



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

LISANDRA JUVÊNCIO DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FOSFATO DISSÓDICO
DE DEXAMETASONA FRENTE À CEPAS DE *Candida albicans* RESISTENTES AO
FLUCONAZOL E SUA ATIVIDADE CONTRA BIOFILME**

FORTALEZA/CE

2021

LISANDRA JUVÊNCIO DA SILVA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FOSFATO DISSÓDICO DE
DEXAMETASONA FRENTE À CEPAS DE *Candida albicans* RESISTENTES AO
FLUCONAZOL E SUA ATIVIDADE CONTRA BIOFILME

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

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

Coorientadora: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.

FORTALEZA/CE

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)

D11a da Silva, Lisandra Juvêncio.

Avaliação in vitro da atividade antifúngica do fosfato dissódico de dexametasona frente a cepas de candida albicans resistentes ao fluconazol e sua atividade contra biofilme / Lisandra Juvêncio da Silva. – 2022.

74 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

Coorientação: Prof. Dr. Cecília Rocha da Silva.

1. Dexametasona. 2. Candida albicans. 3. Reposicionamento de Medicamentos. 4. Biofilmes. I. Título.

CDD 616.9

LISANDRA JUVÊNIO DA SILVA

AValiação *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FOSFATO DISSÓDICO DE
DEXAMETASONA FRENTE A CEPAS DE *candida albicans* RESISTENTES AO
FLUCONAZOL E SUA ATIVIDADE CONTRA BIOFILME

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. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em:29/06/2021.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

A Deus.

Aos meus pais, Maria Vilanir Juvêncio da Silva e
Antônio César Pedro da Silva.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me ajudou muito nessa caminhada.

Aos meus pais por todo apoio e por todo o incentivo aos estudos.

Ao meu namorado Erick Barros por todo apoio e por me ajudar todas as vezes em que eu precisei.

Ao Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior, pela excelente orientação e por todas as palavras de sabedoria.

A minha coorientadora Professora Dra. Cecilia Rocha pela excelente orientação e todo apoio, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A Dra. Livia, Daiana, Helaine, por toda a ajuda, apoio no mestrado e no desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos do LABIMAN Daiana, Thiago, Amanda Cavalcante, Amanda Dias, Vitoria, Daniel, Lara, Octávio, João e Bruna por toda ajuda e por momentos compartilhados no laboratório com vocês tudo é mais divertido.

A minha amiga Brenda Gaspar por todo o apoio, pelas conversas e pela ajuda sempre que eu precisei

Aos colegas da turma de mestrado e os professores PPGMM pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

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

“Uma das lições com as quais eu cresci foi a de sempre permanecer verdadeiro consigo mesmo e nunca deixar que as palavras de alguém o distraiam dos seus objetivos. Michelle Obama.”

RESUMO

Muito se tem discutido recentemente sobre infecções fúngicas superficiais e profundas que aumentaram significativamente aumentando as taxas de morbimortalidade na atualidade. Embora aumentem o desenvolvimento de drogas antimicrobianas, o arsenal encontrado no mercado para o tratamento de infecções fúngicas ainda são baixos, logo acabam limitando o tratamento do paciente. Espécies do gênero *Candida* são os agentes oportunistas mais comuns em infecções fúngicas em espécies de diferentes grupos de pacientes com imunodeficiência. Portanto, o redirecionamento de medicamentos é um importante meio de prospecção de novas alternativas terapêuticas, visto que esses medicamentos apresentam propriedades farmacológicas e toxicológicas bem caracterizadas, reduzindo o tempo e o custo de desenvolvimento dos medicamentos. O presente estudo investiga a ação antifúngica do fosfato de dexametasona dissódico um tipo de glicocorticoide cujas principais ações farmacológicas incluem atividade anti-inflamatório, antialérgico e antirreumático. Os testes de sensibilidade foram realizados utilizando o método de microdiluição em caldo (CLSI; M27-A3) e a técnica checkerboard aplicada a biofilmes maduros e em desenvolvimento de duas cepas de *C. albicans*, juntamente com o teste de produção de hifas e análise do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo. Os resultados mostraram atividade do fosfato de dexametasona contra cepas resistentes ao fluconazol (FLC), com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando de 31,25 a 500 µg / mL, enquanto fosfato dissódico de dexametasona e FLC juntas tiveram efeito sinérgico, causando 100% de inibição de todas as cepas em relação ao biofilme em desenvolvimento. Por sua vez, o fosfato dissódico de dexametasona sozinho reduziu a viabilidade celular do biofilme em desenvolvimento em 89%, enquanto o biofilme maduro não mostrou redução quando tratado com o fosfato dissódico de dexametasona sozinho ou em combinação com a FLC. A combinação também causou uma diminuição na produção de hifas e mudanças no nível de despolarização mitocondrial, um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e um aumento na externalização da fosfatidilserina. Além disso, fosfato dissódico de dexametasona interagiu com ALS3 e SAP5, importantes em processos de virulência. O fosfato dissódico de dexametasona apresentou atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol e causou diminuição na produção de hifas, podendo ser considerado um medicamento potencial para auxiliar no combate a infecções fúngicas por *Candida albicans*.

Palavras-chave: Dexametasona, *Candida albicans*, Reposicionamento de Medicamentos, Biofilmes.

ABSTRACT

Much has been discussed recently about fungal infections superficial and thorough has increased significantly and such as consequence end up cause increase of rates of morbidity and mortality of individuals nowadays although increase development of antibiotics, arsenal antifungals found for market for the treatment of fungal infection still low, as soon end up limiting patient's treatment and may cause resistance to strains. Species of the genus *Candida* are the most common opportunistic agents in candidiasis-related fungal infections in species in different groups of immunodeficiency patients. Therefore, drug redirection is an important means of prospecting for new therapeutic alternatives, as these drugs have well-characterized pharmacological and toxicological properties, thus reducing the time and cost of drug development. The present study investigates the antifungal action of dexamethasone sodium phosphate (DEXA), a type of glucocorticoid whose main pharmacological actions include anti-inflammatory, anti-allergic, and anti-rheumatic. Sensitivity tests were carried out using the broth microdilution method (CLSI; M27-A3) and the checkboard technique applied to mature and developing biofilms of two strains of *C. albicans*, along with the hyphal production test and analysis of the mechanism of cell death through flow cytometry. The results showed activity of dexamethasone phosphate (DEXA) against strains resistant to fluconazole (FLU), with minimum inhibitory concentrations (MIC) varying from 31.25 to 500 µg/mL, while DEXA and FLU together had a synergistic effect, causing 100% inhibition of all strains in relation to the developing biofilm. In turn, DEXA alone reduced the cell viability of the developing biofilm by 89%, while the mature biofilm showed no reduction when treated with DEXA alone or in combination with FLU. The combination also caused a decrease in the production of hyphae and changes in the level of mitochondrial depolarization, an increase in the generation of reactive oxygen species, and an increase in the externalization of phosphatidylserine. In addition, it DEXA interacted with ALS3 and SAP5, important in virulence processes. Dexamethasone disodium phosphate showed antifungal activity against strains of *Candida albicans* resistant to fluconazole and caused a decrease in the production of hyphae, so it can be considered a potential drug to help fight fungal infections caused by *Candida albicans*.

