



Universidade Federal do Ceará
Departamento de Patologia e Medicina Legal
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica

Maria Aryadine Venancio Holanda

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do midazolam frente a isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, sua atividade contra biofilme formado e investigação do provável mecanismo de ação

Fortaleza
2020

Maria Aryadine Venancio Holanda

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do midazolam frente a isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, sua atividade contra biofilme formado e investigação do provável mecanismo de ação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

**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)

- H669a Holanda, Maria Aryadine Venancio.
Avaliação in vitro da atividade antifúngica do midazolam frente a isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, sua atividade contra biofilme formado e investigação do provável mecanismo de ação / Maria Aryadine Venancio Holanda. – 2020.
84 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.
1. midazolam. 2. biofilme. 3. potencial antifúngico. 4. reposicionamento de fármacos. 5. *Candida* spp.. I. Título.

CDD 616.9

Maria Aryadine Venancio Holanda

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do midazolam frente a isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, sua atividade contra biofilme formado e investigação do provável mecanismo de ação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Médica.

Aprovada em: 08/12/2020.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Solange de Oliveira Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À Deus e minha família.

AGRADECIMENTO

À Deus, por me permitir dá mais um passo na minha formação acadêmica dando força, paciência, discernimento e esperança.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa durante o período do mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior por ter dado a mim a oportunidade e confiança de participar e desenvolver trabalhos junto ao grupo e pelos conselhos durante a caminhada até esse momento. A ele meu profundo agradecimento.

Aos professores participantes da banca por terem aceitado o convite e disponibilizado seu tempo, somando com seu conhecimento e contribuindo com melhorias para o trabalho apresentado.

Aos colegas do Laboratório de Bios prospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) por todo o compartilhamento de experiências, pelo acolhimento e por terem sido muito prestrativos durante o percurso até aqui. Tornaram essa jornada mais descomplicada e prazerosa. A eles, meu profundo agradecimento.

Aos meus pais, Sidney do Nascimento Bezerra e Francisca Maria de Guadalupe Venancio Lemos, pelo exemplo e apoio.

Ao meu esposo, Helmano César da Silva Holanda, por me instigar a ser cada vez melhor como pessoa e profissional e por todos seus conselhos e orações. Ao meu filho, Heitor Venancio Holanda, pelo dom da sua vida e por ter sido a força que recebi durante a conclusão desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica com seu corpo docente e discente, que me fizeram crescer de uma maneira muito valiosa.

Aos parceiros do LABIMAN, em especial ao Dr. Bruno Coelho Cavalcanti, por toda contribuição no desenvolvimento desse e demais projetos realizados pelo grupo.

“Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria”.

(Santo Agostinho).

RESUMO

A ocorrência da candidíase invasiva em hospitais terciários vem aumentando significativamente nas últimas décadas, abrangendo aproximadamente 80% das infecções fúngicas nosocomiais. Um dos fatores que contribuem com essa porcentagem é o aparecimento de resistência aos antifúngicos, que pode ser influenciada pela capacidade que algumas espécies de *Candida* spp. apresentam de formar biofilmes e também pelo reduzido arsenal terapêutico, busca-se novas alternativas que visem driblar essa limitação. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do midazolam isolado e em associação com azólicos frente a isolados clínicos de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol na forma planctônica e em biofilme. Utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, descrita pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, M27-A3), com o intuito de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Realizou-se também ensaios de citometria de fluxo para a investigação do provável mecanismo de ação, avaliação de dano ao DNA pelo ensaio do cometa e teste de citotoxicidade na linhagem L929 de fibroblastos murino. O midazolam apresentou CIM que variou de 125 a 250 µg/mL. O midazolam não demonstrou citotoxicidade quando avaliada nas concentrações de 31,5 a 500 µg/mL. Apresentou redução significativa da viabilidade celular do biofilme de *Candida albicans* em 500 µg/mL, de *Candida tropicalis* em 1000 µg/mL e de *Candida parapsilosis* em 125 µg/mL. Verificou-se também que o midazolam promove diminuição da densidade celular, danos na membrana mitocondrial e que propiciou externalização da fosfatidilserina, mas não foi capaz de produzir espécies reativas de oxigênio e causar danos ao DNA. Observou-se também a interação do midazolam e do biofilme de *Candida* spp. através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde as células tratadas apresentaram alteração em sua aparência, o que pode ter sido ocasionado pela perda da rigidez da parede celular fúngica. Portanto, o midazolam mostrou-se como potencial antifúngico frente aos isolados testados nesse estudo.

Palavras-chave: midazolam, biofilme, potencial antifúngico, reposicionamento de fármacos, *Candida* spp.

ABSTRACT

The occurrence of invasive candidiasis in tertiary hospitals has increased significantly in recent decades, covering approximately 80% of nosocomial fungal infections. One of the factors that contribute to this percentage is the appearance of the resistance to antifungals, which can be influenced by the ability of some species of *Candida* spp. to form biofilms and also by the reduced therapeutic arsenal, makes it necessary to search for new alternatives to overcome this limitation. The objective of the work was to evaluate the antifungal activity of midazolam isolated and in association with azolics in relation to clinical isolates of *Candida* spp. resistant to fluconazole in planktonic form and in biofilm. The microdilution broth technique described by the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, M27-A3) was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Flow cytometry tests were also performed to investigate the probable mechanism of action, evaluation of DNA damage by the comet test and cytotoxicity test on L929 murine fibroblasts. Midazolam showed MIC ranging from 125 to 250 $\mu\text{g/mL}$. Midazolam showed no cytotoxicity when evaluated at concentrations of 31.5 to 500 $\mu\text{g/mL}$. It showed significant reduction in cellular viability of *Candida albicans* biofilm by 500 $\mu\text{g/mL}$, *Candida tropicalis* by 1000 $\mu\text{g/mL}$ and *Candida parapsilosis* by 125 $\mu\text{g/mL}$. It was also found that midazolam promotes decreased cell density, damage to the mitochondrial membrane and that it provided phosphatidylserine externalization but was not able to produce reactive oxygen species and cause DNA damage. The interaction of midazolam and *Candida* spp. biofilm was also observed through scanning electron microscopy (SEM), where the treated cells presented alteration in their appearance, which may have been caused by the loss of rigidity of the fungal cell wall. Therefore, midazolam proved to be an antifungal potential against the isolates tested in this study.

Keywords: midazolam, biofilm, antifungal potential, drug repositioning, *Candida* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Etapas para o desenvolvimento de biofilme de <i>Candida</i> spp.	24
Figura 2 -	Estrutura química do midazolam	30
Figura 3 -	Resumo dos resultados obtidos	39
Figura 4 -	Avaliação da viabilidade celular em cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol por citometria de fluxo	45
Figura 5 -	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial em cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol por citometria de fluxo	47
Figura 6 -	Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em <i>Candida</i> spp. resistente ao fluconazol expostas ao midazolam em diferentes intervalos de tempo avaliado por citometria de fluxo	49
Figura 7 -	Avaliação da externalização de fosfatidilserina em <i>Candida</i> spp. resistente ao fluconazol expostas ao midazolam em diferentes intervalos de tempo avaliado por citometria de fluxo	51
Figura 8 -	Avaliação do índice de dano ao DNA em <i>C. albicans</i> resistente a azólicos através do ensaio do cometa versão alcalina	52
Figura 9 -	Atividade do midazolam frente ao biofilme formado de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> avaliada pelo método do MTT	54
Figura 10 -	Perfil da anfotericina B frente ao biofilme formado de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> avaliada pelo método do MTT	55
Figura 11 -	Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de <i>Candida</i> spp. após incubação na concentração de 10XCIM do MIDAZ.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de espécies de <i>Candida</i> spp.....	16
Tabela 2 - Efeito antifúngico do midazolam frente à cepas de <i>Candida</i> spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol	33
Tabela 3 - Efeito da associação do midazolam (MIDAZ) com fluconazol (FLUCO) frente à cepas de <i>Candida</i> spp.....	44
Tabela 4 - Efeito da associação do midazolam (MIDAZ) com itraconazol (ITR) frente à cepas de <i>Candida</i> spp.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANFO B	Anfotericina B
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DCF	2',7' Diclorofluoresceína
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína não fluorescente
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FICI	<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>
FITC	Fluoresceína
FLUCO	Fluconazol
GABA	Ácido γ -aminobutírico
H2DCFDA	Diacetato de 2',7'- diclodihidrofluoresceína
ISRS	Inibidores seletivos da receptação da serotonina
ITRA	Itraconazol
MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i>
MEM	Meio essencial mínimo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
MIDAZ	Midazolam
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)propanesulfonic Acid</i>
MTT	Brometo de difeniltetrazólio –[3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo]
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI	Iodeto de propídio
PPB	Tampão fosfato de potássio
RH123	Rodamina 123
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

SAP	<i>Secreted aspartyl proteinases</i>
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
UTI	Unidade de terapia intensiva
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
$\Delta\psi_m$	Potencial transmembrana mitocondrial

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Gênero <i>Candida</i> e Infecções fúngicas.....	16
2.2	Principais fatores de virulência.....	18
2.2.1	<i>Biofilme</i>	19
2.3	Resistência a antifúngicos e Incidência de Candidíase	21
2.4	Novas alternativas terapêuticas	26
2.5	Midazolam	27
3.	HIPÓTESES	29
4.	OBJETIVOS	30
4.1	Objetivo geral	30
4.2	Objetivos específicos	30
5.	MATERIAS E MÉTODOS	31
5.1	Microrganismos	31
5.2	Fármacos	31
5.3	Teste de sensibilidade aos antifúngicos	31
5.3.1	<i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	31
5.3.2	<i>Teste do sinergismo pela técnica de microdiluição em caldo: checkerboard</i> ..	32
5.3.3	<i>Análise dos dados</i>	33
5.4	Testes utilizando citometria de fluxo	33
5.4.1	<i>Tratamento das células de Candida spp.</i>	33
5.4.2	<i>Determinação da viabilidade celular</i>	33
5.4.3	<i>Despolarização mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células de Candida spp.</i>	33
5.4.4	<i>Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células de Candida spp.</i>	34
5.4.5	<i>Determinação da externalização de fostatidilserina em células de Candida spp.</i>	34
5.4.6	<i>Análise dos dados dos ensaios de citometria de fluxo</i>	34
5.5	Ensaio do Cometa	34
5.5.1	<i>Análise dos dados obtidos pelo ensaio do cometa</i>	35
5.6	Ensaio de biofilme	36
5.6.1	<i>Determinação da atividade do midazolam sobre biofilme formado de</i>	

	<i>Candida spp.</i>	36
5.6.2	<i>Análise dos dados dos resultados do biofilme</i>	37
5.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
5.8	Cultivo de células L929	37
5.8.1	<i>Inibição da viabilidade celular de células L929 utilizando o teste MTT</i>	38
6.	RESULTADOS	39
6.1	Midazolam apresenta atividade antifúngica frente às cepas de <i>Candida spp.</i> resistentes ao fluconazol	40
6.2	Midazolam apresenta interação com azólicos	40
6.3	Avaliação do provável mecanismo de morte celular	44
6.3.1	<i>Midazolam reduz a viabilidade celular de Candida spp.</i>	44
6.3.2	<i>Midazolam ocasiona despolarização mitocondrial ($\Delta\psi_m$)</i>	46
6.3.3	<i>Midazolam não produz espécies reativas de oxigênio (EROs)</i>	48
6.3.4	<i>Midazolam atua na externalização de fosfatidilserina</i>	50
6.3.5	<i>Midazolam não ocasiona dano ao DNA</i>	52
6.4	Midazolam inibe crescimento de biofilme formado de <i>Candida spp.</i>	53
6.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	56
6.6	Midazolam não apresenta citotoxicidade em células L929	58
7.	DISCUSSÃO	59
8.	CONCLUSÃO	63
9.	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Candida* podem ser encontrados como constituintes da microbiota humana (BRUNKE *et al.*, 2016; FORNARI *et al.*, 2016), e seus principais representantes são *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*. Contudo, quando o indivíduo se encontra imunocomprometido (indivíduo com alguma doença de base ou transplantados, por exemplo) ou por ocasião de procedimentos médicos (cirurgias invasivas, uso de antibióticos de amplo espectro, uso de próteses), esse gênero pode tornar-se um patógeno oportunista e levar a infecções que variam de candidíase superficial de pele e mucosa, a infecções invasivas mais graves (SANTOS *et al.*, 2014, CANELA *et al.*, 2017).

Em humanos, a candidemia apresenta-se como a infecção invasiva mais recorrente, podendo ou não estar associada à invasão de tecidos profundos (ANTINORI *et al.*, 2016), com 95% dos casos de candidíase associados a *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*. (YAPAR, 2014; SAFAVIEH *et al.*, 2017), colocando esses microrganismos em quarto lugar dentre os mais isolados em sepse hospitalar (KUMAR *et al.*, 2015).

Destas espécies, *Candida albicans* é apontada como a espécie responsável pela maior parte dos casos analisados ao redor de mundo de infecções em seres humanos. Entretanto, o número de casos a partir de espécies de *Candida* não-*albicans* vêm crescendo ao longo dos últimos anos, variando de acordo com a epidemiologia da candidemia (DA COSTA *et al.*, 2014; SILVA-DIAS *et al.*, 2015; DE MEDEIROS *et al.*, 2019).

Não obstante a isso, o gênero *Candida* apresenta também fatores de virulência como adesão aos tecidos e dispositivos médicos do hospedeiro, além da capacidade de formação de biofilme. O biofilme, por sua vez, corresponde a um dos principais e mais patogênico fator de virulência, é refere-se à comunidade de microrganismos que se organizam dentro de uma matriz extracelular apresentando vantagens para a sobrevivência por conferir proteção, resistência a algum tipo de estresse, seja ele químico ou físico, além da possibilidade de haver cooperação metabólica (RAMAGE *et al.*, 2012; VALENTÍN *et al.*, 2012; BONHOMME; D'ENFERT, 2013; CHANDRA *et al.*, 2015; GULATI e NOBILE, 2016).

Estudos têm mostrado que a candidemia apresenta-se como a infecção fúngica responsável por grande parte dos casos de candidíase invasiva. Em pacientes internados está relacionada como uma das causas predominantes de doenças graves e acompanhada de uma alta taxa de mortalidade, influenciada por fatores como uso crescente de dispositivos

invasivos (em especial os intravasculares) e permanência prolongada em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), ocasionado custos elevados ao sistema de saúde (YAPAR *et al.*, 2014; KULLBERG e ARENDRUP, 2015; SULEYMAN e ALANGADEN, 2016; TADEC *et al.*, 2016; CANELA *et al.*, 2018; DE MELO *et al.*, 2019).

Apesar do tratamento de infecções por *Candida* spp. ter mudado e evoluído ao longo das décadas ele ainda encontra-se limitado por conta do número reduzido de agentes antifúngicos, em decorrência de problemas que envolvem a segurança dos medicamentos, principalmente no que tange à sua toxicidade nas células hospedeiras, assim como pelo desenvolvimento de resistência frente aos fármacos disponíveis para terapia de infecções por *Candida* spp. (TOBUDIC *et al.*, 2012; BASSETTI *et al.*, 2018; WIEDERHOLD, 2018).

Os antifúngicos mais utilizados na contemporaneidade abrangem as seguintes categorias: poliênicos (nistatina e anfotericina B), os triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol) e as equinocandinas (casposfungina e micafungina) (MATTHAIYOU *et al.*, 2015). Destes, os azóis, que subdividem-se em imidazóis (cetoconazol e miconazol) e triazóis, são os mais utilizados na clínica (VANDEPUTTE *et al.*, 2012) por serem menos tóxicos e de custo mais acessível, atuando na via de biossíntese do ergosterol através da inibição da enzima 14- α -lanosterol desmetilase, causando a depleção do ergosterol e a consequente perda da integridade da membrana (PFALLER, 2012). Entretanto, o uso das equinocandinas vem sendo recomendado por serem eficazes no tratamento de infecções com *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans*, biofilmes e até mesmo em cepas resistentes aos azólicos apesar de apresentarem limitação quanto à ausência de formulação oral, por exemplo (PAPPAS *et al.*, 2016; KATRAGKOU *et al.*, 2016).

Com o número e eficácia limitados dos agentes antifúngicos atuais, bem como a resistência antimicrobiana têm motivado o desenvolvimento de novos fármacos que apresentem toxicidade consideravelmente baixa e capacidade de reduzir o desenvolvimento de resistência por parte desses microorganismos (SIMÕES *et al.*, 2012; BASSETTI *et al.*, 2018).

Nesse contexto, o reposicionamento de fármacos atua como aliado por diminuir os custos no tratamento terapêutico, uma vez que aumenta o espectro de ação de um medicamento que já se encontra com disponibilidade no mercado (PIERCE *et al.*, 2015).

O midazolam é um benzodiazepínico que pode ser utilizado como anestésico intravenoso, apresentando menos depressão cardiovascular e respiratória que os anestésicos comuns, como propofol (RANG *et al.*, 2016). A ligação dos benzodiazepínicos ao seu receptor reflete sobre o receptor GABA potencializando a sua ação, com consequente

hiperpolarização da fibra nervosa, com produção de efeito sedativo (RANG *et al.*, 2016), podendo ocasionar relaxamento do músculo genioglosso, produzindo obstrução à passagem do ar pela língua ((RANG *et al.*, 2016).

Kathwate *et al.* (2015) observaram que o midazolam apresentou potencial antifúngico frente a duas cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 10231 e 90028) com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 100µg/ml em ambas. Observou-se também ação frente a biofilme formado, com inibição na concentração de 125µg/ml.

