e biofilmes de *C. tropicalis* com vistas a obter sinergismo e contribuir, possivelmente, na determinação da eficácia de combinação destes fármacos frente cepas resistentes.

3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- O diclofenaco de sódio possui efeito antifúngico, *in vitro*, contra cepas clínicas de *C. tropicalis* sob crescimento planctônico e biofilme;
- O diclofenaco quando combinado com os antifúngicos fluconazol, voriconazol e anfotericina B promove efeito sinérgico, *in vitro*, frente às cepas de *C. tropicalis* humanas sob crescimento planctônico e de biofilme;
- O diclofenaco combinado com fluconazol causa alterações na estrutura do biofilme de *C. tropicalis*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos, *in vitro*, do diclofenaco isolado e combinado aos antifúngicos fluconazol, voriconazol e anfotericina B frente a cepas de *C. tropicalis* humanas sob crescimento planctônico e de biofilmes.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar a concentração inibitória mínima do diclofenaco e dos antifúngicos fluconazol, voriconazol e anfotericina B , *in vitro*, frente as cepas de *C. tropicalis*;
2. Avaliar os efeitos das combinações entre o diclofenaco e o fluconazol, voriconazol e anfotericina B frente as células planctônica e biofilmes de *C. tropicalis* ;
3. Analisar biofilmes em formação de *C. tropicalis* tratados com diclofenaco isolado e em associação com o fluconazol utilizando microscopia eletrônica de varredura e confocal.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de estudo

As pesquisas foram realizadas no laboratório Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará (UFC), com participação da Central analítica da UFC para obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

5.2 Microrganismos

Neste estudo foram utilizadas 09 cepas clínicas de *Candida tropicalis* (Tabela 1) obtidas da coleção de cultura do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), e 01 ATCC 750.

Tabela 1. Códigos e espécime clínico de isolamento das cepas de *Candida tropicalis* utilizadas

Cepa	Espécime clínico
CEMM- 03-6-075	Urina
CEMM- 03-6-077	Urina
CEMM- 03-6-079	Urina
CEMM- 03-6-082	Urina
CEMM- 03-6-073	Secreção de ferida
CEMM- 03-6-066	Aspirado traqueal
CEMM- 03-6-067	Aspirado traqueal
CEMM- 03-6-071	Lavado brônquio alveolar
CEMM- 01-2-055	Sangue
ATCC 750	Pulmonar

As cepas foram recuperadas da micoteca e submetidas a testes purificação e identificação utilizando ChromoAgar *Candida*TM. Em seguida foram cultivados em meio ágar batata dextrose (PDA) (Himedia, Índia) e incubados à 35 °C, durante 24 horas.

5.3 Drogas

Os antifúngicos fluconazol (FLC; Pfizer Pharmaceuticals, EUA), voriconazol (VRC; Pfizer, Brasil) e anfotericina B (AMB; Sigma Chemical Corporation, EUA) foram preparados na concentração de 6.400 µg/mL, 1.600 µg/mL e 1.600 µg/mL, respectivamente, em dimetilsulfóxido (DMSO), conforme protocolo M27-S4 padronizado pelo CLSI (CLSI, 2012). O Diclofenaco de sódio (Novartis Biociências, São Paulo, Brasil) foi preparado conforme recomendações do fabricante em água destilada estéril a uma concentração estoque de 25.000 µg/mL. As drogas foram estocadas a -20 °C e diluídas no momento de uso em meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co., EUA), tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico (MOPS, Sigma Chemical Co., EUA)

5.4 Sensibilidade antifúngica

Os ensaios de sensibilidade para determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para diclofenaco, fluconazol, voriconazol e anfotericina B contra células planctônicas de *C. tropicalis* foram realizados por microdiluição em caldo, conforme descrito no documento M27-A3 (CLSI 2008 b), com adaptações. Os inóculos foram preparados em solução salina estéril (0,9%) e a suspensão obtida foi ajustada à turbidez 0,5 na escala de McFarland. Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída nas

proporções 1:50 e 1:20 em meio RPMI para obtenção de um inóculo apresentando concentração final de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/mL. Alíquotas de 100 µL do inóculo foram adicionadas às placas de cultura de 96 poços já contendo 100 µL de RPMI-1640 suplementado com as drogas, distribuídas em diluições seriadas. As drogas foram testadas em concentrações com intervalos que variaram de 0,25 a 256 µg/mL para FLC, de 0,0625 a 128 µg/mL para VRC, de 0,03125 a 16 µg/mL para AMB e de 128 a 4096 µg/mL para diclofenaco. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Para anfotericina B e diclofenaco a CIM foi definida como a menor concentração de fármaco capaz de inibir 100% do crescimento fúngico, enquanto para fluconazol e voriconazol, a CIM foi definida como a menor concentração de fármaco capaz de inibir 50% do crescimento fúngico, quando comparado ao controle de crescimento sem drogas. Todos os isolados foram testados em duplicata. Isolados com CIM $\geq 1,0$ µg / ml, $\geq 8,0$ µg / ml foram considerados resistentes ao voriconazol e fluconazol, respectivamente (CLSI 2012). A concentração fungicida mínima (CFM) de DIC foi determinada semeando-se o conteúdo dos poços que não apresentavam crescimento fúngico visível em tubos de ágar batata dextrose. Após 24 h de incubação a 35 °C, a CFM foi determinada como a menor concentração da droga que reduziu em 99,9% o inóculo fúngico inicial (CANTÓN et al., 2004). As cepas *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram usadas como controle de qualidade para cada teste.

5.5 Interação do diclofenaco com antifúngicos sobre células planctônicas

A avaliação das combinações entre o diclofenaco e os antifúngicos fluconazol, voriconazol e anfotericina B sobre células planctônicas de *C. tropicalis* foi realizada empregando-se o método de microdiluição em caldo em tabuleiro de xadrez (*checkerboard*) descrito por Chatzimoschou et al. (2011). Foram testadas combinações de fluconazol (0,0625-128 µg / mL), voriconazol (0,0625 a 64 µg / mL) e anfotericina B

(0,015625 a 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$) com diclofenaco (8-512 $\mu\text{g} / \text{mL}$), adicionando 50 μL de cada concentração de diclofenaco com 50 μL de cada concentração de agentes antifúngicos. As microplacas foram incubadas a 35 ° C por 24 h e as CIMs dos fármacos combinados foram determinadas pelo cálculo da menor concentração de fármacos capazes de inibir 50% do crescimento fúngico para FLC e VRC e 100% para AMB e DIC. Os valores de CIM obtidos por leitura visual e espectrofotometria de 630 nm foram utilizados para determinar a concentração inibitória fracionária (FICI). As interações foram definidas como sinérgicas quando $FICI \leq 0,5$, indiferentes quando $0,5 < FICI < 4$ e antagônicas quando $FICI \geq 4$ (ODDS, 2003).

5.6 Análise da combinação de antifúngicos e diclofenaco contra biofilmes em formação

Para avaliar as interações entre o diclofenaco e os antifúngicos contra biofilmes de três linhagens de *C. tropicalis* (CEPA 03-6-079, CEPA 03-6-082 e CEPA 03-6-067) utilizou-se o método de microdiluição em caldo descrito por Brilhante et al. (2016). Para tanto, o inóculo foi previamente preparado em meio RPMI 1640 e ajustado para a concentração de 1×10^6 células / mL; em seguida, alíquotas contendo 100 μL do inóculo foram transferidas para placas de poliestireno com 96 poços contendo 50 μL de cada concentração de diclofenaco e 50 μL de cada concentração dos demais antifúngicos. As drogas foram combinadas nas seguintes concentrações: diclofenaco (256 - 2048 $\mu\text{g} / \text{mL}$), FCL (32 - 512 $\mu\text{g} / \text{mL}$), VRC (16 - 256 $\mu\text{g} / \text{mL}$) e AMB (0,25 - 4 $\mu\text{g} / \text{mL}$). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após o período, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS-Tween (0,05% de Tween 20 em PBS). O biofilme foi quantificado por ensaios de redução de XTT (Sigma Chemical Corporation, EUA), conforme descrito por Brilhante et al.

(2016). Para esse fim, alíquotas de 120 μL da solução de XTT-menadiona [1 mg / mL de XTT e 1 mM de menadiona (Sigma Chemical Co., EUA)] foram preparadas em PBS e filtradas através de uma membrana de 0,22 μM , e em seguida adicionadas aos poços; as placas foram incubadas protegidas da luz por 3 horas a 35 ° C. Após esse período, 100 μL da solução XTT foram transferidos para uma nova placa e foi feita a leitura espectrofotométrica a 492 nm. Os valores de CIMB obtidos foram utilizados para determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF); a concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 50% (CIMB50) da atividade metabólica do biofilme para FLC, VRC e DIC e 90% (CIMB90) para AMB, quando comparada a atividade metabólica do crescimento livre de drogas (VALENTIN et al., 2012). Combinações com $\text{ICIF} \leq 0,5$ foram consideradas sinérgicos, para aqueles com $0,5 < \text{ICIF} < 4$ foram considerados indiferentes e apenas aqueles com $\text{ICIF} > 4$ foram classificados como antagônicos (ODDS, 2003).

5.7 Microscopia eletrônica de varredura de biofilme em formação

A interação entre diclofenaco e fluconazol contra biofilmes de 01 cepa de *C. tropicalis* (CEMM 03-6-067) foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de acordo com Wang et al. (2009), com modificações. Os biofilmes foram formados diretamente nas lâminas ThermanoxTM utilizando placas de cultura de 12 poços. Com base nos resultados obtidos no teste de interação os biofilmes foram expostos às concentrações de fluconazol (64 $\mu\text{g} / \text{mL}$), fluconazol / diclofenaco (64 $\mu\text{g} / \text{mL} / 512 \mu\text{g} / \text{mL}$) e diclofenaco (512 $\mu\text{g} / \text{mL}$). O controle (não tratado) foi preparado apenas em RPMI 1640. Após 24 h de crescimento a 37 ° C após 24 h de crescimento a 37 ° C, as lâminas foram lavadas duas vezes com tampão de cacodilato (0,15 M). Os biofilmes foram então cobertos com glutaraldeído (2,5% em tampão cacodilato 0,15 M)

e incubados a 4 ° C durante a noite. Após a incubação, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cacodilato por 5 minutos e desidratados em uma concentração crescente de etanol (50, 70, 80, 95 e 100%) duas vezes, por 10 minutos cada concentração. Os biofilmes foram secos à temperatura ambiente e cobertas com hexametildisilazano (HMDS) por 30 minutos. O HDMS foi removido e os biofilmes foram secos durante a noite, revestidos com ouro de 10 nm (Emitech Q150T) e observadas com um microscópio eletrônico de varredura FEI Inspect S50, no modo de alto vácuo de 15 kV.

5.8 Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) de biofilme em formação

Os biofilmes de 01 cepa de *C. tropicalis* (CEMM 03-6-067) foram analisados por MCVL, de acordo com Brilhante et al. (2016). Os biofilmes foram formados diretamente nas lâminas de Thermanox™, conforme descrito na seção anterior (MEV). Para tanto, as amostras foram analisadas nas concentrações de FLC (64 µg / mL), FLC / diclofenaco (64 µg / mL e 512 µg / mL) e diclofenaco (512 µg / mL), além do controle (sem drogas). Os biofilmes foram incubados por mais 24 horas a 35 ° C. Após o período de incubação, as lâminas contendo o biofilme foram corados com fluorescente *Live / Dead* (Invitrogen TM151). Posteriormente, as lâminas foram avaliadas usando um microscópio confocal (Nikon C2), a 488 nm para a detecção do corante fluorescente SYTO9 (células vivas) e a 561 nm para a detecção de iodeto de propídio (células mortas).

5.9 Análise estatística

Para as análises realizadas foi utilizada a variável Concentração Inibitória Mínima (MIC). Para os dados que apresentaram simetria e variâncias semelhantes, foi

utilizado o teste t de Student, já nas comparações em que os dados demonstraram assimetria foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Em todas as situações, o nível de significância máximo, adotado para conclusões afirmativas, foi de 95 % ($p < 0,05$).

6.RESULTADOS

6.1 Sensibilidade antifúngica

Os valores de CIM determinados para o diclofenaco e os antifúngicos contra 10 cepas de *Candida tropicalis* estão demonstrados na Tabela 2. O diclofenaco apresentou CIM de 1024 µg/m para todos os isolados testados. Quanto aos antifúngicos FLC, VRC e AMB, as CIM exibiram variações, com FLC apresentando CIM de 0,25 a 128 µg/mL, com 5 /10 cepas resistentes; VRC com CIM de 0,0625 a 64 µg/mL e 6 /10 cepas resistentes, e AMB com CIM de 0,125 a 1 µg/mL.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima de diclofenaco, fluconazol, voriconazol e anfotericina B frente a cepas planctônicas de *Candida tropicalis*.

<i>Candida tropicalis</i> (10)	MIC (µg/mL)			
	Isoladas			
	DIC	FLC	VRC	AMB
CEMM 03-6-079 ^R	1024	64	16	1
CEMM 03-6-077 ^R	1024	64	16	0,5
CEMM 03-6-067 ^R	1024	128	16	0,5
CEMM 03-6-073 ^R	1024	128	16	0,5
CEMM 03-6-066 ^R	1024	16	4	0,125
CEMM 01-2-055	1024	2	0,25	0,5
CEMM 03-6-071	1024	1	0,125	0,125
CEMM 03-6-082 ^R	1024	0,5	64	0,25
CEMM 03-6-075	1024	0,25	0,125	1
ATCC 750	1024	1	0,0625	0,25

AMB: Anfotericina B. CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica. DIC: diclofenaco. FLC: fluconazol. VRC: Voriconazol. ^R Resistente. Ponto de corte: CIM ≥ 1,0 µg / ml (VRC) ≥ 8,0 µg / ml (FLC).