Keywords: Dexamethasone, *Candida albicans*, Drug Repositioning, Biofilms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estágios de formação e desenvolvimento do biofilme de <i>Candida albicans</i>	22
Figura 2- Estrutura química do fosfato dissódico Dexametasona.....	31
Figura 3- Atividades do fosfato dissódico dexametasona isolado e associado com fluconazol frente aos biofilmes formados de <i>Candida albicans</i>	43
Figura 4- Atividades do fosfato dissódico dexametasona frente aos biofilmes em formação de <i>Candida albicans</i>	44
Figura 5- ALS3 complexada com Hepta-threonine (A) Fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona(B) Fluconazol (C).....	45
Figura 6- Complexo de interação da Dexametasona com a ALS3.....	47
Figura 7- Sítio de ligação SAP5.....	48
Figura 8- Complexo de interação da Dexametasona com a SAP5.....	49
Figura 9- Avaliação da integridade de membrana em cepa de <i>C. albicans</i> resistente ao FLC tratadas com fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona, fluconazol isolados e em associação.	50
Figura 10- Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em cepa de <i>C. albicans</i> resistente ao FLC tratadas com fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona e fluconazol isolados e em associação.	51
Figura 11- Avaliação da produção de EROs em <i>C. albicans</i> resistente ao fluconazol.	52
Figura 12- Externalização de fosfatidilserina em <i>C. albicans</i> resistentes ao fluconazol após exposição ao fosfato dissódico de dexametasona e fluconazol isolados e em associação.	53
Figura 13- Redução da formação de hifas em <i>C. albicans</i> . A controle; B:Fluconazol; C:Fosfato dissódico de dexametasona; D: Fosfato dissódico de dexametasona + Fluconazol (100X no microscópio óptico).....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Avaliação do efeito antifúngico do fosfato dissódico de dexametasona e do fluconazol (FLC) isolado e em combinação sobre cepas de Candida albicans. O sinergismo foi avaliado pelo método checkerboard para derivação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI). .42	
Tabela 2- Distâncias de resíduos ALS3 Candida albicans	46
Tabela 3- Ligação de Hidrogênio	48
Tabela 4- Interações Hidrofóbicas.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALS3	<i>Agglutinin-like protein 3</i>
ANFO B	Anfotericina B
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CDR	<i>Candida Drug Resistance</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CVV	Candidíase vulvovagina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
E.P.M	Erro Padrão da Média
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FICI	<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>
FITC	Fluoresceína
FLC	Fluconazol
H2DCFDA	Diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína
HEPES	N - (2-Hidroxietil) piperazina-N' - (ácido 2-etanosulfônico)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
LABIMAN	Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas
ITRA	Itraconazol
IND	Indiferente
ITS	<i>Internal Transcribed Spacers</i>
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i>
MTT	Brometo de difeniltetrazólio –[3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio brometo]
NAOH	Hidróxido de Sódio
NACL	Cloreto de Sódio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PH	Potencial Hidrogeniônico

PI	Iodeto de Propídeo
PS	Fosfatidilserina
RH123	Rodamina 123
RMSD	Root Mean Square
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SIN	Sinergismo
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mL
UFC	Universidade Federal do Ceará
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Gênero <i>Candida</i>	17
2.2 Infecções Fúngicas	18
2.3 Fatores de Virulência	20
2.3.2 <i>Proteínas de adesão</i>	20
2.3.3. <i>Biofilmes</i>	21
2.3.4. <i>Resistência Aos Antifúngicos</i>	24
2.4 Candidemia	24
2.5 Antifúngicos	27
2.5.1 <i>Poliênicos</i>	27
2.5.2 <i>Equinocandinas</i>	28
2.5.3 <i>Azólicos</i>	28
2.6 Novas Estratégias Terapêuticas	29
2.7 Fosfato Dissódico Dexametasona	30
3. HIPÓTESES	33
4. OBJETIVOS	34
4.1. Objetivo Geral	34
4.2. Objetivos Específicos	34
5. METODOLOGIA	35
5.1. Fármacos	35
5.2 Recuperação Das Cepas	35
5.3 Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> antifúngicos	35
5.3.1. <i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	35
5.3.2. <i>Teste sinergismo pela técnica de microdiluição em caldo: checkerboard</i>	36
5.3.3. <i>Análise dos dados</i>	36
5.4 Ensaio Para Determinação Da Atividade Em Biofilme Fúngico	36
5.4.1. <i>Crescimento dos isolados de <i>Candida spp.</i> no modo biofilme</i>	36
5.4.2 <i>Determinação da atividade do fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona sobre biofilmes formados de <i>Candida albicans</i></i>	37

5.4.3 Determinação da atividade do fosfato dissódico de dexametasona sobre os biofilmes em formação de <i>Candida albicans</i>	38
5.4.4 Docagem Molecular	38
5.4.4.1 Preparação dos alvos <i>Candida albicans</i>	38
5.4.4.2 Design dos Ligantes.....	38
5.4.4.3 Preparação do Receptor-Ligantes.....	39
5.4.4.4 Identificação da Enzima Alvo.....	39
5.5 Produção De Hifas	39
5.6. Testes Realizados Por Citometria De Fluxo	39
5.6.1. Preparo das suspensões.....	39
5.6.2. Tratamento das células.....	39
5.6.3. Determinação da densidade celular.....	40
5.6.4 Avaliação do potencial de membrana ($\Delta\psi_m$)	40
5.6.5. Detecção de espécies reativas de oxigênio.....	40
5.6.6. Marcação por Anexina V.....	40
5.6.7 Análise dos dados.....	41
6. RESULTADOS	41
6.1 Atividade antifúngica do fosfato dissódico de dexametasona frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol	41
6.2 Efeito da combinação do fosfato dissódico de dexametasona com fluconazol frente a cepas de <i>Candida</i> spp.	41
6.3 Avaliação da atividade antibiofilme do fosfato dissódico de dexametasona frente aos biofilmes de <i>Candida albicans</i>	43
6.3.1 Atividade do fosfato dissódico de dexametasona frente aos biofilmes formados de <i>Candida albicans</i>	43
6.3.2 Atividade do fosfato dissódico de dexametasona frente aos biofilmes em formação de <i>Candida albicans</i>	44
6.4 Avaliação da interação do fosfato dissódico de dexametasona com ALS3 E SAP5 através de docagem molecular	45
6.5 Fosfato dissódico de dexametasona isolado e associado com fluconazol reduziram a integridade da membrana de <i>C. albicans</i> resistente ao fluconazol	50

<i>6.5.1 Despolarização mitocondrial é induzida por fosfato dissódico de dexametasona em C. albicans resistente ao fluconazol.....</i>	<i>51</i>
<i>6.5.2 Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células de C. albicans após exposição ao fosfato dissódico de dexametasona e fluconazol isolados e em associação.....</i>	<i>52</i>
<i>6.5.3 Externalização de fosfatidilserina (PS) em células de C. albicans após exposição ao fosfato dissódico de dexametasona e fluconazol isolados e em associação.....</i>	<i>53</i>
6.6 A formação de hifas é inibida pela presença de fosfato dissódico de dexametasona	54
7. DISCUSSÃO	55
8. CONCLUSÃO.....	60
9. REFERENCIA	61

1. INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Candida* são uma levedura comensal encontrada na microflora da cavidade oral, pele, trato gastrointestinal e na região vaginal. *Candida albicans* pode causar candidíase oportunista sistêmica ou superficial quando a imunidade do hospedeiro é comprometida por quimioterapias de câncer, administração de imunossupressores ou síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). A taxa de mortalidade por candidíase é de aproximadamente 50% porque existem poucas opções farmacoterapêuticas eficazes ou métodos diagnósticos rápidos e eficientes (VERMA; GAFFEN; SWIDERGALL, 2017). Além disso, a resistência adquirida aos antifúngicos está crescendo, o que complica ainda mais o manejo terapêutico (BEARDSLEY et al., 2018).

A candidemia é a quarta infecção da corrente sanguínea associada à assistência à saúde mais frequente e a infecção fúngica grave mais frequente que se desenvolve em pacientes gravemente enfermos em unidades de terapia intensiva (UTI) (BASSETTI et al., 2019). Em um estudo realizado por Kilic et al (2017) foi feita uma análise retrospectiva de 6 anos dos dados pertencentes a pacientes com candidemia internados entre janeiro de 2010 e 2016, no Hospital Universitário Erciyes, um centro de atendimento terciário localizado no Centro da Turquia. No total, 351 pacientes com candidemia foram incluídos. No geral, 48,1% dos episódios de candidemia (169/351) foram causados por *C. albicans*, seguido por *C. parapsilosis* (25,1%), *C. glabrata* (11,7%).

Sobouti et al (2021) realizou um estudo com total de 71 pacientes menores de 18 anos hospitalizados devido a queimaduras, esse estudo de coorte retrospectivo foi realizado no Shahid Motahari Burn Hospital, Teerã, Irã, de janeiro de 2017 a fevereiro de 2019. As hemoculturas mostraram candidemia em 19 pacientes (27%). Com base nos resultados, *C. albicans* foi o fungo mais comumente isolado de pacientes com e sem candidemia.

Recentemente, muito se tem discutido sobre infecções fúngicas superficiais e profundas. O aumento significativo dos casos e as suas consequências resultam em um aumento nas taxas de morbimortalidade dos indivíduos. Na atualidade, a disponibilidade de agentes antifúngicos disponíveis no mercado em relação aos antibióticos ainda é muito baixa. Isso acaba limitando o tratamento do paciente e o uso irracional dos antibióticos pode causar resistência às cepas (CATALDI et al., 2017; VAN DAELE et al., 2019).

O biofilme é um mecanismo que os microrganismos patogênicos e comensais que utilizam para a sua sobrevivência. Pode ser formado em superfícies abióticas e bióticas e são consideradas responsáveis por cerca de 80% das infecções microbianas no corpo. O biofilme de *C. albicans* mostra maior resistência aos azólicos através da regulação positiva das bombas de efluxo que desempenham um papel aditivo em contribuir para a resistência na fase inicial de formação de biofilme. Como para todos os microrganismos capazes de formar biofilmes, as espécies de *Candida* formam um biofilme bem estruturado, que representa um fator chave para a adesão tenaz aos tecidos do hospedeiro, evitando o sistema imunológico e para o desenvolvimento de tolerância a antifúngica (ALVENDAL et al., 2020; ARENDRUP; PERLIN, 2014; SILVA et al., 2009).