Dessa forma, tendo em vista as vantagens do reposicionamento de fármacos quanto à economia de tempo e dinheiro e a necessidade de buscar novos candidatos que apresentem potencial antifúngico, o presente estudo teve como finalidade avaliar a ação antifúngica do midazolam frente a células planctônicas e a biofilme formado de três espécies de *Candida* spp.; compreender os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antifúngico do fármaco utilizado por citometria de fluxo e ensaio do cometa e realizar ensaio de citotoxicidade em células de fibroblasto murino L929.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Candida* e Infecções fúngicas

O gênero *Candida* é responsável por 90% de todos os casos de infecções fúngicas invasivas (NAMI *et al.*, 2018) e como causa de infecções nosocomiais da corrente sanguínea ocupam a quarta, sexta e sétima posição nos EUA, Europa e Brasil, respectivamente (CAGGIANO *et al.*, 2015). Esse fato aumenta o tempo de hospitalização, dos custos hospitalares e da taxa de mortalidade, que varia de 30 a 81% (DE ROSA *et al.*, 2015; BASSETTI *et al.*, 2015).

C. albicans é o agente de candidemia mais prevalente, contudo a epidemiologia da candidíase mudou nos últimos anos, onde o relato de isolamento de espécies de não-*albicans* como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* têm aumentado (MATTA *et al.*, 2017). Vale salientar que desde a década de 80, casos de candidemia aumentaram em diferentes regiões no mundo e nos hospitais do Brasil, apresenta-se como uma das infecções oportunistas com elevadas taxas de incidência (CAMARGO *et al.*, 2010; MARINS *et al.*, 2018).

Candida albicans pode ser encontrada como componente da microbiota humana, presente na pele, orofaringe, trato respiratório inferior, trato gastrointestinal e sistema geniturinário (NAMI *et al.*, 2018). Entretanto quando o hospedeiro se encontra imunocomprometido podem ocasionar infecções tanto superficiais quanto sistêmicas e até mesmo septicemia, sendo considerada como causa principal de candidíase em ambientes hospitalares (ALEXANDER *et al.*, 2013; ARMSTRONG-JAMES *et al.*, 2017). Pode ser encontrada na forma de levedura ou apresentar pseudo-hifas e hifas verdadeiras a depender do ambiente (CANELA *et al.*, 2017; DE MELO *et al.*, 2019).

Candida tropicalis normalmente está associada à infecção e não como componente da microbiota humana, especialmente em pacientes adultos com perfil oncológico, diabetes e que fazem uso de antibióticos de amplo espectro. Muitos a consideram como a segunda mais virulenta dentro do gênero, atrás de *Candida albicans* (ZUZA-ALVES *et al.*, 2017).

Candida parapsilosis é um importante patógeno que, por colonizar a pele, está frequentemente associado a uso de dispositivos invasivos e pode causar surtos, sendo responsável por 30% dos casos de candidemia entre os recém-nascidos (YAPAR, 2014). Vale salientar a habilidade que esse microrganismo apresenta de produzir biofilmes, ocupando o segundo lugar quanto à produção de biofilme entre as demais espécies de *Candida*, apesar de

apresentar taxa de mortalidade mais baixa em comparação a *Candida albicans* (SILVA *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.*, 2013; THOMAZ *et al.*, 2018).

Candida glabrata é um agente infeccioso com ocorrência maior entre pacientes idosos e neoplásicos (YAPAR, 2014). Como é um patógeno que apresenta resistência ao fluconazol, infecções por *C. glabrata* podem ser tratadas com equinocandinas, porém estudos têm mostrado ocorrência de resistência a essa classe de antifúngicos (PHAM *et al.*, 2014; ARYAMLOO *et al.*, 2019). É a espécie de *Candida* que tem a capacidade de adquirir e, em seguida, expressar mutações de resistência na presença de pressão de seleção causada pelo aumento do uso de azólicos e equinocandinas no ambiente clínico (PRISTOV e GHANNOUM, 2019).

Candida krusei é intrinsecamente resistente ao fluconazol e é mais comum em pacientes que receberam células-tronco hematopoiéticas, por exemplo. Estudos vêm demonstrando que a presença desse microrganismo pode estar associada também a pacientes que receberam profilaxia com fluconazol, indicando uma possível pressão seletiva para um patógeno que também apresenta baixa sensibilidade ao fluconazol (YAPAR, 2014).

A prevalência das espécies, no entanto, vai variar de acordo com fatores como localização geográfica e com o grupo de pacientes em questão (CAGGIANO *et al.*, 2015). A tabela 1 mostra um apanhado das principais espécies isoladas num estudo realizado no sul do Brasil em 2018.

Espécie	Candidemia
<i>Candida albicans</i>	63
<i>Candida tropicalis</i>	18
<i>Candida parapsilosis</i>	13
<i>Candida glabrata</i>	18
<i>Candida krusei</i>	6
Outras espécies de <i>Candida</i> spp.	3

Adaptado de Breda *et al.* (2018).

2.2 Principais fatores de virulência

Alguns fatores contribuem para a patogenicidade das espécies de *Candida* e a compreensão dos mecanismos que esses microrganismos utilizam no estabelecimento da infecção é crucial para o desenvolvimento de novas terapias e diagnósticos antifúngicos. Entre esses fatores destacam-se adesão, polimorfismo, expressão de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases, hemolisinas e lipases) e a capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas (CANELA *et al.*, 2018; JALAL *et al.*, 2019).

A adesão é mediada por um conjunto especializado de proteínas, denominadas adesinas, que possibilitem a aderência do microrganismo a outras células do gênero *Candida*, a outros microrganismos, a superfícies abióticas e às células hospedeiras (GARCIA *et al.*, 2011). Esse processo corresponde à etapa que permite a colonização inicial pelo microrganismo e é essencial para o estabelecimento da doença (SILVA *et al.*, 2012), onde o processo pós adesão determina maior resistência às defesas do hospedeiro bem como a antifúngicos (MODRZEWSKA e KURNATOWSKI, 2015).

Nota-se também diferenças entre a adesão por parte das espécies de *Candida*, onde *C. albicans* apresenta maior capacidade de adesão *in vitro*, seguida por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (LIMA-NETO *et al.*, 2011) onde o mecanismo que envolve essa adesão baseia-se na interação entre a parede celular fúngica e a superfície da célula hospedeira, sendo mediada pelos seguintes fatores: célula fúngica, células do hospedeiro e as condições ambientais (WANG *et al.*, 2012).

Candida albicans pode apresentar-se como levedura em forma de ovoide, em células alongadas com constrições nos septos (pseudo-hifas) ou por hifas verdadeiras, caracterizando-se como um fungo polimórfico (MAYER *et al.*, 2013).

As espécies de *Candida* podem infectar o hospedeiro por estas estruturas morfológicas, seja pelas pseudo-hifas (*Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*) ou pelas hifas, a exemplo da *Candida albicans* (DAS *et al.*, 2019). A forma de levedura relaciona-se com o processo de disseminação pela corrente sanguínea e a forma de hifa é a mais invasiva, onde essa mudança na morfologia pode ser acarretada por sinais ambientais a exemplo da mudança de pH, de temperatura ou atmosfera (MAYER *et al.*, 2013).

Das *et al* (2019) buscaram implementar métodos de bioinformática e biologia de sistemas para analisar e interpretar a rede de proteínas interações proteicas (*Protein-Protein Interaction* - PPI) envolvidas na conversão de levedura para o desenvolvimento de hifas e

concluíram que alguns processos metabólicos foram significativos para a morfogênese e atividade patológica de *C. albicans*.

Acredita-se que as enzimas hidrolíticas extracelulares, principalmente as proteases, fosfolipases, lipases e hemolisinas desempenham um papel importante na patogenicidade do gênero *Candida* por facilitarem a adesão, a penetração nos tecidos e a subsequente invasão do hospedeiro (PEREIRA *et al.*, 2015). As enzimas hidrolíticas mais discutidas são as produzidas por *C. albicans*, que são as proteases aspárticas segregadas (Saps), que atuam contribuindo para a invasão ao tecido do hospedeiro por digestão ou destruição das membranas celulares e pela degradação das moléculas de superfície do hospedeiro. Há também algumas evidências de que as enzimas hidrolíticas são capazes de atacar células e moléculas do sistema imunológico do hospedeiro para evitar ou resistir à atividade antimicrobiana (MORAN *et al.*, 2012).

Quanto às fosfolipases, estas podem contribuir para a patogenicidade via disrupção das membranas do hospedeiro. Já as lipases apresentaram virulência reduzida em um modelo de infecção sistêmica em camundongos (MAYER *et al.*, 2013). Melo *et al.* (2019) observaram que cepas de *C. parapsilosis* foram capazes de produzir hemolisinas, enquanto *C. glabrata* foi capaz tanto de lisar os eritrócitos quando produziu fosfolipase, revelando que a dinâmica de patogenicidade pode se alterar com a espécie e que conhecer esses aspectos é fundamental para a escolha terapêutica.

2.2.1 Biofilme

Como visto anteriormente, além dos fatores predisponentes do hospedeiro, os fatores de virulência estão diretamente relacionados com a patogenicidade das espécies de *Candida*, seja ele o polimorfismo, a expressão de enzimas hidrolíticas e também a produção de adesinas que vão influenciar na formação de biofilme tanto nos tecidos vivos do hospedeiro como em dispositivos médicos, por exemplo (MAYER *et al.*, 2013, CANELA *et al.*, 2018).

Os biofilmes correspondem, portanto, a comunidades de células aderidas que estão organizadas em uma matriz extracelular polimérica em superfícies tanto biótica como abióticas (válvulas cardíacas, próteses internas e catéteres, dispositivos de assistência ventricular, dispositivos artificiais de bypass vascular e marca-passo), além de ser a forma mais frequente de se encontrar os microrganismos, o que o torna tão relevante para a comunidade científica (MARAK *et al.*, 2018; JALAL *et al.*, 2019).

A formação de um biofilme é facilitada intrinsecamente pela ação de adesinas bem como a associação entre células microbianas, que apresentam um padrão específico de expressão gênica. Importante salientar que pode haver a inclusão tanto de formas leveduriformes como filamentosas, que serão adequadas para a colonização de superfícies abióticas (BORGES *et al.*, 2018).

O processo para o desenvolvimento do biofilme envolve alguns estágios. O primeiro compreende a aderência das células de levedura sobre uma superfície, num período de aproximadamente 60 a 90 minutos para obtenção de uma camada basal de células, essencial para as fases subsequentes. Em seguida essas leveduras irão transformar-se em hifas, fundamentais para conferir a estabilidade do biofilme (GULATI *et al.*, 2016).

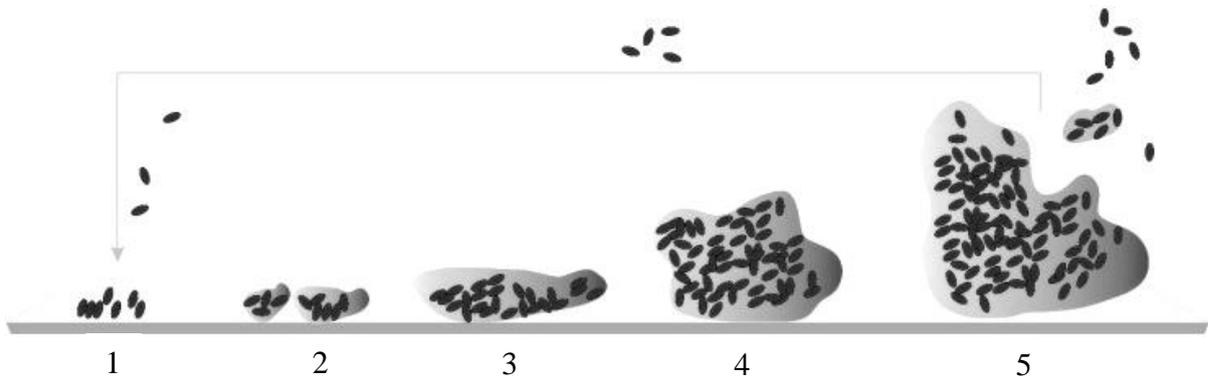
O próximo estágio compreende a secreção da matriz extracelular com a maturação de uma estrutura tridimensional (BONHOMME *et al.*, 2013). Ressalta-se que a composição dessa matriz pode variar por espécie, onde em *C. albicans* esta compreende 55% em glicoproteínas, 25% em carboidratos, 15% em lipídios e 5% em ácidos nucleicos (NOBILE *et al.*, 2015).

Na maturação do biofilme, que se dá tipicamente após 24h, observa-se uma aparência elaborada e consistente, o que confere proteção contra lesões químicas e físicas. Nessa fase é possível visualizar ao microscópio a presença de leveduras, pseudo-hifa e hifa. Para a fase final há o estágio de dispersão, onde as leveduras que estão dispersas no biofilme apresentam maior aderência e capacidade de formar biofilmes (GULATI *et al.*, 2016).

Há ainda a possibilidade de formação de biofilmes multiespécies, onde Xu *et al.* (2014) num modelo de mucosa *in vitro* demonstraram interações sinérgicas entre *C. albicans* e uma das bactérias orais *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* ou *Streptococcus gordonii*, o que mostrou-se benéfico para ambas espécies quanto à capacidade de invadir e formar biofilmes patogênicos. Barros *et al.* (2016) sugeriram que pode haver também competição entre diferentes espécies de *Candida* spp., onde *C. krusei* e *C. glabrata* foram capazes de alterar a formação de biofilme em espécie de *C. albicans*.

Na figura 1 é possível observar o complexo processo para formação de biofilme que se baseia na fase inicial de adesão em que a levedura em suspensão e as células planctônicas aderem à superfície; fase intermediária de desenvolvimento de biofilme; fase de maturação - a matriz polimérica penetra completamente todas as camadas das células aderidas à superfície em uma estrutura tridimensional; dispersão - as células mais superficiais deixam o biofilme e colonizam as áreas ao redor da superfície.

Figura 1 – Etapas para o desenvolvimento de biofilme de *Candida* spp.



1) as células se ligam reversivelmente à superfície; 2) as células se ligam irreversivelmente, pela ação de substâncias exopoliméricas; 3) primeira fase de maturação é alcançada, como indicado pelo desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme. 4) segunda fase de maturação com biofilme completamente maduro; 5) leveduras (células escuras na figura) se dispersam. Adaptado de Rodrigues *et al.* (2019).

A penetração pelos agentes antifúngicos é dificultada pela alta resistência a drogas antifúngicas e ao sistema imune do hospedeiro dessa comunidade, com capacidade de resistir a concentrações de fármacos até 1000 vezes mais elevadas do que para as leveduras (JALAL *et al.*, 2019).

Marak *et al.* (2018) demonstraram que de 41 isolados de *Candida albicans*, 21 (51,2%) cepas foram positivas para produção de biofilme. Entre o total de 49 de *Candida* não *albicans*, 28 (57,14%) isolados eram produtores de biofilme. Dos isolados de *Candida parapsilosis*, 100% mostrou capacidade de formação de biofilme, seguido de *C. tropicalis* (61,53%) e *C. krusei* (55,55%), mas *C. glabrata* não produziu biofilme. Esses dados corroboram com o fato das infecções por *Candida* não *albicans* continuarem a adquirir maior representatividade com o passar dos anos.

2.3 Resistência aos antifúngicos e Incidência de Candidíase

A gravidade das infecções por *Candida* spp. representa risco considerável de morbidade e mortalidade além de serem ocasionalmente difíceis de tratar, o que requer a busca pela terapêutica antifúngica adequada (GARNACHO-MONTERO *et al.*, 2013; MARINS *et al.*, 2018).

Com isso, alguns hospitais têm optado por efetuar tratamento empírico e profilático em pacientes que apresentem algum fator de risco relacionado com o desenvolvimento de candidíase invasiva, como aqueles que foram submetidos à cirurgia abdominal. Já os que

apresentem colonização por *Candida* spp. e também fatores de risco para infecção, mas que estão estáveis, a terapia preventiva não é aconselhada (MATTHAIYOU *et al.*, 2015). Entretanto, enquanto há estudos que demonstram diminuição da mortalidade em pacientes que receberam o tratamento empírico, outros indicam que tal prática não fez diferença relevante na mortalidade hospitalar, o que sugere que esse assunto ainda é controverso (BASSETTI *et al.*, 2014).

Marins *et al.* (2018) demonstraram que em um hospital São Paulo, num total de 115 casos de candidemia, em 81,7% (94/115), o tratamento empírico foi determinado como adequado após a análise dos testes de sensibilidade antifúngica e houve necessidade de alterar o agente antifúngico em 36,5% dos casos.

Nesse contexto, é fundamental compreender a regra 90 a 60. Essa regra diz respeito à utilização de terapia antifúngica adequada, onde os microrganismos sensíveis responderão em 90% dos casos e os resistentes em 60%. Há, no entanto, diversos fatores que vão influenciar na interação entre o microrganismo e o fármaco, tais como a espécie envolvida na infecção, o isolado, perfil de sensibilidade, fatores de crescimento, dose do fármaco a ser administrada (ZAVREL e WHITE, 2015).

Apesar do aumento no número de infecções por *Candida* spp., o arsenal terapêutico de antifúngicos ainda é bem inferior se comparado ao antibacteriano, com apenas três classes de antifúngicos sistêmicos que são utilizados na prática clínica: polienos (anfotericina B desoxicolato, anfotericina B lipossomal), azólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol) e equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, micafungina) (MATTHAIYOU *et al.*, 2015).

A anfotericina B (anfo B) na forma desoxicolato interage com o ergosterol da membrana fúngica formando poros que vão aumentar sua permeabilidade e possibilitar a saída de componentes celulares essenciais que vão resultar na sua morte. Apesar de sua ação efetiva como fungicida, apresenta aspectos negativos em relação a sua citotoxicidade e por isso não é recomendada em todos os casos. Contudo, como forma de driblar essa toxicidade sua forma lipossomal exibe maior segurança, mas com custo mais elevado. Os principais efeitos colaterais incluem nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, anemia e trombocitopenia (MATTHAIYOU *et al.*, 2015).

