



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

FATIMA DAIANA DIAS BARROSO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA DOBUTAMINA
CONTRA CEPAS DE *CANDIDA* SPP. RESISTENTES AO FLUCONAZOL E
DETERMINAÇÃO DE SUA POSSÍVEL ATIVIDADE ESPÉCIE-ESPECÍFICA
CONTRA CEPAS DE *CANDIDA GLABRATA***

FORTALEZA

2021

FATIMA DAIANA DIAS BARROSO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA DOBUTAMINA CONTRA
CEPAS DE *CANDIDA* SPP. RESISTENTES AO FLUCONAZOL E DETERMINAÇÃO DE
SUA POSSÍVEL ATIVIDADE ESPÉCIE-ESPECÍFICA CONTRA CEPAS DE *CANDIDA*
GLABRATA.

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior

Co-orientador: Prof. Dra. Cecília Rocha da Silva

FORTALEZA

2021

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)

B285a Barroso, Fatima Daiana Dias.

Avaliação in vitro da atividade antifúngica da Dobutamina contra cepas de Candida spp. resistentes ao fluconazol e determinação de sua possível atividade espécie-específica contra cepas de Candida glabrata : / Fatima Daiana Dias Barroso. – 2021.

77 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

Coorientação: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.

1. Biofilmes . 2. Candida glabrata . 3. Imunossuppressores . 4. Dobutamina. I. Título.

CDD 616.9

FATIMA DAIANA DIAS BARROSO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA DOBUTAMINA CONTRA
CEPAS DE *CANDIDA* SPP. RESISTENTES AO FLUCONAZOL E DETERMINAÇÃO DE
SUA POSSÍVEL ATIVIDADE ESPÉCIE-ESPECÍFICA CONTRA CEPAS DE *CANDIDA*
GLABRATA.

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof. Dr. Emmanuel Silva Marinho
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, Evanildo e Daniela.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as oportunidades até aqui me oferecidas.

Agradeço a toda minha família pelo apoio incondicional aos meus sonhos e objetivos, meus pais, Evanildo e Daniela por todo apoio durante minha vida acadêmica. Meus tios, Núbia e Bosco pela parceria e assistência prestada a todo momento.

Aos meus irmãos, Juliana, Amadeu Neto e Deisyana, especialmente a última, peça fundamental nesse processo. Ao meu namorado e apoiador, Saulo Maia, pela paciência e assistência até aqui.

A todos os meus amigos do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas, em especial a Lívia Gurgel, Lisandra Juvêncio e Helaine Almeida, pela atenção e disponibilidade em prestar toda a ajuda possível.

Ao meu amigo João Batista pelos ensinamentos e conhecimentos repassados.

Ao meu orientar, professor Hélio Vitoriano, pela confiança e por acreditar no meu potencial.

Aos professores Iri Sandro e Bruno por participarem da banca de qualificação e pelas contribuições.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM/UFC), pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos nessa área tão especial, a microbiologia.

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

“Até aqui nos ajudou o Senhor. ”

Samuel 7:12

RESUMO

As infecções por espécies de *Candida non-albicans* vem tomando um espaço cada vez maior no cenário mundial. Os avanços na área médica, como também uma maior eficiência dos imunossupressores tem provocado o aumento da sobrevivência das populações de risco, bem como o aparecimento de cepas resistentes ao tratamento convencional. *C. glabrata* é um patógeno oportunista pertencente a microbiota normal dos seres humanos é a segunda causa mais comum de candidemia, apresentando intrinsecamente uma maior resistência ao fluconazol. Dessa forma faz-se necessária a busca por novas estratégias terapêuticas. O reposicionamento de fármacos e o sinergismo entre componentes utilizados na terapia são estratégias eficientes, as quais diminuem a toxicidade dos fármacos e representam também uma economia de recursos. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito antifúngico da dobutamina frente a cepas clínicas de *Candida spp.* especialmente frente a *C. glabrata* bem como seu sinergismo com azóis e sua ação na formação de biofilmes. Foi utilizado o protocolo M27-A3 para determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e a citometria de fluxo para elucidação do possível mecanismo de ação. Os isolados testados apresentaram CIMs variando de 2 - 32 µg/mL para dobutamina, com efeito fungistático. 82% das cepas testadas mostraram sinergismo com fluconazol e 90% com itraconazol. Não foi observada ação significativa sobre a formação de biofilmes. Os ensaios de citometria mostraram que a dobutamina induz a formação de espécies reativas de oxigênio intracelular, as quais causam danos no DNA levando a morte celular.

Palavras-chave: Resistência; *Candida glabrata*; Reposicionamento; Sinergismo; EROs

ABSTRACT

Infections with *non-albican Candida* species have been taking up more and more space on the world stage, due both to advances in the medical field and the increase in populations considered more susceptible. *C. glabrata* is an opportunistic pathogen belonging to the normal human microbiota and is the main or the second most common cause of candidemia, intrinsically presenting greater resistance to fluconazole. Thus, it is necessary to search for new therapeutic strategies. The redirection of drugs and synergism between the components used in therapy are efficient strategies, which decrease the toxicity of drugs and also represent a saving of resources. The objective of the study was to evaluate the antifungal effect of dobutamine on clinical strains of *Candida* spp., especially against *C. glabrata* as well as its synergism with azoils and its action on biofilm formation. The M27-A3 protocol was used for the determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) and flow cytometry for elucidation of the possible mechanism of action. The tested isolates presented MICs, ranging from 2 - 32 $\mu\text{g/mL}$ for dobutamine, with fungistatic effect. 82% of the strains showed synergism with fluconazole and 90% with itraconazole. The effect on biofilm formation was indifferent. Cytometry tests showed that dobutamine induces mitochondrial depolarization with a consequent increase in the formation of reactive intracellular oxygen species and loss of cellular homeostasis, which cause DNA damage leading to death.

Keywords: Resistance. *Candida glabrata*. Repurposing. Sinergism. EROs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição geográfica das espécies de <i>Candida</i> spp.....	20
Figura 2	– Esquema de invasão de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> as células do hospedeiro.....	26
Figura 3	– Fases de formação de biofilmes de leveduras do gênero <i>Candida</i> spp.....	29
Figura 4	– Representação esquemática dos biofilmes de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i>	30
Figura 5	– Estrutura 2D da dobutamina. Fórmula molecular: C ₁₈ H ₂₃ NO ₃ ; Massa molecular: 301.4 g/mol.....	37
Figura 6	– Avaliação do tempo de morte da dobutamina isolada e associada ao fluconazol frente a <i>C. glabrata</i> resistente ao fluconazol.....	54
Figura 7	– A e B Efeito da dobutamina isolada frente a biofilmes formados de <i>C. glabrata</i> 7 e 8. C e D Efeito do Fluconazol isolado sobre biofilmes formados de <i>C. glabrata</i> 7 e 8.....	56
Figura 8	– A e C: Efeito da Dobutamina combinada ao Itraconazol frente a biofilme de <i>C. glabrata</i> 7 e 8, respectivamente. B e D Efeito da Dobutamina combinada ao Fluconazol frente a biofilme de <i>C. glabrata</i> 7 e 8, respectivamente.....	57
Figura 9	– Efeito da Dobutamina sobre o início do processo de formação dos biofilmes de <i>C. glabrata</i> 7 (A) e <i>C. glabrata</i> 8 (B).....	58
Figura 10	– Diminuição da viabilidade celular após tratamento de 24 h com dobutamina nas concentrações de 8 µg/mL(CIM) , 16 µg/mL(2xCIM) e nas combinações com fluconazol em células de <i>C. glabrata</i>	60
Figura 11	– Aumento da despolarização mitocondrial após tratamento de 24 h com dobutamina nas concentrações de 8 µg/mL (CIM), 16 µg/mL(2xCIM) e nas combinações com fluconazol em células de <i>C. glabrata</i>	61
Figura 12	– Porcentagem de células TUNEL positivas após tratamento de 24 h com dobutamina nas concentrações de 8 µg/mL (CIM), 16 µg/mL(2xCIM) e nas combinações com fluconazol em células de <i>C. glabrata</i>	62

Figura 13 – Esquematização do mecanismo de ação da dobutamina sobre células de *C.*

glabrata..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de CIM para dobutamina e fluconazol isolados e combinados frente a cepas de <i>Candida</i> spp.....	51
Tabela 2 – Avaliação do efeito antifúngico da dobutamina isolada e associada ao fluconazol e itraconazol frente a cepas de <i>C glabrata</i>	53
Tabela 3 – Reversão do efeito antifúngico da dobutamina frente a cepas de <i>C. glabrata</i> após adição de substancia antioxidante.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM	Concentração Inibitória Mínima
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
YPD	Yeast Peptone Dextrose
DMSO	Dimetilsulfóxido
MTT	Brometo de 3-(4,5-difenil-2H-tetrazólio)
FLU	Fluconazol
ANFO	Anfotericina B
DOB	Dobutamina
ITRA	Itraconazol
AC	Ácido ascórbico
MMOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
ATCC	American Type Culture Collection
FICI	Índice da Concentração Inibitória da Fração
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
IP	Iodeto de propídio
DO	Densidade Ótica
HEPES	N - (2-Hidroxietil) piperazina-N' - (ácido 2-etanosulfônico)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Epidemiologia das Infecções causadas por <i>Candida</i>	17
2.1.1	Advento de infecções causadas por espécies de <i>Candida non-albican</i>	20
2.2	Gênero <i>Candida spp</i>	22
2.2.2	<i>Candida glabrata</i>	23
2.3	Fatores de Virulência associados à Infecção por <i>Candida</i>	24
2.3.1	Produção de Biofilmes.....	27
2.4	Alternativas terapêuticas.....	30
2.4.1	Polienos.....	31
2.4.2	Azois.....	31
2.4.3	Equinocandinas.....	32
2.5	Resistencia aos antifúngicos.....	33
2.6	Novas Estratégias Terapêuticas.....	35
2.7	Dobutamina.....	36
3	HIPÓTESES	38
4	OBJETIVOS	39
4.1	Objetivo geral.....	39
4.2	Objetivos específicos.....	40
5	METODOLOGIA	41
5.1	Recuperação de cepas.....	41
5.2	Fármacos utilizados.....	41
5.3	Indução da resistência de cepas de <i>C. glabrata</i>	42
5.4	Teste de sensibilidade analítica aos fármacos.....	42
5.4.1	Determinação da Concentração Inibitório Mínima.....	42
5.4.2	Avaliação de sinergismo.....	43
5.4.3	Determinação de Concentração fungicida mínima (CFM).....	44
5.4.4	Determinação do nível de tolerância.....	44
5.4.5	Efeito do ácido ascórbico na atividade da dobutamina.....	44
5.4.6	Ensaio de determinação de curva de morte.....	45

5.5	Ensaio de Biofilmes.....	45
5.5.1	Formação de Biofilme de leveduras em placa de 96 poços de poliestireno.....	45
5.5.2	Avaliação da atividade da dobutamina, fluconazol e itraconazol sobre biofilmes formados de <i>C. glabrata</i>	46
5.5.3	Avaliação da atividade da dobutamina, fluconazol e itraconazol sobre biofilmes em formação de <i>C. glabrata</i>	47
5.5.4	Análise de dados.....	48
5.6	Avaliação de mecanismo de morte celular.....	49
5.6.1	Preparo e tratamento das células.....	49
5.6.2	Determinação de viabilidade celular.....	49
5.6.3	Determinação de potencial transmembrana mitocondrial.....	49
5.6.4	Ensaio de TUNEL.....	50
5.6.5	Análise de dados.....	50
6	RESULTADOS	51
6.1	Ensaio de determinação de CIM (Concentração Inibitória Mínima) e Sinergismo frente a cepas de <i>Candida</i> spp.....	51
6.2	Ensaio de determinação de CIM (Concentração Inibitória Mínima) e Sinergismo frente a cepas de <i>Candida glabrata</i>	52
6.3	Avaliação do tempo de morte de células de <i>C. glabrata</i>	54
6.4	Determinação da ação da dobutamina isolada e combinada sobre biofilmes de <i>C. glabrata</i>	55
6.5	Reversão do efeito antifúngico da dobutamina após adição do antioxidante.....	59
6.6	A dobutamina diminui a viabilidade celular de forma concentração-dependente....	60
6.7	Dobutamina aumenta os níveis de despolarização mitocondrial.....	61
6.8	Associação entre DOB e FLU aumenta significativamente os níveis de fragmentação de DNA.....	62
7	DISCUSSÃO	63
8	CONCLUSÃO	68
9	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Candida spp. é o principal agente envolvido nas infecções fúngicas invasivas em pacientes hospitalizados, sendo o quarto patógeno mais isolado em infecções de corrente sanguínea nos Estados Unidos da América (EUA) e Europa, com uma taxa de candidemia entre 0,20 a 0,38 a cada 1000 admissões (MESINI et al., 2020; TORTORANO et al., 2004). É importante ressaltar que nas últimas décadas vem se notando uma inversão epidemiológica, no início dos anos 90 *Candida albicans* representava cerca de dois terços das infecções, diminuindo para cerca de 50% até o final da década. Por outro lado, verificou-se o advento de outras espécies, como *C. krusei* e *C. glabrata* (MASCHMEYER, 2006; TORTORANO et al., 2013).

Espécies de *Candida non-albicans* causam cerca de 35 a 65% de todos os casos de candidemia, ocorrendo com maior frequência em pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) (KRCMERY; BARNES, 2002). Dentro desse grupo a espécie de *C. glabrata*, a qual coloniza as membranas mucosas humana (HEALEY; PERLIN, 2018) é a principal ou a segunda causa mais comum de candidemia, apresenta intrinsecamente uma maior resistência ao fluconazol, cerca de 20% dos isolados adquirem resistência durante o tratamento profilático com fluconazol (PFALLER et al., 2012). Em alguns casos, também apresenta resistência adaptativas as equinocandinas, derivada de mutações em regiões específicas dos genes FSK1 e FSK2 (PRISTOV; GHANNOUM, 2019). Dentre os principais fatores de virulência relacionados a *C. glabrata* estão a formação de biofilmes, produção de hemolisina e catalase (SILVA et al., 2012).

Um estudo realizado por KHAN et al., (2020) no Kuwait durante um período de 8 anos (2011-2018) identificou 1410 isolados de *C. glabrata*, os quais demonstraram ser mais frequentes em pacientes maiores de 60 anos e do sexo feminino. Nesse estudo a prevalência

geral de resistência ao fluconazol entre os 1410 isolados de *C. glabrata* foi de 7,2%, porém foi muito maior ,11,6%, entre os isolados obtidos entre 2015 e 2018, em comparação com a taxa de 2,5% entre os isolados coletados entre 2011 e 2014.

Diversos outros estudos mostram o aumento da incidência de *C glabrata* ao redor do mundo(GHAZI et al., 2019). Na Arábia Saudita, uma análise realizada entre 2013 e 2018 demonstrou que *C. glabrata* (23%), foi o segundo patógeno mais isolado em casos de candidemia, com um aumento de espécies *non-albicans* de 71% para 78% (ABANAMY et al., 2020). Na América do Norte, AZIE et al., (2012) também demonstrou um aumento dos isolados de *Candida non-albicans* (52,2%), com *C. glabrata* identificada com a segunda espécie mais frequente (25%). A taxa de mortalidade associada a infecções por *Candida glabrata* é em torno de 49% (MASCHMEYER, 2006).

Tendo em vista a problemática da resistência adquirida aos azóis, principalmente entre as espécies de *Candida non-albicans*, e o aumento das infecções causadas por *C. glabrata*, influenciando negativamente na morbidade dos indivíduos, procurar novas drogas antifúngicas que sejam eficientes, seguras e não-tóxicas com menor indução de resistência é uma prioridade (LIU et al., 2019). Nesse contexto, tem-se o reposicionamento de fármacos como uma alternativa viável, principalmente no que tange a fatores econômicos (CALDERONE et al., 2014). O efeito antimicrobiano das catecolaminas ainda é pouco estudado, MACREADIE; BARTONE; SPARROW, (2010) expôs a ação da dopamina frente a cepas de *Candida* spp. ATCC, mostrando que essa catecolamina provavelmente tem ação sobre a cadeia respiratória dessa leveduras. O objetivo desse estudo foi investigar a ação antifúngica da dobutamina, uma catecolamina sintética com efeito inotrópico positivo relativamente seletivo (JOHNSON, 1983) frente a cepas *Candida* spp., bem como seu efeito espécie-específico frente a cepas de *C. glabrata*, bem como seu mecanismo de ação e efeito sobre a formação de biofilmes desse microrganismo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia das Infecções causadas por *Candida*

Infecções oportunistas causadas por patógenos fúngicos têm se tornado cada vez mais comum ao redor do mundo (XIAO et al., 2018). As leveduras e fungos estão entre os dez patógenos mais frequentemente isolados e cerca de 7% dos episódios febris são decorrentes de infecções fúngicas (DE PAUW, 2006). De acordo com algumas estimativas, a candidíase em sua forma invasiva atinge mais de 250.000 pessoas por ano em todo o mundo e causa de mais de 50.000 mortes (KULLBERG; ARENDRUP, 2015).