Nesse contexto, o redirecionamento de fármacos, pode ajudar na diminuição dos custos no tratamento terapêutico, pois possibilita o aumento do espectro de ação de um medicamento que já se encontra aprovado pela *Food and Drug Administration (FDA)*, e com disponibilidade no mercado (DIMASI et al., 2010; PIERCE et al., 2015). Como exemplo de alternativa terapêutica, Li et al. (2016) observaram que a budesonida, utilizado primordialmente como anti-inflamatória, apresentou atividade antifúngica frente a cepas de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol.

Atualmente, existem estudos demonstrando o potencial efeito antifúngico dos glicocorticóides, dentre eles a fosfato dissódico de dexametasona tanto na sua forma isolada como combinada com o fluconazol, e esses resultados mostraram que a fosfato dissódico de dexametasona potencializa o efeito antifúngico do fluconazol contra cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e o mecanismo sinérgico está relacionado à inibição do efluxo de drogas e à redução da virulência de *Candida albicans* (LI et al., 2016; SUN et al., 2017).

Entretanto, ainda se tem o que investigar sobre a fosfato dissódico de dexametasona como outros mecanismo de ação em cepas resistentes ao fluconazol. Portanto, tendo em vista a importância do redirecionamento de fármacos quanto economia de tempo e dinheiro e a necessidade de buscar novos candidatos que apresentem potenciais antifúngicos, o presente estudo tem como objetivo investigar a ação antifúngica do fosfato dissódico de dexametasona isolado e associado ao fluconazol frente a células planctônicas e em biofilme formado e em formação de cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol. Através de ensaios que utilizam a citometria de fluxo, buscou-se elucidar melhor os possíveis mecanismos de ação do fosfato

dissódico de dexametasona sobre as células fúngicas. Além disso, foi investigado o papel do fosfato dissódico de dexametasona utilizando técnicas de docagem molecular para avaliar a sua interação com a ALS3 e a Sap5 importantes no processo de virulência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* é formado por fungos leveduriformes hialinos, que apresentam duas formas de reprodução: assexuada ou anamorfa, através da formação de blastoconídios, pseudo-hifas e, ocasionalmente, hifas verdadeiras, e sexuadas ou teleomorfa. A primeira documentação de leveduras do gênero *Candida* como patógeno é referida a Langebeck, que em 1839 observou e isolou da cavidade oral de um paciente com afta bucal um microrganismo que atualmente é a mais importante levedura patogênica do homem, *C. albicans* (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Na atualidade as leveduras do gênero *Candida* são classificadas como pertencentes ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, com base no tipo de estrutura reprodutiva, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales*, família *Debaryomycetaceae* (NCBI, 2015). Os métodos microbiológicos clássicos usados para identificar fungos semelhantes a leveduras são demorados e baseados na correspondência de características individuais de culturas e cepas com espécies específicas. A identificação rápida e precisa de microrganismos patogênicos é crucial para um tratamento eficaz. *C. albicans* continua a ser a espécie mais importante entre os fungos semelhantes à levedura patogênicos para as pessoas (MALDONADO et al., 2018; PAWLAK et al., 2021).

Os fungos do gênero *Candida* são parasitas que podem estar presentes na microbiota humana em diversos sítios anatômicos como pele, mucosa bucal, trato gastrintestinal e genitourinário. As espécies do gênero *Candida* são patógenos oportunistas e são conhecidos por causar infecções em hospedeiros imunocomprometidos ou deficientes. Essas infecções podem ser superficiais, afetando a pele ou a membrana mucosa, ou invasivas, que podem ser fatais (PRISTOV; GHANNOUM, 2019; SILVA, 2016).

As espécies de *Candida* são patógenos oportunistas que podem causar doenças que variam desde simples infecções mucocutâneas a fungemia e morte em imunossuprimidos e pacientes hospitalizados. *C. albicans* é considerada a espécie mais associada a infecções em humanos e, portanto, a levedura mais estudada (SILVA et al., 2019).

C. albicans é um dos principais patógenos que causam a condição infecciosa grave conhecida como candidíase. *C. albicans* é uma levedura comensal encontrada na microflora da cavidade oral, pele, trato gastrointestinal e na região vaginal. *C. albicans* pode causar candidíase oportunista sistêmica ou superficial quando a imunidade do hospedeiro é comprometida por

quimioterapias de câncer, administração de imunossupressores ou síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). A taxa de mortalidade por candidíase é de aproximadamente 50% porque existem poucas opções farmacoterapêuticas eficazes ou métodos diagnósticos (VERMA; GAFFEN; SWIDERGALL, 2017).

C. albicans existe em três fases biológicas: levedura, pseudo-hifas e hifas. As hifas, que representam uma fase importante no processo da doença, podem causar danos aos tecidos ao invadir as células epiteliais da mucosa, levando à infecção do sangue. Há evidências suficientes de que esses fungos se encontram na forma de leveduras; ao atingir tecidos mais profundos, se transformam em hifas e/ou pseudohifas, que são formas virulentas do fungo e o critério para a diferenciação entre hifa verdadeira e pseudo-hifa está na observação da formação do tubo germinativo (BARBEDO; SGARBI, 2010; CASSONE, 2015; CHEN et al., 2020).

Mudanças na micromorfologia ocorrem em função da expressão gênica, que se reflete na macromorfologia do desenvolvimento leveduriforme quanto à cor, que pode ser do branco ao creme, e ao aspecto, pastoso, brilhoso ou opaco. O meio de isolamento cromogênico possibilita a identificação presuntiva das espécies do gênero *Candida*, como também facilita o reconhecimento de culturas mistas. Seu princípio é a produção de cor nas colônias, por reações enzimáticas específicas, com um substrato cromogênico do meio. *C. albicans*, constitui, colônias de coloração verde (BARBEDO; SGARBI, 2010; HOUANG et al., 1997).

2.2 Infecções Fúngicas

As doenças fúngicas se tornaram um grande problema médico na segunda metade do século 20, assim os avanços da medicina moderna, somado a epidemia de HIV, resultaram em muitos indivíduos com imunidade prejudicada. As doenças fúngicas são difíceis de controlar porque tendem a ser crônicas, difíceis de diagnosticar e erradicadas com medicamentos antifúngicos (CASADEVALL, 2018).

As doenças fúngicas invasivas continuam sendo a principal causa de morbidade e mortalidade. A escolha do tratamento antifúngico mais adequado depende da identificação da espécie de fungo suspeita, dos fatores de risco que o paciente pode apresentar. Apesar dos avanços e intervenções médicas para melhorar a qualidade de vida das pessoas que estão na terapia intensiva, pessoas com câncer ou imunocomprometidos graves ou outros hospedeiros suscetíveis, às doenças fúngicas invasivas continuam sendo causas graves e subestimadas de doença e morte em todo o mundo (FIRACATIVE, 2020; RUHNKE et al., 2020).*C.*

albicans continua sendo o principal agente etiológico da candidíase, a infecção fúngica invasiva mais comum e agora a terceira a quarta infecção mais frequente em hospitais em todo o mundo (WALL et al., 2020).

A candidemia é uma infecção grave da corrente sanguínea, com taxas de incidência entre um e três episódios/1000 internações, e apresenta taxas brutas de mortalidade superiores a 40% nos hospitais públicos terciários no Brasil. Os estudos epidemiológicos realizados na região mostraram que *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são responsáveis por mais de 80% dos episódios de candidemia e *C. glabrata* por menos de 10% dos casos em hospitais públicos (COLOMBO et al., 2006; DOI et al., 2016; NUCCI et al., 2013).

Em um trabalho realizado por Canela et al. (2018) na unidade de emergência do hospital das clínicas de Ribeirão Preto em São Paulo, no período referente de 2014 a 2015, da totalidade de 79 isolados de *Candida spp.* oriundas de sangue, houve um predomínio das espécies de *C. albicans* (44%), seguido respectivamente por *C. glabrata* (19%), *C. tropicalis* (19%), *C. parapsilosis* (14%) e *C. orthopsilosis* (4%).

2.3 Fatores De Virulência

A virulência se refere especificamente a uma propriedade do patógeno e, de acordo com as definições modernas, virulência é a capacidade de um patógeno de se multiplicar e causar danos ao seu hospedeiro (CASADEVALL, 2007).