Os azólicos apresentam amplo espectro de ação e são muito utilizados na prática terapêutica devido sua segurança e disponibilidade de formulações tanto orais quanto intravenosas. Seu modo de ação consiste em inibir a ação da enzima 14- α -desmetilase, impedindo a conversão de lanosterol em ergosterol, comprometendo a formação da membrana

fúngica. Esse grupo é dividido entre imidazóis e triazóis (de primeira geração: itraconazol e fluconazol; de segunda geração: voriconazol e posaconazol) (COLOMBO *et al.*, 2013; SPAMPINATO e LEONARDO, 2013).

As equinocandinas são uma nova classe de antifúngicos agrupados como inibidores do complexo enzimático 1,3- β -D-glucano sintase, um componente essencial da parede celular fúngica. São consideradas fungicidas para espécies de *Candida* e fungistáticas para espécies de *Aspergillus*, com baixo perfil de toxicidade, o que leva essa classe a ser mais segura e bem tolerada (COLOMBO *et al.*, 2013; NAMI *et al.*, 2018). Esse fato vai ao encontro da recomendação da ESCMID (Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas) que sugere o uso inicial de equinocandinas para candidemia em pacientes instáveis (MATTHAIYOU *et al.*, 2015).

Marins *et al.* (2018) observaram aumento no consumo de anfo B na forma lipossomal e voriconazol, provavelmente por estarem relacionados a tratamentos empíricos; e micafungina por seu baixo custo; e redução no consumo de caspofungina, por seu alto custo; e fluconazol, que pode estar relacionada com a predominância de *Candida* não *albicans* no local do estudo.

De Souza *et al.* (2016) relataram maior consumo da classe dos azólicos em um hospital universitário brasileiro, com destaque para fluconazol; seguido do voriconazol e anfo B desoxicolato. A explicação provável diz respeito às limitações de recursos, por se tratar de um hospital.

As espécies de *Candida* podem apresentar resistências aos azólicos por algumas formas principais. A presença de bombas de efluxo, que são transportadores associados à membrana, atuarão evitando acúmulo intracelular da droga, evitando níveis tóxicos que matariam a célula permitindo sua alteração e possibilitando a aquisição de resistência ao antimicrobiano (SPAMPINATO e LEONARDO, 2013; NAMI *et al.*, 2018). Outro mecanismo é a alteração no gene *ERG11*, que ao ter sua expressão alterada pode mudar a afinidade de lanosterol-14- α -demethylase por drogas desse grupo (SPAMPINATO e LEONARDO, 2013; GOLABEK *et al.*, 2015; NAMI *et al.*, 2018). Já mutações no gene *ERG3* podem aumentar a resistência de *C. albicans* ao fluconazol (VALE-SILVA *et al.*, 2012). A célula fúngica pode também desenvolver mutações que irão resultar em vias alternativas que evitarão alteração na membrana celular e acúmulo de produtos tóxicos pelos azólicos, permitindo sua manutenção (SPAMPINATO e LEONARDO, 2013).

Pode ocorrer também a desacetilação de histona, levando à expressão de genes relacionados aos estágios iniciais de adaptação ao estresse. As histonas desacetilases são

enzimas que atuam no núcleo para desacetilar histonas em lisinas, fatores de transcrição, proteínas de transdução de sinal e outras proteínas celulares (LI *et al.*, 2015).

Já mutações no gene *FKSI*, que codifica a enzima β -1,3-D-glucano-sintase, podem diminuir a sensibilidade à caspofungina e ocasionar um maior risco de falha terapêutica, podendo levar ao aumento nas concentrações inibitórias mínimas (CIM) do antifúngico (LACKNER *et al.*, 2014; JENSEN *et al.*, 2015)

Com o advento e ampliação da utilização de drogas antifúngicas, observa-se cada vez mais casos de resistência a esses medicamentos, evidenciando a insuficiência na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resistência aos antifúngicos (VIEIRA *et al.*, 2016).

O uso desses antifúngicos deve ser monitorado ao longo dos anos para controlar seu uso exagerado, medir melhorias e obter dados que possam ser usados para futuras comparações de perfis de sensibilidade, por exemplo. O monitoramento também é importante para evitar o desenvolvimento de isolados clínicos resistentes (MARINS *et al.*, 2018).

Marak *et al.* (2018) mostraram que todos os isolados de *Candida* spp. testados foram sensíveis à anfotericina B, assim como Arora *et al.* (2017) que não observaram cepas que desenvolveram resistência à anfo B. Acredita-se também que as células em um biofilme exibem alta resistência a drogas antifúngicas e ao sistema imune do hospedeiro, principalmente devido à penetração inadequada de agentes antifúngicos, somado à produção de enzimas prejudiciais ao tecido hidrolítico extracelular, à transição de hifas e à formação de biofilme altamente resistente a medicamentos (JALAL *et al.*, 2019).

Yenisehirli *et al.* (2015) relataram taxas de resistência de fluconazol e voriconazol de 34% e 14% entre *C. albicans*, respectivamente. Quanto ao estudo realizado com 90 isolados, observou-se que 75,55% foram sensíveis ao fluconazol e 24,44% foram resistentes. Entre os isolados resistentes à *Candida* spp., 40,90% eram *C. albicans*; 36,36% eram *C. tropicalis* e 22,72% eram *C. krusei*. Outro dado apresentado foi que 18,88% dos isolados apresentaram perfil de resistência ao voriconazol, sendo 17,64% de *C. krusei* e 41,17% de *C. albicans* e *C. tropicalis*. A crescente na resistência ao fluconazol e voriconazol pode ser ocasionada pelo uso indiscriminado e por longos períodos desses antifúngicos. Entretanto, não há correlação direta entre a formação de biofilme e a sensibilidade antifúngica (MARAK *et al.*, 2018).

A candidíase invasiva parece ser mais uma infecção nosocomial quando se considera sua incidência hospitalar e fatores de risco associados à assistência à saúde (procedimentos invasivos e uso prolongado de antibióticos). No entanto, a taxa de casos adquiridos na comunidade não deve ser ignorada, já que o Programa de Vigilância Antimicrobiana

SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) apresentou que dentro dos 1.354 episódios de infecção relacionados a espécies de *Candida* que foram detectados entre 2008 e 2009, 36,5% destes foram adquiridos na comunidade, ressaltando que os casos na América do Norte foram mais frequentes que na Europa (PFALLER *et al.*, 2011).

Pfaller *et al.* (2007) reportaram 1,9 a 2,4 por 1000 admissões nos Estados Unidos (EUA). Zilderberg *et al.* (2008) documentaram um aumento de 50% na hospitalização por candidemia de janeiro de 2000 a dezembro de 2005 nos Estados Unidos (EUA). Contudo, diferenças regionais devem ser ponderadas. Lockhart *et al.* (2012) realizaram um estudo comparando a incidência de candidemia nas cidades de Atlanta e Baltimore (ambas nos EUA) entre 2008 e 2011, e foi possível calcular uma diferença de 12,9 casos por 100.000 habitantes para cada cidade, respectivamente.

No contexto europeu, a incidência é menor se comparada com os Estados Unidos. Poikonen *et al.* (2010) relataram uma incidência média anual de 2,86 casos por 100.000 habitantes na Finlândia entre 2004 e 2007 e na Suécia uma incidência anual de 4,2 casos / 100.000 habitantes entre 2005 e 2006 (ERICSSON *et al.*, 2013). Na Inglaterra e no País de Gales relatou-se uma incidência geral anual de candidemia de 1.52 casos por 100.000 habitantes (OESER *et al.*, 2013).

Quanto aos estudos envolvendo países da América Latina, Nucci *et al.* (2013) trazem as taxas de incidência usando internações hospitalares como denominador. Para a Argentina observou-se 1,95 casos por 1.000 internações, seguido pela Venezuela com 1,72 casos por 1.000 internações e o Brasil com 1,38 casos por 1.000 internações. Os aspectos que podem estar ligados a esses valores podem resultar de problemas que afetam países em desenvolvimento; limitação de recursos, tratamento antifúngico menos agressivo; podem ser citados como exemplos (NUCCI *et al.*, 2010).

Um estudo mais recente, realizado por Medeiros *et al.* (2019) avaliaram a epidemiologia da candidemia nosocomial no Nordeste do Brasil num estudo retrospectivo de 2011 a 2016 e encontraram uma taxa de 2,23 episódios por 1000 admissões, corroborando com outros estudos multicêntricos semelhantes (COLOMBO *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2013).

Com o passar dos anos documentou-se mudanças na epidemiologia da candidemia, como mudanças na distribuição de espécies, nos padrões de resistência e nas práticas terapêuticas, bem como um aumento no uso de equinocandinas como terapia primária (CLEVELAND *et al.*, 2015). Braga *et al.* (2018) realizaram um estudo avaliando mudanças na epidemiologia da candidemia em um hospital público no Brasil a partir de 331 episódios

diagnosticados de janeiro de 1996 a dezembro de 2016. O agente etiológico mais frequente foi *C. albicans* (124 episódios), seguido por *C. tropicalis* (93 episódios), *C. parapsilosis* (61 episódios) e *C. glabrata* (23 episódios). Os 30 episódios restantes foram causados pelas espécies menos frequentes. Já a taxa global de mortalidade em 30 dias foi de 58,9% e não se alterou significativamente ao longo do tempo.

2.4 Novas alternativas terapêuticas

Num contexto global, observa-se o aumento de infecções fúngicas que podem ser ocasionados pelo aumento de imunodeficiências, por consequência na utilização de dispositivos invasivos ou por outros motivos. Contudo, o arsenal antifúngico tem limitações principalmente quanto à toxicidade. O aumento na tendência ao desenvolvimento de resistência aos antifúngicos pode resultar falhas no tratamento, aumento nas taxas de mortalidade e morbidade e com isso, custos elevados para o sistema de saúde (SHAHID, 2016).

Nesse sentido, diante da carência de novos antifúngicos, o estabelecimento de um fármaco totalmente novo é um processo longo, difícil e com elevado custo somando um investimento de mais de 1,5 bilhões de dólares. Assim, o reposicionamento de fármacos atua como um caminho alternativo e que vêm trazendo resultados promissores no desenvolvimento de medicamentos, além dessas moléculas já apresentarem disponibilidade prévia no mercado (PIERCE *et al.*, 2015). De Andrade *et al.* (2020) observou a atividade da cetamina e Sá *et al.* (2020) do etomidato, ambos fármacos que tem seu uso clássico como anestésico; onde apresentaram atividade frente a isolados de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

Outro aspecto a ser considerado e que se encontra em ascensão é a identificação de efeito sinérgico entre um azólico e outro fármaco, que apresente seu uso clássico para outra finalidade. Essa combinação pode diminuir a concentração do antifúngico e contribuir retardando o desenvolvimento de resistência ao azólico (PIERCE *et al.*, 2015). Da Silva *et al.* (2013) demonstram que o uso da amiodarona (da classe de antiarrítmicos) em combinação com o fluconazol apresenta atividade antifúngica em espécies de *Candida tropicalis* resistentes ao fluconazol.

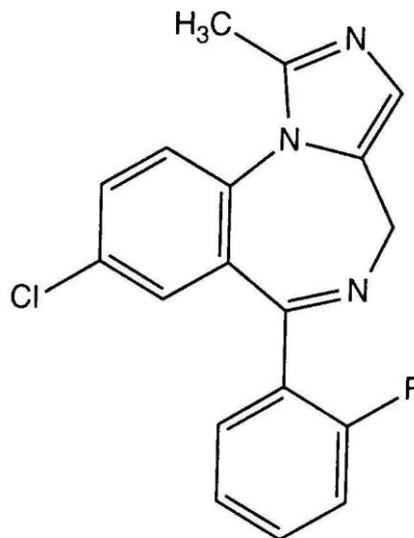
2.5 Midazolam

Os principais fármacos utilizados para tratar a ansiedade são pertencentes a dois grupos. Os antidepressivos, com os inibidores seletivos da receptação da serotonina (ISRSs) a exemplo da fluoxetina, paroxetina e sertralina, que atuam no tratamento do distúrbio de ansiedade generalizada, distúrbio do estresse pós-traumático; e os benzodiazepínicos (BZs), a exemplo do midazolam, lorazepam e diazepam, utilizados para o tratamento de ansiedade aguda e insônia. O primeiro benzodiazepínico, clordiazepóxido, foi sintetizado em 1961. Esse grupo tem em sua estrutura química grupos de substituição que podem ser alterados sem ocasionar perda de atividade, o que possibilitou a criação de componentes que foram testados e podem ser usados na prática clínica (RANG *et al.*, 2016).

Os benzodiazepínicos potencializam a atividade do receptor do tipo A do ácido γ -aminobutírico (GABA_A) e são amplamente prescritos para tratar ansiedade, insônia e distúrbios convulsivos. Infelizmente, o uso clínico de BZs é severamente limitado pela tolerância (JACOB *et al.*, 2012)

O midazolam (figura 2), que é um representante desse grupo, possui meia-vida biológica de 2-4 horas, com duração total de ação inferior a 6 horas e que pode ser usado como hipnótico ou como anestésico intravenoso, apresentando menor depressão cardiovascular e respiratória que anestésicos comuns, como etomidato e cetamina (RANG *et al.*, 2016).

Figura 2 – Estrutura química do midazolam



Fonte: Ohno *et al.* (2012)

Com o objetivo de explorar o potencial de drogas existentes para buscar propriedades desconhecidas, Kathwate *et al.* (2015) testaram o potencial antifúngico de seis drogas antiepilépticas contra *C. albicans* e observaram que lorazepam, midazolam e diazepam inibiram o crescimento de *C. albicans* (ATCC 10231 e ATCC 90028) nas concentrações de 25µg/ml, 100µg/ml e 400µg/ml, respectivamente. Observou-se também ação frente a biofilme formado, com inibição na concentração de 125µg/ml, no caso do midazolam.

3. HIPÓTESES

Baseado nas vantagens do reposicionamento de fármacos e no estudo que mostrou atividade antifúngica do midazolam frente a cepas ATCC de *Candida albicans*, surgiu o interesse de estudar possível ação do midazolam contra cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol. Foram levantadas, então, as seguintes hipóteses:

3.1. Midazolam inibe o crescimento *in vitro* de cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

3.2. Midazolam associado ao fluconazol ou ao itraconazol inibe o crescimento *in vitro* de cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

3.3. Midazolam tem ação antifúngica contra biofilmes de espécies de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

3.4. Midazolam causa morte celular em cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

3.5. Midazolam não apresenta efeito antifúngico frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antifúngico do midazolam frente a cepas clínicas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol tanto na forma planctônica como de biofilme.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do midazolam, fluconazol e itraconazol frente a cepas de *Candida* spp.;

4.2.2. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do midazolam associado ao fluconazol ou ao itraconazol frente a cepas de *Candida* spp.;

4.2.3. Avaliar a atividade do midazolam frente ao biofilme formado de cepas de *Candida* spp.;

4.2.4. Investigar o provável mecanismo de ação antifúngico do midazolam através de citometria de fluxo e o teste do cometa – versão alcalina.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Microrganismos

Para o estudo foram utilizadas 17 cepas clínicas de *Candida* spp todas identificadas molecularmente (7 *C. albicans*, 5 *C. tropicalis*, 5 *C. parapsilosis*) e 2 cepas padrão ATCC (*C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258). Todos os isolados pertencem à micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará.

Para recuperação das cepas, as leveduras que estavam estocadas em ágar Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) a – 20 °C foram descongeladas e ressuspensas em caldo Sabouraud (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 35°C por 24h. Posteriormente, foram repicadas em ágar Sabouraud e incubadas a 35°C por 48h.

5.2 Fármacos

Os fármacos utilizados neste estudo foram: fluconazol (FLUCO), itraconazol (ITR), anfotericina B (ANFO B) e midazolam (MIDAZ) obtidos da Sigma Aldrich, USA. As soluções de ITR e ANFO B foram diluídas em DMSO (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e o FLUCO e MIDAZ foi diluído em água destilada estéril. Os antifúngicos foram utilizados nas faixas 0,125 a 64µg/mL (FLUCO); 0,03 a 16µg/mL (ITR), 0,125 a 16µg/mL (ANFO B). O MIDAZ foi utilizado na faixa 1.95 a 1000µg/mL (CLSI, 2008).

5.3 Teste de sensibilidade aos antifúngicos

5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste de sensibilidade foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo segundo o documento M27-A3 (CLSI, 2008) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) (pH 7,0 ± 0,1) tamponado com 0,165 M ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA). Para a realização dos testes foram utilizadas placas de 96 poços - fundo U. Na coluna dois (2) foram adicionados 200 µL das drogas e em seguida realizou-se a diluição seriada para obter o intervalo desejado. A coluna 1

foi utilizada como controle de esterilidade do meio RPMI 1640 e a coluna 12 como controle positivo do teste (inóculo + meio). Para o inóculo, a suspensão foi preparada de acordo com a escala 0,5 McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram realizadas duas diluições em meio RPMI 1640 para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/ mL. Um volume de 100 μ L desta suspensão padronizada foi adicionado em cada poço contendo os fármacos em estudo. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 35 °C (± 2 °C) e após esse período a leitura visual foi realizada.

Para a leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 50% do crescimento do microrganismo, em comparação com o verificado no poço controle (coluna 12 - contendo somente o meio de cultura e o inóculo padronizado) para os derivados azólicos e midazolam (CLSI, 2012).