Diversos fatores contribuem para o aumento na incidência das infecções fúngicas. O avanço alcançado pelos tratamentos médicos cada vez mais especializados, como transplantes de medula e outros órgãos, imunossupressão e quimioterapia tem proporcionado o aumento da sobrevivência dos pacientes, porém também tornam esses pacientes mais susceptíveis a infecções fúngicas graves (MASCHMEYER, 2006; TORTORANO et al., 2004).

Os fungos do gênero *Candida* são os mais frequentemente isolados em infecções fúngicas humanas (SILVA et al., 2012), sendo classificados como a quarta causa mais comum de infecções nosocomiais da corrente sanguínea nos EUA, e responsáveis por cerca de 8 a 15% dos casos de sepse adquiridas no ambiente hospitalar (PFALLER et al., 2012). Esse gênero é dividido entre *Candida albicans* e as espécies não-*albicans*, que incluem *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, sendo a distribuição epidemiológica de acordo com o local analisado (LOPES COLOMBO et al., 1999). Recentemente, foi relatado uma nova espécie dentro do gênero, *Candida auris*, a qual emergiu como um patógeno global multirresistente, sendo isolada primeiramente em 2009 do canal auditivo e posteriormente em 2011 em amostras de hemocultura (DE CÁSSIA ORLANDI

SARDI et al., 2018) .Desde sua descoberta em 2009 até junho de 2020, o gênero *C. auris* atraiu considerável atenção de ambos campos de pesquisa clínica e científica, em 2016, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) divulgaram um alerta as unidades de saúde sobre o surgimento de infecções causadas por *C. auris* com altas taxas de mortalidade (DU et al., 2020). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou um alerta a respeito do diagnóstico de *C. auris*, a qual foi identificada em um paciente adulto internado em um hospital da Bahia (ANVISA, 2020).

De acordo com os estudos epidemiológicas ao redor do mundo sugere-se que a espécie de *Candida albicans* permanece como a mais isolada (SANTOS et al., 2018) , a espécies de *C. tropicalis* é frequentemente isolado na região da Ásia-Pacífico e menos encontrado no resto do mundo, *C. glabrata* destaca-se na região da América do Norte sendo menos isolada na América Latina e *C. parapsilosis* é três vezes mais isolada na América do Norte do que na Europa (GHAZI et al., 2019; PAPON et al., 2013).

Um estudo realizado por LINDBERG et al., (2019) mostrou que entre os isolados de corrente sanguínea de um centro terciário na Suíça, 65% correspondiam a *C. albicans* ; 19% *C. glabrata* ; 10% *C. parapsilosis* ; 4% *C. dubliniensis* ; 3% *C. tropicalis* e 2% *C. krusei*. Na região da Ásia, SADEGHI et al., (2018) analisaram amostras de diversos sítios infectados por *Candida* e concluíram que que as espécies *non-albicans* mais prevalentes foram: *C. parapsilosis* (36.8%), *C. glabrata* (32.9%), *C. orthopsilosis* (11.4%), *C. tropicalis* (8.9%), *C. krusei* (5.0%) e *C. guilliermondii* (5.0%). Nessa mesma região, na Arábia Saudita, em amostras de pacientes com candidemia entre os anos de 2013 a 2018, *C. albicans* foi o patógeno mais identificado (27%). Seguido por *C. glabrata* 23%, *C. parapsilosis* 22% e *C. tropicalis* 18%. Os casos de candidemia aumentaram ao longo dos anos, com um aumento da incidência das espécies *non-albicans* de 71% para 78% (ABANAMY et al., 2020).

A candidemia é a forma mais grave de infecção por *Candida* e corresponde a presença desse patógeno na corrente sanguínea, cerca de 33% a 55% de todos os episódios de candidemia ocorrem no ambiente da unidade de terapia intensiva (UTI), com taxas de mortalidade variando de 28% a 48% (HA et al., 2012; TORTORANO et al., 2004). O desenvolvimento de infecções por *Candida* geram um custo adicional em torno de US\$35000 a US\$68000 para o sistema de saúde em decorrência principalmente do maior tempo hospitalização (RENTZ; HALPERN; BOWDEN, 1998). Por tanto, a candidemia permanecendo com um desafio contínuo nos hospitais, pois possuem altas taxas de mortalidade e morbidade além de uma sobrecarga nos custos de assistência à saúde (MOTTA et al., 2010).

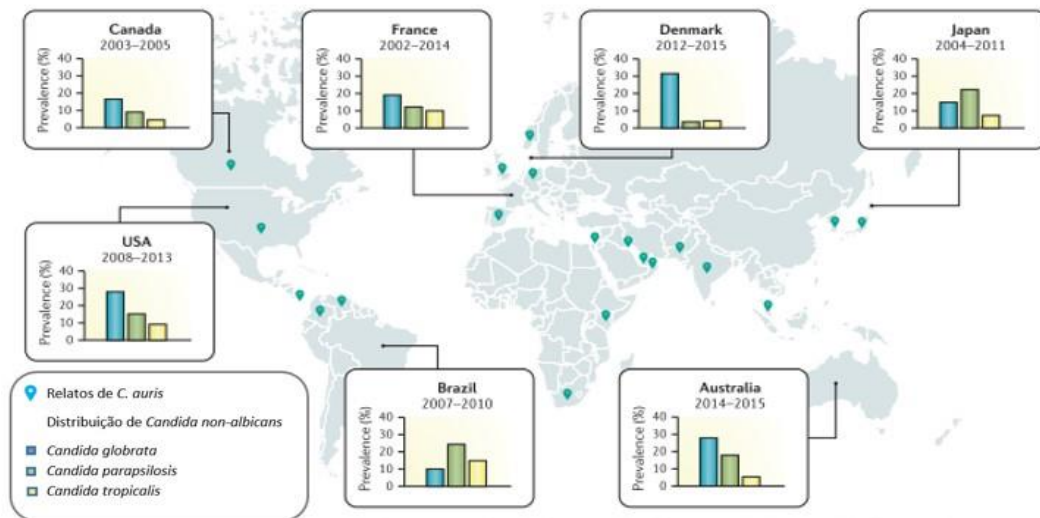
As maiores taxas de candidemia da América Latina são relatadas na Colômbia, com 1,96 casos a cada mil admissões (NUCCI et al., 2010). CORTÉS et al., (2014) mostrou que na Colômbia, a espécie de *Candida albicans* é a mais isolada com 66,4% seguida de *C. parapsilosis* 14%, com taxas de mortalidade de 35,9%.

No Brasil, as taxas de candidemia são de aproximadamente 1,87 casos e cada mil admissões, 0,27 casos a cada mil pacientes por dia, sendo mais frequentes no gênero masculino 58,1%, com média de idade de 40 anos (MOTTA et al., 2010). Quanto a distribuição epidemiológica, a espécie mais prevalente no Brasil é a *C. albicans*, correspondendo a cerca de 52,2% das infecções, seguida por *C. parapsilosis* 22,1%, *C. tropicalis* 14,8% e *C. glabrata* 6,6% (MOTTA et al., 2010).

Um estudo conduzido por VIEIRA DE MELO et al., (2019) em um hospital terciário no Nordeste do Brasil, mostrou que *C. albicans* permaneceu como a espécie com maior número de isolados, 34,3% ao longo dos anos, porém as espécies *non-albicans* ganharam maior notoriedade, sendo responsáveis por 65,7% das infecções com a seguinte distribuição: *C. tropicalis* 25,7%, *C. parapsilosis* 25,7%, *C. glabrata* 10%, e *C. krusei* 1,4%. BRAGA et al., (2018) relataram uma taxa de mortalidade de 58,9% entre os pacientes que desenvolveram

candidemia. A Figura 1 mostra a distribuição das espécies de *Candida* spp. globalmente, juntamente com relatos de casos de *Candida auris*.

Figura 1: Distribuição geográfica das espécies de *Candida* spp. A espécie *Candida albicans* é a mais isolada em todo mundo, porém as espécies *non-albicans* são mais prevalentes em algumas regiões.



Fonte: Adaptado de PAPPAS et al., 2018.

2.1.1 Advento de infecções causadas por espécies de *Candida non-albicans*

Os avanços da medicina nos últimos 10 anos como aliado as melhores técnicas de diagnósticos e tratamentos quimioterápicos, fizeram com que as espécies de *Candida non-albicans* emergissem como um importante grupo de patógenos capazes de causar infecções oportunistas. Dados epidemiológicos recentes demonstram que apesar de *C. albicans* ainda ser a mais isoladas, houve aumento na incidência de espécies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (BRAGA et al., 2018; LOPES COLOMBO et al., 1999; NUCCI et al., 2010).

Alguns autores também sugerem que esse fenômeno está relacionado com o aumento do uso do fluconazol e a pressão que este medicamento exerce sobre as cepas (LOPES COLOMBO et al., 1999).

Utilizando o coeficiente de Spearman AWAD et al., (2018) mostrou uma correlação positiva mais fraca da anfotericina B com o surgimento de infecções causadas por *Candida non-albicans* em comparação com os azóis e uma correlação negativa entre a anfotericina B e *Candida glabrata*. Isso pode ser explicado pelo fato de que a anfotericina B, diferentemente dos azóis, é igualmente ativa contra a maioria das espécies de *Candida* (KLEPSEK, 2011).

De acordo com um estudo conduzido por LIMA et al., (2017) em um hospital universitário brasileiro entre os anos de 2001 a 2003 e 2011 a 2013, às espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *C. glabrata* foram isoladas mais frequentemente, respondendo por 87,7% de todas as infecções. A frequência de *C. albicans* foi 39,6%, *C. tropicalis* 31,1% e *C. glabrata* 17,1%, demonstrando a importância das espécies *non-albicans* nas infecções nosocomiais.

Com relação aos pacientes que desenvolvem imunodeficiência congênita ou adquirida, há uma grande correlação com o desenvolvimento de infecções causadas por *Candida non-albicans* (LIU et al., 2014). Um estudo de TERÇAS et al., (2017) utilizando isolados de mucosa oral de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida provenientes de pacientes de um hospital de São Luís/MA mostrou que apesar de *Candida albicans* ser a mais prevalente, 56% dos isolados, 40% dos isolados correspondiam a outras espécies de *Candida* : *C. tropicalis* (12%), *C. krusei* (12%), *C. glabrata* (8%), *C. famata* (4%), *C. parapsilosis* (4%) e *C. guilliermondii* (4%), 23,5% das cepas foram consideradas resistentes ao fluconazol, com concentração inibitória mínima maior que 64µg/mL.

2.2 Gênero *Candida*

Candida spp. são classificadas taxonomicamente no reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae* (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). SIDRIM, 2004 descreve o gênero *Candida* como o principal entre os fungos patogênicos, compreendendo aproximadamente 200 espécies, porém apenas 15 são agentes patogênicos. As espécies de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* correspondem a 95% de todas as infecções. Outras espécies patogênicas são: *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa* e *Candida norvegensis* (YAPAR, 2014).

Adicionalmente, cerca de 65% das espécies de *Candida* são incapazes de crescer a 37°C, fazendo com que esses patógenos não consigam viver como comensais no corpo humano e conseqüentemente não sejam capazes de causar infecções (CALDERONE et al., 2014). Na espécie humana, o gênero *Candida* têm como *habitat* natural o trato gastrointestinal e também a mucosa vaginal, sendo dificilmente isolado em uma pele saudável (SIDRIM, 2004).

Em situações normais, as barreiras do organismo como barreira mucociliar e as superfícies intactas do epitélio e do trato gastrointestinal, por exemplo, previnem a invasão por microrganismos. Porém quando há uma quebra no equilíbrio patógeno-hospedeiro, acontece o estabelecimento da infecção (GULLO, 2009).

Com relação às formas de transmissão, TOZZO, ALINE; GRAZZIOTIN, (2012) enfatizam o mecanismo endógeno de transferência do gênero *Candida*, o qual é um constituinte normal da microbiota, de modo que, quando há alguma quebra na barreira imunológica do hospedeiro pode-se instalar uma infecção oportunista. Diversos dispositivos médicos passíveis de serem infectados, como cateteres, sondas e soluções intravenosas podem dar origem a infecções exógenas (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

2.2.1 *Candida glabrata*

Essa espécie foi primeiramente denominada como *Cryptococcus glabratus* em 1917 e posteriormente reclassificado como *Torulopsis glabrata* em 1938, devido ao fato de que esses microrganismos não formam hifas verdadeiras ou pseudo-hifas como as outras espécies de *Candida* spp. Apesar dessas particularidades, foi finalmente classificado no gênero *Candida* como *C. glabrata* em 1978 (TAPIA P., 2008). Os blastoconídeos de *Candida glabrata* medem aproximadamente entre 1-4 μm , sendo menores que os das outras espécies: *C. albicans* (4–6 μm), *C. tropicalis* (4–8 μm) e *C. parapsilosis* (2.5–4 μm) (KRCMERY; BARNES, 2002).

Quando inoculada em ágar Sabouraud dextrose forma colônias lisas e cintilantes, de coloração creme e tamanho menor que as outras espécies. No que tange a bioquímica, *C. glabrata* é capaz de assimilar apenas glicose e trealose (SIDRIM, 2004). No CHOMagar é possível visualizar colônias de coloração branca, rosas ou roxas, e quanto a genética sua principal característica é um genoma haploide, diferentemente das outras espécies de *Candida albicans* e *non-albicans*, o que facilita a aquisição de genes de resistência (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999; SILVA et al., 2012).

De acordo com HEALEY; PERLIN, (2018) apesar da aparente falta de fatores de virulência, como formação de hifas e secreção de enzimas hidrolíticas, *C. glabrata* pode replicar-se e disseminar rapidamente em condições de imunossupressão do hospedeiro. Infecções provocadas por *C. glabrata* estão mais frequentemente associadas ao uso prévio de fármacos da classe dos azólicos, realização de transplante de órgãos e células hematopoiéticas (CASTRO et al., 2016).

Uma importante característica dessa espécie é sua sensibilidade diminuída aos antifúngicos azólicos, cerca de 3-7% de amostras de *C. glabrata* apresentam resistência ao fluconazol (CIM \geq 64 $\mu\text{g/mL}$), além disso estudos mostram que em torno de 20% dos isolados

são dose-dependente, aumentando assim a possibilidade de falha terapêutica no tratamento dessas infecções com uso do fluconazol (CASTÓN-OSORIO; RIVERO; TORRE-CISNEROS, 2008).

FIGUEIREDO-CARVALHO et al., (2017) analisaram 91 isolados clínicos de *C. glabrata*, destes cerca de 9,9% mostraram resistência a anfotericina B, 15,4% ao fluconazol, 5,5% ao itraconazol e 15,4 % a micafungina. De acordo com esse mesmo estudo as cepas de *C. glabrata* foram boas produtoras catalase, protease aspártica, esterase, fitase e hemolisina, sendo ainda capazes de aderir a um conjunto diversificado de superfícies, formando biofilmes via produção de adesinas, constituindo importantes fatores de virulência da espécie.

2.3 Fatores de Virulência associados à Infecção por *Candida*

A patogenicidade de *Candida* spp. é mediada por diversos fatores de virulência, entre eles está a capacidade de adesão a superfícies bióticas e abióticas, fator fundamental para a colonização e início da infecção no hospedeiro (ICHIKAWA et al., 2019). Muitos fungos contêm uma família de glicoproteínas da parede celular, denominadas “adesinas”, que conferem propriedades de adesão específicas, sendo necessárias para as interações das células fúngicas entre si e com as células do hospedeiro (DE GROOT et al., 2013).

Nos últimos 30 anos tem-se pesquisado a estrutura das adesinas, porém apenas algumas foram elucidadas, sendo as mais importantes a família de proteínas de adesinas epiteliais (Epa) de *C. glabrata* e a família de proteínas de sequência semelhante a aglutinina de *C. albicans* (Als) (WILLAERT, 2018).