6.2 Combinação de drogas frente células planctônicas de *Candida tropicalis*

As combinações entre o diclofenaco e os antifúngicos contra cepas de *C. tropicalis* humanas apresentaram interações sinérgicas ($ICIF \leq 0,5$) e indiferentes ($ICIF = 0,5 < ICIF < 4$), sem nenhuma interação antagônica ($FICI \geq 4$) (Tabela 3). As leituras utilizando espectrofotômetro confirmam os resultados (Figura 4). O diclofenaco reduziu as CIMs do fluconazol de 8 a 32 vezes, e do voriconazol de 16 a 32 vezes contra cepas resistentes a azólicos, apresentando, portanto, sinergismo. No entanto, nas cepas de *C. tropicalis* sensíveis a azólicos, a combinação de drogas apresentou interações tidas como indiferentes, embora tenha sido observadas reduções das CIMs em 0,5 vezes para o FLC e de 0,5 a 2 vezes para VRC. As combinações entre DIC e AMB apresentaram interações sinérgicas ($ICIF \leq 0,5$) em 2/10 cepas e interações indiferentes ($ICIF = 0,5 < ICIF < 4$) em 8/10 cepas, com redução das CIMs em 4 vezes. Estatisticamente, na comparação droga isolada *versus* droga combinada, o DIC apresentou redução na CIM quando combinado com FLC, VRC ou AMB, independente de resistência. O FLC quando combinado com DIC apresentou redução da CIM frente a cepas resistentes ($p=0,0199$), não sendo verificadas diferenças significativas ($p=0,0781$) quando consideradas todas as cepas. Já o VRC, quando combinado com DIC, apresentou reduções da CIM tanto frente a cepas resistentes ($p=0,0313$), quanto em todas as cepas testadas ($p=0,0352$), comparado à droga testada isoladamente. Os valores estatísticos da CIM para AMB não indicaram reduções significativa na comparação droga isolada *versus* droga combinada. Quanto aos valores de ICIF observados verificou-se ICIF de 0,039 a 2,015 para DIC/FLC; 0,019 a 2,015 DIC / VRC e 0,265 a 2,007 para DIC / AMB.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima de diclofenaco, fluconazol, voriconazol e anfotericina B combinados, e índice de concentração inibitória fracionada frente a células planctônicas das espécies de *Candida tropicalis*.

<i>Candida tropicalis</i> (10)	MIC (µg/mL)			Índice de concentração inibitória fracionária		
	Combinadas			DIC + FLU	DIC + VRC	DIC + AMB
	DIC/FLU	DIC/VRC	DIC/AMB			
CEMM 03-6-079	8 / 2	16/ 0,0625	8 / 0,5	0,039 ^S	0,019 ^S	0,507 ^I
CEMM 03-6-077	16 / 2	16/ 0,5	8 / 0,5	0,046 ^S	0,046 ^S	1,007 ^I
CEMM 03-6-067	1/ 8	16/ 0,25	8 / 0,5	0,063 ^S	0,031 ^S	1, 007 ^I
CEMM 03-6-073	1/ 8	16/ 0,25	8 / 0,5	0,063 ^S	0,031 ^S	1,007 ^I
CEMM 03-6-066	32 / 2	32 / 0,125	8 / 0,25	0,156 ^S	0,062 ^S	2,007 ^I
CEMM 01-2-055	8/ 2	8 / 0,125	16 / 0,5	1,007 ^I	0,515 ^I	1,031 ^I
CEMM 03-6-071	8 / 1	8 / 0,25	8 / 0,0315	1,007 ^I	2,015 ^I	0,267 ^S
CEMM 03-6-082	8 / 1	32 / 2	8 / 0,5	2,007 ^I	0,062 ^S	2,007 ^I
CEMM 03-6-075	16 / 05	8 / 0,25	16 / 0,25	2,015 ^I	2,007 ^I	0,265 ^S
ATCC 750	8 / 1	8 / 0,125	8 / 0,25	1,007 ^I	2,007 ^I	1,007 ^I

AMB: Anfotericina B. CEMM: Centro Especializado em Micologia Médica. DIC: diclofenaco.FLC: fluconazol. I: Indiferença. S: sinergismo.VRC: Voriconazol.

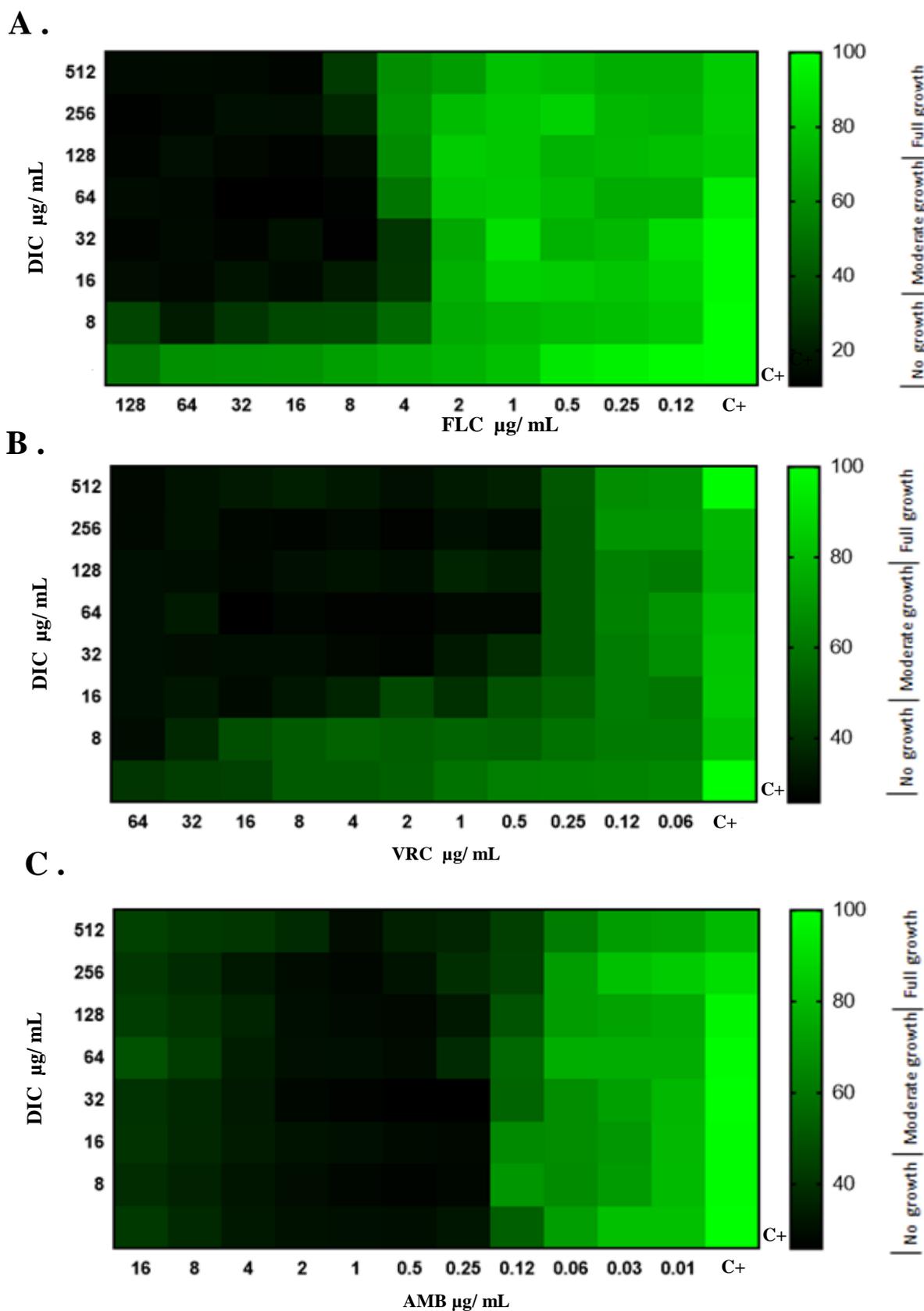


Figura 4. Tabuleiro de damas na forma de mapa de calor projetado pelo software GraphPad Prism 7.0. Efeitos da interação medicamentosa entre o diclofenaco e os antifúngicos fluconazol (A), voriconazol (B) e anfotericina B (C) sobre células plactônicas de *Candida tropicalis* após 24 h de incubação à 35 °C. O crescimento foi quantificado por espectrofotômetro a 630 nm .

6.3 Efeito da combinação do diclofenaco com antifúngicos sobre biofilme em formação

O diclofenaco isolado na concentração 2048 $\mu\text{g} / \text{mL}$ diminuiu a formação de biofilme de *C. tropicalis* em 50%. Quando em combinação com FLC ou VRC, foram observadas interações sinérgicas, com redução de CIM dos azóis de 512 para 32-64 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para FLC e de 128 para 16 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para VRC (Tabela 4). A análise espectrofotométrica dos testes de suscetibilidade do tabuleiro de damas é representada como um mapa de calor, demonstrando a interação sinérgica entre diclofenaco e azóis (Fig. 5 A-B). Contudo, não foi observado sinergismo da combinação de diclofenaco e AMB contra a formação de biofilme (Tabela 4 e Fig. 5C).

Tabela 4. Concentração inibitória mínima para biofilme de diclofenaco, fluconazol, voriconazol e anfotericina B isolados e combinados, e índice de concentração inibitória fracionada frente a biofilmes das espécies de *Candida tropicalis*.

<i>Candida tropicalis</i>	CIMB ($\mu\text{g/mL}$)						Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)			
	Drogas isoladas				Drogas combinadas			DIC + FLU	DIC + VRC	DIC + AMB
	DIC	FLC	VRC	AMB	DIC/FLU	DIC/VRC	DIC/AMB			
CEMM 03-6-079	2048	512	128	1	256 / 64	256 / 16	256 / 2	0,25 ^S	0,25 ^S	2,12 ^I
CEMM 03-6-082	2048	512	256	4	512 / 32	512 / 16	256 / 4	0,31 ^S	0,31 ^S	1,12 ^I
CEMM 03-6-067*	2048	512	128	4	512 / 64	256 / 16	512 / 4	0,37 ^S	0,25 ^S	1,25 ^I

CIMB : Concentração inibitória mínima para biofilme. DIC: Diclofenaco. FLC: Fluconazol. VRC: voriconazol. ^S : Sinergismo. ^I Indiferença.

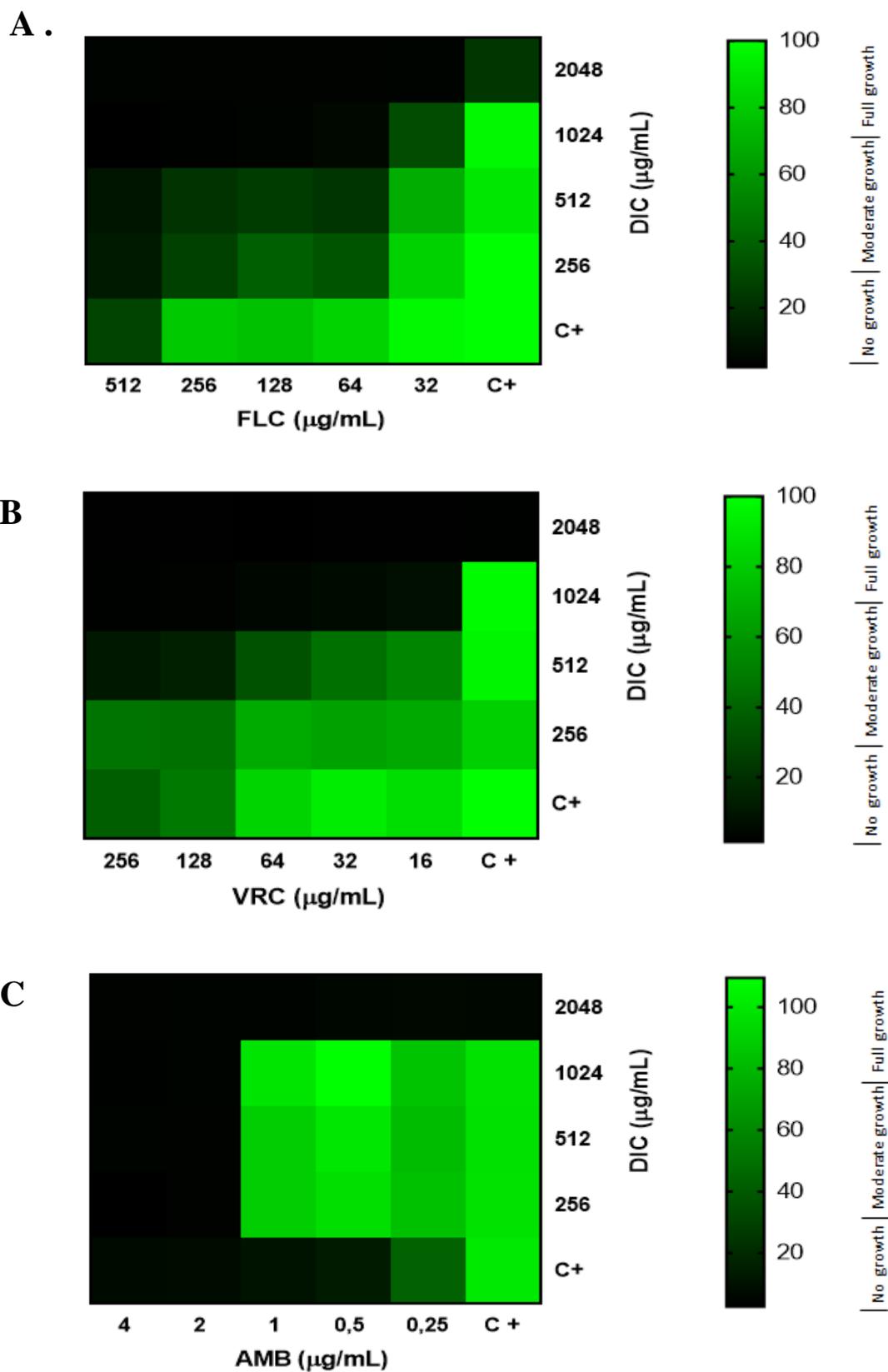


Figura 5. Mapa de calor projetado pelo software GraphPad Prism 7.0. Efeitos da interação medicamentosa entre o anti-inflamatório diclofenaco e os antifúngicos fluconazol (A), voriconazol (B) e anfotericina B (C) sobre biofilmes de *Candida tropicalis* após 24 h de incubação à 35 ° C. O crescimento foi quantificado por espectrofotômetro a 492 nm.