Os fatores de virulência expressos ou exigidos pelas espécies de *Candida* e, em particular, *C. albicans*, para causar infecções pode variar dependendo do tipo de infecção que pode ser mucosa ou sistêmica, o local e o estágio da infecção e a natureza da resposta do hospedeiro. No entanto, os fatores de virulência estão envolvidos no processo infeccioso, mas nenhum fator único é responsável pela virulência de *Candida* e nem todos os atributos de virulência expressos podem ser necessários para um determinado estágio da infecção. São sugeridos como atributos de virulência para *C. albicans*, formação de hifas, moléculas de reconhecimento de superfície, troca fenotípica e produção de enzima hidrolítica extracelular foram os mais amplamente estudados nos últimos anos (A CALDERONE; A FONZI, 2001; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

O polimorfismo implica na transição de *C. albicans* de uma forma comensal para uma patológica, o que depende de mudanças no ambiente em que está localizado. É caracterizada pela transição morfológica de blastosporos em hifas, e a forma de transição entre eles são

pseudo-hifa. Fatores que contribuem para o potencial patogênico de *C. albicans* são a expressão de proteínas importantes para adesão e invasão. O processo de adesão é afetado por vários fatores, como os tipos de proteínas da parede celular e as propriedades físicas e químicas da superfície celular (HANAOKA; DOMAE, 2020; NOBLE; GIANETTI; WITCHLEY, 2018; TALAPKO et al., 2021)

Os mecanismos relacionados com estas alterações podem ter evoluído tanto para tolerar situações de estresse no hospedeiro, como para gerar grandes variações genéticas como forma de adaptação a cada microambiente. *C. albicans* é naturalmente sensível aos antifúngicos sistêmicos, mas em alguns casos, principalmente quando há exposição prolongada ao antifúngico (principalmente fluconazol) pode haver a seleção de isolados resistentes (COLOMBO et al., 2013; SELMECKI; FORCHE; BERMAN, 2010).

2.3.1 Capacidade de adesão

A adesão das células de *Candida* é um fenômeno complexo e multifatorial que se baseia na expressão de diversos tipos de adesinas nas superfícies de células modificadas morfológicamente (KHAN et al., 2010). A adesão às superfícies celulares do hospedeiro é influenciada por fatores como a formação do tubo germinativo, disponibilidade de carboidratos, pH, temperatura, produção de fosfolipases, de proteases e de outras enzimas extracelulares (VIDOTTO et al., 2003). Genes altamente expressos codificam fatores de virulência, como enzimas que dissolvem a parede celular e fatores de adesão, como proteases aspárticas secretadas (Saps) e sequência semelhante à aglutinina (Als) que permitem *C. albicans* aderir, invadir e danificar o epitélio células (FAN et al., 2013).

2.3.2 Proteínas de adesão

Um fator que contribui para o processo de virulência é a produção de enzima hidrolítica, que é conhecida por desempenhar um papel central na patogenicidade de bactérias, protozoários e leveduras patogênicas (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

C. albicans, as proteínas da família da sequência semelhante à aglutinina (ALS) família de genes codifica oito glicoproteínas de superfície celular que medeiam a aderência a superfícies bióticas e abióticas e agregação célula-célula. As proteínas Als são críticas para o comensalismo e virulência. Suas atividades incluem fixação e invasão de células endoteliais e epiteliais, morfogênese e formação de biofilmes no tecido do hospedeiro e em cateteres médicos residentes (HO et al., 2019).

Estudos de alguns pesquisadores demonstraram que Als3 atua como um tipo de invasão fúngica ligando-se às proteínas adesivas E- e N-cálcio na superfície da célula hospedeira, mediando os efeitos da endocitose e, em seguida, invadindo a célula hospedeira (KULLBERG et al., 2017; MUSHI et al., 2017). Apesar da existência de outras adesinas, ALS3 desempenha um papel central neste processo. Portanto, essa adesina seria um alvo importante para atenuar a virulência microbiana e, em última análise, aumentar a eficácia de novos compostos antifúngicos (SILVA et al., 2019).

O processo de invasão ativa coincide ser mediado principalmente por proteases aspárticas segregadas (SAPS) (DALLE et al., 2010; MAYER; WILSON; HUBE, 2013) e fosfolipases (A CALDERONE; A FONZI, 2001). A principal ação dos SAPs no processo de invasão aparenta ser a facilitação da penetração das hifas pelas camadas epiteliais. Duas subfamílias SAPs foram destacadas neste processo: SAP4-6, associada à expressão de marcadores de diferenciação de queratinócitos e SAP5, com degradação da caderina E que se encontra presente nas junções interepiteliais (ROLLENHAGEN et al., 2009). A degradação dessa proteína causa alteração estrutural na integridade do tecido, facilitando a invasão por *C. albicans* (VILLAR et al., 2007).

Als3 é específico para hifas e, portanto, está envolvido no processo de invasão e é alvo de estudos recentes (DO AMARAL VALENTE SÁ et al., 2020; HOSSEINI et al., 2019; SEKI et al., 2019). Nos últimos anos, a descoberta de medicamentos antifúngicos tem se concentrado em uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares da infecção fúngica; fatores de virulência, como adesinas de parede celular de fungos (CORTÉS et al., 2019; VILA et al., 2017).

Ter como alvo a etapa inicial do processo de infecção que é a adesão de *C. albicans* à célula hospedeira é uma estratégia promissora, abrindo caminho para novos agentes antifúngicos (MARTIN; KAVANAGH; VELASCO-TORRIJOS, 2021).

2.3.3. Biofilmes

Espécies de *Candida* são patógenos fúngicos que são capazes de persistir dentro do hospedeiro devido ao desenvolvimento de traços de patogenicidade e resistência a múltiplas drogas, muitas vezes levando ao fracasso das estratégias terapêuticas. Uma característica específica da patogenicidade das espécies de *Candida* é sua capacidade de formar biofilmes, que as protegem de fatores externos, como as defesas do sistema imunológico do hospedeiro e

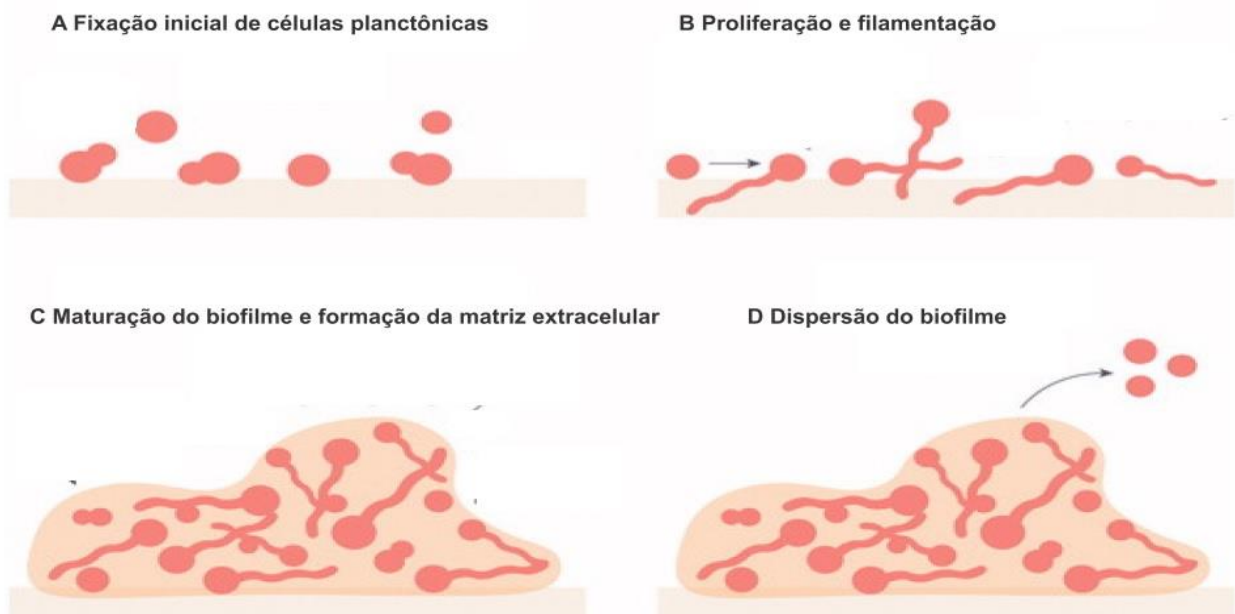
drogas antifúngicas (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). Portanto, há uma necessidade contínua de descoberta de novos agentes antifúngicos que sejam eficazes contra biofilmes de *Candida* (CHAN et al., 2021)

A formação de biofilme representa um modo de crescimento protegido que torna as células bacterianas menos suscetíveis a antimicrobianos e à morte por mecanismos efetores imunológicos do hospedeiro e, assim, permite que os patógenos sobrevivam em ambientes hostis e dispersem e colonizar novos nichos (DEL POZO, 2018).