De acordo com FILLER, (2006) a família de genes ALS (sequência semelhante à aglutinina) de *C. albicans* codifica um grupo de proteínas de superfície celular ligadas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), existindo ao menos oito genes diferentes de ALS, Als1p e

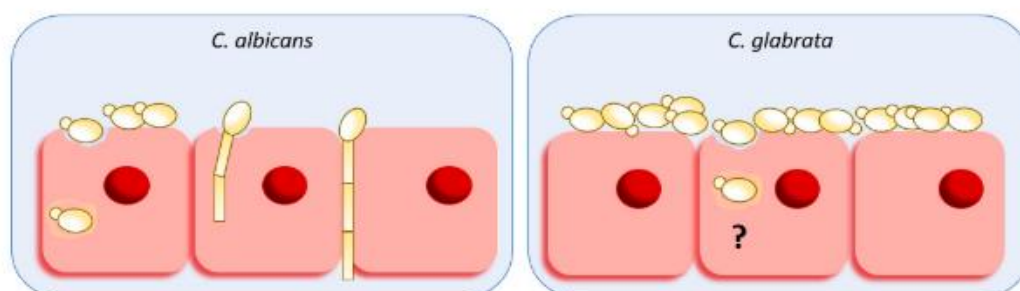
Als3p medeiam a aderência às células endoteliais vasculares e células epiteliais orais, sendo expressas principalmente por hifas, e genes que codificam outras adesinas, como HWP1 (proteína da parede de hifas 1).

A endocitose de células endoteliais de *C. albicans* é induzida quando o organismo se liga a N-caderina e outras proteínas da superfície de células endoteliais, induzindo o rearranjo do microfilamento, que resulta na formação de pseudópodes que engolfam o organismo e o atraem para a célula, esse processo também é dependente de cálcio extracelular (PHAN et al., 2007). Cepas mutantes de *C. albicans*, onde são deletados os genes que codificam Als3 perdem significativamente a capacidade de aderir, invadir e danificar as células do hospedeiro, adicionalmente, a proteína Als3 é altamente expressa por *C. albicans* nos rins de camundongos com doença disseminada e pacientes com candidemia têm anticorpos de alto título contra Als3 (FU et al., 2013; SPELLBERG et al., 2006).

A adesão da espécie de *Candida glabrata* às células epiteliais é especialmente dependente da interação das proteínas Epa (adesinas epiteliais) da parede celular, como Epa1p, Epa6p e Epa7p, que são as adesinas Epa mais bem caracterizadas (WILLAERT, 2018). As células de *C. glabrata* de tipo selvagem ligam-se a substratos hidrofóbicos por meio de ligações macromoleculares fortemente adesivas, enquanto as células mutantes com expressão de Epa6 prejudicadas são fracamente adesivas (DUFRÊNE, 2015).

C. albicans entra nas células hospedeiras por endocitose induzida ou por penetração ativa, através da formação de hifas, as quais estão associadas à liberação de enzimas hidrolíticas, resultando em danos às células e perda da integridade epitelial. Acredita-se que a endocitose induzida de células hospedeiras seja o mecanismo por trás da invasão de *C. glabrata*, porém o mecanismo exato permanece não elucidado (GALOCHA et al., 2019) (Figura 2).

Figura 2: Esquema de invasão de *C. albicans* e *C. glabrata* as células do hospedeiro.



Fonte: Galocha et al., 2019

Diferentemente do gênero *C. albicans*, *C. glabrata* apresenta sua patogenicidade independente da morfologia, sendo a invasão de barreiras naturais do organismo a rota mais comum de chegada dessa levedura a corrente sanguínea. SASANI E, KHODAVAISY S, AGHA KUCHAK AFSHARI S, DARABIAN S, AALA F, (2017) relatou que *C. glabrata* pode mudar sua morfologia e crescer como uma pseudo-hifa em meio com privação de nitrogênio, entretanto esse fenômeno ainda não foi relatado *in vivo*, não podendo ainda ser relacionado as formas de invasão.

A produção de enzimas hidrolíticas também compreendem uma importante fonte de fatores de virulência das espécies de *Candida* spp. As SAPs e fosfolipases, podem digerir componentes da superfície da célula epitelial, permitindo a entrada em ou entre as células hospedeiras (BORELLI et al., 2008; FREIRE et al., 2015). As SAP1-SAP3 são associados ao crescimento da levedura e têm atividade ótima em valores de pH mais baixos, já a SAP4-SAP6 são associados ao crescimento de hifas e têm atividade ótima em valores de pH mais altos. A necessidade de proteinases específicas durante os estágios diferentes das infecções pode explicar o fato de que existe um número significativo de SAPs no gene de *C. albicans* (NAGLIK et al., 2003; PATIL et al., 2018).

Apesar da espécie de *C. glabrata* não expressar SAPs, em seu genoma encontram-se 11 aspartil-proteases não secretadas ligadas a GPI (genes YPS), que são proteases aspárticas expostas à superfície necessárias para a virulência, conhecidas como yapsinas, as quais tem a função de manter a parede celular, remodelação e interações célula a célula (GALOCHA et al., 2019; RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014).

Em relação as fosfolipases, as quais são capazes de causar danos na membrana de fosfolipídeos, causando lise e aumentando a capacidade de invasão, a espécie de *C. albicans* é uma forte produtora (CANELA et al., 2018), já na espécie de *C. glabrata* a produção dessa enzima é quase inexistente, de forma que seu papel real na virulência dessa levedura ainda não está totalmente esclarecido, porém quando presente pode estar associada a candidemias persistentes (GALOCHA et al., 2019).

2.3.1 Produção de Biofilmes

De acordo com o Instituto Nacional de Saúde dos EUA, os biofilmes microbianos são responsáveis por 65% das infecções nosocomiais e mais de 80% das infecções crônicas (ČERNÁKOVÁ et al., 2019). Biofilmes são definidos como comunidades complexas de microrganismos que crescem em micro colônias revestidas por matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que podem ser associadas à superfície ou populações que se auto agregam (RODRIGUES et al., 2017).

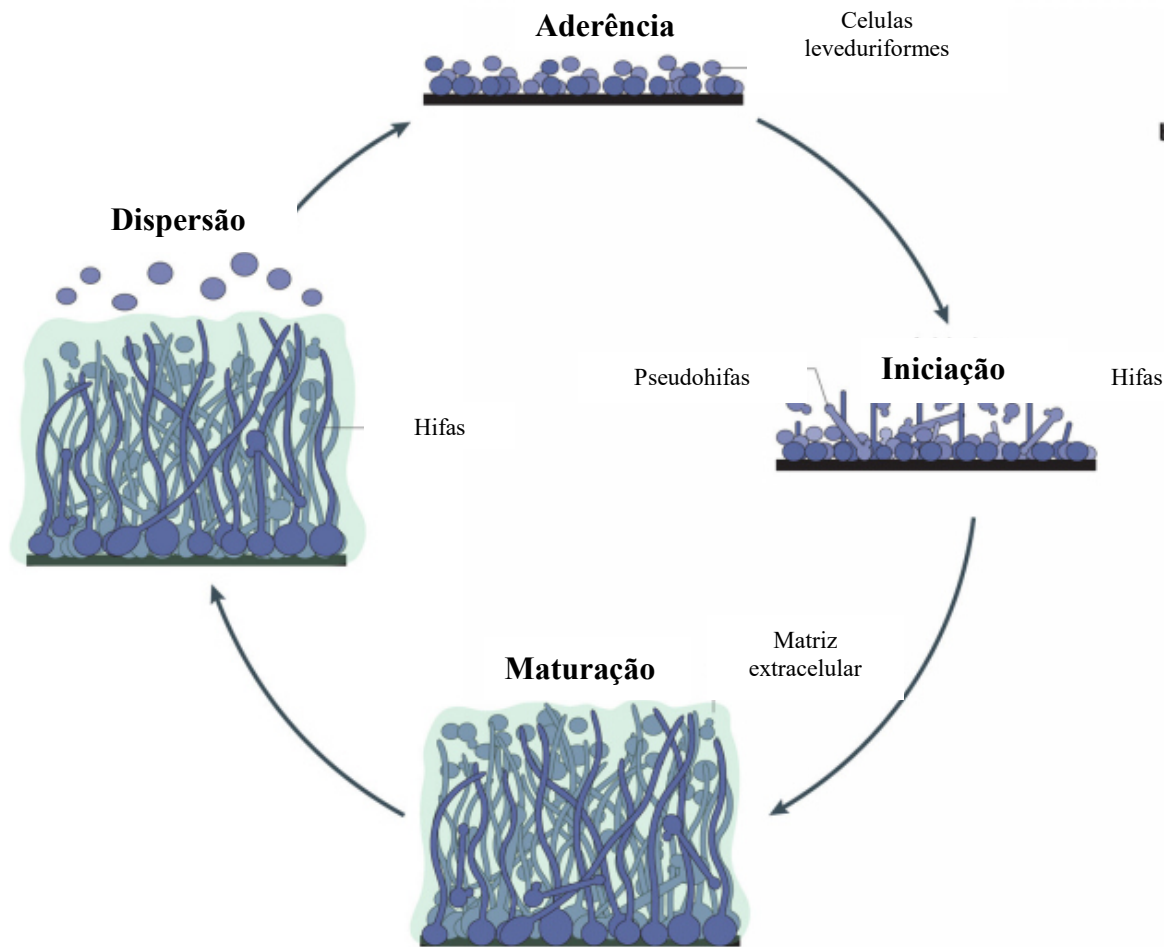
As células quando associadas em biofilmes, possuem altos índices de resistência as terapias antimicrobianas, leveduras do gênero *Candida*, por exemplo, estão associadas a formação de biofilmes nas superfícies de dispositivos vasculares, dificultando a terapia medicamentosa (ZARNOWSKI et al., 2018).

Todos os dispositivos médicos implantados, incluindo cateteres, marcapassos, dentaduras, lentes de contato e articulações protéticas fornecem substratos eficientes para o crescimento de biofilmes, assim como superfícies bióticas, como células da mucosa e epiteliais, com colonização e invasão de órgãos parenquimatosos, e consequente dispersão das células do biofilme para a corrente sanguínea, ocasionando infecções disseminadas (PATIL et al., 2018; WINTER et al., 2016).

Com base nessas observações, o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* foi dividido em quatro estágios: aderência, iniciação ou proliferação, maturação e dispersão (Figura 3). Apesar do mecanismo de aderência as superfícies hospedeiras das células de *Candida* não ser totalmente elucidado, as evidências atuais indicam que a natureza da superfície, as moléculas envolvidas no *quorum sensing*, os hormônios do hospedeiro e a presença de outros microrganismos podem influenciar esta etapa inicial da formação do biofilme (MATTHEW B. LOHSE, MEGHA GULATI, ALEXANDER D. JOHNSON, 2018).

Uma peça fundamental dos biofilmes de *C. albicans* é a presença de uma matriz extracelular, a qual é formada durante a fase de maturação do biofilme e engloba a complexa rede de células de levedura, pseudo-hifas e hifas, fornecendo proteção das defesas imunológicas do hospedeiro, dificultando o tratamento antifúngico e contribuindo para a estabilidade do biofilme (UPPULURI; LOPEZ RIBOT, 2017).

Figura 3: Fases de formação de biofilmes de leveduras do gênero *Candida*.

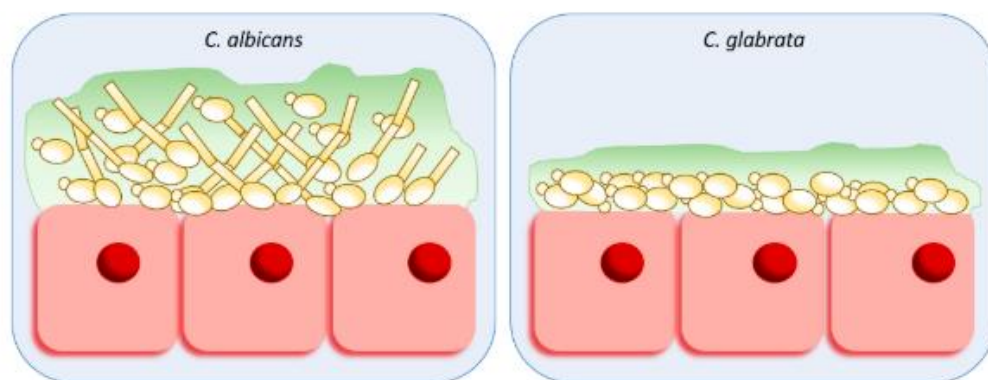


Fonte: Nobile et al., 2018.

Embora esse processo de formação dos biofilmes seja comum para todas as espécies do gênero *Candida*, existem algumas diferenças entre as espécies em relação a dimensão, morfologia, matriz de exopolissacarídeos produzida, resistência ambiental e capacidade de resistências aos antifúngicos. Uma diferença significativa entre os biofilmes maduros de *C. albicans* e *C. glabrata* é a dimensão e biomassa total (GALOCHA et al., 2019; RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014). A formação de biofilme *in vivo* de *C. glabrata* chega a uma espessura de $75-90 \pm 5 \mu\text{m}$, que é metade da espessura normal dos biofilmes de *C. albicans*, com menor proporção de biomassa em comparação com *C. albicans* (KUCHARÍKOVÁ et al.,

2015). Na figura 4 pode-se observar a diferença estrutural dos biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*, biofilmes maduros de *C. albicans* são compostos por um complexo emaranhado de pseudo-hifas, hifas e células leveduriformes, enquanto os biofilmes de *C. glabrata* são compostos por células de blastoconídeos.

Figura 4: Representação esquemática dos biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*.



Fonte: Galocha et al., 2019

2.4 Alternativas Terapêuticas

Durante muito tempo a Anfotericina B, desenvolvida em 1950, consistiu no único tratamento antifúngico eficaz para uso sistêmico, embora seja efetiva possui alto grau de toxicidade, limitando seu uso (BELLMANN; SMUSZKIEWICZ, 2017). Nas últimas décadas, houve a introdução dos azóis na terapia antifúngica, os quais são relativamente atóxicos. Por último, podemos citar as equinocandinas, as quais estão disponíveis apenas para administração parenteral (KATZUNG, 2013). Os fungos são organismos eucariotos, assim como seus hospedeiros, os humanos, portanto esse fato limita o número de alvos moleculares que podem ser explorados seletivamente para o desenvolvimento de novos antifúngicos que sejam pouco tóxicos para os humanos (ROBBINS; WRIGHT; COWEN, 2017).

2.4.1 Polienos

Os antifúngicos da classe dos polienos são usados desde 1950, possuem ação fungicida e consistem na última linha de defesa contra infecções fúngicas invasivas, pois são altamente tóxicos (ROBBINS; WRIGHT; COWEN, 2017). Diversos polienos foram isolados do *Streptomyces* spp, no entanto, apenas anfotericina B, formulações lipídicas de anfotericina B (complexo lipídico de anfotericina B, anfotericina B lipossomal e dispersão coloidal de anfotericina B) e nistatina tópica permanecem em uso clínico generalizado (CHANDRASEKAR, 2011).

Classicamente os polienos se ligam ao ergosterol presente na membrana plasmática dos fungos, formando poros e aumentando a permeabilidade celular, resultando em morte. Entretanto, estudos recentes demonstraram que os polienos agem como uma "esponja de ergosterol", formando grandes agregados extramembranosos que extraem o ergosterol lipídico de membrana essencial da membrana plasmática (ANDERSON et al., 2014). A anfotericina B convencional está associada a uma alta incidência de nefrotoxicidade, a qual limita seu uso e frequentemente requer intervenção médica (KLEPSEK, 2011). As formulações lipídicas de Anfoterecina B surgiram em 1990 e em comparação com a mesma, são mais bem toleradas, com menor grau de nefrotocixidade, permitindo a administração de doses mais elevadas (ANDES et al., 2006).

2.4.2 Azóis

Os Azóis são fármacos que interagem com as enzimas do sistema citocromo desmetilase fúngico, especificamente a lanosterol 14- α -demetilase (Erg11), resultando em distúrbios na síntese de ergosterol, retenção anormal de esteróis, formação incompleta da parede celular, retenção de fosfolipídios intracelulares e, por fim, morte celular fúngica (NAMI et al., 2019).