6.4 Análise de microscopia do biofilme em formação

Alterações na estrutura do biofilme e na morfologia celular foram observadas quando os biofilmes foram formados na presença de diclofenaco isoladamente ou em combinação com fluconazol. Na análise por microscopia eletrônica de varredura foi observada uma redução no número de células, produção e filamentos da matriz quando os biofilmes foram formados na presença de diclofenaco ou diclofenaco / FLC; além disso, as células da levedura apresentaram-se túrgidas quando comparadas ao controle livre de drogas (Figura 6). Na análise microscópica confocal foi observada redução de células viáveis em biofilmes formados na presença de diclofenaco / fluconazol e algumas células de levedura também mostraram-se túrgidas quando comparadas ao controle sem drogas (Figura 7).

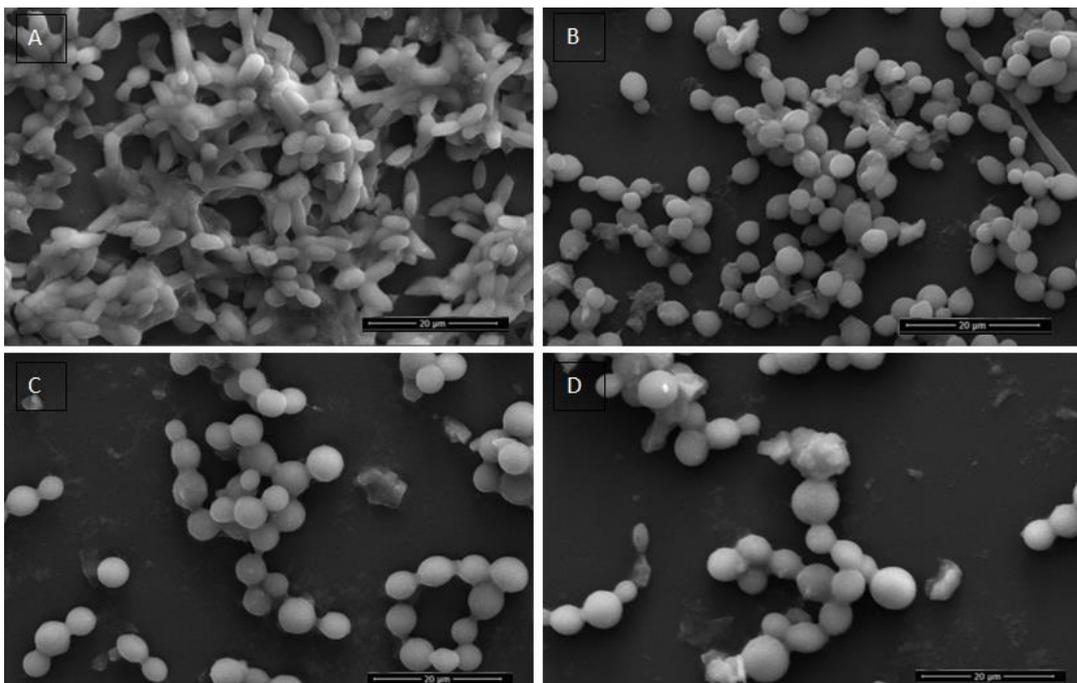


Figura 6. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilmes em formação de *Candida tropicalis* após 24 h de incubação. (A) Biofilmes sem exposição às drogas (controle). (B) Biofilme após exposição à FLC (64 µg / ml). (C) Biofilme tratados com DIC (512 µg / ml). (D) Biofilme tratado com DIC (512 µg / ml) e FLC (64 µg / ml). Observa-se desestruturação de biofilmes expostos à FLC(B), DIC (C) e DIC / FLC (D) Escala: 20 µm Ampliação:5.000 X

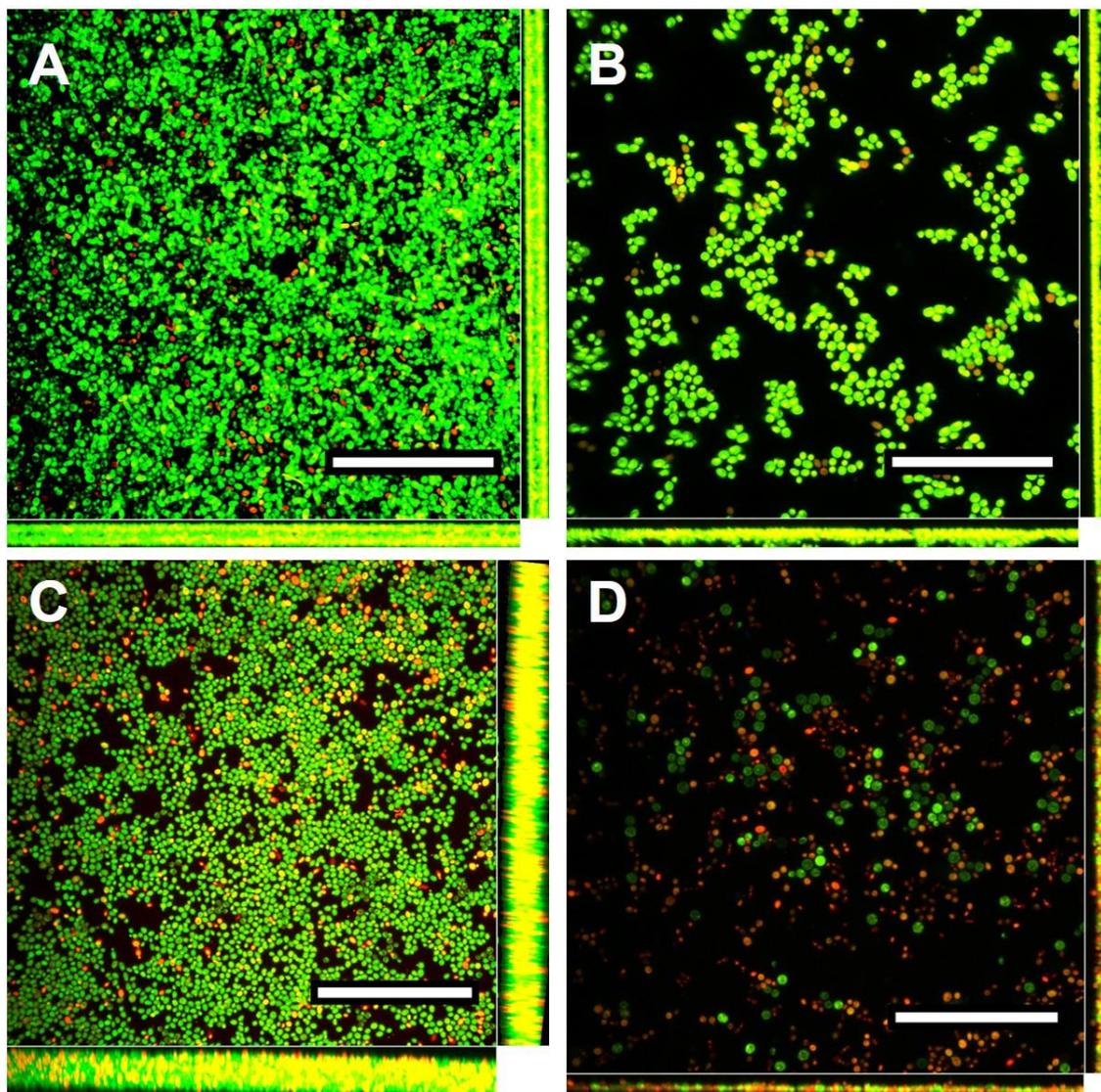


Figura 7. Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de biofilmes de *Candida tropicalis* cultivados na presença de diclofenaco e fluconazol após 24 h de incubação. (A) Biofilmes sem exposição a drogas (controle). (B) Biofilme cultivado na presença de fluconazol (64 $\mu\text{g} / \text{ml}$). (C) Biofilme cultivado na presença de diclofenaco (512 $\mu\text{g} / \text{ml}$). (D) Biofilme cultivado na presença de diclofenaco (512 $\mu\text{g} / \text{ml}$) e fluconazol (64 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Observe que as células na presença de fluconazol e diclofenaco estão túrgidas e uma redução da viabilidade é observada. Escala: 200 μm . Ampliação: 400x. Lasers: 488 nm (células viáveis, SYTO9), 561 nm (células danificadas, iodeto de propídio).

7 DISCUSSÃO

Candida tropicalis resistentes aos azólicos têm sido frequentemente isolada de casos de candidemia perfazendo altas taxas de mortalidade (WANG et al., 2015a). Uma nova abordagem para potencializar a eficácia terapêutica de medicamentos antifúngicos e reduzir a resistência adquirida é testá-los em combinações com outros compostos a fim de obter interações sinérgicas (MORAES; FERREIRA-PEREIRA, 2019). O diclofenaco é um AINE que tem demonstrado potencial antifúngico contra biofilmes de *Candida albicans* (ASHRAF et al., 2015a) e *Aspergillus fumigatus* (NARGESI; REZAIE, 2018).

Nossos dados corroboram os relatados nas pesquisas de Cordeiro et al. (2013) e Brilhante et al., 2018, bem como, os obtidos por Jin et al. (2018) e Ahangarkani et al. (2019) no qual foi relatado cepas sensíveis a AMB, além de CIM ≤ 2 a > 64 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para fluconazol.

O perfil da CIM do DIC contra *C. tropicalis*, obtido em nossos estudos, não demonstrou variações dentre as cepas analisadas, observando-se CIM de 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para todos os isolados. Ahangarkani et al. (2019) avaliaram a atividade do diclofenaco contra várias espécies de *Candida*, relatando valores de CIM de 512 e 2048 $\mu\text{g} / \text{mL}$ contra *C. tropicalis* (n = 2).

Alguns estudos relataram atividade antifúngica do diclofenaco contra *C. albicans* com valores da CIM em até 6250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (YUCESROY et al. 2000; ABDELMEGEED; SHAABAN, 2013b). O diclofenaco também apresentou valores elevados da CIM (até 8192 $\mu\text{g} / \text{mL}$) frente a *C. auris*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* (ROSATO et al., 2016; AHANGARKANI et al., 2019).

Nossos estudos demonstraram que o diclofenaco reduziu as CIMs dos azólicos contra células planctônicas de *C. tropicalis* resistentes, observando-se redução de até 32 vezes na concentração inibitória de VRC. Resultados semelhantes foram obtidos na

combinação de diclofenaco e FLC contra *C. albicans* (YUCESYOY et al., 2000) e diclofenaco e azóis frente a *Trichosporon asahii* (YANG et al., 2016). No entanto, Ahangarkani et al. (2019) não observaram interação sinérgica entre diclofenaco e FLC contra cepas resistentes de *C. tropicalis*, o que contrasta com nossos resultados.

A combinação de diclofenaco e azóis contra cepas sensíveis de *C. tropicalis* resultou em indiferença. Urai et al. (2014) relataram que inibidores da COX, como o diclofenaco, reduziram a atividade do FLC frente a *C. albicans* sensível ao azol. Estudos avaliando os efeitos do diclofenaco nos genes relacionados à resistência ao azol em *C. tropicalis* são necessários para melhor compreender a interação sinérgica encontrada no presente estudo. Os efeitos do diclofenaco de sódio nas cepas de *C. tropicalis*, provavelmente, ocorre devido a alterações na expressão de genes relacionados à resistência e formação de biofilme, como observado nas espécies correlatadas de *C. albicans*.

Os efeitos do DIC contra *Candida albicans* incluem redução na produção de biofilmes e formação de hifas, devido, possivelmente a inibição de uma via de biossíntese dependente da COX (ABDELMEGEED; SHAABAN, 2013); inibição de genes responsáveis pela transição levedura-hifa (RASHKI GHALEHNOO et al., 2010); redução da formação de tubo germinativo (RUSU et al., 2014), além de alterações morfofisiológicas da célula fúngica (RUSU et al., 2017).

O diclofenaco reduziu a formação de biofilme de *C. tropicalis* na concentração de 2048 µg/mL. Resultados semelhantes foram observados em cepas de *C. albicans* a 1 mM (296,2 µg / mL) de diclofenaco, no qual, de modo semelhante, houve redução da filamentação e formação de biofilme desse patógeno fúngico (ALEM; DOUGLAS, 2005).