Para avaliar a ocorrência de resistência aos azólicos foram levados em consideração os seguintes pontos de corte: CIM $\geq 0,25$ μ g/ mL para itraconazol e CIM ≥ 16 μ g/ mL para fluconazol (CLSI, 2012). Todo o experimento foi realizado em triplicata e foram utilizadas as cepas controle: *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

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

Após a determinação da CIM de cada fármaco isolado, foi realizada a técnica do *checkerboard* (ODDS, 2003). Nesta técnica, cada poço contém uma combinação única de diferentes concentrações dos fármacos testadas, no qual se determina o percentual de inibição do crescimento das células na presença de diferentes combinações dos fármacos em relação ao poço controle. Para isso as cepas foram expostas a concentrações de FLUCO (0.250 - 32 μ g/mL); ITR (0.25 - 1 μ g/ mL) em associação com MIDAZ (250 - 500 μ g/ml). A interação entre os fármacos foi realizada a partir da determinação da Concentração Inibitória Fracionária (FICI, do inglês, *Fractionary Inhibitory Concentration*), obtida pela soma do FIC de cada fármaco, que se trata da relação entre a CIM de cada fármaco utilizada em combinação e a CIM do mesmo fármaco utilizado sozinho (Quadro 1). Foram considerados os seguintes parâmetros: FICI $\leq 0,5$: sinergismo, FICI $> 4,0$: antagonismo e $0,5 < FICI < 4,0$: indiferente (ODDS, 2003).

Quadro 1- Determinação da Concentração Inibitória Fracionária

$FICI = FIC_A + FIC_B$ <p>Onde: $FIC_A = \frac{CIM_{\text{fármaco A em combinação}}}{CIM_{\text{fármaco A isolado}}}$ $FIC_B = \frac{CIM_{\text{fármaco B em combinação}}}{CIM_{\text{fármaco B isolado}}}$</p>
--

5.3.3 Análise dos dados

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

5.4 Testes utilizando citometria de fluxo

5.4.1 Tratamento das células de *Candida spp.*

Para a determinação da viabilidade celular, avaliação do potencial transmembrana mitocondrial, detecção de espécies reativas de oxigênio e marcação por anexina V, as cepas de *Candida spp.*, resistentes ao fluconazol foram expostas ao FLUCO (16 µg/ ml) e MIDAZ (CIM/2, CIM, 2x CIM) e em meio RPMI, que foi utilizado como controle negativo. As células tratadas foram incubadas a 37 °C durante o período de 24 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (DA SILVA *et al.*, 2014; DE ANDRADE NETO *et al.*, 2014).

5.4.2 Determinação da viabilidade celular

As células de *Candida spp.*, após exposição ao MIDAZ e FLUCO durante o período de 24h, foram marcadas com o marcador PI (iodeto de propídeo) e em seguida, foram analisadas por citometria de fluxo. Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013).

5.4.3 Despolarização mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células de *Candida spp.*

As células de *Candida spp.*, após exposição ao MIDAZ e FLUCO durante o período de 24h, foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), incubadas com rodamina 123 (1 µg/ mL) (Sigma, USA) a 37 °C por 15 min no escuro. Posteriormente, foram lavadas duas vezes

com PBS e reincubadas a 37 °C por 30 min. A fluorescência foi determinada por citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2014; DE ANDRADE NETO *et al.*, 2014).

5.4.4 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em células de Candida spp.

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

5.4.5 Determinação da externalização de fosfatidilserina em células de Candida spp.

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

5.4.6 Análise dos dados dos ensaios de citometria de fluxo

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

5.5 Ensaio do Cometa

O ensaio em cometa alcalino foi realizado essencialmente como descrito por MILOSHEV; MIHAYLOY; ANACHKOVA (2002). Até 200 μ L de agarose 0,5% (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) foi espalhada em cada lâmina e seca a temperatura ambiente antes da aplicação da suspensão de células sobre as lâminas. As células de *Candida albicans* foram centrifugadas em microcentrífuga de eppendorf durante 5 min, lavadas com água destilada, e ressuspensas em tampão S (1M de sorbitol, 25 mM de KH₂PO₄, pH 6,5). Alíquotas de aproximadamente 5×10^4 células foram misturadas com agarose de baixo ponto de fusão (37 °C) contendo Zymolyase 20T (2 mg/ mL) e espalhado sobre as lâminas, coberto com lamínulas e incubadas durante 20 min a 30 °C para desintegrar a parede da célula de levedura e obter os esferoplastos. A fim de minimizar a atividade de enzimas celulares endógenas, todos os procedimentos que se seguem foram realizados numa sala fria a 8 a 10 °C. As lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em uma solução (30 mM de NaOH, 1M de NaCl, 0,1% laurilsarcosina, 50 mM EDTA, pH 12,3) durante 1 h para lisar os esferoplastos. As lâminas foram lavadas três vezes durante 20 min cada em uma solução (30 mM de NaOH, 10 mM de EDTA e pH 12,4) para o desenrolamento do DNA e, em seguida, submetido a eletroforese no mesmo tampão.

A eletroforese foi realizada por 20 min a 0,5 V/ cm e amperagem ajustada para 24 mA. Após eletroforese, os géis foram neutralizados por submersão das lâminas em 10 mM Tris HCl pH 7,5 durante 10 min seguido por incubações consecutivas por 10 min em etanol 76% e 96%. Finalmente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, coradas com brometo de etídio (1 mg/ mL) e visualizadas em microscópio de fluorescência. Todos os passos acima foram realizados no escuro para evitar danos adicionais no DNA. Imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas idênticas) foram analisadas para cada grupo experimental. A leitura é feita através de escores de acordo com o tamanho da cauda (de não danificado - 0 a dano máximo - 4), e o valor de índice de dano foi calculada para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de zero (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (COLLINS, 2004).

5.5.1 Análise dos dados obtidos pelo ensaio do cometa

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

(ANOVA) seguidos pelo Student Newman Keuls ($p < 0,05$), utilizando o programa Prism versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.6 Ensaio de Biofilme

A formação do biofilme foi realizada utilizando placas de microtitulação de acordo com a metodologia de Pierce *et al.* (2008), com pequenas modificações. Para esses testes foram utilizadas uma cepa boa formadora de biofilme de cada espécie de *Candida* spp.: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35°C por 24h. Em seguida, as leveduras foram suspensas em 5 mL de meio YPD e reincubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e lavadas com PBS por três vezes. As células foram ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI. Seguidamente, foram dispensados 200µL do inóculo em uma placa de 96 poços fundo chato. No poço 12 adicionou-se somente RPMI como controle de esterilidade. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. No dia seguinte, o sobrenadante foi aspirado e a placa foi lavada delicadamente com PBS por três vezes para remoção das células não aderentes. Por fim, pode-se visualizar a formação de biofilme no fundo de cada poço, estando estes apropriados para a etapa seguinte.

5.6.1 Determinação da atividade do midazolam sobre biofilme formado de *Candida* spp.

Após formação do biofilme, o fármaco (200µL) nas diversas concentrações testadas (CIM/2, CIM, 2XCIM, 4XCIM, 10X CIM) foi colocada na placa. Foi preparado um controle negativo (poço sem formação de biofilme, apenas com RPMI) e um controle de 100% de crescimento (com suspensão de células em RPMI sem fármaco) e as placas foram incubadas a 35°C por 24h. Após este período, o fármaco foi aspirado e a placa lavada com PBS três vezes. Em seguida, adicionou-se o corante de viabilidade celular brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT) (1 mg/ mL) (Sigma, USA). Para cada cepa, foi utilizada uma solução na proporção (75:6); 75 mL de solução de sal de MTT (1 mg/ mL em PBS), 6 mL de solução de menadiona (1 mM em acetona; Sigma, Alemanha) e incubadas por 35°C por 18h, no escuro. Após incubação de 18 a 20h no escuro, o corante foi removido, os poços lavados 3x com PBS e adicionado DMSO (200 µL). Após 10 a 15 min, retirou-se 100 µL de cada

poço e transferiu-se para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. A redução de crescimento foi comparada ao poço que corresponde a 100% de crescimento, livre de fármaco (PIERCE *et al.*, 2008). A concentração do MIDAZ variou de 2500 a 125 µg/ mL e a anfotericina B de 16 a 0,03 mg/ L. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.6.2 Análise dos dados dos resultados do biofilme

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

5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise morfológica, pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), os biofilmes formados em lamínulas foram processados conforme a metodologia descrita por Di Bonaventura *et al.* (2006), com modificações. Os biofilmes foram então fixados com 500µl de solução de glutaraldeído 2,5% (Sigma - Aldrich - St Louis - USA) em tampão cacodilato (0,15M) (Electron Microscopy Sciences –Hatfiel - PA), com adição do azul de alcian 0,1% (Sigma - Aldrich - São Paulo - Brasil), overnight a 4 °C. Em seguida os biofilmes foram lavados com o tampão cacodilato duas vezes. Depois realizou-se uma série de desidratações alcoólicas ascendentes: 50, 70, 80, 95 e 100% de etanol, repetidas duas vezes e por um período de 10 minutos cada desidratação, seguido de secagem de 15 a 30 minutos à 28 °C. Após secagem, os biofilmes foram desidratados com hexametildisilazano (Sigma - St Louis - USA) durante 30 minutos e secos dentro de um dessecador, overnight. As lamínulas contendo o biofilme formado foram recobertos com 10nm de ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura Quanta FEG 450, em alto vácuo. As imagens foram processadas em software Photoshop CC5 (Adobe).

5.8 Cultivo de células L929

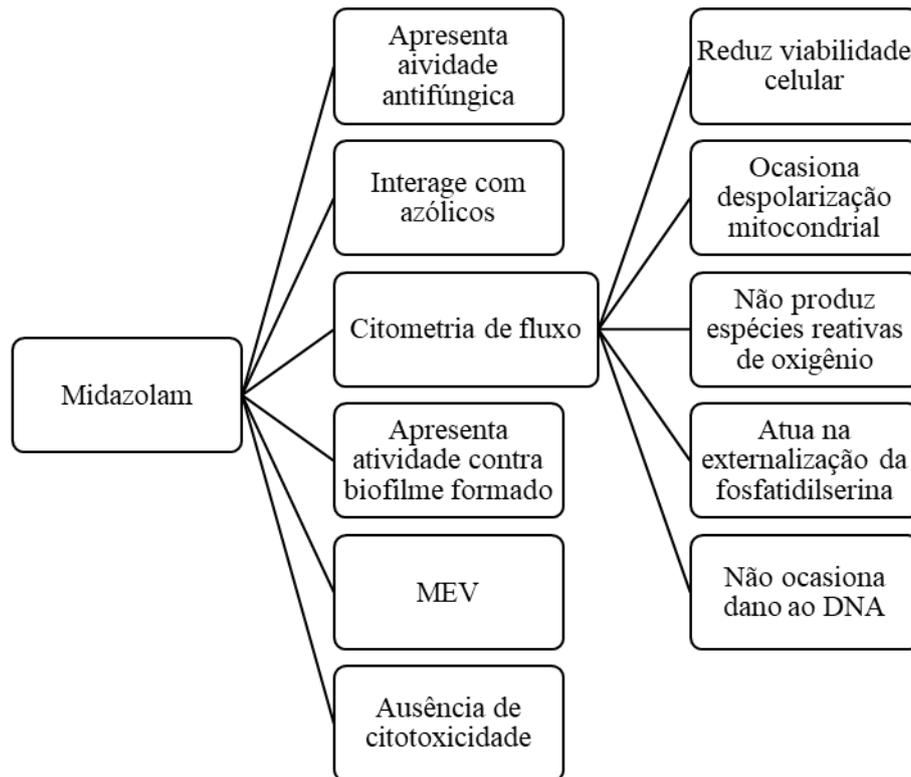
Foram cultivadas células L929 de fibroblasto murino adquiridas de um banco de células do Rio de Janeiro sob condições padrões (a 37 °C com 5% de CO₂) em MEM (meio essencial mínimo) contendo sais de Earle. Todos os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino, glutamina 2 mM, 100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

5.8.1 Inibição da viabilidade de células L929 utilizando o teste MTT

A viabilidade celular foi quantificada pela capacidade das células vivas de reduzir o sal de tetrazólio para o produto de formazan púrpura. As células L929 foram semeadas em placas de 96 poços (0,3 x 10⁶ células/ poço) e midazolam (31,25 a 500 µg/mL) dissolvido em água destilada estéril foram então adicionadas a cada poço, seguido de incubação durante 24h, sob cultivo em condições padrões. Em seguida, as placas foram centrifugadas e o meio foi substituído com meio fresco (150µL) contendo 0,5mg/mL de MTT. Após 3h, foi adicionado em 150µL de DMSO e a absorbância foi medida utilizando um leitor multiplacas (contagem Packard Spectra, Canadá). O efeito na viabilidade celular do midazolam foi quantificado como a porcentagem de controle de absorbância do corante reduzido a 595 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos três vezes (CAVALCANTI *et al.*, 2009, DE ANDRADE NETO *et al.*, 2014).

6. RESULTADOS

Figura 3 – Resumo dos resultados obtidos



6.1 Midazolam apresenta atividade antifúngica frente às cepas de *Candida spp.* resistentes ao fluconazol

A concentração inibitória mínima (CIM) das cepas em estudo foram determinadas através da técnica de microdiluição em caldo. De acordo com a Tabela 2, é possível observar o fenótipo de resistência das cepas em estudo, onde 12 cepas clínicas eram resistentes ao fluconazol e 5 cepas clínicas eram sensíveis. Também foram adicionadas ao estudo duas cepas padrão: *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258. A Tabela 2 mostra que o midazolam teve atividade antifúngica nas cepas testadas com a CIM variando de 125 a 250 µg/mL.

6.2 Midazolam apresenta interação com azólicos

A fim de avaliarmos o possível efeito sinérgico entre o midazolam e os azólicos (fluconazol e itraconazol) utilizamos a técnica do *checkboard*. Para isso, foram selecionadas todas as cepas em estudo para verificação da interação entre os fármacos. De acordo com a Tabela 3 e Tabela 4, podemos observar que os valores de FICI variaram entre 0,5 a 2 caracterizando 21% dos isolados com efeito de sinergismo para a interação tanto entre midazolam e fluconazol, com maior expressão em relação a *Candida tropicalis*; quanto para midazolam em associação com o itraconazol, com maior expressão em *Candida parapsilosis*:

Quadro 2- Interpretação da Concentração Inibitória Fracionária

CIM ≤ 0,5 (sinergismo-S)	0.5 < CIM < 4.0 (indiferente-IND)	CIM > 4.0 (antagonismo-A).
--------------------------	-----------------------------------	----------------------------

Tabela 2 - Efeito antifúngico do midazolam frente a cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol

Isolado ^a	Origem	Valores de CIM ^b (µg/mL)		
		fluconazol	itraconazol	midazolam
<i>Candida albicans</i> 01	sangue	32	0,25	250
<i>Candida albicans</i> 02	sangue	16	0.25	250
<i>Candida albicans</i> 03*	lavado brônquico	16	0.25	250
<i>Candida albicans</i> 04	urina	16	0.25	125
<i>Candida albicans</i> 05	urina	16	0,25	250
<i>Candida albicans</i> 06**	urina	0,250	0,125	250
<i>Candida albicans</i> 07**	urina	0,250	0,125	250
<i>Candida tropicalis</i> 01	urina	32	0,25	250
<i>Candida tropicalis</i> 02	sangue	32	0.25	250
<i>Candida tropicalis</i> 03	sangue	32	0.25	250
<i>Candida tropicalis</i> 04*	lavado brônquico	16	0.25	250
<i>Candida tropicalis</i> 05**	lavado brônquico	0,5	0,125	250
<i>Candida parapsilosis</i> 01	sangue	32	0.25	250
<i>Candida parapsilosis</i> 02*	sangue	16	0.25	250
<i>Candida parapsilosis</i> 03	sangue	32	1	250
<i>Candida parapsilosis</i> 04**	urina	0,5	0,125	250
<i>Candida parapsilosis</i> 05**	Sangue	4	0,125	125
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	1	0,5	250
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258	16	0.25	250

^aIsolados de *Candida* spp.

^bA CIM foi definido como a menor concentração do fármaco capaz de reduzir em 50% o crescimento fúngico após 24h de incubação de *Candida* spp. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27-A3 do CLSI. Os valores da CIM são expressos em µg/mL. A CIM representa a média geométrica de pelo menos 3 (três) experimentos realizados em diferentes dias.

*Isolados utilizados para investigar ação do midazolam frente a biofilme formado e provável mecanismo de ação.

**Isolados sensíveis ao fluconazol.

Tabela 3 - Efeito da Associação do midazolam (MIDAZ) com fluconazol (FLUCO) frente a cepas de *Candida* spp.

Isolados ^a	CIM isolada ^b		CIM combinada ^c		Interpretação ^e
	(µg/mL)		(µg/mL)		
	MIDAZ	FLUCO	MIDAZ/ FLUCO	FICI ^d	
<i>C. albicans</i> 01	250	16	125/8	1	IND
<i>C. albicans</i> 02	250	32	125/16	1	IND
<i>C. albicans</i> 03	125	16	62.5/8	1	IND
<i>C. albicans</i> 04	250	16	125/8	1	IND
<i>C. albicans</i> 05	250	16	125/8	1	IND
<i>C. albicans</i> 06	250	0,250	125/0,125	1	IND
<i>C. albicans</i> 07	250	0,250	125/0,125	1	IND
<i>C. tropicalis</i> 01	250	32	62.5/8	0,5	SIN
<i>C. tropicalis</i> 02	250	32	62.5/8	0,5	SIN
<i>C. tropicalis</i> 03	250	32	62.5/8	0,5	SIN
<i>C. tropicalis</i> 04	250	16	125/8	1	IND
<i>C. tropicalis</i> 05	250	0,500	250/0,5	2	IND
<i>C. parapsilosis</i> 01	250	32	125/16	1	IND
<i>C. parapsilosis</i> 02	250	32	125/16	1	IND
<i>C. parapsilosis</i> 03	250	16	125/8	1	IND
<i>C. parapsilosis</i> 04	250	0,500	125/0,25	1	IND
<i>C. parapsilosis</i> 05	125	4	31,25/1	0,5	SIN
<i>C. parapsilosis</i> ATCC2019	250	1	250/1	2	IND
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	250	32	125/16	1	IND

^aIsolados de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.