Entretanto, os azóis não são 100% seletivos para a ligação no sítio de inibição da podendo também ligar-se as enzimas do citocromo (CYP) 450 de mamífero, que são responsáveis pelo

metabolismo de várias enzimas , dessa forma, as interações com outros medicamentos são um fator a ser levado em consideração durante o tratamento com essa classe (WIEDERHOLD, 2018). A classe dos azóis compreende o fluconazol e o itraconazol, os quais estão disponíveis em formulações orais e parenterais, o voriconazol, posaconazol isavoconazol, os quais possuem o espectro de ação mais amplo (PERFECT, 2017).

2.4.3 Equinocandinas

Existem três equinocandinas atualmente disponíveis no mercado : caspofungina, micafungina e anidalfungina, sendo o principal mecanismo de ação a inibição do β -(1,3)-D-glucano sintetase, componente essencial da parede celular de muitos fungos, que está ausente em células humanas (MORRIS; VILLMANN, 2006).

As equinocandinas geralmente são bem toleradas, possuindo poucas interações medicamentosas significantes, podem também ser usadas com segurança em pacientes com disfunção renal e hepática (CAPPELLETY; EISELSTEIN-MCKITRICK, 2007) . A Infectious Diseases Society of America (IDSA) recomenda as equinocandinas como agentes de primeira linha para o tratamento de infecções por *Candida glabrata* em pacientes neutropênicos (HOWARD et al., 2011).

2.5 Resistência aos antifúngicos

A resistência aos antifúngicos é um fenômeno que tem tornado cada vez mais visibilidade, podendo ser definida clinicamente como a persistência de sinais e sintomas de uma infecção apesar de níveis toleráveis do medicamento no organismo (SILVA et al., 2012). Dependendo da droga e da espécie de *Candida*, o mecanismo de resistência pode ser inerente a espécie, quando não há

exposição prévia a antifúngicos (resistência intrínseca), ou adquirida, onde a resistência aparece após o microrganismo ser exposto a uma determinada droga (PFALLER et al., 2012).

Vários fatores podem influenciar no aparecimento da resistência ao fluconazol, incluindo a duração da exposição, frequência de dosagem e nível de exposição, ou seja, quanto mais longa a exposição (7 dias a 2 meses), maior a probabilidade de desenvolvimento de resistência (AUTMIZGUINE et al., 2018)

O azóis, os quais são fungistáticos e agem inibindo a enzima alvo intracelular ERG11p envolvida na biossíntese de ergosterol. Mais de 140 alterações foram descritas no gene alvo ERG11, algumas das quais foram encontradas exclusivamente em isolados resistentes aos azóis (ARENDRUP; PATTERSON, 2017). Outro fator que está envolvido na resistência aos azóis é a presença de bombas de efluxo. Na espécie de *C. albicans*, três bombas de efluxo são conhecidas por mediar a resistência ao fluconazol, os transportadores ABC altamente homólogos Cdr1 e Cdr2 e o principal facilitador Mdr1. Destes, apenas Cdr1 é produzido em quantidades significativas sob condições de crescimento padrão, e a expressão de CDR1 é ainda mais elevada na presença de fluconazol (MORSCHHÄUSER, 2016; POPP C, RAMÍREZ-ZAVALA B, SCHWANFELDER S, KRÜGER I, 2019).

A espécie de *Candida glabrata* tem uma sensibilidade intrinsecamente reduzida ao fluconazol podendo desenvolver resistência cruzada a outros azóis. Além disso, a frequência de resistência às equinocandinas também vem aumentando (LINDBERG et al., 2019). Nos EUA as taxas de isolados multirresistentes de *C. glabrata* é de 1 a 2%, em centros com alto uso de antifúngicos como no *Duke University Hospital* (Durham, NC) e *MD Anderson Cancer Center* (MDACC, Houston, TX) as taxas são de 3,5 % e 7%, respectivamente. Em regiões como Europa, Ásia e Austrália as taxas de *C. glabrata* resistentes as equinocandinas são menores, em torno de 2 % (FARMAKIOTIS; KONTOYIANNIS, 2017).

As equinocandinas são os agentes de escolha no tratamento da candidíase invasiva, porém o uso generalizado dessa classe de medicamentos tem sido acompanhado por relatos de resistência a medicamentos entre isolados clínicos, particularmente aqueles da espécie haplóide *Candida glabrata* (RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014) . ALEXANDER et al., (2013) mostrou que a resistência de *C. glabrata* as equinocandinas aumentou de 4,9% para 12,3% entre os anos de 2001 a 2010, principalmente devido a exposição prévia as equinocandinas e a presença de mutações no gene FKS levando a falha terapêutica.

A resistência é mediada por mutações pontuais em “hot spots” do gene FKS1 (todas as espécies de *Candida*) ou FKS2 (*C. glabrata*) que resultam em atividade atenuada da equinocandinas (SHIELDS et al., 2019). A maioria das mutações em FKS confere resistência a todas as classe da equinocandinas, sendo a resistência as equinocandinas não-mediada por FKS um fato incomum, porém existem relatos (SHIELDS et al., 2019).

Um estudo de LINDBERG et al., (2019) demonstrou que 97% (26.19) de todos os os isolados de *C. glabrata* mostraram sensibilidade reduzida ao fluconazol, com CIM90 em torno de 16 µg/ml. Todos os isolados de *C. glabrata* utilizados no estudo de CANELA et al., (2018) e um de *C. parapsilosis* , derivados de um hospital terciário localizado no Rio de Janeiro, exibiram susceptibilidade dependente da dose ao fluconazol, um isolado de *C. albicans* e um isolado de *C. tropicalis* exibiram suscetibilidade dose-dependente ao voriconazol e três cepas de *C. glabrata* exibiram susceptibilidade dependente da dose à caspofungina.

2.6 Novas estratégias terapêuticas

O aparecimento da resistência fúngica aos fármacos existentes é um fenômeno cada vez mais comum, sendo o controle das infecções por *Candida* um desafio na clínica moderna (ČERNÁKOVÁ et al., 2019). Dessa forma, o desenvolvimento de novas moléculas ou o aproveitamento de moléculas já existentes no mercado, as quais sejam mais eficazes e menos tóxicas faz-se fundamental para contornar esse processo (SANTOS et al., 2018). Muitos caminhos estão sendo investigados, incluindo o desenvolvimento de novos compostos antifúngicos, o uso de probióticos, prebióticos ou simbióticos, a exploração das propriedades antifúngicas de derivados de plantas, uso de terapia fotodinâmica, entre outros (ČERNÁKOVÁ et al., 2019; MUAKKASSA; GHANNOUM, 2016).

De acordo com LIU et al., (2014), outras estratégias possíveis para o enfrentamento da resistência, as quais são : sinergismo de drogas, o uso de antifúngicos clássicos com fármacos não antifúngicos e uso de produtos naturais. O uso de compostos com aplicações estabelecidas, mas com atividade antifúngica inexplorada, é referido como "reaproveitamento" de medicamentos, uma das vantagens desse processo é a diminuição da toxicidade, pois os compostos já possuem atividade conhecida (CALDERONE et al., 2014).

Este é um conceito muito atraente para as indústrias farmacêuticas, pois estima-se que o reposicionamento para o desenvolvimento de medicamentos requer muito menos tempo (3-5 anos), pois pode começar da fase II e dinheiro (\$ 0,3 bilhões) e maior probabilidade de sucesso, um exemplo é o sildenafil (AGGARWAL et al., 2020; PUSHPAKOM et al., 2018).

No que se refere a reposicionamento com finalidade antifúngica, estudos de DA SILVA et al., (2013a) concluíram que a amiodarona, droga utilizada para tratamento de arritmias, quando administrada em combinação com fluconazol, exibe atividade sinérgica contra as cepas de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol, devido a alterações na integridade da membrana

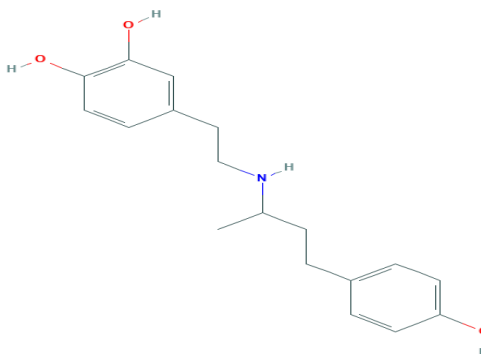
celular. ALNAJJAR; BULATOVA; DARWISH, (2018) demonstrou que o nifedipeno, um bloqueador de canal de cálcio, também exibe efeito isolado e combinado com o fluconazol contra cepas de *C. glabrata*.

De acordo com estudos de DO AMARAL VALENTE SÁ et al., (2020) o etomidato, um anestésico hipnótico, mostrou atividade antifúngica contra o crescimento de biofilmes de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol, assim como o etomidato diminuiu a expressão de manoproteínas na superfície de *C. albicans*, dificultando o processo de adesão a superfícies. Outro fármaco anestésico que demonstrou atividade antifúngica foi a cetamina. De acordo com DE ANDRADE NETO et al., (2020), a cetamina possui efeito sinérgico com dois fármacos antifúngicos que são intensamente utilizados, o fluconazol e o itraconazol, contra células planctônicas e biofilmes de *Candida* spp. Dessa forma, o reposicionamento de fármacos pode fornecer opções terapêuticas para uma grande diversidade de infecções.

2.7 Dobutamina

A dobutamina é uma catecolamina sintética com atividade simpatomimética e efeito inotrópico positivo relativamente seletivo (Figura 5). O seu mecanismo de ação clássico é o aumento da contratilidade miocárdica mediada por estimulação β -adrenérgica com menor estimulação dos receptores β_2 e α_1 . A dobutamina também causa vasodilatação, estimulando os receptores β_2 adrenérgicos nos vasos sanguíneos, aumentada pela vasoconstrição reflexa, resultando em aumento do débito cardíaco (RUFFOLO, 1987).

Figura 5: Estrutura 2D da dobutamina. Fórmula molecular: C₁₈H₂₃NO₃; Massa molecular: 301.4 g/mol.



Fonte: PubChem ID 36811

É administrada como uma infusão intravenosa contínua, começando em doses de 2 a 3 pg / kg / min até que os efeitos hemodinâmicos desejados sejam obtidos (JOHNSON, 1983). Quanto a farmacocinética, o início da ação ocorre de 1 a 2 minutos após a infusão, atingindo o estado de equilíbrio plasmático dez minutos após a infusão. A meia-vida plasmática é de cerca de dois minutos, a metabolização ocorre no fígado, gerando produtos inativos os quais são eliminados principalmente na urina e uma pequena parte nas fezes (LEWIS et al., 2019; RUFFOLO, 1987).

Estudos de MACREADIE; BARTONE; SPARROW, (2010) mostraram que a dopamina, outra catecolamina, inibe o crescimento de cepas de *C. glabrata* e *S. cerevisiae*, através da geração de espécies reativas de oxigênio. Sendo assim diante e da atividade antifúngica da dopamina e da ausência de trabalhando explorando a atividade de catecolaminas frente a leveduras, o presente trabalho procurou investigar a ação da dobutamina sobre leveduras do gênero *Candida*, buscando propor um possível reposicionamento do fármaco.

3 HIPÓTESES

- 3.1** A dobutamina apresenta atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.
- 3.2** A dobutamina associada ao fluconazol apresenta efeito antifúngico sinérgico frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.
- 3.3** A dobutamina associada ao fluconazol e ao itraconazol apresenta efeito antifúngico sinérgico frente a cepas de *Candida glabrata*.
- 3.4** A dobutamina isolada apresenta efeito antifúngico frente a biofilmes de *Candida glabrata*..
- 3.5** A adição de ácido ascórbico reverte o efeito antifúngico da dobutamina frente a cepas de *Candida glabrata*.
- 3.6** A exposição de 24 h a dobutamina diminui a viabilidade celular de *Candida glabrata*.
- 3.7** O efeito antifúngico da dobutamina é mediado pela geração de espécies reativas de oxigênio.
- 3.8** A dobutamina não apresenta efeito antifúngico frente a leveduras do gênero *Candida* spp.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* da dobutamina frente a cepas de *Candida* spp. e *Candida glabrata* resistentes ao fluconazol na forma planctônica e em biofilmes.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da dobutamina frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol;

4.2.2 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da dobutamina associada ao fluconazol frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol;

4.2.3 Avaliar a cinética de inibição da dobutamina frente a cepas de *Candida glabrata* através da curva de morte.

4.2.4 Investigar a atividade da dobutamina sobre biofilmes maduros e em formação frente a cepas de *Candida glabrata*, bem como seu sinergismo com fluconazol e itraconazol em biofilmes;

4.2.5 Avaliar a atividade da dobutamina juntamente com ácido ascórbico frente a cepas de *Candida glabrata*;

4.2.6 Avaliar a viabilidade celular de *Candida glabrata* após a exposição de 24 h a diferentes concentrações e combinações de dobutamina com fluconazol e ácido ascórbico;

4.2.7 Avaliar o perfil de despolarização mitocondrial de *Candida glabrata* após a exposição de 24 h a diferentes concentrações e combinações de dobutamina com fluconazol e ácido ascórbico;

4.2.8 Avaliar o dano de DNA, através de teste do TUNEL, das células de *Candida glabrata* após a exposição de 24 h a diferentes concentrações e combinações de dobutamina com fluconazol e ácido ascórbico;

5. METODOLOGIA

5.1 Recuperação das cepas

Foram utilizadas inicialmente 14 cepas clínicas de *Candida* spp (5 cepas de *C. albicans*, 5 cepas de *C. parapsilosis*, 3 cepas de *C. tropicalis* e 1 cepas de *C. glabrata*) e posteriormente nove cepas clínicas de *Candida glabrata* derivadas de diferentes sítios, identificadas por VITEK (Biomérieux, Brasil) e por técnica de microcultivo em ágar arroz, pertencentes a coleção do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Uma cepa de *Candida krusei* ATCC 6258 e uma cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas como controles dos testes. As cepas estavam armazenadas em caldo Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (dinâmica, São Paulo, Brasil) em freezer a -20°C. Para recuperação das cepas foi utilizado meio caldo Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia), no qual 100µL das leveduras foram ressuspensas e incubadas a 35°C por 24 horas. Seguiu-se o replique em meio ágar Sabouraud, sendo as cepas novamente incubadas a 35°C durante 24 horas.

5.2 Fármacos Utilizados

Os fármacos utilizados foram Fluconazol (FLC), itraconazol (ITRA), Anfotericina B (ANFO) cloridrato de dobutamina (DOB) e Ácido ascórbico (AC), os quais foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (USA). Os fármacos Fluconazol, Itraconazol e Anfotericina foram suspensos em água destilada estéril ou DMSO e as soluções mãe nas concentrações de 2564µg/mL, 1000 µg/mL e 1000 µg/mL, respectivamente, foram armazenadas a - 20 °C.

5.3 Indução de Resistência das cepas de *Candida glabrata*

O protocolo de indução de resistência foi realizado de acordo com (DA SILVA et al., 2013b) de forma que as cepas de *C. glabrata* foram colocadas em contato com concentrações crescentes de fluconazol iniciando a partir do valor da concentração inibitória mínima (CIM) em 1mL de meio RPMI. Posteriormente essas cepas foram recuperadas, inoculando 20 µL da suspensão de inóculo de em ágar Sabouraud dextrose e colocada novamente em contato com fluconazol. O processo de indução levou 60 dias.

5.4 Testes de Sensibilidade Analítica aos fármacos

5.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

O teste de sensibilidade foi realizado de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008) utilizando meio RPMI (pH 7,0) tamponado com 0,165 de MMOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços de poliestireno fundo U, na qual na coluna 2 foi adicionado 200µl da droga diluída seguida da diluição seriada para alcance das concentrações desejadas. Na coluna 12 foram adicionados meio de cultura e inóculo, sendo utilizado como controle positivo do teste. Na coluna 1 foi disposto apenas o meio de cultura, sendo utilizada como controle negativo. O Fluconazol foi testado na faixa de 128 – 0,125 µg/mL, para itraconazol 8 – 0,015 µg/mL, para a dobutamina 128 – 0,125 µg/mL (para *Candida glabrata*) / 3125 – 128 µg/mL(para as demais espécies) e ácido ascórbico 4000 – 7,81 µg/mL. Após o crescimento de 24 h a 35°C das cepas utilizadas no estudo, foi preparado uma suspensão de inóculo inicial em salina estéril na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de acordo com a turvação da escala 0,5 de McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Posteriormente, foram realizadas duas diluições

consecutivas em meio RPMI 1640 para obtenção de concentração final do inóculo 0,5 a 2,5 x 10⁸ UFC/mL. Foram adicionados 100µL do inóculo final em todos os poços, com exceção da coluna 1. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 35°C, realizando-se posteriormente a leitura visual. O teste foi realizado em triplicata.