Ademais, o diclofenaco reduziu a concentração de azol necessária para prejudicar a formação de biofilme. A combinação de DIC com FLC ou VRC, *in vitro*, contra biofilmes de *C. tropicalis* resistentes resultou em sinergismo. De modo semelhante, Abdelmegeed; Shaaban (2013) relataram que a combinação de DIC com FLC causou efeito sinérgico com redução na formação de biofilmes *in vitro* em *C. albicans* resistentes. Rosato et al., 2016 também relataram interação sinérgica, desta vez, entre anidulafungina e DIC sobre biofilmes de *Candida* spp. Estes achados são condizentes com os obtidos por Kondo et al., 2015, no qual observaram reduções nos biofilmes *in vivo* e *in vitro* em *C. albicans*, quando tratadas com DIC e caspofungina combinados, ocasionando maior sensibilidade destas espécies quando pré-expostas ao anti-inflamatório.

Na análise microscópica, observa-se uma redução no número de células sésseis e na filamentação quando os biofilmes são cultivados na presença de 512 µg / mL de DIC; dose esta, considerada não tóxica para humanos e outros animais, haja vista que a dose tóxica humana é cinco a dez vezes a dose terapêutica usual (até 200 mg /dia) (OLSON et al., 2004). Estudos têm demonstrado que o diclofenaco inibiu a filamentação em *C. albicans* a 500 µg/ml (RASHKI GHALEHNOO et al., 2010) e em *A. fumigatus* (NARGESI; REZAIE, 2018), o que pode levar a uma menor capacidade de formação de biofilme, uma vez que a filamentação é um fator chave relacionado à formação de biofilme dessas espécies de fungos.

A redução na formação de hifas e na adesão celular causada pelo DIC contra *C. albicans* está relacionada à expressão reduzida de alguns genes, como *EFG1*(gene regulador de proteína da parede celular fúngica, associada à transcrição morfológica), *HWPI*(relacionada à produção de hifa e tudo germinativo), *ALS1*e *ALS3* (genes relacionados ao crescimento e mudança morfológica de *Candida* spp.) (Rashki

Ghalehnoo et al. 2010). Assim, a redução na formação de biofilme de *C. tropicalis* causada pelo DIC, quando comparado com FLC, pode estar relacionada a alterações na expressão de genes importantes, como observado em *C. albicans*.

As imagens de microscopia, da combinação de DIC e FLC mostraram desestruturação do biofilme de *C. tropicalis*, bem como, alterações na morfologia da célula apresentando-se mais túrgidas comparado ao controle. Estes achados corroboram os trabalhos de Rusu et al. (2017) no qual esse anti-inflamatório foi capaz de danificar estruturas celulares de *C. albicans*. Assim, como o diclofenaco interfere na formação estrutural do biofilme fúngico e pode alterar a expressão gênica, é possível que as células sésseis se tornem mais sensíveis a ação do fluconazol.

8 CONCLUSÃO

O diclofenaco de sódio causou redução da CIM do fluconazol e do voriconazol frente a células planctônicas e biofilme de *Candida tropicalis* resistentes, sendo observado sinergismo destas combinações, e indiferença na combinação com AMB. Além disso, o diclofenaco combinado com fluconazol reduziu a viabilidade e formação do biofilme em cepa resistente.

REFERÊNCIAS

- ABDELMEGEED, E.; SHAABAN, M. I. Cyclooxygenase inhibitors reduce biofilm formation and yeast-hypha conversion of fluconazole resistant *Candida albicans*. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 598–604, out. 2013.
- AHANGARKANI, F. ; KHODAVAISSY, S.; MAHMOUDI, S., SHOKOHI, T.; SADEGH REZAI, M.; FAKHIM, H.; DANNAOUI, E.; FARAJI, S.; CHOWDHARY A.; JACQUES, F. M.; BADALI, H. Indifferent effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) combined with fluconazole against multidrug-resistant *Candida auris* Antifungal bioactive View project Fatal rhinocerebral mucormycosis in a patient with ulcerative colitis receiving azath. **Current Medical Mycology**, v.5, n.3, p. 26, 2019.
- AKBARI, F.; KJELLERUP, B. Elimination of Bloodstream Infections Associated with *Candida albicans* Biofilm in Intravascular Catheters. **Pathogens**, v. 4, n. 3, p. 457–469, 29 jun. 2015.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 999–1008, ago. 2006.
- ALARCO, A.-M.; RAYMOND, M. The bZip Transcription Factor Cap1p Is Involved in Multidrug Resistance and Oxidative Stress Response in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 3, p. 700-708, 1999.
- ALEGRO, J. V; ARGENTINE, S.; RUSSELL, L. There Was a Fungus Among Us: A Cohort of Fungal Infectious Endocarditis Cases in East Tennessee. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6. 2019.
- ALEM, M. A. S.; DOUGLAS, L. J. Effects of Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Biofilms and Planktonic Cells of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 41–47, jan. 2004.
- ALEM, M. A. S.; DOUGLAS, L. J. Prostaglandin production during growth of *Candida albicans* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 1001–1005, nov. 2005.
- ANDES, D.R.; SAFDAR, N.; BADDLEY, J.W.; PLAYFORD, G.; REBOLI, A.C.; REX, J.H.; SOBEL, J. D.; PAPPAS, P.G.; KULLBERG, B.J. Impact of Treatment Strategy on Outcomes in Patients with Candidemia and Other Forms of Invasive Candidiasis: A Patient-Level Quantitative Review of Randomized Trials. **Clinical Infectious Diseases**, 2012.
- ANN CHAI, L. Y.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 282–298, 30 nov. 2010.
- ARASTEHFAR, A. et al. Antifungal susceptibility, genotyping, resistance mechanism, and clinical profile of *Candida tropicalis* blood isolates. **Medical Mycology**, 2017.
- ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. **Trends in Microbiology**, v, 15, n. 1p. 62-75, 2017.

ARAÚJO, M.; DE MEDEIROS, P. **Epidemiologia e fatores prognósticos de candidemia nosocomial no nordeste brasileiro: um estudo retrospectivo de 6 anos.** 2019. 62p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

ARIDOĞAN, I. A.; MACIT, ILKIT.; VOLKAN, IZOL.; AYLIN, ATES. *Malassezia* and *Candida* colonisation on glans penis of circumcised men. **Mycoses**, v. 48, n. 5, p. 352–356, 1 set. 2005.

ARMSTRONG-JAMES, D.; HARRISON, T. S. Immunotherapy for fungal infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 434–439, 2012.

ASHRAF, A.; FATMA, Y.; NORA, T.; OMAR, A.E.W.; ABD, E.K.R.; ESRAA, I.; REHAM, H.; MOHAMED, K.; MOHAMED, R.; SAMEH, A.; ABOBAKR, M.; REHAB, M. A. E. B. Effect of Some Non steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Growth, Adherence and Mature Biofilms of *Candida* spp. **American Journal of Microbiological Research**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2015.

BAJRACHARYA, B.; BHATTACHARYYA, S.; POUDEL, P. Prevalência de espécies de *Candida* na cavidade oral de pacientes com câncer bucal submetidos à radioterapia | **Anais da King Edward Medical University**, v. 25, n.1, 2019.

BANERJEE, P; DAS, S. Haematogenous Spread of Fluconazole Resistant *Candida Tropicalis* from Mycobiome of Respiratory Tract in COPD Patients. **Indian Journal of Public Health Research & Development**, v.10, n.11, 2019.

BARCHIESI, F.; DI FRANCESCO, L. F.; SCALISE, G. In Vitro Activities of Terbinafine in Combination with Fluconazole and Itraconazole against Isolates of *Candida albicans* with Reduced Susceptibility to Azoles. **American Society for Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 1812–1814, 1997.

BASSETTI, M.; GARNACHO-MONTERO, J.; CALANDRA, T.; KULLBERG, B.; DIMOPOULOS, G.; AZOULAY, E.; CHAKRABARTI, A.; KETT, D.; LEON, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; SANGUINETTI, M.; TIMSIT, J-F.; RICHARDSON, M.D.; SHORR, A.; CORNELLY, O. A. Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. **Intensive care medicine**, v. 43, n. 9, p. 1225–1238, 2017.

BAUER, B. K.; SCHULZE, A. B.; LÖHER, A.; REINKE, F.; ECKARDT, L. *Candida tropicalis* defibrillator endocarditis: A case report and review of current literature. **Medical Mycology Case Reports**, v. 25, p. 1–9, set. 2019.

BELENKY, P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J. J. Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. **Cell Reports**, v. 3, n. 2, p. 350–358, 21 fev. 2013.

BENTUBO, H. D. L.; MANTOVANI, A.; YAMASHITA, J. T.; GAMBALE, W.; FISCHMAN, O. Yeasts of the genital region of patients attending the dermatology service at Hospital São Paulo, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 32, n. 4, p. 229–234, 1 out. 2015.

BERDIEKE, G.; PIERRE, B.; ERIC, VAN. W.; JOHAN, M.; ISABEL, S.; MARIJKE, H. K. L. Increasing candidemia incidence from 2004 to 2015 with a shift in

epidemiology in patients pre - exposed to antifungals. **Mycoses**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2018.

BERKOW, E.; LOCKHART, S. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 10, p. 237–245, jul. 2017.

BINK, A.; NEIRINCK, B.; VLEUGELS, J.; VAN DIJCK, P.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K. The Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Diclofenac Potentiates the In Vivo Activity of Caspofungin Against *Candida albicans* Biofilms. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 11, p. 1790–1797, 1 dez. 2012.

BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R. O.; DENNING, D. W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases - Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BORGHI, E.; MORACE, G.; BORGIO, F.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; NILE, C.; RAMAGE, G. New strategic insights into managing fungal biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1077, 2015.

BOUZA, E.; VENA, A.; MUNOZ, P.; MACHADO, M.; MARTÍNEZ-JIMENEZ, C.; MUÑOZ, P.; GIOIA, F. T2 *Candida* MR as a predictor of outcome in patients with suspected invasive candidiasis starting empirical antifungal treatment: a prospective pilot study—authors' response. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 2, p. 533–534, 2019.

BRAGA, P. R.; CRUZ, I. L.; ORTIZ, I.; BARREIROS, G.; NOUÉR, S.A.; NUCCI, M. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 273–277, 2018.

BRILHANTE, R. S.N.; PAIVA, M. A. N.; SAMPAIO, C. M.S.; TEIXEIRA, C. E. C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M. ; LEITE, J. J. G.; MOREIRA, C. A.; SILVA, L. P.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F.G. Yeasts from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 268–277, 2011.

BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; SOARES, P.I.B.; ASTETE-MEDRANO, D.J.; MONTEIRO, A.J.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F.G. Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): a potential hazard to human health. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 6, p. 718-723, 2010.

BRILHANTE, R. S. N.; DE ARAGÃO, P.H. R.; DE ALENCAR, L. P.; RIELLO, G. B.; RIBEIRO, J. F.; DE OLIVEIRA, J. S.; CASTELO-BRANCO, D. S.C.M.; BANDEIRA, T. J. P. G.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, M. F.G.; CORDEIRO, R. A.; MOREIRA, J. L. B.; SIDRIM, J.J.C. Evidence of Fluconazole-Resistant *Candida* Species in Tortoises and Sea Turtles. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5–6, p. 421–426, 2015.

BRILHANTE, R. S. N.; SILVA, S. T. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; TEIXEIRA, C. E. C.; BORGES, L. C.; BITTENCOURT, P. V.; DE OLIVEIRA, J.

S.; MONTEIRO, A. J.; BANDEIRA, T. J. P. G.; CORDEIRO, R. A.; MOREIRA, J. L. B.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F.G. Emergence of azole-resistant *Candida albicans* in small ruminants. **Mycopathologia**, v. 180, n. 3-4, p. 277-280, 2015.

BRILHANTE, R. S. N.; DE OLIVEIRA, J. S.; EVANGELISTA, A.J.J.; SERPA, R.; DA SILVA, A.L.; DE AGUIAR, F.R.M.; PEREIRA, V.S.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; PEREIRA-NETO, W.A.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F.G. *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, 30 ago. 2016.

BRILHANTE, R. S. N.; DE OLIVEIRA, J. S.; EVANGELISTA, A.J.J.; PEREIRA, V.S.; ALENCAR, L.P.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; CÂMARA, L. M. C.; DE LIMA-NETO, R.G.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F.G. In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. **Medical mycology**, v. 56, n. 8, p. 1012–1022, 2018.

BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O.; BRILHANTE, R. S.N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F.G.; The Anatomical Distribution and Antimicrobial Susceptibility of Yeast Species Isolated from Healthy Dogs. **the veterinary journal**, V. 182, N. 2, P. 320–326, nov. 2009.

BROWN, G. D.; DENNING, D.W.; GOW, N.A.R.; LEVITZ, S.M.; NETEA, M.G.; WHITE, T.C. Supplementary Materials for Hidden Killers : Human Fungal Infections. **Science translational medicine**, v. 13, p. 165 , 2012a.

BROWN, G. D.; DENNING, D.W.; GOW, N.A.R.; LEVITZ, S.M.; NETEA, M.G.; WHITE, T.C. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 2012b.

BUFALARI, A.; MAGGIO, C.; MORETTI, G.; CROVACE, A.; STEFANETTI, V.; STRAUBINGER, R. K.; PASSAMONTI, F. Management of *Candida guilliermondii* joint infection in a dog. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, n. 1, 8 jul. 2016.

BUJDÁKOVÁ, H. Management of *Candida* biofilms: state of knowledge and new options for prevention and eradication. **Future Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 235–251, fev. 2016.

BUTLER, G.; RASMUSSEN, M. D.; LIN, M. F.; SANTOS, M. A.; SAKTHIKUMAR, S., MUNRO, C. A.; AGRAFIOTI, I. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 657-662, 2009.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; GOBERNADO, M.; VIUDES, A.; ESPINEL-INGROFF, A. Synergistic Activities of Fluconazole and Voriconazole with Terbinafine against Four *Candida* Species Determined by Checkerboard, Time-Kill, and Etest Methods Downloaded from. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 49, n. 4, p. 1593–1596, 2005.

CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and

vaccine prospects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 122, n. 6, p. 785–794, 2015.

CASTELLANI, A. Observations on the Fungi Found in Tropical Bronchomycosis. **The Lancet**, v. 179, n. 4610, p. 13–15, 1912.

CECCARELLI, G.; GHEZZI, M.C.; RAPONI, G.; BRUNETTI, G.; MARSIGLIA, C.; FALLANI, S.; NOVELLI, ANDREA.; VENDITTI, M. Voriconazole treatment of *Candida tropicalis* meningitis: Persistence of (1,3)- β -d-glucan in the cerebrospinal fluid is a marker of clinical and microbiological failure: A case report. **Medicine (United States)**, v. 95, n. 31, 1 ago. 2016.

CHANDRA, A.; RAO, N.; DAS, A.; SEN, M. A rare clinical entity as large intrarenal abscess in a type II diabetic patient due to *Candida tropicalis*: A case report. **Current Medical Mycology**, v. 5, n. 4, p. 54, dez. 2019.

CHEN, S.C.A.; D. MARRIOTT.; PLAYFORD, E.G.; NGUYEN, P.; ELLIS, D.; MEYER, W.; SORRELL, T.C.; SLAVIN, M. Candidaemia with uncommon *Candida* species: predisposing factors, outcome, antifungal susceptibility, and implications for management. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 662–669, jul. 2009.

CHEW, K. L.; CHENG, J.W.S.; JUREEN, R.; LIN, R.T.P.; TEO, J.W.P. ERG11 mutations are associated with high-level azole resistance in clinical *Candida tropicalis* isolates, a Singapore study. **Mycoscience**, v. 58, n. 2, p. 111–115, 1 mar. 2017.

CHIN, N.-X.; WEITZMAN, I.; DELLA-LATTA, P. In Vitro Activity of Fluvastatin, a Cholesterol-Lowering Agent, and Synergy with Fluconazole and Itraconazole against *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*B. **American Society for Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850–852, 1997.

CHOI, M. J.; WON, E.J.; SHIN, J.H.; HYUN KIM, S.; LEE, W.G.; KIM, M.N.; LEE K.; SHIN, M.G.; SUH, S.P.; RYANG, D.W.; IM, Y.J. Resistance Mechanisms and Clinical Features of Fluconazole-Nonsusceptible *Candida tropicalis* Isolates Compared with Fluconazole-Less-Susceptible Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3653–3661, jun. 2016.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 621–681, 2006.

CLARIA, J. Cyclooxygenase-2 Biology. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 27, p. 2177–2190, 2003.

CLEVELAND, A. A.; FARLEY, M. M.; HARRISON, L. H.; STEIN, B.; HOLLICK, R.; LOCKHART, S. R.; MAGILL, S. S.; DERADO, G.; PARK, B.J.; CHILLER, T. M. Changes in Incidence and Antifungal Drug Resistance in Candidemia: Results From Population-Based Laboratory Surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 10, p. 1352–1361, 2012.

CLEVELAND, A. A.; HARRISON, L. H.; FARLEY, M. M.; HOLLICK, R.; STEIN, B.; CHILLER, T. M.; LOCKHART, S. R.; PARK, B.J. Declining incidence of

candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: Results from population-based surveillance. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 2008–2013, 2015.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard - second edition. M27-A3. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. M38-A2. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b.

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

CORDEIRO, R. A.; TEIXEIRA, C.E.C.; BRILHANTE, R.S.N.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; PAIVA, M.A.N.; LEITE, J.J.G.; LIMA, D.T.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F.G. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 53–59, jan. 2013.

CORDEIRO, R. A.; BITTENCOURT, P.V.; BRILHANTE, R. S. N.; TEIXEIRA C.E.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; SILVA, S.T.C.; DE ALENCAR, L. P.; SOUZA, E.Y.; BANDEIRA, T.J.P.G.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F.G. Species of *Candida* as a component of the nasal microbiota of healthy horses. **Medical Mycology**, v. 51, n. 7, p. 731–736, 2013.

CORNELY, O. A.; GACHOT, B.; AKAN, H.; BASSETTI, M.; UZUN, O.; KIBBLER, C.; MARCHETTI, O.; DE BURGHGRAEVE, P.; RAMADAN, S.; PYLKKANEN, L.; AMEYE, L.; PAESMANS, M.; DONNELLY, P. J.; Epidemiology and Outcome of Fungemia in a Cancer Cohort of the Infectious Diseases Group (IDG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC 65031). **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 3, p. 324–331, 2015.

CASTELO-BRANCO, D. S.C.M.; BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M.A.N.; TEIXEIRA, C.E.C.; CAETANO, E.P.; RIBEIRO, J.F.; CORDEIRO, R.A. ; SIDRIM, J.J.C.; MONTEIRO, A.J.; ROCHA, M.F.G. Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 555-560, 2013.

DA SILVA-ROCHA, W. P.; , LEMOS, V.L.B. SVIDIZISNKI, T. I. E.; MILAN, E. P.; CHAVES, G. M. *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. **BMC Oral Health**, v. 14, n. 1, 2014.

DA SILVA, C. R.; NETO, J.B.A. ; SIDRIM, J.J.C.; ÂNGELO, M. R. F.; MAGALHÃES, H. I.F.; CAVALCANTI, B. C.; BRILHANTE, R.S. N.; MACEDO, D. S.V.; MORAES, M.O.; LOBO, M. D. P.; GRANGEIRO, T. B.; JÚNIOR, H. V. N. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691–1700, 2013.

DA SILVA, G. C.; DE VERAS, B. O.; DE ASSIS, C.R. D.; NAVARRO, DANIELA M. A. F.; DINIZ, D. L.V.; DOS SANTOS, F.A. B.; DE AGUIAR, J.C. R.O. F.; DA SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Chemical composition, antimicrobial activity and synergistic effects with conventional antibiotics under clinical isolates by essential oil of *Hymenaea rubriflora* Ducke (FABACEAE). **Natural Product Research**, p. 1–5, 21 fev. 2020.

DAS, C.; DHAR, S. K.; BEHERA, D. Antifungal sensitivity of *candida* spp. Isolated from skin infections at a tertiary care teaching hospital. **Indian Journal of Public Health Research and Development**, v. 10, n. 10, p. 392–396, 1 out. 2019.

DELALOYE, J.; CALANDRA, T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 154–162, 2014.

DENNING, D. W. Calling upon all public health mycologists: To accompany the country burden papers from 14 countries. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 6, p. 923–924, 2017.

DENNING, D. W.; BROMLEY, M. J. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1414–1416, 2015.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y.H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130–6185, 12 out. 2011.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S. Medical Device-Associated *Candida* Infections in a Rural Tertiary Care Teaching Hospital of India. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2016, 2016.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. **International Journal of Microbiology**, 2014.

DO AV SÁ, L. G.; DA SILVA, C. R.; CAMPOS, R.S.; NETO, J.B.A.; SAMPAIO, L. S.; DO NASCIMENTO, F. B.; BARROSO, F.D.D.; DA SILVA, L. J.; QUEIROZ, H.A.; CANDIDO, T.M. ; RODRIGUES, D.S.; LEITAO, A.C.; DE MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C.; JÚNIOR, H.V.N. Synergistic anticandidal activity of etomidate and azoles against clinical fluconazole-resistant *Candida* isolates. **Future Microbiology**, v. 14, n. 17, p. 1477–1488, 2019.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A.C.C.; EDMOND, M.B.; MARRA, A.R.; CAMARGO, L. F.A.; SIQUEIRA, R.A.; DA MOTA, V.P.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DOI, M.; HOMMA, M.; CHINDAMPORN, A.; TANAK, K. Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. **Microbiology**, v. 138, n. 10, p. 2243–2251, 1992.

DOMINGUEZ, E. G.; ANDES, D. R. *Candida* biofilm tolerance: Comparison of planktonic and biofilm resistance mechanisms. In: **Candida albicans: Cellular and Molecular Biology: Second Edition**. [s.l.] Springer International Publishing., p. 77–92,

2017

DONDERS, G. G. G.; SOBEL, J. D. *Candida* vulvovaginitis: A store with a buttery and a show window. **Mycoses**, v. 60, n. 2, p. 70–72, 1 fev. 2017.

DONGLIANG, Y.; LING, H.Y.; XIN, Y. Z.; SHENG, Z.G.; DAN, LI.; QIAN, Z. Y.; HUA, X. Z.; MING, G. X.; XING, W. L.; HUI, W. L. Cis-2-dodecenoic Acid Mediates Its Synergistic Effect with Triazoles by Interfering with Efflux Pumps in Fluconazole-resistant *Candida albicans* Antibacteria View project Cis-2-dodecenoic Acid Mediates Its Synergistic Effect with Triazoles by Interfering with Efflux Pumps in Fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 32, n. 3, p. 199-209, 2019.

EDDOUZI, J.; PARKER, J.E.; VALE-SILVA, C.L.A.; COSTE, A.A.; ISCHER, F.; KELLY, A. S.; MANAI, C. M.; SANGLARD, B. D. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from tunisian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3182–3193, 1 jul. 2013.

ELENA, R.; ELENA, R.; SIMONA, E.S.; OANA, N.; TATIANA, V. The conventional identification and effect of diclofenac and aspirin on the *Candida* species. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 14, n. 5, p. 4720-4727, 2009.

ELENA, R.; AVRAM, I.; VASSU, T. Ultrastructural Changes of *Candida albicans* Species Induced by the Presence of Sodium Diclofenac View project Special Issue. **Revista de Chimie –Bucharest**, v. 68, n. 11, p. 2566-2569, 2017.

O'SHAUGHNESSY, E. M.; MELETIADIS, J.; STERGIOPOULOU, T.; DEMCHOK, J. P.; WALSH, T.J. Antifungal interactions within the triple combination of amphotericin B, caspofungin and voriconazole against *Aspergillus* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 1–4, 1 dez. 2006.

ELLS, R.; KOCK, J.L.F. ALBERTYN, J.; KEMP, G.; POHL, C.H.; Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on prostaglandin E 2 production by *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 200, n. 1, p. 23–28, fev. 2011.

FAN, X.; FAN, X.; XIAO, M.; LIAO, K.; KUDINHA, T.; WANG, H.; ZHANG, L.; HOU, X.; KONG, F.; XU, Y.C. Notable increasing trend in azole non-susceptible *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China (August 2009 to July 2014): Molecular Epidemiology and clinical azole consumption. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 464, 2017.

FAN, X.; XIAO, M.; ZHANG, Y.D.; HUANG, J.-J.; WANG, H.; HOU, X.; ZHANG, L. .; KONG, F.; CHEN, S.C.-A.; TONG, Z.-H.; XU, Y.-C. Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida tropicalis* isolates causing invasive candidiasis in China. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 885–891, jul. 2019.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal Biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, 2012.

FERREIRA, C.; GONÇALVES, B.; BOAS, D.V.; OLIVEIRA, H.; HENRIQUES M.; AZEREDO, J.; SILVA, S. *Candida tropicalis* biofilm and human epithelium invasion is highly influenced by environmental pH. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 8, p. 101, nov. 2016.

- FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 109-118, 2011.
- FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186–194, 2012.
- MENOTTI, A.F.S.; FERRAZ, C.P.; MORAES, L.T.; JARDIM, N.A.; DE BARROS, Y. V.; GOMES, R.M.V.; ELIAS, R.M.; CORRÊIA, T.F.B. **Prevalência de Microrganismos em Infecções de Trato Urinário na Unidade de Terapia Intensiva Adulto Em Um Hospital de Médio Porte**. Periodicos.univag.com.br, n. 10, 2019.
- FORASTIERO, A.; MESA-ARANGO, A. C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; ALCAZAR-FUOLI, L.; BERNAL-MARTINEZ, L.; PELAEZ, T.; LOPEZ, J. F.; GRIMALT, J. O.; GOMEZ-LOPEZ, A.; CUESTA, I.; ZARAGOZA, O.; MELLADO, E. *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4769–4781, 1 out. 2013.
- FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001.
- FURLANETO, M. C.; FAVERO, D.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L. Effects of human blood red cells on the haemolytic capability of clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, p. 13, 2015.
- GALÁN-LADERO, M. Á.; BLANCO-BLANCO, M.T.; FERNÁNDEZ-CALDERÓN, M.C.; LUCIO, L.; GUTIÉRREZ-MARTÍN, Y.; BLANCO, M.T.; PÉREZ-GIRALDO, C. *Candida tropicalis* biofilm formation and expression levels of the CTRG ALS-like genes in sessile cells. **Yeast**, v. 36, n. 2, p. 107–115, 2019.
- GAN, T. J. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. **Current medical research and opinion**, v. 26, n. 7, p. 1715-1731, 2010.
- GHANNOUM, M.; ROILIDES, E.; KATRAGKOU, A.; PETRAITIS, V.; WALSH, T. J. The Role of Echinocandins in *Candida* Biofilm–Related Vascular Catheter Infections: In Vitro and In Vivo Model Systems. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. suppl_6, p. S618–S621, 1 dez. 2015.
- GIACOBINO, J.; MONTELLI, A. C.; BARRETTI, P.; BRUDER-NASCIMENTO, A.; CARAMORI, J. T.; BARBOSA, L.; BAGAGLI, E. Fungal peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis (PD) in Brazil: molecular identification, biofilm production and antifungal susceptibility of the agents. **Medical Mycology**, v. 54, n. 7, p. 725–732, 2016.
- GOMES, L. H.; ECHEVERRIGARAY, S.; CONTI, J.H.; LOURENÇO, M.V.M.; DUARTE, K.M. Presence of the yeast *Candida tropicalis* in figs infected by the fruit fly *Zaprionus indianus* (dip.: *Drosophilidae*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 5–7, 2003.
- GROSSET, M.; DESNOS-OLLIVIER, M.; GODET, C.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; CAZENAVE-ROBLOT, F. Recurrent episodes of Candidemia due to *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* with acquired echinocandin

resistance. **Medical Mycology Case Reports**, v. 14, p. 20–23, 1 dez. 2016.