^bA CIM foi definido como a menor concentração do fármaco capaz de reduzir em 50 % o crescimento fúngico após 24h de incubação de *Candida* spp. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27-A3 do CLSI. Os valores da CIM são expressos em µg/mL.

^cForam utilizadas as faixas de concentrações de FLUCO (0.250 - 32µg/mL) e MIDAZ (125 - 250µg/mL).

^dO efeito sinérgico de FLUCO associado com o MIDAZ foi calculado baseado no índice da concentração inibitória fracionária (FICI).

^eA análise/ interpretação foi de acordo com os valores de CIM: CIM ≤ 0,5 – sinergismo (S), 0.5 < CIM < 4,0 – indiferente (I) e CIM > 4,0 - antagonismo (A).

Tabela 4 - Efeito da Associação do midazolam (MIDAZ) com itraconazol (ITR) frente a cepas de *Candida* spp.

Isolados ^a	CIM isolada ^b ($\mu\text{g/mL}$)		CIM combinada ^c ($\mu\text{g/mL}$)		
	MIDAZ	ITR	MIDAZ/ITR	FICI ^d	Interpretação ^e
	<i>C. albicans</i> 01	250	0.25	125/0.125	1
<i>C. albicans</i> 02	250	0.25	62.5/0.06	0.49	SIN
<i>C. albicans</i> 03	125	0.25	62.5/0.125	1	IND
<i>C. albicans</i> 04	250	0.25	125/0.125	1	IND
<i>C. albicans</i> 05	250	0,25	125/0.125	1	IND
<i>C. albicans</i> 06	250	0,125	125/0,06	1	IND
<i>C. albicans</i> 07	250	0,125	125/0,06	1	IND
<i>C. tropicalis</i> 01	250	0,25	125/0.125	1	IND
<i>C. tropicalis</i> 02	250	0.25	125/0.125	1	IND
<i>C. tropicalis</i> 03	250	0.25	125/0.125	1	IND
<i>C. tropicalis</i> 04	250	0.25	125/0.125	1	IND
<i>C. tropicalis</i> 05	250	0,125	250/0,125	2	IND
<i>C. parapsilosis</i> 01	250	0.25	125/0.125	1	IND
<i>C. parapsilosis</i> 02	250	0.25	125/0.125	1	IND
<i>C. parapsilosis</i> 03	250	1	15.62/0.06	0.12	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 04	250	0,125	125/0,06	1	IND
<i>C. parapsilosis</i> 05	125	0,125	31,25/0,03	0,49	SIN
<i>C. parapsilosis</i> ATCC2019	250	0,5	31.25/0.06	0.24	SIN
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	250	0.25	125/0.125	1	IND

^aIsolados de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.

^bA CIM foi definido como a menor concentração do fármaco capaz de reduzir em 50% o crescimento fúngico após 24h de incubação de *Candida* spp. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27-A3 do CLSI. Os valores da CIM são expressos em $\mu\text{g/mL}$

^cForam utilizadas as faixas de concentrações de ITR (0.125 - 1 $\mu\text{g/mL}$) e MIDAZ (125 - 250 $\mu\text{g/mL}$).

^dO efeito sinérgico de ITRA associado com o MIDAZ foi calculado baseado no índice da concentração inibitória fracionária (FICI).

^eA análise/ interpretação foi de acordo com os valores de CIM: CIM \leq 0,5 – sinergismo (S), 0,5 < CIM < 4,0 – indiferente (I) e CIM > 4,0 - antagonismo (A).

6.3 Avaliação do provável mecanismo de morte celular

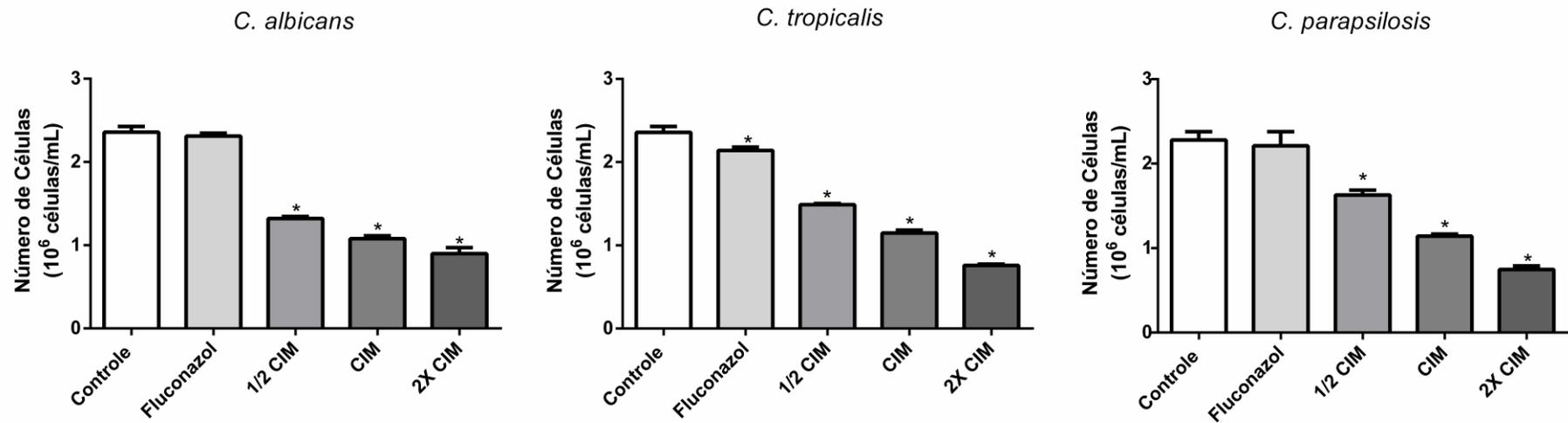
Diante da ação antifúngica do midazolam frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, foi investigado o possível mecanismo de morte envolvido por meio da técnica de citometria de fluxo. Para todas as análises dos eventos celulares, foi utilizado um controle negativo contendo células de leveduras sem fármaco, fluconazol (16 µg/mL) e o midazolam foi avaliado nas concentrações de 1/2CIM (383,5µM), CIM (767µM) e 2XCIM (1534µM). Para estes testes foi selecionada uma cepa representando *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (Tabela 3). As análises foram feitas após 24h.

6.3.1 Midazolam reduz a viabilidade celular de *Candida* spp.

Através da análise de citometria pela exclusão do iodeto de propídio pode-se avaliar a redução de viabilidade celular das cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLUCO após diferentes tratamentos, como exposto na figura 4. O midazolam, quando usado nas concentrações de 1/2CIM (383,5µM), CIM (767µM) e 2XCIM (1534µM) promoveu uma redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,05$) em relação ao controle. Pode-se observar que a redução de viabilidade celular se mostrou semelhante entre as três espécies testadas, com uma relação dose-dependente. As células tratadas com FLUCO (16µg/mL) não apresentaram redução de viabilidade celular significativa em relação ao controle para as cepas de *C. albicans* (2%) e *C. parapsilosis* (4%).

Para *Candida albicans*, houve redução significativa da viabilidade celular nos demais tratamentos: MIDAZ 1/2CIM (125µg/mL) - **44%**; MIDAZ CIM (250µg/mL) - **55%** e MIDAZ 2XCIM (500µg/mL) - **62%**. Para *Candida tropicalis*, a redução foi significativa em todos os tratamentos, incluindo com FLUCO (9%): MIDAZ 1/2CIM (125µg/mL) - **38%**; MIDAZ CIM (250µg/mL) - **52%** e MIDAZ 2XCIM (500µg/mL) - **69%**. Para *Candida parapsilosis* a redução apresentou o seguinte aspecto: MIDAZ 1/2CIM (125µg/mL) - **29%**; MIDAZ CIM (250µg/mL) - **50%** e MIDAZ 2XCIM (500µg/mL) - **68%**.

Figura 4 - Avaliação da viabilidade celular em cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol por citometria de fluxo. Foram utilizados o controle positivo FLUCO (16 µg/mL) e MIDAZ (CIM= 250 µg/mL) nas concentrações CIM/2, CIM e 2X CIM e avaliados após tratamento em três cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.



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

* $p < 0.05$ - os resultados foram comparados com o controle, determinado por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

6.3.2 Midazolam ocasiona despolarização mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

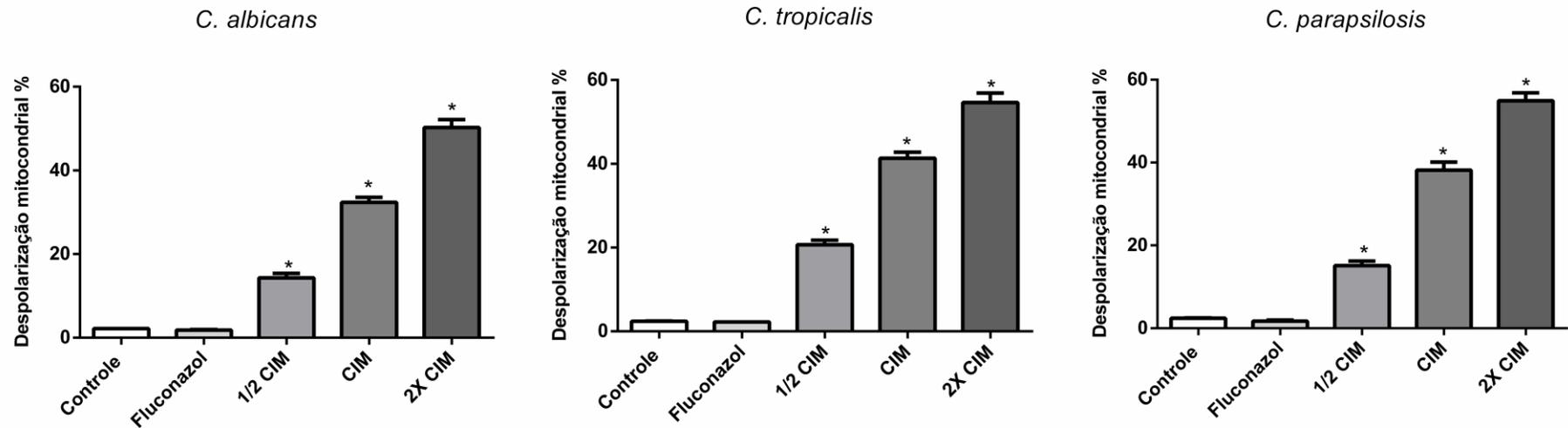
De acordo com a Figura 5, as células de *Candida* spp. que foram expostas às diferentes concentrações do midazolam 1/2CIM (383,5 μ M), CIM (767 μ M) e 2XCIM (1534 μ M) demonstraram um aumento do percentual de células com baixo potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$) à medida que a CIM aumentava em relação ao grupo controle.

Os resultados apresentados mostram a despolarização mitocondrial de células de *C. albicans* causada pelo MIDAZ 1/2CIM (125 μ g/mL) – **14,3%**; MIDAZ CIM (250 μ g/mL) – **32,3%** e MIDAZ 2XCIM (500 μ g/mL) – **50,2%**, frente ao FLUCO (16 μ g/mL) - **1,81%**, que não foi significativo, e ao controle positivo (2,17%) de despolarização mitocondrial.

Houve despolarização para o tratamento com *Candida tropicalis*: MIDAZ 1/2CIM (125 μ g/mL) – **20,6%**; MIDAZ CIM (250 μ g/mL) – **41,3%** e MIDAZ 2XCIM (500 μ g/mL) – **54,6%**, comparando-se com FLUCO (16 μ g/mL) – **2,26 %**, que não foi significativo, e ao controle positivo (2,41%) de despolarização mitocondrial.

Para *Candida parapsilosis* a redução apresentou o seguinte aspecto: MIDAZ 1/2CIM (125 μ g/mL) – **15,1%**; MIDAZ CIM (250 μ g/mL) – **38,1%** e MIDAZ 2XCIM (500 μ g/mL) – **54,9%**. Os valores foram comparados também ao FLUCO (16 μ g/mL) - **1,73%**, que não foi significativo, e ao controle positivo (2,43%) de despolarização mitocondrial.

Figura 5 - Avaliação da **despolarização mitocondrial** em cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol por citometria de fluxo. Foram utilizados o controle positivo FLUCO (16 µg/mL) e MIDAZ (CIM= 250 µg/mL) nas concentrações CIM/2, CIM e 2X CIM e avaliados após tratamento em três cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.



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

* $p < 0.05$ - os resultados foram comparados com o controle, determinado por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

6.3.3 Midazolam não produz espécies reativas de oxigênio (EROs)

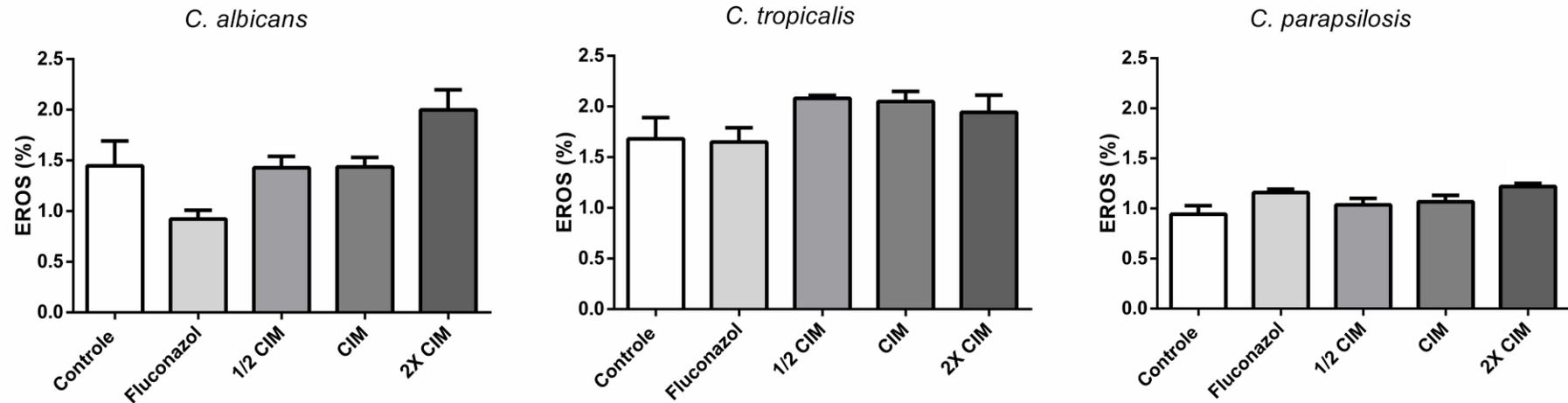
A Figura 6 mostra que o midazolam nas concentrações de 1/2CIM (383,5 μ M), CIM (767 μ M) e 2XCIM (1534 μ M) não provocou produção significativa de espécies reativas de oxigênio quando comparado ao controle na cepa de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

As células de *C. albicans* não apresentaram produção significativa de EROs em nenhum tratamento realizado: MIDAZ 1/2CIM (125 μ g/mL) – **1,42%**; MIDAZ CIM (250 μ g/mL) – **1,43%** e MIDAZ 2XCIM (500 μ g/mL) – **1,99%**, frente ao FLUCO (16 μ g/mL) – **0,92%** e ao controle negativo (1,44%).

O mesmo comportamento ocorreu diante das células de *Candida tropicalis*: MIDAZ 1/2CIM (125 μ g/mL) – **2,08%**; MIDAZ CIM (250 μ g/mL) – **2,05%** e MIDAZ 2XCIM (500 μ g/mL) – **1,94%**, frente ao FLUCO (16 μ g/mL) – **1,64%** e ao controle negativo (1,68%).

Para *Candida parapsilosis*: MIDAZ 1/2CIM (125 μ g/mL) – **1,03%**; MIDAZ CIM (250 μ g/mL) – **1,06%** e para MIDAZ 2XCIM (500 μ g/mL) – **1,22%**, sem valores significativos para produção de EROs.

Figura 6- Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em *Candida* spp. resistentes ao fluconazol expostas ao midazolam em diferentes intervalos de tempo avaliado por citometria de fluxo. Foram utilizados o controle positivo FLUCO (16 µg/mL) e MIDAZ (CIM= 250 µg/mL) nas concentrações CIM/2, CIM e 2X CIM e avaliados após tratamento em três cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.