A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento visível das leveduras (CLSI, 2008). As cepas com CIM ≥ 64 µg/mL foram consideradas resistentes (CLSI, 2012).

5.4.2 Avaliação de sinergismo

O efeito das substâncias combinadas foi testado utilizando o cálculo do índice da concentração inibitória da fração (FICI), através da metodologia do *Checkboard*, o qual avalia a interação sinérgica ou antagônica dos fármacos por meio de comparações entre as concentrações inibitórias mínimas do fármaco sozinho e combinado (CASTRO et al., 2016). O teste foi realizado de acordo com (DA SILVA et al., 2013b). As drogas foram preparadas em concentrações duas vezes maior que a concentração inibitória mínima (CIM) para cada cepa. Foram adicionados 100µL do meio RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) com pH 7,0 tamponado com 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA) em cada poço, com exceção da coluna 2. Na coluna 2 foram adicionados 200µL das diferentes concentrações das drogas, variando com relação as concentrações inibitórias mínimas de cada cepa. Posteriormente, foi realizada a diluição seriada até a coluna 11 e 100µL do inóculo final foi acrescido. A coluna 12 foi utilizada como controle positivo contendo apenas meio de cultura e inóculo e a coluna 1 foi utilizada como controle negativo. Uma cepa de *Candida krusei* ATCC 6258 e uma cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas como controle.

Os resultados das combinações seguiram a equação: FICI (índice da concentração

inibitória da fração) = $FIC^A + FIC^B = C_A^{COMB} / CIM_A^{SOZINHO} + C_B^{COMB} / CIM_B^{SOZINHO}$, onde $CIM_A^{SOZINHO}$ e $CIM_B^{SOZINHO}$ são as concentrações inibitórias das drogas sozinhas e C_A^{COMB} e C_B^{COMB} são as concentrações das drogas combinadas (DENARDI *et al.*, 2015). A interpretação do resultado foi de acordo com ODDS, 2003 onde sinergismo ($FICI \leq 0.5$), antagonismo ($FICI > 4.0$) e ausência de interação ($FICI > 0.5-4.0$).

5.4.3 Determinação de Concentração fungicida mínima (CFM)

Para determinação do CFM uma alíquota de 10 μ L da suspensão utilizada no teste de sensibilidade foi inoculado em placas de ágar Saboraud. As pacas foram incubadas a 35° por 24h, sendo que a CFM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 99,9% das colônias visualmente na superfície do ágar (DE ANDRADE NETO *et al.*, 2020).

5.4.4 Determinação do nível de tolerância

O nível de tolerância foi determinado de acordo com o método estabelecido por DAS *et al.* (2016), o qual segue a fórmula: Tolerância = CFM/CIM.

5.4.5 Efeito do ácido ascórbico na atividade da dobutamina

O ensaio foi realizado de acordo com (LIU *et al.*, 2019) com algumas modificações, onde 100 μ L de uma concentração de 10^6 células de *C. glabrata* foi incubada com 50 μ L de dobutamina e 50 μ L de AC nos respectivos CIM de cada isolado, sendo posteriormente determinado o valor da CIM 50%, o qual corresponde a inibição visível de 50% do crescimento fúngico.

5.4.6 Ensaio de Determinação de Curva de morte

O ensaio de curva de tempo de morte foi realizado de acordo com (ALNAJJAR; BULATOVA; DARWISH, 2018), utilizando uma cepa de *C. glabrata* sob diferentes combinações dos fármacos (DOB, DOB 2xMIC, DOB + AC, DOB +FLU, ITRA+ DOB e Controle). Uma alíquota de 20 µL foi retirada dos eppendorfes nos tempos de 0, 4h, 8h, 12h e 24h, sendo inoculados em tapete com alça de drigalski em ágar Sabouraud destrose. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram interpretados de acordo com (GUO et al., 2008), onde uma diminuição de $\geq 2\log_{10}$ UFC/mL em relação ao controle foi considerado sinergismo, aumento de $\geq 2\log_{10}$ UFC/mL antagonismo, efeito aditivo caracterizado como diminuição de < 2 mas $>1 \log_{10}$ UFC/mL e indiferente, aumento de < 2 mas $>1 \log_{10}$ UFC/mL.

5.5 Ensaio de Biofilmes

5.5.1 Formação de Biofilme de leveduras em placa de 96 poços de poliestireno

Foram escolhidas duas cepas de *C. glabrata* 7 e 8 para os experimentos, pois as mesmas apresentaram as maiores concentrações inibitórias mínimas para fluconazol, 64 µg/mL e 128 µg/mL respectivamente. A formação dos biofilmes de *C. glabrata* em placas de poliestireno foi feita de acordo com a metodologia de PIERCE et al., 2008 com algumas modificações. Foram utilizadas duas cepas clínicas de *C. glabrata* de resistente ao fluconazol, com CIM de 64 µg/mL e 128 µg/mL. Para o início dos testes as cepas foram previamente semeadas em caldo Sabouraud e incubadas a 35 ° por 24hs, posteriormente as cepas foram semeadas em ágar Sabouraud e incubadas sob as mesmas condições. Colônias puras provenientes de culturas de

24 h foram inoculadas em caldo YPD (Sigma, USA) e incubadas a 35° por 24 h. As células foram então centrifugadas a 5.000g por 5 min e lavadas com PBS três vezes seguidas. Após as lavagens das células foi preparado um inóculo com grau de turbidez de 0,5 na escala MacFarland, a qual corresponde a $1,5 \times 10^8$ células por mL em meio RPMI. 200 µL do inóculo de células de *C. glabrata* foi então adicionado a uma placa de 96 poços de poliestireno, utilizou-se apenas o meio RPMI como controle negativo na coluna 12. As placas foram então incubadas por 24 h a 35°.

Posteriormente ao período de incubação, o conteúdo do sobrenadante foi aspirado e descartado. A placa foi então lavada de forma gentil três vezes com solução tampão de PBS (Tampão Salina). A quantificação da biomassa dos biofilmes formados foi feita utilizando-se cristal violeta 0,3%. Primeiramente foi adicionado 200 µL de metal com a finalidade de fixar as células ao fundo da placa, após o período de 10 min foi adicionado 200 µL de cristal violeta 0,3%, após 20 min foi adicionado etanol. Foi transferida então uma alíquota de 100 µL para uma nova placa para leitura da densidade óptica em espectrofotômetro a 590 nm. Os controles negativos foram aqueles em que apenas o meio RPMI foi adicionado.

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

5.5.2 Avaliação da atividade da dobutamina, fluconazol e itraconazol sobre biofilmes formados de *C. glabrata*

Para avaliação da atividade dos fármacos, a dobutamina, fluconazol e itraconazol foram testados nas concentrações de CIM/2, CIM, 2x CIM, 4x CIM e 10x CIM. Após a formação de biofilme na placa de 96 poços de poliestireno foi adicionado 200 µL das soluções de fármacos, a placa foi então incubada a 35° por 24 h. O controle negativo foi visualizado a partir dos poços contendo apenas meio RPMI e considerou-se como controle positivo os poços com crescimento de 100 % dos inóculos, ou seja, sem tratamento com fármacos. Passadas as 24 h, a placa foi lavada gentilmente com solução PBS, posteriormente adicionou-se o reagente 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 24 h, no escuro. Após o período de 24 h, o MTT foi retirado dos poços e adicionado 200 µL de DMSO. Após 15 minutos de contato com DMSO retirou-se uma alíquota de 100 L para uma nova placa, sendo a leitura realizada em leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. As comparações de crescimento levaram em consideração os poços que cresceram 100% das leveduras. Os ensaios foram realizados em triplicata em três dias distintos.

5.5.3 Avaliação da atividade da dobutamina, fluconazol e itraconazol sobre biofilmes em formação de *C. glabrata*

Para avaliação da atividade dos fármacos, a dobutamina, fluconazol e itraconazol foram testados nas concentrações de CIM/2, CIM, 2x CIM, 4x CIM e 10x CIM. Durante a fase de formação do biofilme, ou seja, no momento em que a suspensão de inóculo foi adicionada à placa, foram adicionadas simultaneamente as soluções de fármacos, porém na razão de 1:1 (100 µL de inóculo + 100 µL de fármacos).

O controle negativo foi visualizado a partir dos poços contendo apenas meio RPMI e considerou-se como controle positivo os poços com crescimento de 100 % dos inóculos, ou seja, sem tratamento com fármacos. Passadas as 24 h, a placa foi lavada gentilmente com solução PBS, posteriormente, adicionou-se o reagente 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 24 h, no escuro. Após o período de 24 h, o MTT foi retirado dos poços e adicionado 200 µL de DMSO (dimetilsulfóxido).

Após 15 minutos de contato com DMSO retirou-se uma alíquota de 100 µL para uma nova placa, sendo a leitura realizada em leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata em três dias distintos.

5.5.4 Análise de dados

As análises de dados foram feitas a partir da média de 3 experimentos independentes, utilizando análise de variância (ANOVA), seguidos pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), utilizando o software Prisma versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.6 Avaliação de mecanismo de morte celular

5.6.1 Preparo e tratamento das células

As suspensões de células da cepa *C. glabrata* 7 foram obtidas a partir de uma cultura na fase de crescimento exponencial, incubadas em caldo YPD a 35 ° C por 20 h. As células foram coletadas, centrifugadas (1600 por 10 min a 4 ° C) e lavadas duas vezes com uma solução salina a 0,85% (1200 g por 5 min a 4 ° C) e depois ressuspensas (~ 10⁶ células / mL) com um tampão HEPES (Sigma Chemical Co., EUA) suplementada com glicose a 2%, pH 7,2. Uma suspensão de células de 5 × 10⁶ UFC / mL foi incubada a 35 ° C por 20 h juntamente com as diferentes combinações (Controle, Anfotericina 2 µg/mL, Fluconazol 64 µg/mL, DOB 8 µg/mL ,DOB 16 µg/mL , DOB 1 µg/mL + FLU 8 µg/mL , DOB 8 µg/mL + AC 200 µg/mL e DOB16 µg/mL+ AC 200 µg/mL) das drogas (DA SILVA et al., 2013b; DE ANDRADE NETO et al., 2020). As amostras foram submetidas a análise em citometro de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System (Guava Technologies, Inc., Industrial Blvd. Hayward, CA, USA). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em experimentos independentes.

5.6.2 Determinação de viabilidade celular

A integridade da membrana das células foi avaliada utilizando 2mg/mL de iodido de propídio (IP). As amostras foram incubadas por 24h e posteriormente analisadas. Para cada experimento, 10000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram excluídos da análise (DA SILVA et al., 2013b).

5.6.3 Determinação do potencial transmembrana mitocondrial

As células foram tratadas com as diferentes combinações de fármacos durante 24 h, posteriormente incubadas com rodamina 123 (1 µg/ mL) (Sigma, USA) a 37 °C por 15 min no escuro, foi determinada então a fluorescência. Para cada experimento, 10000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram excluídos da análise (DA SILVA et al., 2013b).

5.6.4 Ensaio de tunel

Para a análise da fragmentação do DNA, foi utilizado a técnica de marcação final de dUTP mediada por desoxinucleotidil-transferase (TUNEL). As células tratadas foram fixadas em paraformaldeído a 7% à 35°. Sendo então impregnadas com 1% de Triton X-100 por 10 min em gelo, depois incubadas com a mistura de reação TUNEL por 1 hora a 37 ° C. As células foram então examinadas usando um microscópio de fluorescência (Olympus, Tóquio, Japão). Duzentas células foram contadas por amostra para determinar a porcentagem de células positivas (DE ANDRADE NETO et al., 2020).

5.6.5 Análise de dados

A análise de dados foi feitas a partir da média de 3 experimentos independentes, utilizando análise de variância (ANOVA), seguidos pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), utilizando o software Prisma versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 Ensaios de determinação de CIM (Concentração Inibitória Mínima) e Sinergismo frente a cepas de *Candida* spp.

A dobutamina apresentou efeito inibitório frente a todas as cepas de *Candida* spp., com CIMs variando de 3125 µg/mL a 1562 µg/mL, porém o maior efeito observado foi sobre a cepa de *C. glabrata*, 24,41 µg/mL. As cepas de *Candida* spp. testadas apresentaram CIMs para fluconazol entre 2 µg/mL a 64 µg/mL. Com relação ao sinergismo entre fármacos, 50 % das cepas apresentaram relação sinérgica, incluindo 1 espécie de *Candida albicans* e 4 espécies de *Candida parapsilosis* (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de CIM para dobutamina e fluconazol isolados e combinados frente a cepas de *Candida* spp.

CEPAS	VALORES DE CIM ¹ µg/mL					
	ISOLADOS		COMBINADOS		ΣFICI ²	INTER ³
	Dobutamina	Fluconazol	Dobutamina	Fluconazol		
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	3125	2	718	0,5	0,48	SIN
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	1562	8	781	4	1,00	IND
<i>C. albicans</i> 1	3125	16	781	4	0,50	SIN
<i>C. albicans</i> 2	1562	16	781	8	1,00	IND
<i>C. albicans</i> 3	3125	16	1562	8	1,00	IND
<i>C. albicans</i> 4	3125	16	1562	8	1,00	IND
<i>C. albicans</i> 5	3125	16	1562	8	1,00	IND
<i>C. tropicalis</i> 1	3125	16	1562	8	1,00	IND
<i>C. tropicalis</i> 2	3125	16	1562	8	1,00	IND
<i>C. tropicalis</i> 3	3125	16	1562	8	1,00	IND
<i>C. parapsilosis</i> 1	3125	64	781	16	0,50	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 2	3125	16	1562	8	1,00	IND
<i>C. parapsilosis</i> 3	3125	8	781	2	0,50	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 4	3125	8	781	2	0,50	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 5	3125	32	781	8	0,50	SIN
<i>C. Glabrata</i> 9	24,41	32	0,38	0,5	0,03	SIN

¹ CIM: menos concentração capaz de inibir 50 % do crescimento fúngico. ² FICI: Índice da concentração inibitória

da fração. ³ SIN: sinergismo (FICI \leq 0.5); IND: indiferente (FICI $>$ 0.5–4.0); AN : antagonismo FICI $>$ 4.0).

6.2 Ensaio de determinação de CIM (Concentração Inibitória Mínima) e Sinergismo frente a cepas de *Candida glabrata*

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) da dobutamina variaram de 2 - 32 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas de *C. glabrata*, apresentando assim uma atividade promissora. Para as cepas controles *Candida parapsilosis* ATCC 22019 a CIM foi de 3.125 $\mu\text{g/mL}$ e *Candida krusei* ATCC 6258 1.562 $\mu\text{g/mL}$. Para o fluconazol as CIM variaram entre 2 – 128 $\mu\text{g/mL}$, para o itraconazol variaram entre 0,12 - 8 $\mu\text{g/mL}$ como mostrado na tabela 1. Para todas as cepas a concentração fungicida mínima (CFM) foi $>$ 4096 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). O nível de tolerância variou entre 128 e 2048, constatando-se um efeito fungistático CIM/CFM \geq 16, o qual pode ser visualizado na Tabela 2.