O desenvolvimento do biofilme é um processo altamente regulado e coordenado, onde as interações adesivas e as conversões morfológicas desempenham papéis significativos. As células dentro dos biofilmes são protegidas de estresses ambientais, incluindo as defesas imunológicas do hospedeiro e o tratamento antifúngico, que trazem consequências clínicas importantes para o tratamento de infecções associadas aos biofilmes (WALL et al., 2020).

O processo de desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* pode ser dividido em quatro fases principais: aderência, proliferação, maturação e dispersão como mostrado na figura 1 (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006; LOHSE et al., 2018).

Figura 1- Estágios de formação e desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans*.



Fonte: (PONDE et al., 2021) (imagem com modificações)

Na fase inicial de aderência, às células de levedura se fixam na superfície do material e formam uma camada basal que fixará o biofilme à superfície. Depois ocorrerá uma fase de proliferação, que é caracterizada pelo início da filamentação levando ao surgimento de células hifais e pseudo-hifais que continuam a se alongar durante todo o processo de desenvolvimento do biofilme, formando uma rede complicada que contribui para a robustez geral do biofilme. Na fase de maturação subsequente, o andaime hifal fica envolto em uma manta de substâncias exopoliméricas (EPS) autoproduzidas que atuam essencialmente como uma cola adesiva que mantém toda a estrutura do biofilme unida. O *C. albicans* EPS é composto de carboidratos, proteínas, lipídios e DNA que interagem entre si conferindo as propriedades de matriz de um amálgama (MITCHELL; ZARNOWSKI; ANDES, 2016; PIERCE et al., 2017). Como parte desse processo de desenvolvimento, os biofilmes de *C. albicans* liberam continuamente células de levedura de uma morfologia alongada única que serve para semear novos locais de infecção. O estágio de dispersão garante que “o ciclo de vida do biofilme” possa ser repetido (UPPULURI et al., 2010). Na maioria das condições experimentais, o processo inteiro normalmente leva de 24 a 48 horas, e um biofilme maduro normalmente tem várias centenas de micrômetros de espessura. De modo geral, considera-se que esta complexidade estrutural representa o arranjo espacial ideal para facilitar o influxo de nutrientes, o descarte de produtos residuais e o estabelecimento de do biofilme temos as transições de *C. albicans* entre os estados planctônico e de biofilme.

Como tal, os biofilmes de *C. albicans* são amplamente considerados um fator de virulência importante e um determinante chave para a alta taxa de mortalidade atribuída à candidíase (RAJENDRAN et al., 2016; TUMBARELLO et al., 2007, 2012). Estimativas recentes do National Institutes of Health indicam que os biofilmes patogênicos são responsáveis, direta ou indiretamente, por mais de 80% de todas as infecções microbianas (NOBILE; JOHNSON, 2016).

O sucesso do tratamento da candidíase pode ser ainda mais dificultado onde há um biofilme estabelecido e as infecções de biomateriais continuam a ser um problema cada vez mais alarmante devido à sua recalcitrância intrínseca à terapia convencional. Portanto, tornou-se crucial explorar estratégias alternativas para superar as limitações das terapias atuais contra infecções fúngicas associadas a biofilme resiliente. Além disso, a capacidade de aderir, como um pré-requisito único para formar um biofilme, é um processo rápido que torna a prevenção

do desenvolvimento de biofilme difícil com as ferramentas e estratégias atuais (TOURNU; VAN DIJCK, 2012).

2.3.4. Resistência Aos Antifúngicos

O limitado arsenal terapêutico é um desafio para os médicos, porque os medicamentos disponíveis são frequentemente tóxicos, caros, difíceis de administrar, ineficazes (BEARDSLEY et al., 2018). Diante desse cenário, o surgimento de resistência é especialmente preocupante. Resistência é um fenômeno que ocorre *in vivo*, e pode estar ou não associada à falha terapêutica. Fatores relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica do antifúngico, bem como aqueles relacionados ao hospedeiro e à espécie causadora da infecção, estão envolvidos nas diferenças que existem entre sensibilidade *in vitro* e resposta clínica ao tratamento (DE ANDRADE NETO et al., 2018; PFALLER; DIEKEMA, 2007; PFALLER; DIEKEMA; SHEEHAN, 2006; SANGLARD; ODDS, 2002). A resistência a antifúngicos acontece quando os isolados não são inibidos pela concentração normalmente utilizada no esquema terapêutico ou quando eles demonstram CIM que se encaixam em intervalos suscetíveis aos mecanismos de resistência, e onde não foi comprovada a confiabilidade em estudos de tratamento. (PFALLER, 2012).

O aumento da incidência de candidemia em hospitais terciários em todo o mundo e a frequência de resistência cruzada exigem o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Esse cenário leva a buscar novos candidatos a drogas antifúngicas capazes de superar os problemas de resistência das espécies de *Candida* (DA SILVA et al., 2014; DE ANDRADE NETO et al., 2018).

Estudos epidemiológicos demonstraram que > 90% das infecções invasivas são causadas por apenas cinco espécies, nomeadamente *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (GUINEA, 2014; PAPPAS et al., 2015). Essas espécies são 32 vezes menos sensíveis ao fluconazol que a *C. albicans*. Também foi observado que mais de uma *Candida spp.* podem ser encontrada em amostras clínicas, especialmente de neonatos. A rápida identificação de *C. albicans* junto a outras espécies levou ao desenvolvimento de novos produtos e técnicas comerciais (SAFAVIEH et al., 2017).

2.4 Candidemia

A infecção invasiva causada por espécies de *Candida* é uma condição associada ao avanço da medicina. As infecções por leveduras do gênero *Candida* são chamadas candidíases

ou candidoses e é amplamente reconhecida como uma das principais causas de morbidade e mortalidades relacionadas com infecções. Existem pelo menos 15 espécies distintas de *Candida* que causam doenças humanas, mas mais de 95% das doenças invasivas são causadas pelos 6 patógenos mais comuns: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e, em algumas regiões, *Candida auris*. As infecções graves causadas por esses organismos são coletivamente chamadas de candidíase invasiva (LACAZ et al., 2012; MCCARTY; WHITE; PAPPAS, 2021).

Dados epidemiológicos das últimas décadas apontam a *Candida* como a quarta maior causa de infecções hospitalares, com cerca de 50% desses casos referidos a *C. albicans*. Tipicamente, a progressão da doença por *C. albicans* é controlada pelo sistema imune inato que identifica um componente na parede celular de *Candida* por meio de receptores Toll-like (TLRs) e receptor de lectinas de carboidratos (CLRs) (SAFAVIEH et al., 2017; ZILBERBERG et al., 2009).

Um estudo publicado por Wille et al., (2013) baseado em uma pesquisa em laboratório onde no total de 388 candidemias foram identificados. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente (42,4%). A resistência ao fluconazol foi encontrada em 2,47% das cepas.

Um estudo multicêntrico publicado por Magill et al., (2014) apresentou que os 183 hospitais nos Estados Unidos mostraram que a candidemia era a etiologia mais comum das infecções de corrente sanguínea associada à assistência à saúde. Em outro estudo Shigemura et al., (2014) fez investigações dos fatores de risco e sensibilidade aos agentes antifúngicos de *C. albicans* e espécies de *Candida não-albicans*, nesse estudo mostra a análise de todos os pacientes com a infecção na corrente sanguínea por *Candida* de 2008 a 2013, examinando fatores como sexo, complicações gerais, condições pós-operatório ou suscetibilidade a agentes antifúngicos. As análises de pacientes com infecção na corrente sanguínea foram 61 pacientes com *C. albicans* e 49 pacientes com *Candida não-albicans*, obtiveram os seguintes resultados a *Candida não-albicans* spp. isolado incluído (49%) *C. parapsilosis*, (29%) *C. glabrata*, (12%) *C. tropicalis*, (4%) *C. guilliermondii*, (2%) *C. stellatoidea*, (2%) *C. krusei* e (2%) outra *Candida* spp. Representando uma taxa significativamente maior de câncer de pacientes com infecção na corrente sanguínea de espécies *Candida não-albicans*, quimioterapia, resistência ao fluconazol e resistência ao itraconazol e menor taxa de doenças cardiovasculares subjacentes e pós-operatórios do que *C. albicans*.

De acordo com Hinrichsen et al., (2008) consideraram a grande variabilidade na epidemiologia de candidemia observada em diferentes serviços médicos e a importância do conhecimento do perfil Microbiológico destas infecções para a definição de medidas de prevenção, controle e tratamento.