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

* $p < 0.05$ - os resultados foram comparados com o controle, determinado por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

6.3.4 Midazolam atua na externalização de fosfatidilserina

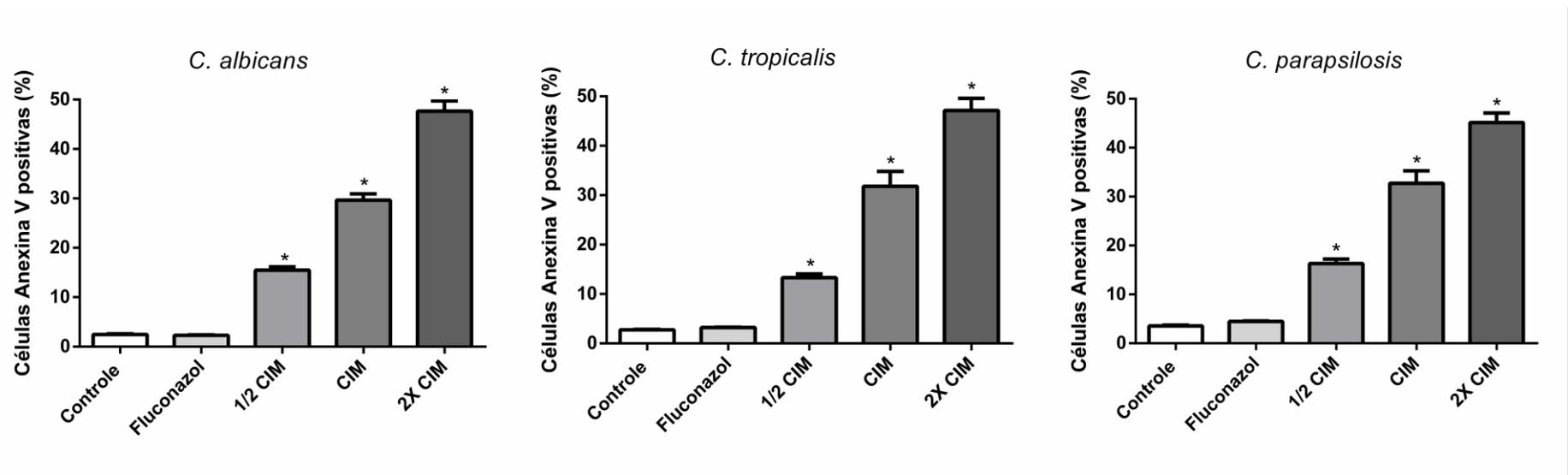
Como demonstrado pela Figura 7, cepas de *Candida* spp. quando expostas às concentrações 1/2CIM (383,5 μ M), CIM (767 μ M) e 2XCIM (1534 μ M) apresentaram aumento significativo na frequência de células com fosfatidilserina externalizadas em relação às células controle. A quantidade de anexina retida na célula é proporcional à quantidade de fosfatidilserina externalizada e indica que as células tratadas com midazolam encontram-se em fase de apoptose inicial.

Ocorreu a externalização de fosfatidilserina nas células de *C. albicans* tratadas com MIDAZ 1/2CIM (125 μ g/mL) – **15,4%**; MIDAZ CIM (250 μ g/mL) – **29,6%** e MIDAZ 2XCIM (500 μ g/mL) – **47,6%**, frente ao FLUCO (16 μ g/mL) – **2,32%** e ao controle negativo (2,46%).

Para *C. tropicalis* a externalização de fosfatidilserina também ocorreu quando as células receberam os mesmos tratamentos: MIDAZ 1/2CIM (125 μ g/mL) – **13,3%**; MIDAZ CIM (250 μ g/mL) – **31,8%** e MIDAZ 2XCIM (500 μ g/mL) – **47,1%**, em relação ao FLUCO (16 μ g/mL) – **3,22%** e ao controle negativo (2,76%).

O tratamento realizado nas células de *C. parapsilosis* também apresentaram valores significativos: MIDAZ 1/2CIM (125 μ g/mL) – **16,3 %**; MIDAZ CIM (250 μ g/mL) – **32,7%** e MIDAZ 2XCIM (500 μ g/mL) – **45,1%**, frente ao FLUCO (16 μ g/mL) – **4,46%** e ao controle negativo (3,57%).

Figura 7 - Avaliação da externalização de fosfatidilserina em *Candida* spp. resistentes ao fluconazol expostas ao midazolam em diferentes intervalos de tempo avaliado por citometria de fluxo. Foram utilizados o controle positivo FLUCO (16 µg/mL) e MIDAZ (CIM= 250 µg/mL) nas concentrações CIM/2, CIM e 2X CIM e avaliados após tratamento em três cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.



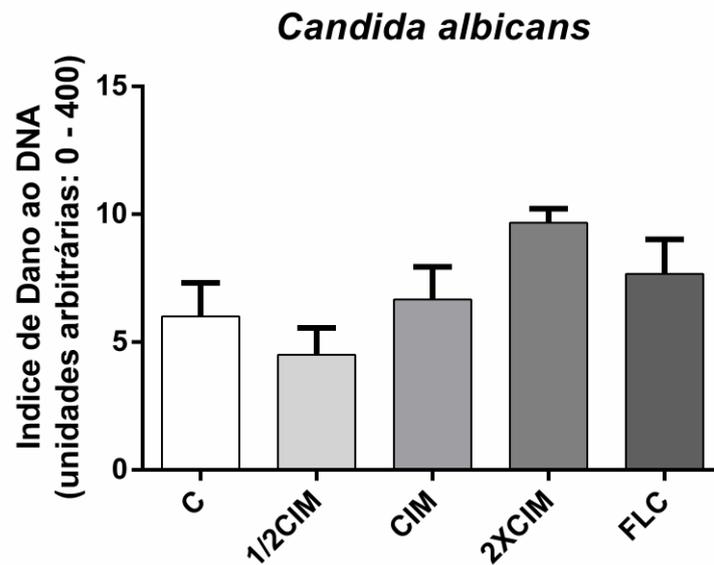
Os dados são apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M).

* $p < 0.05$ - os resultados foram comparados com o controle, determinado por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

6.3.5 Midazolam não ocasiona dano ao DNA

O ensaio do cometa na versão alcalina foi utilizado para demonstrar quebras no DNA em *Candida albicans*. A Figura 8 demonstra que quando as células foram expostas ao midazolam nas três concentrações (1/2CIM, CIM e 2XCIM) não houve aumento significativo quanto ao dano no DNA.

Figura 8- Avaliação do índice de dano ao DNA em *C. albicans* resistente a azólicos através do ensaio do cometa versão alcalina.



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

* $p < 0.05$ - os resultados foram comparados com o controle, determinado por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

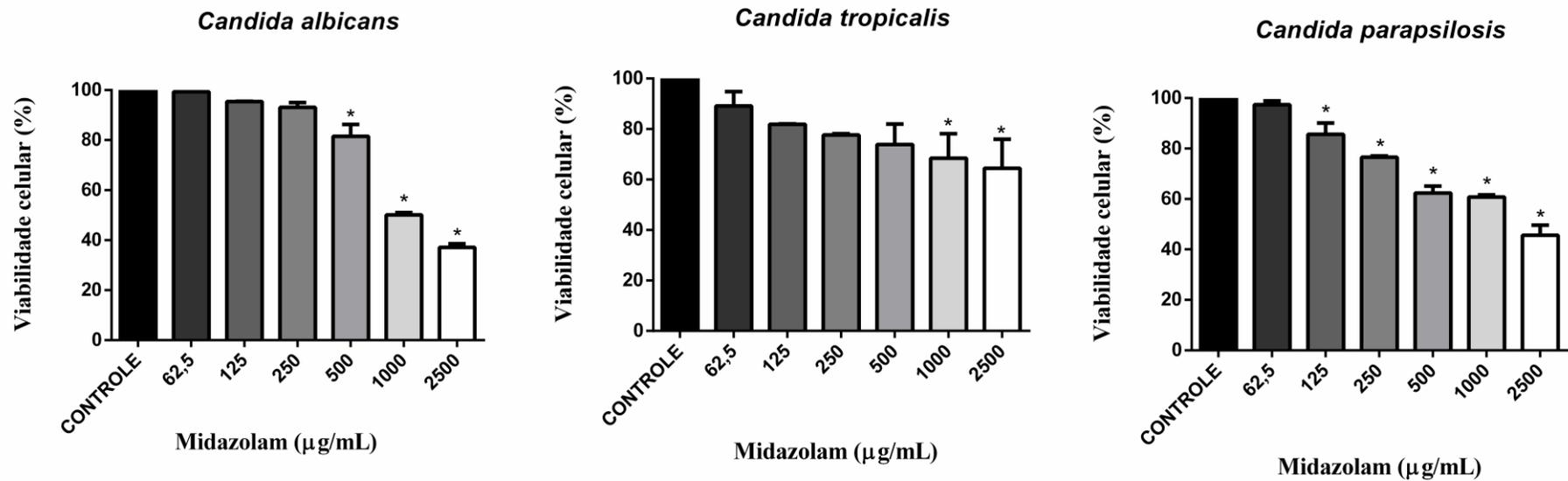
6.4 Midazolam inibe crescimento de biofilme formado de *Candida* spp.

Dada a relevância de considerar a organização dos microrganismos na forma de biofilme, verificamos se o midazolam tinha a capacidade de agir contra biofilmes formados em diferentes espécies de *Candida* spp. Conforme se pode observar na Figura 9, o midazolam foi capaz de inibir biofilme formado nas principais espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Foram utilizadas concentrações inibitórias e subinibitórias: 1/4CIM – 62,5µg/mL, 1/2CIM - 125µg/mL, CIM - 250µg/mL, 2XCIM - 500µg/mL, 4XCIM - 1000µg/mL e 10XCIM - 2500µg/mL.

Em *C. albicans* uma concentração de 4XCIM (1000µg/mL) provocou uma redução de 50% da viabilidade celular do biofilme em relação ao controle de crescimento e redução de 37% em 10XCIM (2500µg/mL). Já em *C. tropicalis* uma redução próxima a 50% também foi observada na concentração de 4XCIM (1000µg/mL).

Quanto à *C. parapsilosis* observou-se redução de 45% da viabilidade do biofilme em 10XCIM (2500µg/mL). Os perfis de inibição do biofilme formado também foram realizados utilizando uma faixa de concentração de ANFO B (0.125 - 16µg/mL) conforme mostrado na Figura 10. Os demais valores de viabilidade celular em relação ao midazolam e à anfotericina B encontram-se no apêndice 1.

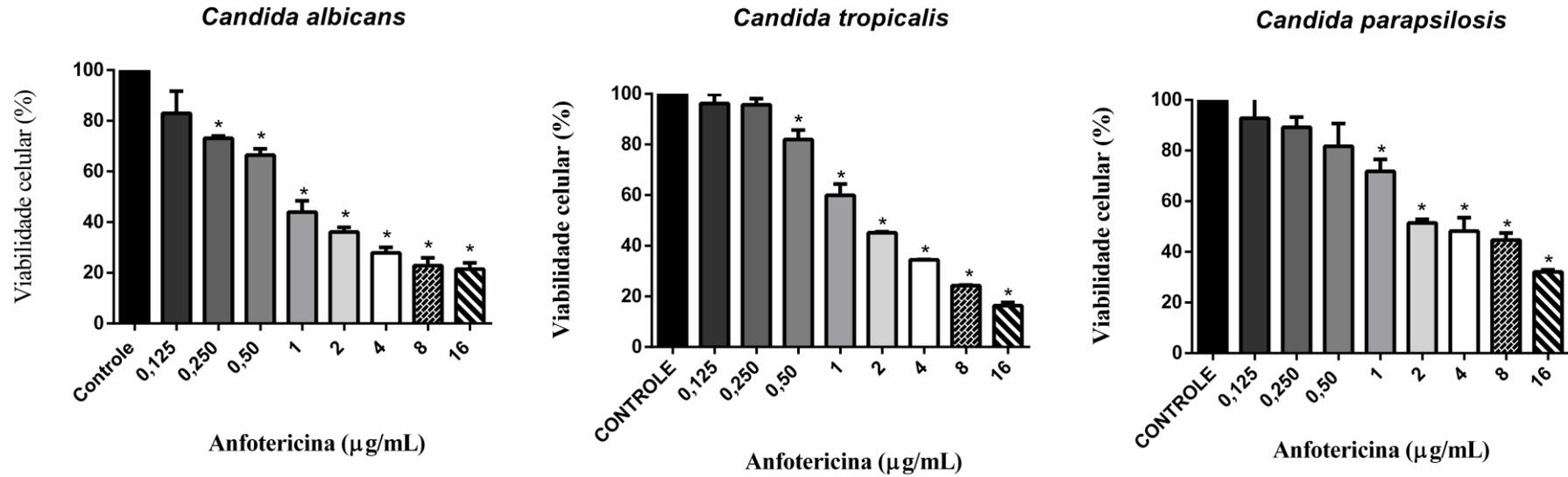
Figura 9- Atividade do midazolam frente ao biofilme formado de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* avaliada pelo método do MTT. MIDAZ foi testado nas concentrações inibitórias (CIM, 2XCIM, 4XCIM e 10XCIM) e subinibitória (CIM/4 e CIM/2). Foram utilizadas uma cepa boa formadora de biofilme de cada espécie: *Candida albicans* (CIM= 250µg/mL), *Candida tropicalis* (CIM= 250µg/mL) e *Candida parapsilosis* (CIM= 250µg/mL). A avaliação da viabilidade celular foi feita pelo ensaio de redução do MTT.



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

*p < 0.05 - os resultados foram comparados com o controle, determinado por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

Figura 10- Perfil da anfotericina B frente ao biofilme formado de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* avaliada pelo método do MTT. ANFO B foi testada na faixa de 16 a 0,03 $\mu\text{g/mL}$. A avaliação da viabilidade celular foi feita pelo ensaio de redução do MTT.



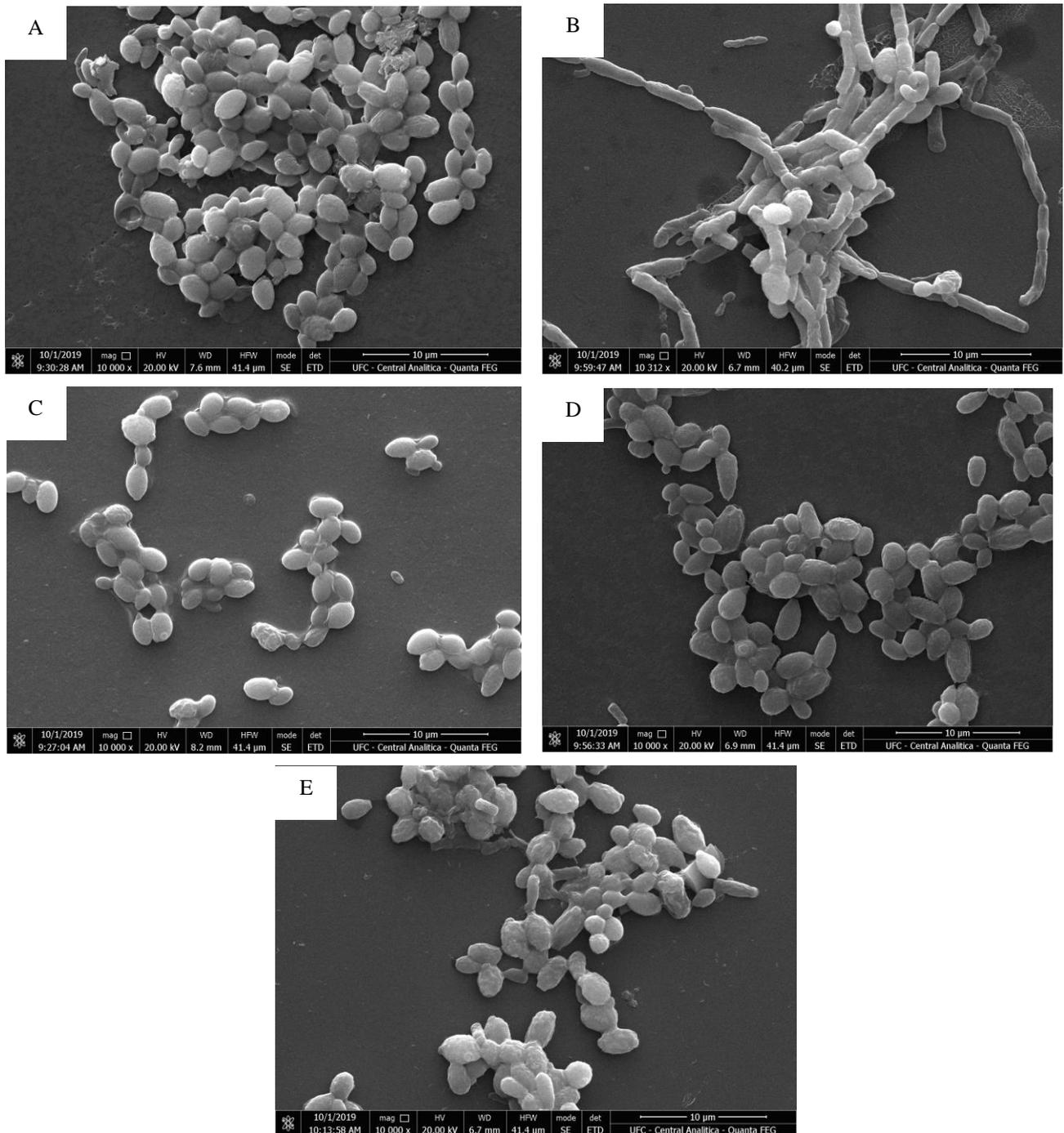
Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M)

*p < 0.05 - os resultados foram comparados com o controle, determinado por ANOVA seguido do teste Newman-Keuls.

6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O efeito do MIDAZ na concentração de 10XCIM quanto à morfologia e estrutura do biofilme de *Candida* spp. foi examinado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise da MEV mostrou células de controle com superfície em geral regular e homogênea (Figura 11A) e hifas normais (Figura 11B). As células tratadas nas concentrações de 10XCIM (Figuras 11C - *Candida albicans*; 11D - *Candida tropicalis*; 11E - *Candida parapsilosis*) apresentaram superfície levemente enrugada com uma aparência de desidratação, o que pode ser resultado da perda da rigidez da parede celular fúngica. As imagens corroboram com os outros achados apresentados.

Figura 11 - Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *Candida* spp. após incubação de 24h do MIDAZ na concentração de 10XCIM. (A e B) Biofilme maduro não tratado (controle). (C, D e E) Biofilme de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, respectivamente, tratado com MIDAZ na concentração de 2500 μ g/ml, onde se observa células alteradas morfolologicamente e com estrutura mais desorganizada do biofilme. Aumento: 10000x. Escala: 10 μ m.