Com relação ao sinergismo, dentre as cepas testadas 82% apresentaram relação sinérgica entre dobutamina e fluconazol, com FICIs variando entre 0,03 – 5. As CIM para fluconazol caíram significativamente, ficando entre 0,5 - 4 $\mu\text{g/mL}$ e para dobutamina entre 0,5 e 32 $\mu\text{g/mL}$ nas cepas que apresentaram atividade sinérgica. A avaliação da atividade combinada da dobutamina com itraconazol, apresentou 90% das cepas com atividade sinérgica. As CIM para itraconazol variaram entre 0,015 e 1 $\mu\text{g/mL}$ e para dobutamina 0,25 - 1 $\mu\text{g/mL}$, com FICIs entre 0,25 e 0,5. Em nenhuma das cepas testadas foi constatada atividade antagônica (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação do efeito antifúngico da dobutamina isolada e associada ao fluconazol e itraconazol frente a cepas de *C glabrata*

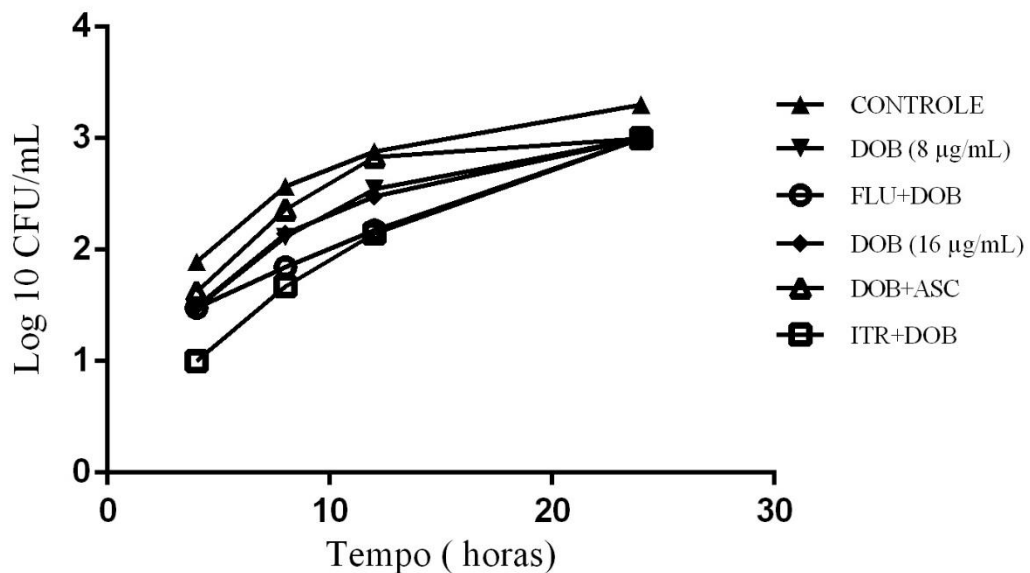
CEPAS	Origem	VALORES DE CIM ¹ µg/mL											
		DOB	FLU	Flu/Dob	∑FICI ²	INTER ³	ITRA	Itra/DOB	∑FICI ²	INTER ³	CFM ⁴	Tolerância CFM/CIM	INTER
<i>C. glabrata 1</i>	Lavado Alveolar	32	64	1/2	0,06	SIN	0,5	0,0625/4	0,25	SIN	>4096	128	Fungistático
<i>C. glabrata 2</i>	Urina	2	32	0,25/0,5	0,14	SIN	0,5	0,25/1	1	IND	>4096	2048	Fungistático
<i>C. glabrata 3</i>	Urina	2	2	1/1	1	IND	0,25	0,062/0,5	0,5	SIN	>4096	2048	Fungistático
<i>C. glabrata 4</i>	Lavado Alveolar	4	64	1/16	0,5	SIN	0,5	0,125/1	0,5	SIN	>4096	1024	Fungistático
<i>C. glabrata 5</i>	Urina	4	4	1/1	0,5	SIN	0,12	0,015/1	0,25	SIN	>4096	1024	Fungistático
<i>C. glabrata 6</i>	Lavado Alveolar	8	32	1/4	0,25	SIN	0,5	0,062/1	0,25	SIN	>4096	512	Fungistático
<i>C. glabrata 7*</i>	Urina	8	64	1/8	0,25	SIN	0,5	0,062/1	0,25	SIN	>4096	512	Fungistático
<i>C. glabrata 8*</i>	Lavado Alveolar	2	128	0,5/32	0,5	SIN	8	1/0,25	0,25	SIN	>4096	2048	Fungistático
<i>C. glabrata 9</i>	Urina	24,41	32	0,38/0,5	0,03	SIN	1	0,125/2	0,21	SIN	>4096	167	Fungistático
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019		3125	2	0,5/781	0,48	SIN	0,5	0,031/195	0,12	SIN	>4096		Fungistático
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258		1562	8	4/781	1	IND	0,25	0,062/390	0,5	SIN	>4096		Fungistático

¹CIM : Menor concentração capaz de inibir 50 % do crescimento fúngico. ² FICI: FICI: Índice da concentração inibitória da fração ³ SIN: sinergismo (FICI ≤ 0.5); IND: indiferente (FICI > 0.5–4.0); ANT: antagonismo (FICI > 4.0) ⁴ CFM : Menor concentração capaz de inibir 99,9% do crescimento fúngico. DOB : dobutamina; FLC: fluconazol; ITR: itraconazol.

6.2 Avaliação do tempo de morte de células de *C. glabrata*

A avaliação do tempo de morte confirmou o efeito predominantemente fungistático da dobutamina frente a *C. glabrata*, com uma diminuição significativa durante 4h e 8h, ou seja, a inibição celular é dependente do tempo de tratamento. Durante esse mesmo período foi verificado um efeito aditivo (diminuição de < 2 mas $> 1 \log_{10}$ UFC/mL) entre as combinações FLU + DOB e ITRA + DOB (Figura 6). O efeito da Dobutamina CIM ($8 \mu\text{g/mL}$) e 2x CIM ($16 \mu\text{g/mL}$) foi semelhante ao efeito do fluconazol sozinho e do itraconazol. A adição do antioxidante (AC) reverteu o efeito da dobutamina.

Figura 6: Avaliação do tempo de morte da dobutamina isolada e associada ao fluconazol frente e *C. glabrata* resistente ao fluconazol. DOB: Dobutamina; FLU: Fluconazol; ASC: Ácido ascórbico; ITR: Itraconazol.



6.3 Determinação da ação da dobutamina isolada e combinada sobre biofilmes de *C. glabrata*

A dobutamina isolada não apresentou atividade frente a biofilmes maduros em nenhuma das cepas testadas de *C. glabrata* nas concentrações de CIM/2, CIM, 2x CIM, 4x CIM e 10x CIM, bem como o fluconazol também não apresenta efeito sobre biofilmes de *C. glabrata* (Figura 7). A dobutamina associada ao fluconazol e ao itraconazol também não apresentou atividade frente a biofilmes maduros de *C. glabrata* em nenhuma das combinações testadas (Figura 8). A dobutamina isolada e em associação com fluconazol e itraconazol não apresentou interferência na fase inicial da formação de biofilmes em nenhuma das concentrações testadas (Figura 9).

Figura 7: A e B Efeito da dobutamina isolada frente a biofilmes formados de *C. glabrata* 7 e 8. C e D Efeito do Fluconazol isolado sobre biofilmes formados de *C. glabrata* 7 e 8.

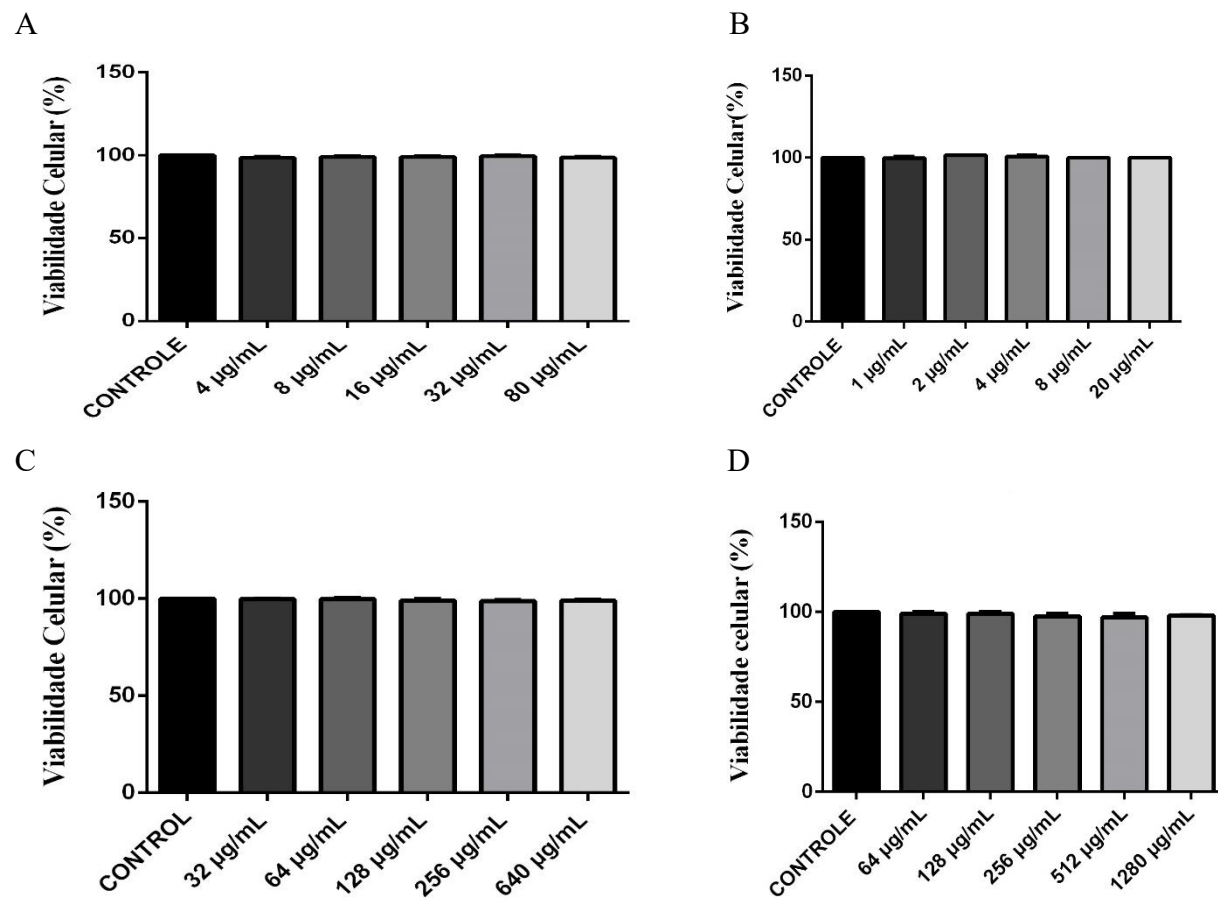


Figura 8: A e C , Efeito da Dobutamina combinada ao Itraconazol frente a biofilme de *C. glabrata* 7 e 8, respectivamente. B e D Efeito da Dobutamina combinada ao Fluconazol frente a biofilme de *C. glabrata* 7 e 8, respectivamente

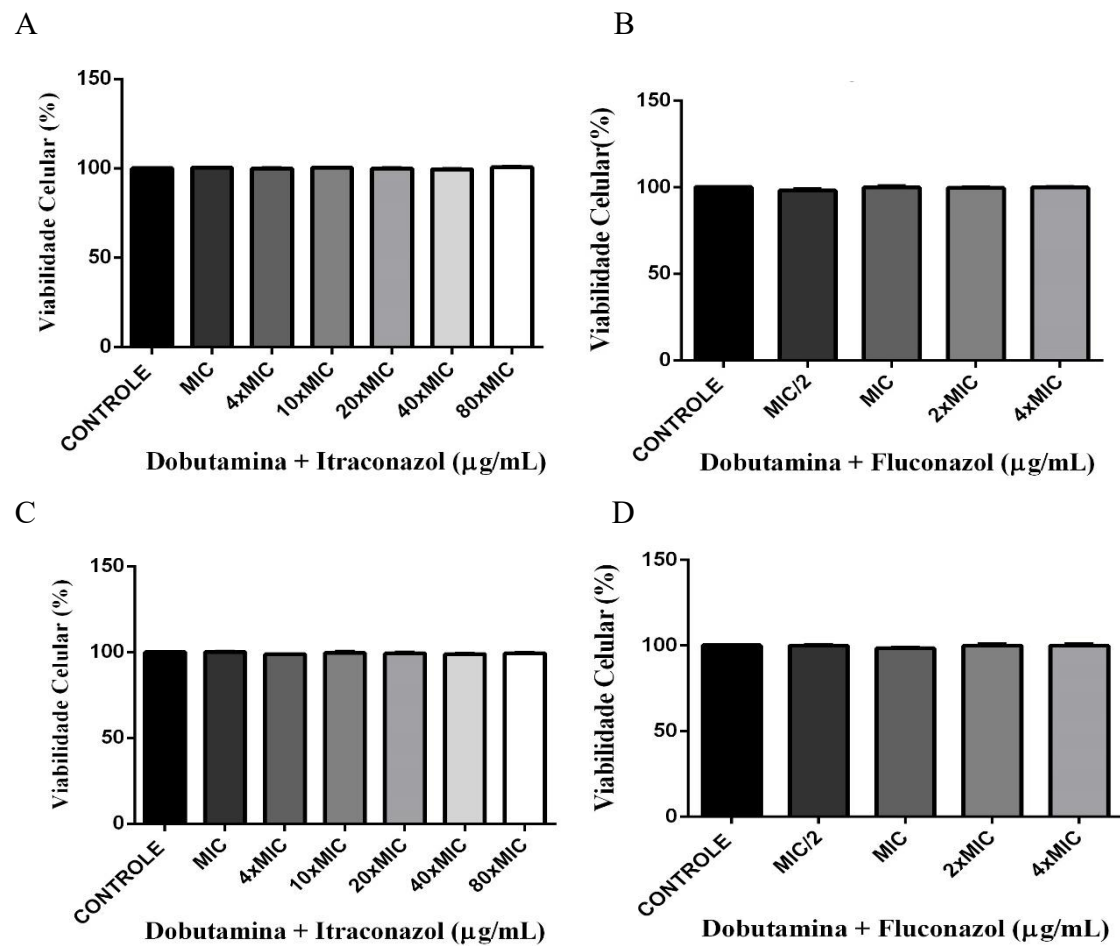
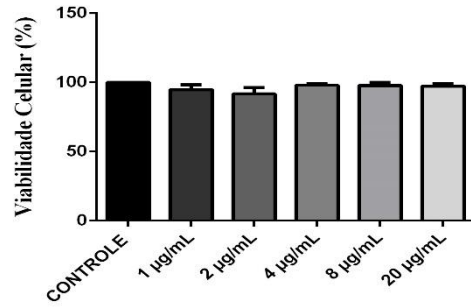
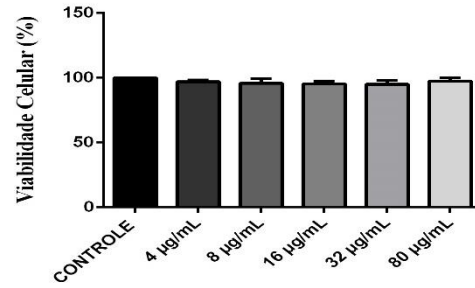


Figura 9: Efeito da Dobutamina sobre o início do processo de formação dos biofilmes de *C. glabrata* 7 (A) e 8 (B).

A



B



6.4 Reversão do efeito antifúngico da dobutamina após adição de ácido ascórbico

Para verificar se a atividade da dobutamina em células de *Candida glabrata* está relacionada com o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi utilizado o ácido ascórbico como substância antioxidante e averiguado seu efeito sobre a CIM da dobutamina. A combinação com AC aumentou consideravelmente a CIM para dobutamina em todas as cepas de *C. glabrata* (256 – 512 µg/mL), apresentando efeito antagônico entre as substâncias, como mostrado na tabela 3, correlacionando positivamente a atividade da dobutamina com acúmulo de EROs intracelular.

Tabela 3: Reversão do efeito antifúngico da dobutamina frente a cepas de *C. glabrata* após adição de substância antioxidante.

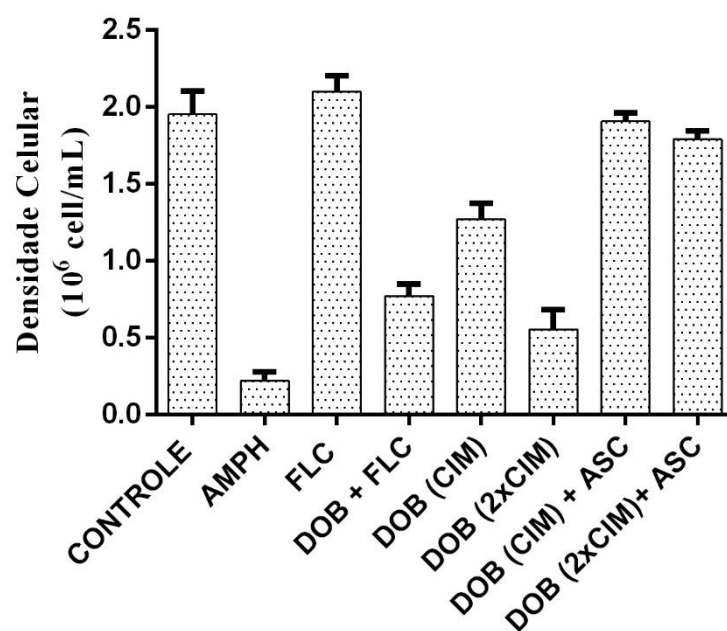
CEPAS	Origem	VALORES DE CIM ¹ µg/mL					
		ISOLADOS		COMBINADOS		ΣFICI ²	INTER ³
		AC	Dobutamina	AC	Dobutamina		
<i>C. glabrata</i> 1	Lavado Alveolar	4000	32	200	256	8,05	ANT
<i>C. glabrata</i> 2	Urina	4000	2	200	256	128,1	ANT
<i>C. glabrata</i> 3	Urina	4000	2	400	512	256	ANT
<i>C. glabrata</i> 4	Lavado Alveolar	4000	4	400	512	128,1	ANT
<i>C. glabrata</i> 5	Urina	4000	4	400	512	128,1	ANT
<i>C. glabrata</i> 6	Lavado Alveolar	4000	8	400	512	64,1	ANT
<i>C. glabrata</i> 7	Urina	4000	8	400	512	64,1	ANT
<i>C. glabrata</i> 8	Lavado Alveolar	4000	2	400	512	256,1	ANT
<i>C. glabrata</i> 9	Urina	4000	24,41	400	512	21,08	ANT
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019		4000	3125	>3125	400	1,1	IND
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258		4000	1562	>1562	400	1,1	IND

¹CIM: Menor concentração capaz de inibir 50 % do crescimento fúngico. ² FICI: Índice da concentração inibitória da fração ³ SIN: sinergismo (FICI ≤ 0.5); IND: indiferente (FICI > 0.5–4.0); ANT: antagonismo FICI > 4.0).