No estudo realizado por Fu et al., (2017) revelou que *C.parapsilosis* é atribuído a apenas 1,4% de todos os casos de candidemia neonatal. O estudo mostra um padrão variável de candidemia neonatal entre pacientes infantis. As espécies mais frequentes de *Candida* isoladas da corrente sanguínea foram *C. albicans* (43,5%). Dentre as espécies não *C. albicans* as mais comuns foram *C.glabrata* (33,3%), seguidas de *C.tropicalis* (20,3%). *Candida não-albicans* juntos representavam mais de 55% de toda candidemia.

Estudo retrospectivo realizado por Zheng et al. (2021) mostraram um aumento na incidência de infecções da corrente sanguínea por *Candida* (BSIs) nos últimos 11 anos (1 de janeiro de 2008 e 31 de dezembro de 2018) no Hospital Ruijin em Xangai. Foi encontrado 393 *Candida spp.* Foram isolados, incluindo 141 (35,9%), *C. albicans*, 87, *C. parapsilosis* (22,1%); 69, *C. tropicalis* (17,6%); 48, *C. glabrata* (12,2%); 20, *C. guilliermondii* (5,1%); 8, *C.sake* (2,0%); 5, *C.krusei* (1,3%) e 15, outras espécies. *C. albicans* continua sendo o patógeno mais comum que causa *Candida* BSI. No entanto, nas últimas duas décadas, aumentou a porcentagem de não-*C. albicans Candida spp.* foram relatados em todo o mundo.

Um estudo realizado por Doi et al., (2016) em 16 hospitais no Brasil avaliou a incidência, a distribuição de espécies, a sensibilidade antifúngica e os fatores de risco para infecções da corrente sanguínea devido às espécies de *Candida*. Estudaram um total de 2.563 episódios de infecção da corrente sanguínea nosocomial. A maioria dos pacientes era do sexo masculino, com idade mediana de 56 anos. Um total de 64 pacientes (46,7%) estavam na UTI quando a candidemia ocorreu. As malignidades foram a condição pressuposta mais comum (32%). A taxa de mortalidade bruta de candidemia durante a internação hospitalar foi de 72,2%. Espécies não-*albicans* de *Candida* foram responsáveis por 65,7% dos 137 isolados de levedura. *C. albicans* (34,3%), *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (15,3%) e *C. glabrata* (10,2%) foram as espécies mais prevalentes.

2.5 Antifúngicos

O desenvolvimento de um novo medicamento desde a descoberta até o marketing leva muito tempo e é muito caro (DO AMARAL VALENTE SÁ et al., 2019). As infecções fúngicas são um dos principais contribuintes para as mortes relacionadas com doenças infecciosas em todo o mundo. Em parte, isso se deve à escassez de antifúngicos disponíveis para combater as doenças fúngicas (LEE et al., 2021; XUE; ROBBINS; COWEN, 2020).

A escolha do antifúngico deve levar em consideração o estado imunológico do paciente, as características específicas da candidíase e as características farmacológicas dos antifúngicos disponíveis (administração, metabolismo, eliminação, interações com outros fármacos e toxicidade). Três grandes famílias agrupam os antifúngicos mais comumente usados: polienos (anfotericina B e nistatina), equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e CIMafungina) e azóis. Os azóis constituem o grupo mais extenso, sendo dividido em imidazol (clotrimazol, CIMonazol, cetoconazol etc.) e triazóis (fluconazol, isavuconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol) (LYU et al., 2016; PAPPAS et al., 2015; SCHEIBLER et al., 2017).

2.5.1 *Poliênicos*

A anfotericina B e suas formulações lipídicas são o agente antifúngico poliênico mais comumente usados, com amplo espectro de ação contra leveduras, bolores e certos protozoários. Ele continua sendo um dos antifúngicos mais prescritos para pacientes criticamente enfermos. A formulação inicial foi o desoxicolato de anfotericina B e por muitas décadas foi o único agente de polieno disponível para o tratamento de doenças fúngicas invasivas, mas, apesar de apresentar melhor tolerância das formulações lipídicas, a toxicidade ainda é uma desvantagem, principalmente no que diz respeito à função renal promovendo o desenvolvimento de novas formulações menos tóxicas. Diferentes formulações à base de lipídios foram desenvolvidas, incluindo lipossomas, complexos lipídicos e dispersão coloidal (QUINDÓS et al., 2019; STEIMBACH et al., 2017).

Nistatina e anfotericina B pertencem ao grupo dos poliênicos que pertencem a uma classe de compostos naturais que possuem uma molécula heterocíclica anfipática. Possuem atividade fungicida, ligam-se ao ergosterol da membrana fúngica criando poros que perturbam a integridade da membrana plasmática, permitindo que constituintes citoplasmáticos se fundem resultando na morte celular (GALLIS; DREW; PICKARD, 1990; PEMÁN; CANTÓN; ESPINEL-INGROFF, 2009).

2.5.2 Equinocandinas

As equinocandinas são a única nova classe de medicamentos aprovada para aplicação clínica nas últimas duas décadas. Eles inibem a 1,3- β -d-glucano sintase de forma não competitiva, privando a parede celular do fungo de um componente polimérico integral, levando à indução celular estresse da parede e, eventualmente, morte celular (DENNING; BROMLEY, 2015; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017)

As equinocandinas são mais bem toleradas, mas possuem um espectro antifúngico mais estreito e não possuem uma via de administração oral. Ainda assim, sua atividade fungicida os torna uma arma de primeira escolha contra Espécies de *Candida*. Para certas infecções fúngicas incomuns, antifúngicos como a flucitosina e a terbinafina também podem ser úteis (QUINDÓS et al., 2019).

2.5.3 Azólicos

Os medicamentos tradicionalmente usados nas clínicas não são adequados o suficiente para combater o aumento das infecções fúngicas, especialmente as formas fúngicas resistentes ao fluconazol. Entre os limitados agentes antifúngicos utilizados nas clínicas, os azólicos apresentam o maior número de candidatos a fármacos em ensaios clínicos e são parcialmente comercializados devido ao enfoque particular das empresas farmacêuticas e centros científicos medicinais (SHAFIEI et al., 2020). O fluconazol apresenta um excelente perfil de segurança, adequada absorção no trato gastrointestinal e é efetivo no tratamento de infecções superficiais e sistêmicas por *Candida* spp., incluindo casos de candidíase oroesofágica, candidemia, candidúria e suas complicações. Em relação a *C. krusei*, sabe-se que possui resistência intrínseca e *C. glabrata* possui menor sensibilidade ao fluconazol, nesses casos utiliza-se voriconazol e posaconazol (COLOMBO et al., 2013).

Em casos de pacientes com fatores de risco para infecções por *Candida* spp. o tratamento profilático indicado em alguns casos, pode ser iniciado com fluconazol. Entre os triazóis, fluconazol tem maior penetração no líquido cefalorraquidiano (LCR) e vítreo, por essa razão é constantemente utilizado no tratamento de infecções intraoculares e no sistema nervoso central por *Candida* spp (PAPPAS et al., 2015).

Antifúngicos azólicos têm como mecanismo de ação inibir a biossíntese de ergosterol, interagem com uma enzima fúngica chamada lanosterol-14- α -desmetilase, inibindo a conversão de lanosterol para ergosterol, relevante componente da membrana fúngica. Azólicos são

divididos em dois grupos, os imidazólicos e os triazólicos. O clotrimazol, lançado em 1960, foi o primeiro imidazólico com ação tópica e ainda é usado para candidíase superficial. Os triazólicos estão subdivididos em primeira geração (itraconazol e fluconazol) e segunda geração (voriconazol e posaconazol). Isavuconazol, uma nova segunda geração, ainda está sob investigação clínica (COLOMBO et al., 2013). Os azóis constituem uma classe antifúngica heterogênea, na qual as moléculas mais novas apresentam um espectro de atividade aprimorado. A principal preocupação do clínico ao usar azólicos está relacionada ao manejo de suas muitas interações medicamentosas potenciais em uma população de pacientes frequentemente frágil (QUINDÓS et al., 2019).

As altas taxas de morbidade e mortalidade, a complexidade das estratégias de tratamento, a toxicidade dos medicamentos e a carga mundial de doenças, demonstra uma necessidade de novos e eficientes meios terapêuticos para combater as micoses invasivas (KISCHKEL et al., 2020).

2.6 Novas Estratégias Terapêuticas

O aumento e a crescente prevalência de infecções fúngicas invasivas, a toxicidade e as interações associadas aos antifúngicos atuais, bem como o aumento da resistência, exigem o desenvolvimento de novos antifúngicos (VAN DAELE et al., 2019). A resistência ao arsenal antifúngico atualmente disponível é um problema crescente (WHO, 2019).