GRÓZER, Z.; TÓTH, A.; TÓTH, R.; KECSKEMÉTI, A.; VÁGVÖLGYI, C.; NOSANCHUK, J. D.; SZEKERES, A.; GÁCSEK, A. *Candida parapsilosis* produces prostaglandins from exogenous arachidonic acid and *OLE2* is not required for their synthesis. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 85–92, 2 jan. 2015.

GUO, Q.; SUN, S.; YU, J.; LI, Y.; CAO, L. Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 457–462, 2008.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; PAGNOCCA, F. C. Yeasts in Aquatic Ecotone Habitats. In: **Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 63–85.

HAMILTON, L. A.; LOCKHART, N. R.; CRAIN, M. R. *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* in an immunocompetent patient: a case report. **Journal of pharmacy practice**, v. 28, n. 3, p. 284–7, 2015.

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p. 462–478, 1995.

HII, I. M.; LIU, C. E.; LEE, Y. L.; LIU, W. L.; WU, P. F.; HSIEH, M. H.; HO, M-W.; CHEN, Y-H.; WANG, F. D. Resistance rates of non-albicans *Candida* infections in Taiwan after the revision of 2012 clinical and laboratory standards institute breakpoints. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 235–240, 2019.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, É.; VILELLA, T. A. S.; RÊGO, L.; LIRA, C.; MARTINS, M.; ARAÚJO, C.; DUARTE, M.; ALMEIDA, L.; LOPES, G. Isolados de *Candida* em hospital terciário no nordeste do Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 325–328, 2009.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 149–169, 2016.

HU, L.; HE, C.; ZHAO, C.; CHEN, X.; HUA, H.; YAN, Z. Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases. **Microbial Pathogenesis**, v. 134, n. May, p. 103575, 2019.

ID, K. S.; BAROUSCH, W.; MAKRISTATHIS, A.; ZELLER, I.; NEHR, M.; SELITSCH, B.; LACKNER, MICHAELA.; RATH, P-M.; STEINMANN, J.; WILLINGER, B. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, 2019.

INÁCIO, C. P.; DE ARAÚJO, P. S. R.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; VERAS, D. L.; NEVES, R. P. Invasive *Candida tropicalis* Infection Caused by Catheter Biofilm in a Patient with Tongue Cancer. **Mycopathologia**, v. 184, n. 2, p. 345–346, 1 abr. 2019.

JAFRI, H.; AHMAD, I. Thymus vulgaris essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 1, 2020.

JAIN, N.; KOHLI, R.; COOK, E.; GIALANELLA, P.; CHANG, T.; FRIES, B. C.

Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1697–1703, mar. 2007.

KULLBERG, B. J.; VASQUEZ, J.; MOOTSIKAPUN, P.; NUCCI, M., PAIVA, J. A.; GARBINO, J.; YAN, J. L.; ARAM, J.; CAPPARELLA, M. R.; CONTE, U.; SCHLAMM, H.; SWANSON, R.; HERBRECHT, R. Efficacy of anidulafungin in 539 patients with invasive candidiasis: a patient-level pooled analysis of six clinical trials. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 8, p. 2368-2377, 2017.

JENSEN, R. H.; SOES, L.M.; LÊMINGUE, L.E.; ROSENVINGE, F.S.; NIELSEN, L.; OLESEN, B.; KRISTENSEN, L.; DŽAJIĆ, E.; ASTVAD, K.M.T.; ARENDRUP, M.C. Posttreatment Antifungal Resistance among Colonizing *Candida* Isolates in Candidemia Patients: Results from a Systematic Multicenter Study. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, V. 60, N. 3, P. 1500-1508, 2016.

JIA, C.; ZHANG, J.; ZHUGE, Y.; XU, K.; LIU, J.; WANG, J.; LI, L.; CHU, M. Synergistic effects of geldanamycin with fluconazole are associated with reactive oxygen species in *Candida tropicalis* resistant to azoles and amphotericin B. **Free Radical Research**, v. 53, n. 6, p. 618–628, 2019.

JIANG, C.; LI, Z.; ZHANG, L.; TIAN, Y.; DONG, D.; PENG, Y. Significance of hyphae formation in virulence of *Candida tropicalis* and transcriptomic analysis of hyphal cells. **Microbiological Research**, v. 192, p. 65–72, 2016.

JIN, J.; GUO, N.; ZHANG, J.; DING, Y.; TANG, X.; LIANG, J.; LI, L.; DENG, X.; YU, L. The synergy of honokiol and fluconazole against clinical isolates of azole-resistant *Candida albicans*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 351–357, set. 2010.

JIN, L.; CAO, Z.; WANG, Q.; WANG, Y.; WANG, X.; CHEN, H.; WANG, H. MDR1 overexpression combined with ERG11 mutations induce high-level fluconazole resistance in *Candida tropicalis* clinical isolates. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 162, 10 dez. 2018.

SIDRIM, J.J.C.; CARVALHO, V.L.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M. BRILHANTE R.S. N.; GUEDES, G.M.M.; BARBOSA, G.R.; LAZZARINI, S. M.; OLIVEIRA D.C.R.; DE MEIRELLES, A.C.O.; ATTADEMO, F. L. N.; FREIRE, A.C.B.; NETO, W.A. P.; CORDEIRO, R.A.; MOREIRA, J.L.B.; ROCHA, M. F. G. Antifungal Resistance and Virulence Among *Candida* spp. from Captive Amazonian manatees and West Indian Manatees: Potential Impacts on Animal and Environmental Health. **EcoHealth**, v. 13, n. 2, p. 328-338, 2016.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 120–128, 2008.

KHODAVANDI, A.; ALIZADEH, F.; AALA, F.; SEKAWI, Z.; CHONG, P.P. In Vitro Investigation of Antifungal Activity of Allicin Alone and in Combination with Azoles Against *Candida* Species. **Mycopathologia**, v. 169, n. 4, p. 287-295, 2009.

KLINGSPOR, L.; TORTORANO, A. M.; PEMAN, J.; WILLINGER, B.; HAMAL, P., SENDID, B.; VELEGRAKI, A.; KIBBLER, C.; MEIS, J.F.; SABINO, R.; RUHNKE,

M.; ARIKAN-AKDAGLI, S.; SALONEN, J.; DÓCZI, I. Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: A prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 1, p.1-87, 2015.

KO, J. H.; JUNG, D.S.; LEE, J.Y.; KIM, H.A.; RYU, S.Y.; JUNG, S-I.; JOO, E-J.; CHEON, S.; KIM, Y-S.; KIM, S-W.; CHO, S.Y.; KANG, C-I.; CHUNG, D. R.; LEE, N. Y.; PECK, K. R. Poor prognosis of *Candida tropicalis* among non-albicans candidemia: a retrospective multicenter cohort study, Korea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 2, p. 195–200, 2019.

KOLTER, R.; GREENBERG, E. P. The superficial life of microbes. **Nature**, v. 441, n. 7091, p. 300-302, 2006.

KONDO, T.; OSHIMA, T.; TOMITA, T.; FUKUI, H.; OKADA, H.; WATARI, J.; MIWA, H. The nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces acid-induced heartburn symptoms in healthy volunteers. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 7, p. 1249–1255, 2015.

KRAUSE, R.; MOISSEL-EICHINGER, C.; HALWACHS, B.; GORKIEWICZ, G.; BERG, G.; VALENTIN, T.; PRATTES, J.; HÖGENAUER, CHRISTOPH.; ZOLLNER-SCHWETZ, I. Mycobiome in the Lower Respiratory Tract – A Clinical Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 07, n. JAN, p. 2169, 2017.

KRISHNAN, N.; PATEL, B.; PALFREY, W.; ISACHE, C. Rapidly progressive necrotizing cellulitis secondary to *Candida tropicalis* infection in an immunocompromised host. **IDCases**, v. 19, 2020.

KU, E. C.; LEE, W.; KOTHARI, H. V.; KIMBLE, E. F.; LIAUW, L.; TJAN, J. The effects of diclofenac sodium on arachidonic acid metabolism. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 15, n. 2, p. 36–41, 1985.

KU, E. C.; LEE, W.; KOTHARI, H. V.; SCHOLER, D. W. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. **The American Journal of Medicine**, v. 80, n. 4, p. 18–23, abr. 1986.

KU, E. C.; WSVARY, J. M.; CASH, W. D. Diclofenac sodium (GP 45840, voltaren), a potent inhibitor of prostaglandin synthetase. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, n. 5, p. 641–643, 1 mar. 1975.

KULLBERG, B. J.; SOBEL, J. D.; RUHNKE, M.; PAPPAS, P. G.; VISCOLI, C.; REX, J. H.; CLEARY, J.D.; RUBINSTEIN, E.; CHURCH, L.W. P.; BROWN, J.M.; SCHLAMM, H. T.; OBORSKA, I.T.; HILTON, F.; HODGES, M R. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: A randomised non-inferiority trial. **Lancet**, v. 366, n. 9495, p. 1435–1442, 2005.

KULLBERG, B. J.; VISCOLI, C.; PAPPAS, P. G.; VAZQUEZ, J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; ROTSTEIN, C.; SOBEL J. D.; HERBRECHT, R.; RAHAV, G.; JARURATANASIRIKUL, S.; CHETCHOTISAKD, P.; WIJNGAERDEN, E.V.; DE WAELE, J.; LADEMACHER, C.; ENGELHARDT, M.; KOVANDA, L.; CROOS-DABRERA, R.; FREDERICKS, C.; THOMPSON, G.R. Clinical Infectious Diseases Isavuconazole Versus Caspofungin in the Treatment of Candidemia and Other Invasive

Candida Infections: The ACTIVE Trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 12, p. 1981-1989, 2019.

KULLBERG, B. J. . M. C. A. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103–124, 2016.

LACKNER, M.; TSCHERNER, M.; SCHALLER, M.; KUCHLER, K.; MAIR, C.; SARTORI, B.; ISTELE, F.; ARENDRUP, M.C.; LASS-FLÖRL, C. Positions and numbers of FKS mutations in *Candida albicans* selectively influence In Vitro and In Vivo susceptibilities to echinocandin treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3626–3635, 2014.

LAPPE-OLIVERAS, P.; TORIELLO, C.; TAYLOR, M. L. Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: An integrative study in Guerrero, Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 77, n. 2, p. 153-168, 2006

LEVETIN, E.; HORNER, W.E.; SCOTT, J.A.; BARNES, C.; BAXI, S.; CHEW, G.L.; PHIPATANAKUL, W.; GRIMES, CARL.; HORNER, W.E.; KENNEDY, K.; LARENAS-LINNEMANN, D.; LEVETIN, E.; MILLER, J. D.; PHIPATANAKUL, W.; PORTNOY.; J.M.; SCOTT, J.A.; WILLIAMS, P.B. Taxonomy of Allergenic Fungi. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 4, n. 3, p. 375–385, 2016.

LI, D.; XIA, R.; ZHANG, Q.; BAI, C.; LI, Z.; ZHANG, P.; Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of China: An 8-year case-control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 3 ago. 2017.

LI, B.; GUO, T.; CHEN, Y.; XIE, J.; NIU, H.; LIU, D.; CHENG, J.; CHEN, X.; WU, J.; ZHUANG, W. Genome sequence of *Candida tropicalis* no. 121, used for RNA production. **Genome Announc.**, v. 2, n. 3, p. e00316-14, 2014.

LI, Y.; WAN, Z.; LIU, W.; LI, R. Synergistic activity of chloroquine with fluconazole against fluconazole-resistant isolates of *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1365–1369, 1 fev. 2015.

LIU, S., YUE, L.; GU, W.; LI, X.; ZHANG, L.; SUN, S. Synergistic Effect of Fluconazole and Calcium Channel Blockers against Resistant *Candida albicans*. **PLOS ONE**, 2016a.

LIU, W.; LI, L.P.; ZHANG, J.D.; LI, Q.; SHEN, H.; CHEN, S. M.; HE, L.J.; YAN, L.; XU, G.T.; AN, M.M.; JIANG, Y.Y. Synergistic Antifungal Effect of Glabridin and Fluconazole. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

LIU, X., WANG, D.; YU, C.; LI, T.; LIU, J.; SUN, S. Potential antifungal targets against a *candida* biofilm based on an enzyme in the arachidonic acid cascade-a review. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Research Foundation, v. 7, p. 1925, 2016b.

LOCKHART, S. R. ; ETIENNE, K.A.; VALLABHANENI, S.; FAROOQI J.; CHOWDHARY, A.; GOVENDER, N.P.; COLOMBO, A.L.; CALVO, B.; CUOMO, C.A.; DESJARDINS, C.A.; BERKOW, E.L.; CASTANHEIRA, M.; MAGOBO, R.E.; JABEEN, K.; ASGHAR, R. J.; MEIS J.F.; JACKSON, B.; CHILLER, T.; LITVINTSEVA, A.P. *Clinical Infectious Diseases*

Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases** ®, v. 64, n. 2, p. 134–174, 2017.

LOHSE, M. B.; GULATI, M.; JOHNSON, A. D.; NOBILE, C. J. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19, 2017.

LORTHOLARY, O.; DESNOS-OLLIVIER, M.; SITBON, K.; FONTANET, A.; BRETAGNE, S.; DROMER, F. Recent Exposure to Caspofungin or Fluconazole Influences the Epidemiology of Candidemia: a Prospective Multicenter Study Involving 2,441 Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 532–538, 2011.