6.6 Midazolam não apresenta citotoxicidade em células L929

A ação do midazolam na viabilidade de fibroblastos murino (L929) foi avaliada pelo método do MTT. Após 24h de exposição ao midazolam na concentração de 31,25 a 500 $\mu\text{g/mL}$ observou-se que não há a presença de citotoxicidade.

7. DISCUSSÃO

No intuito de buscar alternativas que se contraponham a esse contexto o estudo demonstrou que o midazolam, benzodiazepínico com efeito sobre os receptores gabaérgicos, que são considerados inibitórios no sistema nervoso central (RANG *et al.*, 2016), apresenta efeito antifúngico diante de diferentes espécies de *Candida* spp.

Kathwate *et al.* (2015) avaliaram o perfil de sensibilidade do midazolam nas ATCC 90028 (sensível ao fluconazol) e ATCC 10231 (resistente ao fluconazol) de *Candida albicans* e a CIM encontrada foi de 100µg/mL. Nossos resultados apresentaram uma variação maior na CIM, entretanto esse trabalho foi realizado com apenas duas cepas, o que pode ter impossibilitado observar maior variação na CIM. Apesar desse mesmo trabalho analisar o efeito de outros benzodiazepínicos, como o diazepam e lorazepam, com CIM de 400 e 25µg/mL, respectivamente, não foi detectado até então nenhum outro estudo, com o uso desse grupo de fármacos, que apresentasse abordagem semelhante com *Candida* spp., o que confere certa novidade nos nossos achados.

Atualmente também é possível observar vantagens na combinação de fármacos antifúngicos, como os azólicos, com aqueles pertencentes a outras classes de fármacos não antiúngicos, onde pode haver redução de citotoxicidade ou mesmo diminuição na concentração a ser utilizada de uma ou ambas as drogas (PINA-VAZ *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2019). Nesse sentido, os inibidores seletivos da receptação da serotonina (ISRSs) a exemplo da fluoxetina e os benzodiazepínicos, a exemplo do midazolam apresentam possibilidade de aplicabilidade no tratamento de insônia. Levando em consideração essa semelhança e a importância do sinergismo por promover maior aplicabilidade de drogas e possível redução na concentração para seu uso, por exemplo, Oliveira *et al.* (2014) fizeram um estudo para avaliar o efeito sinérgico entre fluoxetina e fluconazol. Inicialmente determinaram a CIM dos isolados de *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) com valores variando de 156 a 625µg/mL e fazendo uso de cepas sensíveis e resistentes ao fluconazol, encontrando um perfil de sinergismo em 50% das cepas.

A partir dos achados com midazolam isolado diante de *Candida* spp., testamos a associação dele com fluconazol e também com o itraconazol, ambas drogas utilizadas nos hospitais públicos do Brasil (MARINS *et al.*, 2018) e observamos um perfil menos expressivo mas ainda presente do encontrado por Oliveira *et al.* (2014), onde a associação tanto de MIDAZ + FLUCO quanto de MIDAZ + ITRA apresentaram o mesmo padrão, com efeito

sinérgico diante de 21% do total dos isolados e interação classificada como indiferente para as demais cepas.

Diante da ação antifúngica do midazolam, consideramos investigar o provável mecanismo de ação de morte celular a partir de técnicas de citometria de fluxo. Ao avaliar a viabilidade celular foi observado que o tratamento de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* com MIDAZ a partir da concentração de 1/2CIM (383,5µM) ocasionou redução significativa no número de células em relação ao controle e ao FLUCO, com aumento no número de células PI positivas em relação ao controle. Esse aspecto pode ser um indicativo de que houve alteração na integridade da membrana celular fúngica, podendo ocasionar por exemplo a formação de poros, contribuindo para morte celular (DAS *et al.*, 2017). De Sá *et al.* (2020) também encontraram esse comportamento de redução da densidade celular após verificar a ação do etomidato (utilizado primordialmente como anestésico) sobre *Candida* spp.

Quanto à via da apoptose, a perda do potencial transmembrana mitocondrial tem sido considerada uma característica da fase inicial da apoptose, causada pela abertura dos poros da membrana da mitocôndria (HWANG *et al.*, 2014). Neste trabalho, observou-se que a função mitocondrial em células de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* foi afetada significativamente após exposição ao MIDAZ à medida que a CIM aumentava (383,5µM - 767µM - 1534µM) em relação ao grupo controle, sugerindo que o MIDAZ afeta a função respiratória mitocondrial, impossibilitando o acúmulo da rodamina-123 nas mitocôndrias (BARROSO *et al.*, 2006). Sobre isso, Hong *et al.* (2013) ao explorarem o efeito do MIDAZ na linhagem de células de linfoma JeKo-1, verificaram que ele possivelmente inicia a via mitocondrial, que pode ser subsequenciada por eventos como fragmentação do DNA, que se encerram com a morte celular (HWANG *et al.*, 2012).

O MIDAZ também pode ser utilizado como anestésico na indução da sedação e foi demonstrado que a sua administração preserva estruturas dendríticas e não afeta o desenvolvimento neuronal durante a anestesia (VUTSKITS *et al.*, 2005), apesar de ativar a apoptose de células cancerígenas de várias origens (MISHRA *et al.*, 2013). Nesse sentido, a produção de EROS desempenha papel crucial na apoptose principalmente por induzir estresse oxidativo que em excesso pode causar danos moleculares (HWANG *et al.*, 2014).

O MIDAZ não apresentou aumento significativo nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) em relação ao controle. Sobre isso, Liu *et al.* (2017) viram que a presença do MIDAZ (100µM) aumentou a sobrevivência em células neuronais corticais primárias sob

estresse oxidativo após tratamento com 10mM de butionina sulfoximina (BSO) e 1mM de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que conduziram à produção de EROs através da ativação da via JNK-ERK. O MIDAZ, por sua vez, atuou suprimindo esse efeito, indicando suas propriedades inibidoras de EROs. Esse comportamento pode ter influenciado na ausência de expressão da ação do MIDAZ quanto ao aumento de EROs diante de outras espécies de *Candida* spp. no estudo.

Já a fosfatidilserina, quando externalizada da camada interna para a externa, sinaliza que a célula deve ser fagocitada por macrófagos. Durante esse processo a anexina V, que é um marcador com alta afinidade pela fosfatidilserina, se liga a ela quando está externalizada na célula em apoptose, como aponta Choi *et al.* (2015). O MIDAZ, nas três concentrações utilizadas produziu um aumento significativo da externalização de fosfatidilserina nas células de *Candida* spp. testadas, sugerindo que essas células estão em processo de apoptose. Esses dados corroboram com os encontrados para a cetamina (atua primariamente como anestésico), onde o tratamento desse fármaco com itraconazol apresentou um aumento significativo de células apoptóticas (DE ANDRADE NETO *et al.*, 2020)

A fim de verificar se o MIDAZ causa danos ao DNA de células de *C. albicans* foi realizado o teste do cometa na versão alcalina. Entretanto, nossos resultados demonstraram que quando as células foram expostas ao midazolam nas três concentrações (1/2CIM, CIM e 2XCIM) não houve aumento ao dano no DNA, sugerindo que o midazolam não afetou a viabilidade do DNA de *Candida albicans* (CAVALCANTI, 2009).

Após verificar o potencial antifúngico do MIDAZ diante de células planctônicas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, buscou-se investigar o potencial antifúngico do MIDAZ sobre biofilme formado de *Candida* spp. analisando a viabilidade celular através do ensaio de redução do MTT,

Os resultados deste trabalho demonstram que o MIDAZ apresenta atividade contra biofilme de todas as espécies selecionadas para o estudo, com redução significativa da viabilidade celular do biofilme de *Candida albicans* em 500µg/ml, de *Candida tropicalis* em 1000µg/ml e de *Candida parapsilosis* em 125µg/ml. Kathwate *et al.* (2015) observaram inibição do biofilme de *Candida albicans* apesar da CIM também se apresentar maior (125µg/mL) se comparado ao encontrado para células planctônicas. Esse perfil de aumento da CIM pode estar associado com a forma de biofilme está comumente relacionada a infecções crônicas e à resistência a antifúngicos, que geralmente têm eficiência reduzida ou até mesmo ausente (TAFF *et al.*, 2013).

Análises de MEV demonstraram os efeitos causados pelo MIDAZ na concentração de 10XCIM (2500µg/mL) frente ao biofilme de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. O efeito antifúngico foi observado através de mudanças morfológicas das células tratadas em comparação ao controle, que se apresentou em geral semelhante nas três espécies. Essas alterações podem causar mudanças na função da parede celular e levar a irregularidades relacionadas, por exemplo, a rigidez mecânica e resistência à pressão osmótica (RUEDA; CUENCA-ESTRELLA; ZARAGOZA, 2014). As imagens corroboram com os outros achados apresentados nesse trabalho.

Os dados mais expressivos estão relacionados à *Candida parapsilosis* e esse comportamento é otimista uma vez que essa espécie tem sido associada a infecções de catéter venoso central por sua capacidade de formar biofilmes, e torna-se um patógeno significativo em unidades de terapia intensiva neonatais ainda mais que *Candida albicans* (BORGES *et al.*, 2018).

Após visualização da ação antifúngica do midazolam frente a cepas de *Candida* spp. foi investigado a sua ação na viabilidade celular de células L929 (fibroblastos murinos), a fim de verificar possível efeito citotóxico, que não foi encontrado nas concentrações desse estudo, como o encontrado por Ohno *et al.* (2012) quando fizeram o ensaio com células de carcinoma epidermoide oral humano (HSC-2, HSC-3, HSC-4, NA, Ca9-22), glioblastoma (T98G, U87MG), leucemia promielocítica humana (HL-60) e células orais normais (HGF, HPC, HPLF).

8. CONCLUSÃO

O midazolam possui ação antifúngica contra forma planctônica de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Também é capaz de promover diminuição da densidade celular, danos na membrana mitocondrial e propicia externalização da fosfatidilserina, sem demonstrar citotoxicidade. No entanto, o midazolam não mostrou efeito pró-oxidante e mutagênico. Quanto a ação frente a biofilmes, o midazolam possui efeito na erradicação de biofilmes formados nas três principais espécies de *Candida* testadas.

9. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, B.D.; JOHNSON, M.D.; PFEIFFER, C.D.; JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C.; CATANIA, J.; BOOKER, R.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S.A.; PERLIN, D.S.; PFALLER, M.A. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clin. Infect. Dis.**, v. 56, n. 12, p. 1724- 1732, 2013.

ANTINORI, S.; MILAZZO, L.; SOLLIMA, S.; GALLI, M.; CORBELLINO, M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **Eur. J. Intern. Med.**, v. 34, n. 1, p. 21–28, 2016.

ARENDRUP, M.C.; DZAJIC, E.; JENSEN, R.H.; JOHANSEN, H.K.; KJAELDGAARD, P.; KNUDSEN, J.D. *et al.* Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. **Clin Microbiol Infect.**, v. 19, p. 343–53, 2013.

ARMSTRONG-JAMES, D.; BROWN, G.D.; NETEA, M.G.; ZELANTE, T.; GRESNIGT, M.S.; VAN DE VEERDONK, F.L.; LEVITZ, S.M. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. **Lancet Infect. Dis.**, v. 17, n. 12, p. 393-402, 2017.

ARORA, S.; DHURIA, N.; JINDAL, N.; GALHOTRA, S. Biofilm formation and antifungal susceptibility of *Candida* isolates. **International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences.**, v.6, p.2517–2521, 2017.

ARYAMLOO, P.; ASGARIAN-OMRAN, H.; ASLANI, N.; HOSSEIN-NATAJ, H.; SHOKOHI, T.; BADALI, H.; NABILI, M.; ABDOLLAHI GOHAR, A.; MOAZENI, M. Cellular apoptosis: An alternative mechanism of action for caspofungin against *Candida glabrata*. **Curr Med Mycol**, v.5, n. 2, p. 9-15, 2019.

BASSETTI, M.; RIGHI, E.; ANSALDI, F.; MERELLI, M.; DE PASCALE, G.; DIAZ-MARTIN, A.; LUZZATI, R. *et al.* A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. **Intensive Care Med.**, v.40, p.839–845, 2014.

BASSETTI, M.; RIGHI, E.; MONTRAVERS, P.; CORNELLY, O.A. What has changed in the treatment of invasive candidiasis? A look at the past 10 years and ahead. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, n. 1, p. i14-i25, 2018.

BONHOMME, J.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 398- 403, 2013.

BORGES, K.R.A.; PIMENTEL, I.V.; LUCENA, L.C.L.S.; DA SILVA, M.A.C.N.; MONTEIRO, S.G.; MONTEIRO, C.A.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; BEZERRA, G.F.B. Adhesion and biofilm formation of *Candida parapsilosis* isolated from vaginal secretions to copper intrauterine devices. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.60, 2018.

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. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 22, p. 273-277, 2018.

BREDA, G.L.; TUON, F.F.; MEIS, J.F.; HERKERT, P.F.; HAGEN, F.; DE OLIVEIRA, L.Z.; DIAS, V.C.; DA CUNHA C.A.; QUEIROZ-TELLES, F. Breakthrough candidemia after the introduction of broad spectrum antifungal agents: A 5-year retrospective study. **Medical Mycology.**, v.56, p.406–415, 2018.

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

CAGGIANO, G.; CORETTI, C.; BARTOLOMEO, N.; LOVERO, G.; DE GIGLIO, O.; MONTAGNA, M.T. *Candida* Bloodstream Infections in Italy: Changing Epidemiology during 16 Years of Surveillance. **Biomed Res Int.**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

CAMARGO, T.Z.S.; MARRA, A.R.; SILVA, C.V.; CARDOSO, M.F.S.; MARTINO, M.D.V.; CAMARGO, L.F.A.; CORREA, L. Secular trends of candidemia in a tertiary care hospital. **Am J. Infect Control.**, v.38, p. 546–51, 2010.

CANELA, H.M.S.; CARDOSO, B.; VITALI, L.H.; COELHO, H.C.; MARTINEZ, R.; FERREIRA, M.E.D.S. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n.1, p. 11-21, 2018.

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

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 4, p. 1-24, 2015.

CHOI, H.; LEE, D. G. Lycopene induces apoptosis in *Candida albicans* through reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction. **Biochimie**, v. 115, p. 108-15, 2015.

CLEVELAND, A.A.; HARRISON, L.H.; FARLEY, M.M. *et al.* 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, 2015.

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

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

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249- 261, 2004.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a

nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J Clin Microbiol.**, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A.L.; NGAI, A.L.; BOURQUE, M.; BRADSHAW, S.K.; STROHMAIER, K.M.; TAYLOR, A.F. *et al.* Caspofungin use in patients with invasive candidiasis caused by common non-*albicans* *Candida* species: review of the Caspofungin database. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, p. 1864–71, 2010.

COLOMBO, A. L. *et al.* Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, v. 17, n. 3, p. 283- 312, 2013.

COLOMBO, A.L.; GARNICA, M.; ARANHA CAMARGO, L.F.; DA CUNHA, C.A.; BANDEIRA, A.C.; BORGHI, D.; CAMPOS, T.; SENNA, A.L.; VALIAS DIDIER, M.E.; DIAS, V.C.; NUCCI, M. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Med Mycol.**, v. 51, n. 1, p. 38-44, 2013.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; SUKIENIK, T. *et al.* Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive Care Med.**, v. 40, p.1489–1498, 2014.

COSTA, C.R. Fatores de virulência de isolados de *Candida* de pacientes imunocometidos. Caracterização molecular de *Candida albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

DA COSTA, V.G.; QUESADA, R.M.; ABE, A.T.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M.C. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. **Mycopathologia**, v. 178, p. 243-250, 2014.

DA MATTA, D.A.; SOUZA, A.C.R.; COLOMBO, A.L. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 2, p. 1-14, 2017.

DAS, B.; DASH, S.K.; MANDAL, D. *et al.* Green synthesized silver nanoparticles destroy multi drug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 6, 862-876, 2017.

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

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

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

DE ANDRADE NETO, J. B., *et al.* Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds *in vitro* against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: a special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **Plos One**, v. 9, n. 5, 2014.

DE ANDRADE NETO J.B.; DA SILVA, C.R.; BARROSO, F.D., *et al.* Synergistic effects of ketamine and azole derivatives on *Candida* spp. resistance to fluconazole. **Future Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 177-188, 2020.

DE MELO, A.P.V.; ZUZA-ALVES, D.L.; DA SILVA-ROCHA, W.P.; DE SOUZA, L.B.F.C. *et al.* Virulence factors of *Candida* spp. obtained from blood cultures of patients with candidemia attended at tertiary hospitals in Northeast Brazil. **Journal de Mycologie Médicale**, v.29, p. 132-139, 2019.

DE ROSA, F.G.; CORCIONE, S.; FILIPPINI, C., *et al.* The effect on mortality of fluconazole or echinocandins treatment in candidemia in internal medicine wards. **Plos One**, v. 10, n.5, p. 1-9, 2015.

DE SOUZA, M.C.P.; DOS SANTOS, A.G.; REIS, A.M.M. Drug utilization study of systemic antifungal agents in a Brazilian tertiary care hospital. **Int J Clin Pharm.**, v.38, p.1398–1406, 2016.

DIBONAVENTURA, G.; POMPILIO, A.; PICCIANI, C.; IEZZI M.; D'ANTONIO, D.; PICC OLOMINI, R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 50, p. 3269-3276, 2006.

ERICSSON, J.; CHRYSANTHOU, E.; KLINGSPOR, L. *et al.* Candidaemia in Sweden: a nationwide prospective observational survey. **Clin Microbiol Infect Dis.** v.19, p. 218–221, 2013.