Além disso, a maioria dos novos fármacos que surgem no mercado não consegue demonstrar segurança e eficácia através dos ensaios clínicos e, conseqüentemente, não consegue entrar no mercado: a taxa de sucesso é inferior a 10%. Como uma nova abordagem para superar esses obstáculos, algumas empresas farmacêuticas visam analisar e estudar moléculas que já estão no mercado sendo comercializadas a partir de uma perspectiva de redirecionamento de medicamentos (CHA et al., 2018; CLOUT et al., 2019; GNS et al., 2019).

O redirecionamento de fármacos é definido como a exploração da capacidade de uma molécula para tratar doenças em condições diferentes do propósito original pretendido, a fim de promover novos usos para drogas conhecidas. O redirecionamento de medicamentos aumentou nos últimos anos como uma opção atraente para o tratamento de uma série de doenças. Em comparação com aqueles trazidos por meio do desenvolvimento de produtos químicos tradicionais, os medicamentos destinados ao redirecionamento podem entrar no mercado mais

rápido e com menor investimento das empresas farmacêuticas (CLOUT et al., 2019; JUÁREZ-LÓPEZ; SCHCOLNIK-CABRERA, 2021).

Uma das estratégias para superar a resistência antifúngica é a combinação de antifúngicos. Várias técnicas, *in vitro*, são utilizadas para avaliar as interações medicamentosas, como o *checkerboard*, métodos de difusão em ágar e curvas de morte. Atualmente, a técnica mais utilizada é o método *checkerboard* (BIDAUD et al., 2021).

Entre as ferramentas *in silico* existentes em Microbiologia, docagem molecular se destaca pela prospecção de alvos proteicos em microrganismos, bem como de moléculas (ligantes) com alta afinidade com esses alvos (SILVA et al., 2019). Este método pode ajudar a conduzir a pesquisa farmacológica, aumentando o índice correto para uma propriedade terapêutica desejada, com menor toxicidade. Além disso, o computador pode fazer a triagem de moléculas potenciais bem toleráveis antes do laboratório, pré-clínico e clínico a pesquisa pode reduzir custos com material, equipamento e pessoal nas fases iniciais do medicamento descoberta (FREIRES et al., 2017).

2.7 Fosfato Dissódico Dexametasona

Os corticosteróides foram introduzidos na prática médica em 1949 para o tratamento da artrite reumatoide. São agentes que simulam os esteróides hormonais endógenos produzidos no córtex adrenal: o cortisol (glicocorticóide) e a aldosterona (mineralocorticóide) (FIGUEIREDO, 2013).

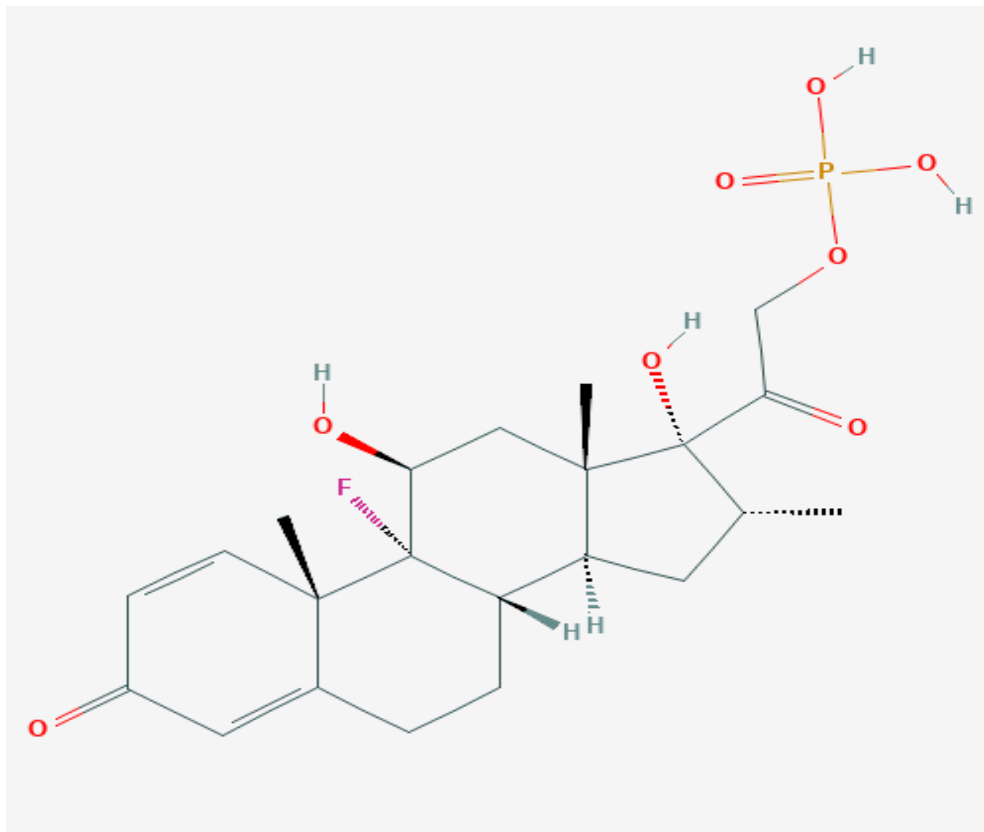
O fosfato dissódico de dexametasona é um tipo de glicocorticóide, e as suas principais ações farmacológicas incluem anti-inflamatória, anti-alérgicas e efeitos anti-reumatismo. Além disso, o fosfato dissódico de dexametasona é amplamente utilizado na prática clínica para infecções graves e choque séptico, nos casos de infecção grave e choque séptico, a aplicação de glicocorticóides será inevitável para a vida do paciente (SHAPIRO; HOWELL; TALMOR, 2005).

Os glicocorticóides são regulados primariamente pela corticotropina (ACTH), enquanto os mineralocorticóides são regulados pelo sistema renina-angiotensina e possuem propriedades de retenção de sal (FIGUEIREDO, 2013).

As formas mais comuns administradas do fosfato dissódico de dexametasona são a dexametasona base, acetato de dexametasona e fosfato dissódico de dexametasona. O fosfato

dissódico de dexametasona base é um pó cristalino branco, ou quase branco, e é utilizado como injetável, devido à baixa solubilidade em água. Este pró-fármaco é hidrolisado rapidamente pelas fosfatases na sua forma ativa dexametasona. As estruturas moleculares do fosfato dissódico de dexametasona podem ser observadas na Figura 2 (ARSAND, 2010; ZHANG et al., 2011).

Figura 2- Estrutura química do fosfato dissódico dexametasona



FONTE: PUBCHEM

É intrigante que, como um tipo de imunossupressor, embora o fosfato dissódico de dexametasona não tenha sido comumente recomendado para tratamento clínico de anti-infecção, mas estudos anteriores mostraram que os glicocorticoides podem amenizar os sintomas de uma infecção grave como importante anti-inflamatório (MORRELL; CIMEK; KOLLEF, 2009; SPRUNG et al., 2009).

Atualmente existem estudos demonstrando o potencial efeito antifúngico dos glicocorticoides, dentre eles a fosfato dissódico de dexametasona tanto na sua forma isolada

como combinada com o fluconazol, e esses resultados mostraram que a fosfato dissódico de dexametasona potencializa o efeito antifúngico do fluconazol contra cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e o mecanismo sinérgico está relacionado à inibição do efluxo de drogas e à redução da virulência de *C.albicans* (LI et al., 2016; SUN et al., 2017).

3. HIPÓTESES

3.1. Fosfato dissódico de dexametasona apresenta atividade antifúngica frente a cepas de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol.

3.2. Fosfato dissódico dexametasona apresenta atividade, *in vitro*, contra biofilme de cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol.

3.3. Fosfato dissódico de dexametasona apresenta efeito sinérgico quando associado ao fluconazol frente a cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol.

3.4. Fosfato dissódico de dexametasona não apresenta atividade antifúngica, atividade, *in vitro*, contra biofilme frente a cepas de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito antifúngico do fosfato dissódico de fosfato dissódico de dexametasona frente a cepas clínicas de *Candida albicans* resistentes ao fluconazol tanto na forma planctônica como de biofilme.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) isolada e em combinação do fluconazol e do fosfato dissódico de dexametasona frente a cepas de *Candida albicans*;

4.2.2. Avaliar a atividade do fosfato dissódico de dexametasona frente ao biofilme formado e em formação de cepas de *Candida albicans*;

4.2.3. Verificar a interação do fosfato dissódico de fosfato dissódico de dexametasona com ALS3 e Sap5 através de técnicas de docagem molecular.