LOVERO, G.; DE GIGLIO, O.; MONTAGNA, O.; DIELLA, G.; DIVENUTO, F.; LOPUZZO, M.; RUTIGLIANO, S.; LAFORGIA, N.; CAGGIANO, G.; MONTAGNA, M. T. Epidemiology of candidemia in neonatal intensive care units: A persistent public health problem. **Ann Ig**, v. 28, n. 4, p. 282–287, 2016.

LUPETTI, A.; PAULUSMA-ANNEMA, A.; WELLING, M. M.; DOGTEROM-BALLERING, H.; BROUWER, C. P.J.M.; SENESI, S.; DISSEL, J.T.; NIBBERING, P. H. Synergistic Activity of the N-Terminal Peptide of Human Lactoferrin and Fluconazole against *Candida* Species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 262–267, 2003.

MANCERA, E.; PORMAN, A. M.; CUOMO, C. A.; BENNETT, R. J.; JOHNSON, A. D. Finding a missing gene: EFG1 regulates morphogenesis in *Candida tropicalis*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 5, n. 5, p. 849–856, 9 mar. 2015.

MARCHETTI, O.; MOREILLON, P.; GLAUSER, M. P.; BILLE, J.; SANGLARD, D. Potent Synergism of the Combination of Fluconazole and Cyclosporine in *Candida albicans*. **American Society for Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 2373–2381, 2000.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: Comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p. 1192–1198, 1 nov. 2014.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Comparison of the antifungal activity of micafungin and amphotericin B against *Candida tropicalis* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 9, p. 2498-2501, 2016.

MEDEIROS, A. O.; KOHLER, L.M.; HAMDAN, J.S.; MISSAGIA, B.S.; BARBOSA, F.A.; ROSA, C.A.; Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. **Medical Mycology**, v. 42, n. 14, p. 3921–3929, ago. 2008.

MENEZES, E. A.; DOS SANTOS, M. D. C.O.; CUNHA, F. A. Identificação preliminar de algumas espécies do gênero *candida spp.* em meio cromógeno: resultados de dois anos de um estudo multicêntrico realizado no ceará. **Revista de Patologia**, v. 40, n. 4, p. 297-303, 2012.

- MESA-ARANGO, A. C.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; ROMÁN, E.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R.; CASAS, C.; HERRERO, E.; ARGÜELLES, J.C.; PLA, J.; CUENCA-ESTRELLA, MANUEL.; ZARAGOZA, O. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 1 nov. 2014.
- MESA-ARANGO, A. C.; RUEDA, C.; ROMÁN, E.; QUINTIN, J.; TERRÓN, M. C.; LUQUE, D.; NETEA, M.G.; PLA, J.; ZARAGOZA, O. Cell wall changes in amphotericin B-resistant strains from *Candida tropicalis* and relationship with the immune responses elicited by the host. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2326–2335, 1 abr. 2016.
- MILAZZO, L.; PERI, A. M.; MAZZALI, C.; GRANDE, R.; CAZZANI, C.; RICABONI, D.; CASTELLI, A.; RAIMONDI, F.; MAGNI, C.; GALLI, M.; ANTINORI, S. Candidaemia Observed at a University Hospital in Milan (Northern Italy) and Review of Published Studies from 2010 to 2014. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 227–241, 2014.
- MILEWSKI, S.; MIGNINI, F.; BOROWSKI, E. Synergistic action of nikkomycin X/Z with azole antifungals on *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 9, p. 2155-2161, 1991.
- MORAES, D. C.; FERREIRA-PEREIRA, A. Insights on the anticandidal activity of non-antifungal drugs. **Journal de Mycologie Medicale**, 2019.
- MORALEZ, A. T.-P.; PERINI, H. F.; FURLANETO-MAIA, L.; ALMEIDA, R. S.; PANAGIO, L. A.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching of *Candida tropicalis* is associated with cell damage in epithelial cells and virulence in *Galleria mellonella* model. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 379–386, 18 maio 2016.
- MORSCHHÄUSER, J.; BARKER, K. S.; LIU, T. T.; BLAß-WARMUTH, J.; HOMAYOUNI, R.; ROGERS, P. D. The Transcription Factor Mrr1p Controls Expression of the MDR1 Efflux Pump and Mediates Multidrug Resistance in *Candida albicans*. **Plus pathogens**, v. 3, n. 11, 2007.
- MOYES, D. L.; RICHARDSON, J. P.; NAGLIK, J. R. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: Scratching the surface. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 338–346, 2015.
- MUADCHEINGKA, T.; TANTIVITAYAKUL, P. Distribution of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 6, p. 894–901, 1 jun. 2015.
- NAGLIK, J. R. Candida Immunity. **New Journal of Science**, v. 2014, 2014.
- NARGESI, S.; REZAIE, S. Investigation an antifungal activity of diclofenac sodium against hyphae formation in aspergillus fumigatus with attention to the expression of ef-1 geneIranian. **Iranian Journal of Public Health**, v. 47, n. 5, p. 770-772, 2018.
- NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical**

Microbiology and Infectious Diseases, v. 31, n. 7, p. 1399–1412, jul. 2012.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Contributions of the Biofilm Matrix to *Candida* Pathogenesis. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 21, 3 fev. 2020.

NOBILE, C. J. Microbial Communities View project Journal of Fungi Request for Submissions on Special Issue on Fungal Cell Adhesion View project. **Annual review of microbiology**, 2015.

NOVERR, M.C.; PHARE, S. M.; TOEWS, G.B.; COFFEY, M.J.; HUFFNAGLE, G.B. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 2957–2963, 2001.

O'BRIEN, C.; OLIVEIRA-PACHECO, J.; BUTLER, G. Genotypic and phenotypic diversity in *Candida tropicalis*. **Access Microbiology**, v. 1, n. 1A, p. 397, 1 mar. 2019.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1–1, 12 jun. 2003.

OKSUZ, S.; SAHIN, I.; YILDIRIM, M.; GULCAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A.N. Phospholipase and Proteinase Activities in Different *Candida* Species Isolated from Anatomically Distinct Sites of Healthy Adults. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 60, n. 5, p. 280, 2007.

OLSON, K. R. **Poisoning & drug overdose**. Lange Medical Books/McGraw-Hill, v. 13, 2007.

PAIVA, L. C. F.; VIDIGAL, P. G.; DONATTI, L.; SVIDZINSKI, T. I.; CONSOLARO, M. E. Assessment of in vitro biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. **Micron**, v. 43, n. 2–3, p. 497–502, fev. 2012.

PANDEY, N.; TRIPATHI, M.; GUPTA, M. K.; TILAK, R. Overexpression of efflux pump transporter genes and mutations in ERG11 pave the way to fluconazole resistance in *Candida tropicalis*: A study from North India region. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 19 fev. 2020.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A.C.; SCHUSTER, M.G.; VAZQUEZ, J. A.; WALSH, T.J.; ZAOUTIS, T. E.; SOBEL, J.D. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases IDSA**, v. 62, n. 4, 2015.

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M.S.; ARENDRUP, M.C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B.J. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–20, 11 maio 2018.

PATHIRANA, R. U.; MCCALL, A. D.; NORRIS, H. L.; EDGERTON, M. Filamentous non-albicans *Candida* species adhere to *Candida albicans* and benefit from dual biofilm growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1188, 2019.

PECORARO, H. L.; BERG, M. R.; DOZIER, B. L.; MARTIN, L. D.; MCEVOY, C.

T.; DAVIES, M. H.; DUCORE, R. *Candida albicans* -associated sepsis in a pre-term neonatal rhesus macaque (*Macaca mulatta*). **Journal of Medical Primatology**, v. 48, n. 3, p. 186–188, 8 jun. 2019.

PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON, W. R. Leukotrienes. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 18, p. 1841–1854, nov. 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T.A. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 48, n. 4, p. 1366–1377, 2010a.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1592–1599, maio 2010b.

PFALLER, M. A.; MOET, G.J.; MESSER, S.A.; JONES, R.N.; CASTANHEIRA, M. *Candida* Bloodstream Infections: Comparison of Species Distributions and Antifungal Resistance Patterns in Community-Onset and Nosocomial Isolates in the SENTRY Antimicrobial. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 55, n. 2, p. 561–566, 2011.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. Regional data analysis of *Candida* non-albicans strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006-2011. **Mycoses**, v. 57, n. 10, p. 602–611, 2014.

PIERCE, C.; VILA, T.; ROMO, J. A.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; WALL, G.; RAMASUBRAMANIAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J. L. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 14, 8 mar. 2017.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.

QUAN, H.; CAO, Y. Y.; XU, Z.; ZHAO, J. X.; GAO, P. H.; QIN, X. F.; JIANG, Y. Y. Potent In Vitro Synergism of Fluconazole and Berberine Chloride against Clinical Isolates of *Candida albicans* Resistant to Fluconazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1096–1099, 2006.

RADHA, R.; SMITH, R. M.; PARK, B. J.; JARVIS, J. N.; GOVENDER, N. P.; CHILLER, T. M.; DENNING, D.W.; LOYSE, A.; BOULWARE, D. R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 123, n. 24, p. 4757–4763, 2018.

RASHKI GHALEHNOO, Z.; RASHKI, A.; NAJIMI, M.; DOMINGUEZ, A. The role of diclofenac sodium in the dimorphic transition in *Candida albicans*. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 3–4, p. 110–115, mar. 2010.

REES, J. R.; PINNER, R. W.; HAJJEH, R. A.; BRANDT, M. E.; REINGOLD, A. L. The Epidemiological Features of Invasive Mycotic Infections in the San Francisco Bay Area, 1992-1993: Results of Population-Based Laboratory Active Surveillance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 1138–1147, 2011.

REMYINGTON, T. L.; ISAAC, A.; VICKERS, D. M.; FULLER, J.; WRENN SMITH, S. Epidemiology of candidemia at a tertiary Canadian hospital, 2004–2013. **Official Journal of the Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada**, v. 3, n. 1, p. 14–23, 2018.

RHODES, J.; ABDOLRASOULI, A.; FARRER, R. A.; CUOMO, C. A.; AANENSEN, D. M.; ARMSTRONG-JAMES, D.; FISHER, M.T.; SCHELENZ, S. Genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging human fungal pathogen *Candida auris* article. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2018.

ROSA DUQUE, J. S.; TO, K. K.; CHIANG, A. K.S.; CHAN, G.C.F.; POON, R.W.S.; YUEN, K-Y.; HÁ, S-Y.; CHEUK, D. K. *Candida Tropicalis* renal microabscesses in a child with leukemia confirmed using nucleic acid amplification and recovery after prolonged antifungal and corticosteroid treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 81, p. 110–113, 1 abr. 2019.

ROSATO, A.; CATALANO, A.; CAROCCI, A.; CARRIERI, A.; CARONE, A.; CAGGIANO, G.; FRANCHINI, CARLO.; CORBO, FILOMENA.; MONTAGNA, M. T. In vitro interactions between Anidulafungin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms of *Candida* spp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 1002-1005, 2016.

RUSU, E.; RADU-POPESCU, M.; PELINESCU, D.; VASSU, T. Treatment with some anti-inflammatory drugs reduces germ tube formation in *Candida albicans* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1379–1383, 2014.

RUSU, E.; SARBU, I.; MITACHE, M.; MOLDOVAN, H.; BIRIS, C. I.; VASSU, T.; PELINESCU, D. Ultrastructural Changes of *Candida albicans* Species Induced by the Presence of Sodium Diclofenac. **Rev. Chim.**, v. 68, n. 11, p. 2566-2569, 2017.

SAFAVIEH, M.; COARSEY, C.; ESIQBU, N.; MEMIC, A.; VYAS, J. M.; SHAFIEE, H.; ASGHAR, W. Advances in *Candida* detection platforms for clinical and point-of-care applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 441–458, 2017.

SAHAL, G.; WOERDENBAG, H. J.; HINRICHS, W. L.; VISSER, A.; TEPPER, P. G.; QUAX, W. J.; MEI, H.C.; BILKAY, I. S Antifungal and biofilm inhibitory effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil on biofilm forming by *Candida tropicalis* isolates; an in vitro study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 246, p. 112188, 10 jan. 2020.

SANDHYA, R.T.; SRIKUMAR, R.; REDDY, E.P.; LATHA, S. Prevalence and Characterization of Opportunistic *Candidal* Infection among Patients with Type II Diabetes Mellitus. **Indian Journal of Public Health Research & Development**, v. 10, n. 7, p. 258, 2019.

SATO, K.; MAKIMURA, K.; HASUMI, Y.; NISHIYAMA, Y.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and**

Immunology, v. 53, n. 1, p. 41–44, jan. 2009.

SEBASTIAN, S.; MALHOTRA, R.; PANDE, A.; GAUTAM, D.; XESS, I.; DHAWAN, B. Staged Reimplantation of a Total Hip Prosthesis After Co-infection with *Candida tropicalis* and *Staphylococcus haemolyticus*: A Case Report. **Mycopathologia**, v. 183, n. 3, p. 579–584, 1 jun. 2018.

SEERVAI, R. N. H.; JONES, S. K.; HIRAKAWA, M. P.; PORMAN, A. M.; BENNETT, R. J. Parasexuality and Ploidy Change in *Candida tropicalis*. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 12, p. 1629-1640, 2013.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 349-361, 2008.

SFEIR, M.M.; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C.; GAMALETSSOU, M. N.; SCHUETZ, A. N.; SOAVE, R.; BESIEN, K.V.; SMALL, C.B.; PERLIN, D.S.; WALSH, T. J. Breakthrough Bloodstream Infections Caused by Echinocandin-Resistant *Candida tropicalis*: An Emerging Threat to Immunocompromised Patients with Hematological Malignancies. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 20, 2020.