6.5 A dobutamina diminui a viabilidade celular de forma concentração-dependente

Após 24h de incubação das diferentes combinações de drogas, na exposição a DOB CIM e DOB 2x CIM foi observado viabilidade celular de $65\pm 0,10\%$ e $28\pm 0,13\%$ respectivamente, em relação ao controle (100%), mostrando uma redução significativa. Já a exposição ao fluconazol 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não mostrou redução na viabilidade celular. A combinação sinérgica entre DOB 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + FLU 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostrou redução significativa na viabilidade ($39\pm 0,08\%$). Foi observado reversão da atividade antifúngica da dobutamina tanto no CIM como 2x CIM quando combinada a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AC de $97\pm 0,06\%$ e $91,7\pm 0,06\%$ respectivamente. A ANFO B foi utilizada como controle. Os dados apresentados na figura 10 reforçam a atividade promissora da dobutamina frente as cepas de *C. glabrata*.

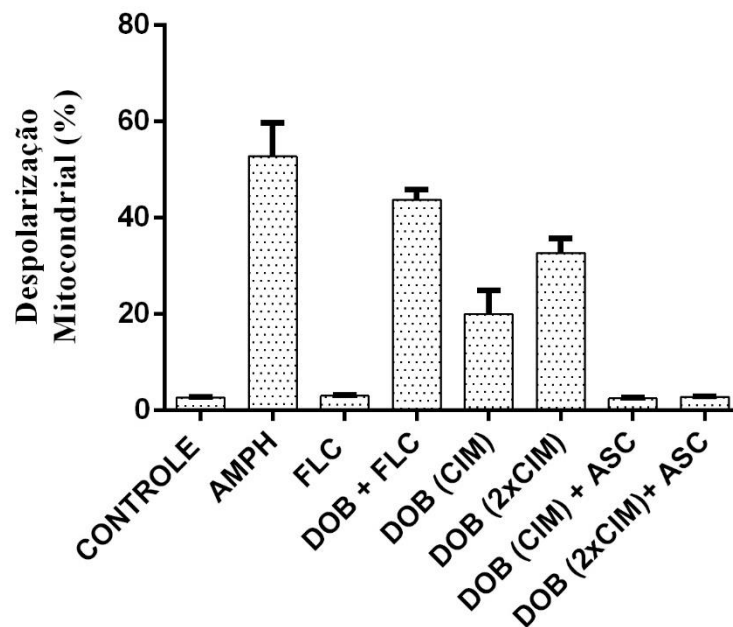
Figura 10: Diminuição da viabilidade celular após tratamento de 24 h com dobutamina nas concentrações de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CIM) , 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2xCIM) e nas combinações com fluconazol em células de *C. glabrata*



6.7 Dobutamina aumenta os níveis de despolarização mitocondrial

Após 24h de exposição foi observada um aumento na despolarização mitocondrial em relação ao controle da combinação entre DOB + FLU de $36,6 \pm 2,10\%$, DOB CIM de $17,3 \pm 8,43\%$ e DOB 2x CIM de $28 \pm 12,5\%$. O fluconazol 64 $\mu\text{g/mL}$ ($2,88 \pm 0,39\%$) não demonstrou despolarização mitocondrial significativa. Nas amostras em que a DOB foi combinada com 200 $\mu\text{g/mL}$ de AC, tanto no CIM ($2,4 \pm 0,23\%$) quanto em 2x CIM ($2,65 \pm 0,42$) foi observada despolarização mitocondrial compatível com o controle ($2,69 \pm 0,15$), demonstrando o efeito antagônico das duas substâncias (Figura 11). A ANFO B foi utilizada como controle.

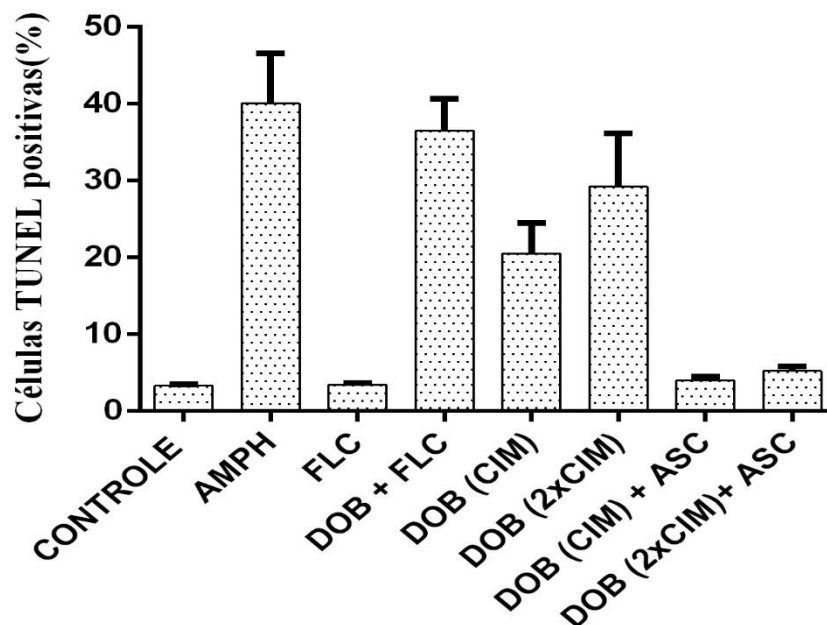
Figura 11: Aumento da despolarização mitocondrial após tratamento de 24 h com dobutamina nas concentrações de 8 $\mu\text{g/mL}$ (CIM) , 16 $\mu\text{g/mL}$ (2xCIM) e nas combinações com fluconazol em células de *C. glabrata*.



6.8 Associação entre DOB e FLU aumenta significativamente os níveis de fragmentação de DNA

Com relação ao teste do TUNEL, a combinação DOB + FLU apresentou cerca de $33,2 \pm 0,08\%$ de células túnel positivas, resultando semelhante ao obtido com o tratamento com ANFO B ($36,7 \pm 0,06\%$). Tanto a exposição com DOB CIM ($17,2 \pm 0,10\%$) como DOB2x CIM ($25,9 \pm 0,13\%$) promoveram uma porcentagem de células positivas significativa em relação ao controle. As combinações de DOB tanto com AC como o FLU $64 \mu\text{g/mL}$ apresentaram porcentagem de células túnel positivas próximas ao controle (Figura 12).

Figura 12: Porcentagem de células TUNEL positivas após tratamento de 24 h com dobutamina nas concentrações de $8 \mu\text{g/mL}$ (CIM) , $16 \mu\text{g/mL}$ (2xCIM) e nas combinações com fluconazol em células de *C. glabrata*.



6 DISCUSSÃO

A capacidade das catecolaminas e agentes ionotrópicos de estimular o crescimento de bactérias através da ligação do grupamento catecol a transferrina e lactoferrina, aumentando assim a aquisição de ferro pela bactérias já é bem estabelecida (SANDRINI et al., 2010). Recentemente, um estudo utilizando isolado de *Salmonella* entérica *Typhimurium* mostrou que a promoção do crescimento bacteriano requer o QseC do sensor de histidina e transportadores bacterianos de ferro, em particular o SitABCD, e também pode envolver a expressão aumentada dos genes da captação bacteriana de ferro (DICHTL et al., 2019). No entanto, poucos estudos exploram a interação dos fármacos vasopressores com patógenos fúngicos.

Nesse estudo foi demonstrada o potencial antifúngico da dobutamina, um agente de estimulação β -adrenérgico, frente a cepas de *Candida glabrata*, com CIM variando entre 2 - 32 $\mu\text{g/mL}$. (GRAYSTONE; WELLS; FARRELL, 1997) mostraram que em concentrações de 5000 $\mu\text{g/mL}$ a dobutamina foi capaz de inibir o crescimento de um isolado clínico de *C. albicans*, em nosso estudo as CIMs para *Candida* spp foram menores, de 1562 a 3125 $\mu\text{g/mL}$. (CUVAS APAN; APAN; APAN, 2016) constataram que há inibição do crescimento de *C. albicans* (ATCC 90028) em diluições de outras catecolaminas como dopamina e noradrenalina nas concentrações de 100 $\mu\text{g / mL}$.

As CIMs encontradas em nosso estudo para cepas clínicas de *C. glabrata* foram significativamente menores e a atividade fungistática da dobutamina foi constatada sobre todos os isolados testados, com ação mais acentuada entre os tempos de 4h e 6 h. Essa atividade é mais pronunciada na espécie de *C. glabrata*, pois a dobutamina apresentou CIMs mais elevadas, variando de 1562 – 3125 $\mu\text{g/mL}$ para espécies clínicas de *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Em relação a atividade sinérgica, a dobutamina mostrou diminuição significativa dos CIM para fluconazol (82%) e itraconazol (90%) quando usada em combinação frente a cepas de *Candida glabrata*. O sinergismo entre fármacos é uma alternativa para a diminuição da indução da resistência bem como para a diminuição da toxicidade dos mesmos (LIU et al., 2014). Não há dados na literatura que avaliam o sinergismo entre a dobutamina, catecolaminas ou fármacos simpatomiméticos com antifúngicos.

Em nosso estudo a dobutamina não apresentou atividade em biofilmes maduros de *C. glabrata*, e aparentemente esse fármaco não interfere na fase inicial da formação do biofilme, a adesão. Apesar de não terem sido encontrados estudos relacionando catecolaminas com formação de biofilmes fúngicos, um estudo de (FRANK; PATEL, 2008) demonstrou que a dobutamina diminuiu significativamente a formação de biofilme de *S. lugdunensis* (87%, 13/15) em cateteres intravenosos a 50 µg / mL e na concentração de 0,15 µg / mL aumentou a formação de biofilme de *S. aureus* e nessa mesma concentração não houve alteração nos biofilmes de *S. epidermidis*. Demonstrando, portanto, que diferentes espécies de microrganismo têm diferentes respostas a dobutamina.

A avaliação através de citometria de fluxo permite concluir que a dobutamina apresenta efeito sobre a membrana celular de forma concentração dependente, com diminuição de cerca de 80 % da viabilidade celular em concentrações de 2xCIM, e 40% na CIM. Um estudo de (CIOCA; WATANABE; ISOBE, 2000) mostrou que concentrações de 0,1–1 mM a dobutamina é capaz de provocar morte em linfócitos sanguíneos também de forma concentração-dependente através da ativação de receptores b-adrenérgicos presentes na membrana celular e aumento do mediador celular adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e acúmulo de Ca^{2+} intracelular (CIOCA; WATANABE; ISOBE, 2000; DANI et al., 2007). Sabe-se que o influxo de Ca^{2+} mitocondrial é um importante fator de regulação de apoptose, estimulando a oxidação de NADH e elevando assim a produção de ERO na mitocôndria (KIM; LEE, 2019). Entretanto a existência de

receptores β -adrenérgicos similares aos de células humanas ainda não foi relatada em células de leveduras.

O Fluconazol é um fármaco que age diretamente na membrana celular através da inibição da enzima lanosterol-desmetilase, a qual é fundamental para a síntese do ergosterol, de acordo com os resultados obtidos, quando associado a dobutamina esse processo de dano na membrana é intensificado. Porém quando combinada ao AC, a densidade celular é recuperada, com resultados semelhantes ao controle. (MACCREADIE; BARTONE; SPARROW, 2010) também demonstrou que a dopamina (10 mM) é capaz de inibir o crescimento de *C. glabrata*, sendo este efeito significativamente reduzido na presença do ácido ascórbico e glutatona, dessa forma essas substâncias agem prevenindo o dano oxidativo causado pelas catecolaminas nas células estudadas. Sugere-se então que o dano de membrana causado pelos azóis é intensificado pela geração de espécies reativas de oxigênio provenientes do tratamento com dobutamina.

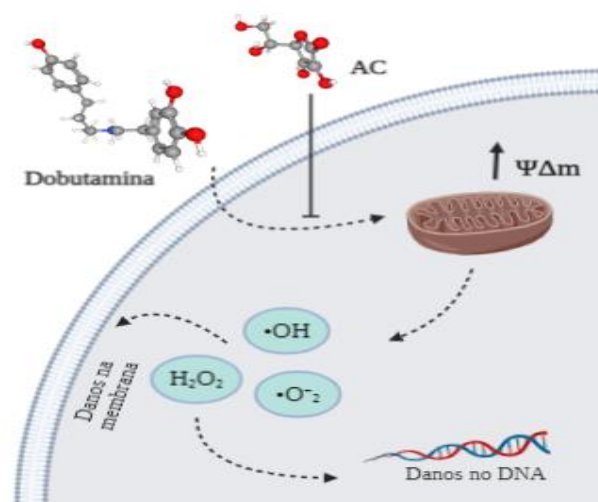
Com relação ao $\Delta\Psi_m$, a dobutamina tanto isolada quanto associada aumentou consideravelmente os níveis de despolarização mitocondrial. Diversos estudos demonstraram que as catecolaminas podem induzir mudanças na atividade mitocondrial, tanto no nível do ciclo de Krebs quanto a nível de cadeia de transporte de elétrons gerando acúmulo de espécies reativas de oxigênio e formação de poros na membrana (SHUKLA; DAVE; KATYARE, 2000). Devido as alterações na permeabilidade da membrana externa da mitocôndria fatores pro-apoptóticos como o citocromo c, podem ser liberados no citosol e ativar também a via de caspases (YUN; LEE, 2016).

Um estudo de (LEE et al., 2003) constatou que após o tratamento com dopamina, houveram mudanças no potencial de membrana, tendência ao edema, aumento da liberação de Ca^{2+} e indução da oxidação de grupos tiol(-SH) em mitocôndrias extraídas do cérebro, todas essas alterações foram revertidas pela adição de enzimas antioxidantes. Em nosso estudo também constatamos que a adição de AC após o tratamento com dobutamina reduziu o potencial

de alterações na mitocôndria, evidenciando a importância do estresse oxidativo no mecanismo de morte dessas células (LAM et al., 2020). As espécies reativas de oxigênio são consideradas reguladores de etapas cruciais da via apoptótica em leveduras. A produção excessiva de ERO leva ao estresse oxidativo, que leva a prejuízos no funcionamento de proteínas celulares, peroxidação lipídica e danos no DNA (LEE; LEE, 2018a).

No teste de TUNEL, o qual é utilizado para detectar a fragmentação de DNA resultante de cascatas de sinalização apoptóticas (LEE; LEE, 2018b), o dano no DNA foi significativo nas concentrações de DOB CIM, DOB 2xCIM e na combinação DOB + FLU. Sugerimos assim que a morte celular causada pela dobutamina possivelmente segue uma via mitocondrial, pela geração de dano oxidativo e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, as quais causam danos ao DNA (LEE; LEE, 2018a), pois na presença do ácido ascórbico na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, o dano no DNA não foi significativo. A figura 13 mostra o mecanismo de ação possível da dobutamina sobre células de *C. glabrata*.

Figura 13: Esquematização do mecanismo de ação da dobutamina sobre células de *C. glabrata*.



Fonte: Autor.