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

GARCIA, M.C.; LEE, J.T.; RAMSOOK, C.B.; ALSTEENS, D.; DUFRÊNE, Y.F.; LIPKE, P.N. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. **PLoS One.**, v.6, n. 3, 2011.

GARNACHO-MONTERO, J.; DIAZ-MARTIN, A.; GARCIA-CABRERA, E.; DE PIPAON, M.R.P.; HERNANDEZ-CABALLERO, C.; LEPE-JIMENEZ, J.A. Impact on hospital mortality of catheter removal and adequate antifungal therapy in *Candida* spp. bloodstream infections. **J Antimicrob Chemother**, v.68, p. 206–213, 2013.

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

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, 2016.

HONG, J.Q.; WU, S.H.; CHEN, Z.Y.; ZHUANG, W.H.; GAO, H.Z. Effect of midazolam on mantle cell lymphoma JeKo-1 cell line and its relevant mechanisms. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 21, n.6, p.1460-3, 2013.

HWANG, J. H. *et al.* Hibicuslide C-induced cell death in *Candida albicans* involves apoptosis mechanism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 5, P. 1400-11, 2014.

JALAL, M.; ANSARI, M.A.; ALZOHAIRY, M.A.; ALI, S.G.; KHAN, H.M.; ALMATROUDI, A.; SIDDIQUI, M.I. Anti*Candidal* activity of biosynthesized silver nanoparticles: effect on growth, cell morphology, and key virulence attributes of *Candida* species. **International Journal of Nanomedicine**, v.14, p.4667–4679, 2019.

JENSEN, R.H.; ASTVAD, K.M.; SILVA, L.V.; SANGLARD, D.; JORGENSEN, R.; NIELSEN, K.F. *et al.* Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. **J Antimicrob Chemother.**, 2015.

KATHWATE, G. H.; SHINDE, R. B.; KARUPPAYIL, S. M. Antiepileptic Drugs Inhibit Growth, Dimorphism, and Biofilm Mode of Growth in Human Pathogen *Candida albicans*. **Assay And Drug Development Technologies**, v. 13, p. 307-312, 2015.

KATRAGKOU, A.; WALSH, T. J.; ROILIDES, E. Invasive fungal infections in pediatric solid organ transplant patients: epidemiology and management. **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 2, p. 57- 64, 2015.

KATRAGKOU, A.; ROILIDES, E.; WALSH, T.J. Role of echinocandins in fungal biofilm-related disease: vascular catheter-related infections, immunomodulation, and mucosal surfaces. **Clin Infect Dis**, v. 61, n. 6, p. S622–9, 2015.

KAZAK, E. *et al.* An investigation of *Candida* species isolated from blood cultures during 17 years in a university hospital. **Mycoses**, v. 57, n. 10, p. 623- 9, 2014.

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

KUMAR, D. *et al.* Candidemia-induced pediatric sepsis and its association with free radicals, nitric oxide, and cytokine level in host. **Journal of Critical Care**, v. 30, n. 2, p. 296- 303, 2015.

LACKNER, M.; TSCHERNER, M.; SCHALLER, M.; KUCHLER, K.; MAIR, C.; SARTORI, B. *et al.* Positions and Numbers of FKS Mutations in *Candida albicans* Selectively Influence In Vitro and In Vivo Susceptibilities to Echinocandin Treatment. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.58, p. 3626-35, 2014.

LEE, K.K.; KUBO, K.; ABDELAZIZ, J.A.; CUNNINGHAM, I.; DE SILVA DANTAS, A.; CHEN, X.; OKADA, H.; OHYA, Y.; GOW, N.A.R. Yeast species-specific, differential inhibition of β -1,3-glucan synthesis by poacic acid and caspofungin. **Cell Surf.**, v.3, p. 12-25, 2018.

LI, X.; CAI, Q.; MEI, H.; ZHOU, X.; SHEN, Y.; LI, D. *et al.* The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. **J Antimicrob Chemother.**, v. 70, p. 1993-2003, 2015.

LIMA-NETO, R.G.; BELTRÃO, E.I.; OLIVEIRA, P.C.; NEVES, R.P. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses**, v. 54, n. 1, p. 23-29, 2011.

LIU, J.Y.; GUO, F.; WU, H.L.; WANG, Y.; LIU, J.S. Midazolam anesthesia protects neuronal cells from oxidative stress-induced death via activation of the JNK-ERK pathway. **Mol Med Rep.**, v. 15, n. 1, p. 169-179, 2017.

LIU, Y.; WANG, W.; YAN, H.; WANG, D.; ZHANG, M.; SUN, S. Anti-*Candida* activity of existing antibiotics and their derivatives when used alone or in combination with antifungals. **Future Microbiology**. v.14, n. 10, 2019.

LO, H.J.; TSENG, K.Y.; KAO, Y.Y.; TSAO, M.Y.; LO, H.L.; YANG, Y.L. Cph1p negatively regulates MDR1 involved in drug resistance in *Candida albicans*. **Int J Antimicrob Agents**.,v.45, p.617-21, 2015.

LOCKHART, S.R.; IQBAL, N.; CLEVELAND, A.A. *et al.* Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two US cities from 2008 to 2011. **J Clin Microbiol.**, v. 50, p. 3435–3442, 2012.

LORTHOLARY, O.; OLLIVIER, M.D.; 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. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.55, p. 532-538, 2011.

MARAK, M.B.; DHANASHREE, B. Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* spp. isolated from clinical samples. **Int J Microbiol.**, 2018.

MARINS, T.A.; MARRA, A.R.; EDMOND, M.B.; MARTINO, M.D.V.; YOKOTA, P.K.O.; MAFRA, A.C.C.N.; JUNIOR, M.S.D. Evaluation of *Candida* bloodstream infection and antifungal utilization in a tertiary care hospital. **BMC Infectious Diseases**., v. 18, 2018.

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

MAURYA, I.K.; PATHAK, S.; SHARMA, M.; SANWAL, H.; CHAUDHARY, P.; TUPEC, S.; DESHPANDE, M.; SINGH CHAUHAN, V.; PRASADA, R. Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. **Peptides**. v. 32, p.1732–1740, 2011.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119- 28, 2013.

MEDEIROS, M.A.P.; MELO, A.P.V.; BENTO, A.O., *et al.* Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **Plos One**, v. 14, n. 8, p. 1-15, 2019.

MILOSHEY, G.; MIHAYLOY, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell electrophoresis on yeast cells. **Mutation Research**, v. 513, n. 1-2, p. 69- 74. 2002.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. **Ann Parasitol**. v. 61, n. 1, p. 3-9, 2015.

MORAN, G.P.; COLEMAN, D.C.; SULLIVAN, D.J. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* More Pathogenic? **Int J Microbiol.**, 2012.

NAMI, S.; MOHAMMADI R.; VAKILI M.; KHEZRIPOUR, K; MIRZAEL H.; MOROVATI, H. Fungal vaccines, mechanism of actions and immunology: a comprehensive review. **Biomed. Pharm.**, v. 109, p. 333-344, 2018.

NOBILE, C.J.; JOHNSON, A.D. *Candida albicans* biofilms and human disease. **Annu. Ver. Microbiol.**, v.69, p.71–92, 2015.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A.M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A.L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clin Infect Dis.**, v. 51, p. 561–570, 2010.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T. *et al.* Latin American Invasive Mycosis Network Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **Plos One.**, v.8, 2013.

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

OESER, C.; LAMAGNI, T.; HEATH, P.T.; SHARLAND, M.; LADHANI, S. The epidemiology of neonatal and pediatric candidemia in England and Wales, 2000–2009. **Pediatr Infect Dis J.**, v.32, p. 23–26, 2013.

OHNO, S.; KOBAYASHI, K.; UCHIDA, S.; AMANO, O.; SAKAGAMI, H.; NAGASAKA, H. Cytotoxicity and Type of Cell Death Induced by Midazolam in Human Oral Normal and Tumor Cells. **Anticancer Research.** v. 32, p. 4737-4748, 2012.

OLIVEIRA, A. S. *et al.* Anti-*Candida* activity of fluoxetine alone and combined with fluconazole: a synergistic action against fluconazole- resistant strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 4224- 6, 2014.

PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.R. *et al.* Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 62, p. e1–50, 2016.

PEREIRA, C.A.; COSTA, A.C.; SILVA, M.P.; BACK-BRITO, G.N.; JORGE, A.O. *Candida albicans* and virulence factors that increases its pathogenicity. **The Battle against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs**, v. 2, p. 631–636, 2015.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev.** v. 20, n. 1, p. 133-63, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L. *et al.* Global Antifungal Surveillance Group 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. **J Clin Microbiol.**, v. 48, p. 1366–1377, 2010.

PFALLER, M.A.; MOET, G.J.; MESSER, S.A.; JONES, R.N.; CASTENHEIRE, M. *Candida* bloodstream infections: Comparison of species distributions and antifungal resistance patterns

in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2008–2009. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 55, 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American journal of medicine**, v. 125, p. S3–13, 2012.

PHAM, C.D.; IQBAL, N.; BOLDEN, C.B.; KUYKENDALL, R.J.; HARRISON, L.H.; FARLEY, M.M. *et al.* Role of FKS mutations in *Candida glabrata*: MIC values, echinocandin resistance, and multidrug resistance. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 58, p. 4690–6., 2014.

PIERCE, C. G. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **NIH Public Access**, v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2008.

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

PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A.G.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RICARDO, E.; MÅRDH, P.A. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 678-685, 2005.

POIKONEN, E.; LYYTIKÄINEN, O.; ANTTILA, V.J. *et al.* Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004–2007. **BMC Infect Dis.**, v.10, 2010.

PRISTOV, K.E.; GHANNOUM, M.A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clin Microbiol Infect.**, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019.

QUINDÓS, G. Epidemiology of *Candidaemia* and invasive candidiasis. A changing face. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 31, n. 1, p. 42–48, 2014.

RAJESHKUMAR, R.; SUNDARARAMAN, M. Emergence of *Candida* spp. and exploration of natural bioactive molecules for anti*Candidal* therapy— status quo. **Mycoses**, v 55, p. 60 – 73, 2011.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Int. J. Microbiol.**, v. 2012, p. 521-528, 2012.

RANG, H.P.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. RANG&DALE'S Pharmacology 8th edition. **Elsevier (Ed.)**, London, UK, 1251-1274, 2016.

RODRIGUES, C.F.; RODRIGUES, M.E.; MARIANA HENRIQUES, M. *Candida* sp. Infections in Patients with Diabetes Mellitus. **J Clin Med.**, v.8, n.1, 2019.

RUEDA, C.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 2, p. 1071–1083, 2014.

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

SANJIB DAS, S.; BHUYAN, R.; BAGCHI, A.; SAHA, T. Network analysis of hyphae forming proteins in *Candida albicans* identifies important proteins responsible for pathovirulence in the organism. **Heliyon**, v.5, 2019.

SANTOS, E.R.; DAL FORNO, C.F.; HERNANDEZ, M.G., *et al.* Susceptibility of *Candida* spp. isolated from blood cultures as evaluated using the M27-A3 and new M27-S4 approved breakpoints. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 56, p. 477-482, 2014.

SHAHID, S. K. Newer patents in antimycotic therapy. **Pharmaceutical patent analyst**, v. 5, n. 2, p. 115-134, 2016.

SHARMA, S.; ALFATAH, M.; BARI, V.K.; RAWAL, Y.; PAUL, S.; GANESAN, K.; Sphingolipid Biosynthetic Pathway Genes FEN1 and SUR4 Modulate Amphotericin B Resistance. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.58, p.2409-14. 2014.

SIFUENTES-OSORNIO, J. *et al.* Epidemiology of invasive fungal infections in latin america current managment of fungal infections. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 1, p. 23– 34, 2012.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SILVA-DIAS, A.; MIRANDA, I.M.; BRANCO, J., *et al.* Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Front Microbiol.**,v. 6, n. 205, p. 1-8, 2015.

SIMÕES, M.; LEMOS, M.; SIMÕES, L.C. Phytochemicals against drug resistant microbes. **Dietary phytochemicals and microbes**. Springer, Dordrecht, Netherlands. In Patra AK (ed), p. 185–205, 2012.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **Biomed Res Int**. v. 2013, 2013.

STEINBACH, W.J.; ROILIDES, E.; BERMAN, D. *et al.* International Pediatric Fungal Network Results from a prospective, international, epidemiologic study of invasive candidiasis in children and neonates. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 31, p. 1252–1257, 2012.

STORTI, L. R. *et al.* *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the Pediatric Unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical College, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 225- 231, 2012.

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

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

TAFF, H.T.; MITCHEL, K.F.; EDWARD, J.A.; ANDES, D.R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8 (10), p., 1325-1337, 2013.

TOBUDIC, S; KRATZER, C.; LASSNIGG, A.; PRESTERL, E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. **Mycoses**, v. 55, p. 199 – 204, 2012.

THOMAZ, D.Y.; DE ALMEIDA, J.N.; LIMA, G.M.E.; NUNES, M.O.; CAMARGO, C.H.; GRENFELL, R.C.; BENARD, G.; DEL NEGRO, G.M.B. An Azole-Resistant *Candida parapsilosis* Outbreak: Clonal Persistence in the Intensive Care Unit of a Brazilian Teaching Hospital. **Front Microbiol.**, v. 9, p. 1-11, 2018.

VALENTÍN, A. *et al.* Voriconazole inhibits biofilm formation in different species of the genus *Candida*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 10, p. 2418- 23, 2012.

VALE-SILVA, L.A.; COSTE, A.T.; ISCHER, F.; PARKER, J.E.; KELLY, S.L.; PINTO, E. *et al.* Azole resistance by loss of function of the sterol $\Delta 5,6$ - desaturase gene (ERG3) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence. **Antimicrob Agents Chemother.**,v.56, p.1960-8, 2012.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, 2012.

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

VIEIRA, A.J.H.; DOS SANTOS, J.I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 2016.

VIEIRA DE MELO, A.P.; ZUZA-ALVES, D.L.; DA SILVA-ROCHA, W.P., *et al.* Virulence factors of *Candida* spp. obtained from blood cultures of patients with candidemia attended at tertiary hospitals in Northeast Brazil. **J Mycol Med.** v. 29, n. 2, p. 132-139, 2019.

VUTSKITS, LASZLO ; GASCON, EDUARDO; TASSONYI, EDOMER; KISS, JOZSEF ZOLTAN. Clinically Relevant Concentrations of Propofol but Not Midazolam Alter In Vitro Dendritic Development of Isolated γ -Aminobutyric Acid-positive. **Interneurons. Anesthesiology**, v. 102, p. 970–976, 2005.

XU, H.; JENKINSON, H.F.; DONGARI-BAGTZOGLU, A. Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of *Streptococcus-Candida* interactions in oral health and disease. **Mol Oral Microbiol.**, v.29, p.99–116, 2014.

WANG, Y.C., HUANG, S.H.; LAN, C.Y.; CHEN, B.S. Prediction of phenotype-associated genes via a cellular network approach: a *Candida albicans* infection case study. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. 1-7, 2012.

WIEDERHOLD, N.P. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. **Int J Antimicrob Agents**; v. 51, n. 3, p. 333-339, 2018.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Ther. Clin. Risk Manag.**, v. 10, p. 95-105, 2014.

YENISEHIRLI, G.; BULUT, N.; YENISEHIRLI, A.; BULUT, Y. In vitro susceptibilities of *Candida albicans* isolates to antifungal agents in Tokat, Turkey. **Jundishapur Journal of Microbiology.**, v.8, 2015.

ZAVREL, M.; WHITE, T. C. Medically important fungi respond to azole drugs: an update. **Future Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1355-73, 2015.

ZILDERBERG, M.D.; SHORR, A.F.; KOLLEF, M.H. Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000–2005. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 29, p. 978–980, 2008.

ZUZA-ALVES, D.L.; SILVA-ROCHA, W.P.; CHAVES, G.M. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. **Front. Microbiol.**, v.8, n. 1927, p. 1-25, 2017.

APÊNDICE

Viabilidade celular em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* em biofilme após 24h de exposição ao midazolam e à anfotericina B, respectivamente.

Tratamento	Viabilidade (%) Média ± EPM (n=3)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Midazolam (µg/ml)			
Controle (-)	100	100	100
CIM/4 (62,5)	99,38 ± 0,17*	89,08 ± 4,63*	97,37 ± 1,53*
CIM/2 (125)	95,45 ± 0,08*	81,85 ± 0,18*	85,60 ± 4,53*
CIM (250)	93,11 ± 1,60*	77,61 ± 0,52*	76,50 ± 0,50*
2xCIM (500)	81,57 ± 4,71*	73,84 ± 8,07*	62,39 ± 2,69*
4xCIM (1000)	50,09 ± 0,74*	68,42 ± 9,72*	60,79 ± 0,78*
10xCIM (2500)	37,10 ± 1,18*	64,47 ± 9,38*	45,64 ± 3,97*

Tratamento	Viabilidade (%) Média ± EPM (n=3)		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Anfotericina B (µg/ml)			
Controle (-)	100	100	100
0,125	82,91 ± 7,14*	96,22 ± 2,88*	92,76 ± 6,39*
0,250	73,09 ± 0,74*	95,68 ± 2,02*	89,22 ± 3,27*
0,5	66,49 ± 1,98*	81,95 ± 3,03*	81,71 ± 7,31*
1	43,93 ± 3,67*	59,98 ± 3,57*	71,80 ± 3,89*
2	36,09 ± 1,53*	45,14 ± 0,30*	51,42 ± 1,20*
4	27,85 ± 1,77*	34,46 ± 0,10*	48,24 ± 4,29*
8	22,86 ± 2,50*	24,31 ± 0,18*	44,70 ± 2,24*
16	21,46 ± 2,02*8	16,41 ± 1,00*	32,13 ± 0,67*

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

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