SHANMUGHAPRIYA, S.; SORNAKUMARI, H.; LENCY, A.; KAVITHA, S.; NATARAJASEENIVASAN, K. Synergistic effect of amphotericin B and tyrosol on biofilm formed by *Candida krusei* and *Candida tropicalis* from intrauterine device users. **Medical Mycology**, v. 52, n. 8, p. 853–861, 1 nov. 2014.

SHARIFZADEH, A.; KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; JAMNANI, F. A.; HAJIABDOLBAGHI, M.; TAMAMI, I. A. Oral microflora and their relation to risk factors in HIV+ patients with oropharyngeal candidiasis. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 23, n. 2, p. 105–112, 2013.

SHARMA, M.; BISWAS, D.; KOTWAL, A.; THAKURIA, B.; KAKATI, B.; CHAUHAN, B. S.; PATRAS, A. Ibuprofen-mediated reversal of fluconazole resistance in clinical isolates of *Candida*. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 9, n. 1, 2015.

SHETH, C. C.; MAKDA, K.; DILMAHOMED, Z.; GONZÁLEZ, R.; LUZI, A.; JOVANI-SANCHO, M. D. M.; VESES, V. Alcohol and tobacco consumption affect the oral carriage of *Candida albicans* and *mutans streptococci*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 254–259, 1 out. 2016.

SHI, G. X.; SHAO, J.; WANG, T.; WU, D.; WANG, C. Mechanism of berberine-mediated fluconazole-susceptibility enhancement in clinical fluconazole-resistant *Candida tropicalis* isolates. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 93, p. 709–712, 1 set. 2017.

SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S.C.; BRILHANTE, R. S. N.; SOARES, G. D. P.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F.G. *Candida* species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): In vitro antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3–4, p. 324–328, 26 out. 2010.

SILVA-DIAS, A.; MIRANDA, I. M.; BRANCO, J.; MONTEIRO-SOARES, M.;

- PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 12 mar. 2015.
- MEDEIROS, C.I.S.; SILVA, D. D. F.; PÉREZ, A.L.A.L.; FILHO, G.G.A.; FILHO, A.A.O.; LIMA, E.O. Study of the Antifungal Potential of (R) - (+) -Citronellal and Its Association With Therapeutic Agents Used in the Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. **Bioscience journal**, V. 33, N. 2,P. 494–506, 2017.
- SILVA, S.; RODRIGUES, C. F.; ARAÚJO, D.; RODRIGUES, M. E.; HENRIQUES, M. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 8, 21 fev. 2017.
- SINGH, S.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Predisposing factors endorsing *Candida* infections. **Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive**, v. 23, n. 3, p. 211–23, 1 set. 2015.
- SONIA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.
- SOUZA, C. M. C.; JUNIOR, S. A.P.; MORAES, T. D. S.; DAMASCENO, J. L.; MENDES, S.A.; DIAS, H. J.; STEFANI, R.; TAVARES, D.C.; MARTINS, C. H.G.; CROTTI, A.E.M. ; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; MENDES-GIANNINI, R.H.P. PIRES, R.H. Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. **Medical Mycology**, v. 54, n. 5, p. 515–523, 1 jul. 2016.
- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 13, 2013.
- SPECTOR, A. A. Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. 52-56, 2009.
- SPITZER, M.; ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169–185, 2017.
- SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial Fungal Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 1023–1052, dez. 2016.
- SWIDERGALL, M.; FILLER, S. G. Oropharyngeal Candidiasis: Fungal Invasion and Epithelial Cell Responses. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2017.
- TAKAHASHI, H.; UEDA, K.; ITANO, E. N.; YANAGISAWA, M.; MURATA, Y.; MURATA, M.; YAGUCHI, T.; MURAKAMI, M.; KAMEI, K.; INOMATA, T.; MIYAHARA, H. *Candida albicans* and *C.tropicalis* Isolates from the Expired Breaths of Captive Dolphins and Their Environments in an Aquarium Yoshiteru Murata *Candida albicans* and *C. tropicalis* Isolates from the Expired Breaths of Captive Dolphins and Their Environments in an Aquarium. **Veterinary Medicine International**, p. 12, 2010.

- TANAKA, H.; ISHIDA, K.; YAMADA, W.; NISHIDA, T.; MOCHIZUKI, K.; KAWAKAMI, H. Study of ocular candidiasis during nine-year period. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n. 3, p. 149–156, 1 mar. 2016.
- TAVEIRA, G. B.; CARVALHO, A. O.; RODRIGUES, R.; TRINDADE, F. G.; DA CUNHA, M.; GOMES, V. M. Thionin-like peptide from *Capsicum annuum* fruits: Mechanism of action and synergism with fluconazole against *Candida* species Applied microbiology. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 12, 27 jan. 2016.
- TEO, J. Q.-M.; LEE, S. J. Y.; TAN, A. L.; LIM, R. S. M.; CAI, Y.; LIM, T. P.; KWA, A. L. H. Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida* bloodstream isolates. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 63, 17 dez. 2019
- TERÇAS, A. L. G.; MARQUES, S.G.; MOFFA, E.B.; ALVES, M.B.; DE AZEVEDO, C.M.; SIQUEIRA, W.L.; MONTEIRO, C.A. Antifungal Drug Susceptibility of *Candida* Species Isolated from HIV-Positive Patients Recruited at a Public Hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2 mar. 2017.
- THOMPSON, G. R.; PATEL, P. K.; KIRKPATRICK, W. R.; WESTBROOK, S. D.; BERG, D.; ERLANDSEN, J.; REDDING, S.W.; PATTERSON, T. F. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 109, n. 4, p. 488–495, 2010.
- TSAO, S.; RAHKHOODAEI, F.; RAYMOND, M. Relative Contributions of the *Candida albicans* ABC Transporters Cdr1p and Cdr2p to Clinical Azole Resistance †. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 53, n. 4, p. 1344–1352, 2009.
- TULLIO, V.; ROANA, J.; SCALAS, D.; MANDRAS, N. Evaluation of the Antifungal Activity of *Mentha x piperita* (*Lamiaceae*) of Pancalieri (Turin, Italy) Essential Oil and Its Synergistic Interaction with Azoles. **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 3148, 29 ago. 2019.
- UDAYALAXMI, J.; JACOB, S.; D’SOUZA, D. Comparison between virulence factors of *Candida Albicans* and non-albicans species of *Candida* isolated from genitourinary tract. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 11, p. DC15-DC17, 2014.
- URAI, M.; KANEKO, Y.; NIKI, M.; INOUE, M.; TANABE, K.; UMEYAMA, T.; FUKAZAWA, H.; OHNO, H.; MIYAZAKI, Y. Potent drugs that attenuate anti-*Candida albicans* activity of fluconazole and their possible mechanisms of action. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 10, p. 612–615, 1 out. 2014.
- VALENTIN, A.; CANTON, E.; PEMAN, J.; MARTINEZ, J. P. Voriconazole inhibits biofilm formation in different species of the genus *Candida*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2418–2423, 1 out. 2012.
- VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **The FASEB Journal**, v. 1, n. 2, p. 89–96, ago. 1987.
- VERGIDIS P, CLANCY CJ, S. R. Early Source Control, Together With Antifungal Therapy, Is the Key to Management of Intra- abdominal *Candida* Infection. **PLoS One**, v. 11, n. 4, 2016
- WAKABAYASHI, H.; ABE, S., OKUTOMI, T., TANSHO, S., KAWASE, K., E YAMAGUCHI, H. Cooperative Anti-*Candida* Effects of Lactoferrin or Its Peptides in

Combination with Azole Antifungal Agents. **Microbiology and Immunology**, v. 40, n. 11, p. 821–825, nov. 1996.

WANG, E.; FARMAKIOTIS, D.; YANG, D.; MCCUE, D. A.; KANTARJIAN, H. M.; KONTOYIANNIS, D. P.; MATHISEN, M. S. The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 8, p. 2362–2368, ago. 2015a.

WANG, H.; XU, Y.-C.; HSUEH, P.-R. Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility in invasive *Candida* species in the Asia-Pacific region. **Future Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 1461–1477, 18 out. 2016.

WANG, L.; JI, X.; SUN, G. F.; QIN, Y. C.; GONG, M.-Z.; ZHANG, J. X.; LI, N.-C.; NA, Y.-Q. Fungus ball and emphysematous cystitis secondary to *Candida tropicalis*: A case report. **Canadian Urological Association Journal**, v. 9, n. 9–10, p. E683–E686, 1 set. 2015b.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309–317, 2004.

WITTIG, E. O.; LOPES, R. W.; KASTING, G. Meningoencefalite a *Candida*. **Arq. Neuro - psiquiat (São Paulo)**, v. 31, p. 146, 1973.

WU, Y.; LI, Y. H.; YU, S. B.; LI, W. G.; LIU, X. S.; ZHAO, L.; LU, J. X. A genome-wide transcriptional analysis of yeast-hyphal transition in *Candida tropicalis* by RNA-Seq. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–16, 2016.

XIAO, Z.; WANG, Q.; ZHU, F.; AN, Y. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and mortality risk factors of candidemia among critically ill patients: A retrospective study from 2011 to 2017 in a teaching hospital in China. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2019.

XISTO, M. I. D. S.; CARAMALHO, R. D.; ROCHA, D. A.; FERREIRA-PEREIRA, A.; SARTORI, B.; BARRETO-BERGTER, E.; JUNQUEIRA, M.L.; LASS-FLÖRL, C.; LACKNER, M. Pan-azole-resistant *Candida tropicalis* carrying homozygous *erg11* mutations at position K143R: a new emerging superbug?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 988-992, 2017.

YAN, Z.; HUA, H.; XU, Y.; SAMARANAYAKE, L. P. Potent Antifungal Activity of Pure Compounds from Traditional Chinese Medicine Extracts against Six Oral *Candida* Species and the Synergy with Fluconazole against Azole-Resistant *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

YANG, S.; LIAO, Y.; CONG, L.; LU, X.; YANG, R. In vitro interactions between non-steroidal anti-inflammatory drugs and antifungal agents against planktonic and biofilm forms of *Trichosporon asahii*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2016.

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

YIN, N.; MA, W.; PEI, J.; OUYANG, Q.; TANG, C.; LAI, L. Synergistic and

antagonistic drug combinations depend on network topology. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 8 abr. 2014.

YOWANG, A.; JINATHAM, V.; TSAOUSIS, A.; KULLAWONG, N.; POPLUECHAI, S.; GENTEKAKI, E. Diversity of eukaryotic gut microbiota of northern Thai populations. **Access Microbiology**, v. 1, n. 1A, p. 557, 1 mar. 2019.

YU, S.; LI, W.; LIU, X.; CHE, J.; WU, Y.; LU, J. Distinct Expression Levels of ALS, LIP, and SAP Genes in *Candida tropicalis* with Diverse Virulent Activities. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1175, 29 jul. 2016.

YUCESOY, M.; OKTEM, I. M. A.; GULAY, Z. In-Vitro synergistic effect of fluconazole with nonsteroidal anti-inflammatory agents against *Candida albicans* strains. **Journal of Chemotherapy**, v. 12, n. 5, p. 385–389, 2000.

ZAJC, J.; ZALAR, P.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeasts in Hypersaline Habitats. In: **Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 293–329.

ZHU, D.; MA, Y.; WANG, G.; PAN, G. Identification of *Candida tropicalis* BH-6 and Synergistic Effect with *Pantoea agglomerans* BH-18 on Hydrogen Production in Marine Culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 5, p. 2677–2688, 6 jan. 2015.

ZNAIDI, S.; DE DEKEN, X.; WEBER, S.; RIGBY, T.; NANTEL, A.; RAYMOND, M. The zinc cluster transcription factor Tac1p regulates PDR16 expression in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 440–452, 2007.

ANEXO A – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.

Original Article – Biofouling – Qualis A1

2020 Jun 16;1-9.

doi: 10.1080/08927014.2020.1777285. Online ahead of print.

Diclofenac Exhibits Synergism With Azoles Against Planktonic Cells and Biofilms of *Candida tropicalis*

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante¹, Jaiane Alves Brasil¹, Jonathas Sales de Oliveira¹, Vandbergue Santos Pereira¹, Waldemiro de Aquino Pereira-Neto¹, José Júlio Costa Sidrim¹, Marcos Fábio Gadelha Rocha^{1 2}

Affiliations

- PMID: **32546021**
- DOI: [10.1080/08927014.2020.1777285](https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1777285)

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of diclofenac on minimum inhibitory concentrations of antifungals against planktonic cells and biofilms of *Candida tropicalis*. Susceptibility testing of planktonic cells was evaluated using the broth microdilution assay and checkerboard method. Biofilm formation by *C. tropicalis* in the presence of diclofenac, alone or in combination with antifungals, was also evaluated, and scanning electron microscope (SEM) and confocal microscope (CLSM) analyses were performed. Diclofenac showed an MIC of 1024 $\mu\text{g ml}^{-1}$ against planktonic cells. The MICs of fluconazole and voriconazole against azole-resistant isolates were reduced 8- to 32-fold and 16- to 256-fold, respectively, when in combination with diclofenac. When in combination with fluconazole or voriconazole, diclofenac reduced the antifungal concentration necessary to inhibit *C. tropicalis* biofilm formation. In conclusion, diclofenac presents synergism with fluconazole and voriconazole against resistant *C. tropicalis* strains and improves the activity of these azole drugs against biofilm formation.

Keywords: *Candida tropicalis*; biofilm; diclofenac; synergism