Em decorrência da dificuldade no desenvolvimento de novos antifúngico, a geração de espécies reativas de oxigênio pode ser uma opção potente quando utilizado em combinação com fármacos clássicos para melhorar a eficácia antimicrobiana e lidar com a situação de urgência da resistência (KIM; LEE, 2019; LAM et al., 2020). Porém são necessárias mais investigações a respeito da ação da dobutamina sobre células de leveduras.

8 CONCLUSÃO

Concluimos então, que a dobutamina possui um efeito antifúngico frente a cepas *Candida* spp., especialmente frente a *C. glabrata*, como também atividade sinérgica com os antifúngicos fluconazol e itraconazol. Esse efeito é provavelmente mediado pelo aumento do estresse oxidativo, o qual eleva a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são capazes de causar danos a membrana fúngica através de indução da peroxidação lipídica e desequilíbrio de íons importantes para a homeostase celular bem como a fragmentação do DNA, danos estes que são revertidos quando adicionado uma substância antioxidante no tratamento das células. Porém são necessários mais estudos que busquem compreender melhor a interação da dobutamina com células de *C. glabrata*.

REFERÊNCIAS

- ABANAMY, R. et al. The epidemiology and clinical characteristics of candida blood stream infection: 6 years experience in a tertiary care center. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 2, p. 345, 2020.
- AGGARWAL, S. et al. Drug repurposing for breast cancer therapy: Old weapon for new battle. **Seminars in Cancer Biology**, n. January, 2020.
- ALEXANDER, B. D. et al. Increasing echinocandin resistance in candida glabrata: Clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 12, p. 1724–1732, 2013.
- ALNAJJAR, L. M.; BULATOVA, N. R.; DARWISH, R. M. Evaluation of four calcium channel blockers as fluconazole resistance inhibitors in Candida glabrata. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 14, p. 185–189, 2018.
- ANDERSON, T. M. et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 5, p. 400–406, 2014.
- ANDES, D. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic comparison of amphotericin B (AMB) and two lipid-associated AMB preparations, liposomal AMB and AMB lipid complex, in murine candidiasis models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 674–684, 2006.
- ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant candida: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 3, p. S445–S451, 2017.
- AUTMIZGUINE, J. et al. Effect of fluconazole prophylaxis on Candida fluconazole susceptibility in premature infants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 12, p. 3482–3487, 2018.
- AWAD, L. et al. Correlation between antifungal consumption and distribution of Candida spp. in different departments of a Lebanese hospital. **Journal of infection in developing countries**, v. 12, n. 21, p. 1–11, 2018.
- AZIE, N. et al. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: Update 2012. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 293–300, 2012.
- BELLMANN, R.; SMUSZKIEWICZ, P. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. **Infection**, v. 45, n. 6, p. 737–779, 2017.
- BORELLI, C. et al. X-ray structures of Sap1 and Sap5: Structural comparison of the secreted

- aspartic proteinases from *Candida albicans*. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 72, n. 4, p. 1308–1319, 2008.
- BRAGA, P. R. et al. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 273–277, 2018.
- CALDERONE, R. et al. Antifungal drug discovery: The process and outcomes. **Future Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 791–805, 2014.
- CANELA, H. M. S. et al. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 1, p. 11–21, 2018.
- CAPPELLETY, D.; EISELSTEIN-MCKITRICK, K. The echinocandins. **Pharmacotherapy**, v. 27, n. 3, p. 369–388, 2007.
- CASTÓN-OSORIO, J. J.; RIVERO, A.; TORRE-CISNEROS, J. Epidemiology of invasive fungal infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. SUPPL. 2, 2008.
- CASTRO, L. L. et al. Prevalence of fungemia in a tertiary hospital: Analysis of the last decade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 4, p. 315–319, 2016.
- ČERNÁKOVÁ, L. et al. Novel Therapies for Biofilm-Based *Candida* spp. Infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1214, p. 93–123, 2019.
- CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: A role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 457–465, 2011.
- CIOCA, D. P.; WATANABE, N.; ISOBE, M. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes is induced by catecholamines. **Japanese Heart Journal**, v. 41, n. 3, p. 385–398, 2000.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599–607, 2003.
- CORTÉS, J. A. et al. Clinical and epidemiological characteristics and risk factors for mortality in patients with candidemia in hospitals from Bogotá, Colombia. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 631–637, 2014.
- CUVAS APAN, O.; APAN, T. Z.; APAN, A. In vitro antimicrobial activity of commonly used vasoactive drugs. **Journal of Clinical Anesthesia**, v. 34, p. 407–411, 2016.
- 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, 2013a.
- 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, 2013b.

DANI, C. et al. Toxicity of corticosteroids and catecholamines for mice neuronal cell cultures: Role of preservatives. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 325–333, 2007.

DE ANDRADE NETO, J. B. et al. Synergistic effects of ketamine and azole derivatives on *Candida* spp. resistance to fluconazole. **Future microbiology**, v. 15, p. 177–188, 2020.

DE CÁSSIA ORLANDI SARDI, J. et al. *Candida auris*: Epidemiology, risk factors, virulence, resistance, and therapeutic options. **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 116–121, 2018.

DE GROOT, P. W. J. et al. Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 4, p. 470–481, 2013.

DE PAUW, B. E. Increasing fungal infections in the intensive care unit. **Surgical Infections**, v. 7, n. SUPPL. 2, p. 93–96, 2006.

DICHTL, S. et al. Dopamine Is a Siderophore-Like Iron Chelator That Promotes *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Virulence in Mice. **mBio**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2019.

DO AMARAL VALENTE SÁ, L. G. et al. Antifungal activity of etomidate against growing biofilms of fluconazole-resistant *Candida* spp. strains, binding to mannoproteins and molecular docking with the ALS3 protein. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 1221–1227, 2020.

DU, H. et al. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 10, 22 out. 2020.

DUFRENE, Y. F. Sticky microbes: Forces in microbial cell adhesion. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 376–382, 2015.

FARMAKIOTIS, D.; KONTOYIANNIS, D. P. Epidemiology of antifungal resistance in human pathogenic yeasts: current viewpoint and practical recommendations for management. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 3, p. 318–324, 2017.

FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 80–96, 1999.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G. et al. Relationship between the Antifungal Susceptibility Profile and the Production of Virulence-Related Hydrolytic Enzymes in Brazilian Clinical Strains of *Candida glabrata*. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.

FILLER, S. G. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 333–339, 2006.

FRANK, K. L.; PATEL, R. Intravenously administered pharmaceuticals impact biofilm

formation and detachment of *Staphylococcus lugdunensis* and other staphylococci.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 60, n. 1, p. 9–16, 2008.

FREIRE, F. et al. Evaluation of gene expression SAP5, LIP9, and PLB2 of *Candida albicans* biofilms after photodynamic inactivation. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 5, p. 1511–1518, 2015.

FU, Y. et al. Investigation of the function of *Candida albicans* Als3 by heterologous expression in *Candida glabrata*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 7, p. 2528–2535, 2013.

GALOCHA, M. et al. Divergent approaches to virulence in *C. Albicans* and *C. Glabrata*: Two sides of the same coin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, 2019.

GHAZI, S. et al. The epidemiology of *Candida* species in the Middle East and North Africa. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 29, n. 3, p. 245–252, 2019.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225–234, 2010.

GRAYSTONE, S.; WELLS, M. F.; FARRELL, D. J. Do intensive care drug infusions support microbial growth? **Anaesthesia and Intensive Care**, v. 25, n. 6, p. 640–642, 1997.

GULLO, A. Invasive fungal infections: the challenge continues. **Drugs**, v. 69 Suppl 1, p. 65–73, 2009.

GUO, Q. et al. Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 457–462, 2008.

HA, Y. E. et al. Impact of first-line antifungal agents on the outcomes and costs of candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3950–3956, 2012.

HEALEY, K. R.; PERLIN, D. S. Fungal resistance to echinocandins and the MDR phenomenon in *Candida glabrata*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, 2018.

HOWARD, S. J. et al. Pharmacodynamics of echinocandins against *Candida glabrata*: Requirement for dosage escalation to achieve maximal antifungal activity in neutropenic hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4880–4887, 2011.

ICHIKAWA, T. et al. Adherence and cytotoxicity of *candida* spp. To HaCaT and A549 cells. **Medical Mycology Journal**, v. 60, n. 1, 2019.

JOHNSON, P. *The Journal of Emergency Medicine*. v. 99, p. 490–496, 1983.

KHAN, Z. et al. Increasing Trends of Reduced Susceptibility to Antifungal Drugs Among Clinical *Candida glabrata* Isolates in Kuwait. v. 00, n. 00, p. 1–9, 2020.

KIM, S.; LEE, D. G. Role of calcium in reactive oxygen species-induced apoptosis in

- Candida albicans: an antifungal mechanism of antimicrobial peptide, PMAP-23. **Free Radical Research**, v. 53, n. 1, p. 8–17, 2019.
- KLEPSEK, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**, v. 26, n. 2, p. 225.e1-225.e10, 2011.
- KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: Pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 4, p. 243–260, 2002.
- KUCHARÍKOVÁ, S. et al. In vivo Candida glabrata biofilm development on foreign bodies in a rat subcutaneous model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 846–856, 2015.
- KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 2015.
- LAM, P. L. et al. The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: An updated mini review. **Chemico-Biological Interactions**, v. 320, 2020.
- LEE, C. S. et al. Combined effect of dopamine and MPP⁺ on membrane permeability in mitochondria and cell viability in PC12 cells. **Neurochemistry International**, v. 43, n. 2, p. 147–154, 2003.
- LEE, W.; LEE, D. G. Reactive oxygen species modulate itraconazole-induced apoptosis via mitochondrial disruption in Candida albicans. **Free Radical Research**, v. 52, n. 1, p. 39–50, 2018a.
- LEE, W.; LEE, D. G. A novel mechanism of fluconazole: Fungicidal activity through dose-dependent apoptotic responses in Candida albicans. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 164, n. 2, p. 194–204, 2018b.
- LIMA, G. M. E. et al. Identification and antifungal susceptibility of Candida species isolated from the urine of patients in a university hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, n. April, 2017.
- LINDBERG, E. et al. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 12–17, 2019.
- LIU, S. et al. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: A promising approach to cope with resistant Candida albicans infections and insight into new antifungal agent discovery. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 5, p. 395–402, 2014.
- LIU, Y. et al. C16-Fengycin A affect the growth of Candida albicans by destroying its cell wall and accumulating reactive oxygen species. **Applied Microbiology and Biotechnology**,

v. 103, n. 21–22, p. 8963–8975, 2019.

LOPES COLOMBO, A. et al. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 34, n. 4, p. 281–286, 1999.

MACREADIE, I. G.; BARTONE, N.; SPARROW, L. Inhibition of respiratory growth and survival in yeast by dopamine and counteraction with ascorbate or glutathione. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 15, n. 3, p. 297–301, 2010.

MASCHMEYER, G. The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. SUPPL. 1, p. 3–6, 2006.

MATTHEW B. LOHSE, MEGHA GULATI, ALEXANDER D. JOHNSON, C. J. N. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2018.

MESINI, A. et al. Changing epidemiology of candidemia: increase in fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*. **Mycoses**, p. 0–3, 2020.

MORRIS, M. I.; VILLMANN, M. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 2. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 63, n. 19, p. 1813–1820, 2006.

MORSCHHÄUSER, J. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* – an example of microevolution of a fungal pathogen. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 192–201, 2016.

MOTTA, A. L. et al. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 441–448, 2010.

MUAKKASSA, F. K.; GHANNOUM, M. Updates on therapeutic strategies against *Candida* (and *Aspergillus*) biofilm related infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 931, 2016.

NAGLIK, J. R. et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 3, p. 469–479, 2003.

NAMI, S. et al. Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, n. July 2018, p. 857–868, 2019.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561–570, 2010.

PAPON, N. et al. Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida*

- albicans Paradigm. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, 2013.
- PATIL, R. H. et al. Fungal biofilm inhibition by piperazine-sulphonamide linked Schiff bases: Design, synthesis, and biological evaluation. **Archiv der Pharmazie**, v. 351, n. 3–4, 2018.
- PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: A reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, 2017.
- PFALLER, M. A. et al. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1199–1203, 2012.
- PHAN, Q. T. et al. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. **PLoS Biology**, v. 5, n. 3, p. 0543–0557, 2007.
- PIERCE, C. G. et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2008.
- POPP C, RAMÍREZ-ZAVALA B, SCHWANFELDER S, KRÜGER I, M. J. Evolution of Fluconazole-Resistant. **mBio**, v. 10, n. December 2018, p. 1–21, 2019.
- PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.
- PUSHPAKOM, S. et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2018.
- RENTZ, A. M.; HALPERN, M. T.; BOWDEN, R. The Impact of Candidemia on Length of Hospital Stay, Outcome, and Overall Cost of Illness. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, n. 4, p. 781–788, 1998.
- ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **The Fungal Kingdom**, p. 903–922, 2017.
- RODRIGUES, C. F. et al. *Candida glabrata* biofilms: How far have we come? **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, 2017.
- RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 673–688, 2014.
- RUFFOLO, B. Y. R. R. Review : The Pharmacology of Dobutamine. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 294, n. 4, p. 244–248, 1987.
- SADEGHI, G. et al. Emergence of non-*Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 1, p. 51–58, 2018.

- SANDRINI, S. M. et al. Elucidation of the mechanism by which catecholamine stress hormones liberate iron from the innate immune defense proteins transferrin and lactoferrin. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 587–594, 2010.
- SANTOS, G. C. D. O. et al. Candida infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–23, 2018.
- SASANI E, KHODAVAISY S, AGHA KUCHAK AFSHARI S, DARABIAN S, AALA F, R. S. Pseudohyphae formation in *Candida glabrata* due to CO₂ exposure. v. 2, n. 4, p. 49–52, 2017.
- SHIELDS, R. K. et al. Spontaneous mutational frequency and fks mutation rates vary by echinocandin agent against *Candida Glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 1, 2019.
- SHUKLA, V. H.; DAVE, K. R.; KATYARE, S. S. Effect of catecholamine depletion on oxidative energy metabolism in rat liver, brain and heart mitochondria; use of reserpine. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, v. 127, n. 1, p. 79–90, 2000.
- SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.
- SPELLBERG, B. J. et al. Efficacy of the anti-*Candida* rAls3p-N or rAls1p-N vaccines against disseminated and mucosal candidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 2, p. 256–260, 2006.
- STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.
- TAPIA P., C. *Candida glabrata*. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 25, n. 4, p. 293, 2008.
- TERÇAS, A. L. G. et al. Antifungal drug susceptibility of *Candida* species isolated from HIV-positive patients recruited at a public hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, p. 1–8, 2017.
- TORTORANO, A. M. et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 317–322, 2004.
- TORTORANO, A. M. et al. A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. **Infection**, v. 41, n. 3, p. 655–662, 2013.

TOZZO, ALINE; GRAZZIOTIN, N. Candidíase vulvovaginal. **PERSPECTIVA, Erechim**, v. 36, n. 133, p. 53–62, 2012.

UPPULURI, P.; LOPEZ RIBOT, J. L. Candida albicans biofilms. **Candida albicans: Cellular and Molecular Biology: Second Edition**, v. 18, n. 5, p. 63–75, 2017.

VIEIRA DE MELO, A. P. 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 Medicale**, v. 29, n. 2, p. 132–139, 2019.

WIEDERHOLD, N. P. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 3, p. 333–339, 2018.

WILLAERT, R. G. Adhesins of yeasts: Protein structure and interactions. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 1–28, 2018.

WINTER, M. B. et al. Global identification of biofilm-specific proteolysis in Candida albicans. **mBio**, v. 7, n. 5, p. 1–13, 2016.

XIAO, M. et al. Five-year national surveillance of invasive candidiasis: Species distribution and azole susceptibility from the China hospital invasive fungal surveillance net (CHIF-NET) study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 7, 2018.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, n. 1, p. 95–105, 2014.

YUN, J. E.; LEE, D. G. Cecropin A-induced apoptosis is regulated by ion balance and glutathione antioxidant system in Candida albicans. **IUBMB Life**, n. 9, p. 652–662, 2016.

ZARNOWSKI, R. et al. Candida albicans biofilm–induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. **PLoS Biology**, v. 16, n. 10, p. 1–18, 2018.

SIDRIM, J.; ROCHA, M. **Micologia medica a luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

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.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standart M27-A3, 3^oed., **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2008

KATZUNG, B.G.; MASTERS SB; TREVOR AJ. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12^a edição. Rio de Janeiro. McGraw-Hill,. 2014.