4.2.4. Investigar o provável mecanismo de ação antifúngico do fosfato dissódico de fosfato dissódico de dexametasona através de citometria de fluxo.

5. METODOLOGIA

5.1. Fármacos

Os fármacos utilizados neste estudo foram o glicocorticoide fosfato dissódico de dexametasona e o antifúngico fluconazol (FLC) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). DEXA foi testada na faixa de 3,90-2000 $\mu\text{g/mL}$ e o FLC na faixa de 0,125-128 $\mu\text{g/mL}$.

5.2 Recuperação Das Cepas

Para este estudo foram utilizadas 12 cepas de *Candida albicans*, isoladas de amostras biológicas. Como controle foram utilizadas a cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e a de *C. Krusei* ATCC 6528. Todas as cepas pertencem à micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Primeiramente, as cepas foram ressuspensas em caldo Sabouraud (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a 35 °C. No dia seguinte, foram semeadas em Sabouraud dextrose ágar (HiMedia, Mumbai, Índia) e em meio cromogênico HiCrome *Candida* Differential Agar (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a 35 °C para avaliar a viabilidade e pureza das colônias (DA SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014). Todo o procedimento foi realizado sob normas de biossegurança nível 2.

5.3 Testes de sensibilidade *in vitro* antifúngicos

5.3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O teste de sensibilidade foi realizado pela técnica de Microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A3 20 usando meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell-Embriolife, São Paulo, Brasil) (pH 7,0 \pm 0, 1) tamponado com 0,165 M acidoforoprodinopropano sulfônico (MOPS) (Sigma, EUA). Para os testes, 96 poços placas de fundo foram usados. A partir de uma cultura de 24 horas dos isolados a serem testados, uma inicial suspensão de inóculo foi preparada de acordo com a escala 0,5 de McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Diluições em série foram então realizadas em meio RPMI para obter inóculo final contendo 0,5 a 2,5 $\times 10^3$ UFC / mL. Um volume de 100 μL desta suspensão padronizada foi adicionado contendo o agente antifúngico. As CIMroplacas foram incubadas por 24 horas a 35 ° C (\pm 2 ° C) e depois disso a leitura visual foi realizada. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a mais baixa concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento do CIMorganismo, para fluconazol e fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona., A fim de avaliar a ocorrência de resistência ao fluconazol, o seguinte ponto de corte foi considerado:

CIM ≥ 8 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Todo o experimento foi realizado em triplicata e cepas de controle foram usados: *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

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

Posteriormente a determinação do CIM de cada droga isolada foi executada a técnica do *checkerboard* (ENDO, 2007; ODDS, 2003). Nesta técnica, cada poço contém uma combinação única de diferentes concentrações das drogas testadas, no qual se determina o percentual de inibição do crescimento das células na presença de diferentes combinações das drogas em relação ao poço controle. Assim as cepas foram expostas a concentrações variadas de FLC combinado com concentrações variadas de DEXA. A avaliação da interação entre FLC e DEXA foi determinada através do cálculo da *Fractionary Inhibitory Concentration* (FICI) ($\text{FICI} = [\text{FC}]/\text{CFS} + [\text{AC}]/\text{AS}$). A interpretação foi realizada de acordo com o valor de FICI. $\text{FICI} \leq 0,5$ - (SIN); $0,5 < \text{FICI} \leq 4,0$ -indiferente (IND) e $\text{FICI} > 4,0$ -antagonismo (ANT). Em todos os testes foram utilizadas as cepas controle: *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 (DA SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2019).

5.3.3. Análise dos dados

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

5.4 Ensaios Para Determinação Da Atividade Em Biofilme Fúngico

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

Os testes de suscetibilidade antifúngica dos biofilmes foram realizados a partir da metodologia apresentada por Pierce et al., (2008), com pequenas alterações. As cepas de *C. albicans* foram semeadas em agar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 horas. Em seguida, as cepas de *Candida albicans* foram suspensas em 5 mL de meio YNB (Yeast Nitrogen Base, Sigma-EUA) e reincubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e lavadas com PBS. Esse procedimento foi repetido três vezes. Em seguida foi feita uma suspensão com o padrão 0,5 da escala McFarland em meio RPMI. Em seguida, foram dispensados 200 μL do inóculo em uma placa de 96 poços fundo chato. No poço 12 adicionou-se somente RPMI como controle de esterilidade. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. No dia seguinte, o sobrenadante foi aspirado e a placa foi lavada delicadamente com PBS por três vezes para remoção das células não aderentes.

5.4.2 Determinação da atividade do fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona sobre biofilmes formados de *Candida albicans*

O fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona foi testado em concentrações variando de 31,25 a 1000 µg / mL e fluconazol foram testados em concentrações que variaram de 1 a 512 µg / mL. Foi utilizado um controle de 100% de crescimento celular (suspensão de células RPMI sem fármaco). As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 h. Após este período, o fármaco foi aspirado e a placa lavada com PBS por três vezes. Em seguida, adicionou-se o corante de viabilidade celular brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difenil tetrazólio (MTT) (1 mg/mL) (Sigma, USA). Após incubação de 18 a 20 horas no escuro, o corante foi removido, os poços lavados 3x com PBS e adicionado DMSO (200 µL). Após 15 minutos, retirou-se 100 µL de cada poço e transferiu-se para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de CIMroplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata em dias diferentes.

5.4.3 Determinação da atividade do fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona sobre os biofilmes em formação de *Candida albicans*.

Para avaliar a atividade do fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona frente ao biofilme ainda em formação foram utilizadas duas cepas de *Candida albicans*. O fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona foi utilizado nas concentrações de CIM/2, CIM, 2x CIM e 4x CIM. As cepas de *Candida albicans*. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 h. Em seguida, as leveduras foram suspensas em 5 mL de meio YNB e reincubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas com PBS por três vezes. As células foram ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI. Em seguida, foram dispensados 100 µL do inóculo e 100 µL da droga em uma placa de 96 poços de fundo chato. No poço 12 adicionou-se somente RPMI como controle de esterilidade. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h. No dia seguinte, o sobrenadante foi aspirado e a placa foi lavada delicadamente com PBS por três vezes. Para se verificar a viabilidade celular foi utilizado o corante brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difenil tetrazólio (MTT) (1 mg/mL) (Sigma, USA). Após incubação de 18 a 20 horas no escuro, o corante foi removido, os poços lavados 3 vezes com PBS e adicionado 200 µL DMSO. Após 15 minutos, retirou-se 100 µL de cada poço e transferiu-se para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de CIMroplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. A redução de crescimento foi comparada ao poço que corresponde a 100% de crescimento, livre de fármacos (PIERCE et al., 2008). Os ensaios foram realizados em triplicata em dias diferentes.

5.4.4 Docagem Molecular

Com a intenção de estudar a natureza das interações, modo de ligação e seletividade da interação entre o fosfato dissódico de dexametasona e a proteína adesina ALS3 de *Candida albicans*, foi usada a técnica de Docagem Molecular, é uma previsão *in silico* associada à *computational virtual high-throughput screening* (vHTS) com uma abordagem econômica de recursos para identificação de moléculas bioativas (ZHENG et al., 2018), uma sequência de algoritmos que desempenham uma simulação de encaixe molecular, tendo como base a teoria de campo de força clássico (FERREIRA et al., 2015).

5.4.4.1 Preparação dos alvos *Candida albicans*

As estruturas cristalinas de ALS3 complexadas com hepta-treonina (hepta-Thr) e SAP5 complexadas com pepstatina A (pepA), inibidor clássico da proteinase aspártica, foram selecionadas usando os códigos PDB 4LEB e 2QZX no Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), onde são depositados com resolução de 1,4 Å e 2,5 Å respectivamente e determinados a partir da difração de raios-X 28, 29. No processo de preparação das enzimas *Candida albicans* ALS3 e SAP5 os resíduos presentes nas estruturas das proteínas foram removidos e hidrogênio polar 30, 31 foi adicionado.

5.4.4.2 Design dos Ligantes

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

5.4.4.3 Preparação do Receptor-Ligantes

No preparo da ALS3, o ligante hepta-threonine e as moléculas de água foram removidas da proteína original e os hidrogênios polares foram adicionados a enzima gerando o arquivo PDBQT por meio do AutoDockTools, sendo o arquivo usando o formalismo do algoritmo genético lamarckiano disponibilizado no código AutodockVina (TROTT; OLSON, 2009). As estruturas flexíveis do fosfato dissódico de dexametasona e fluconazol também foram preparadas no AutoDockTools.

5.4.4.4 Identificação da Enzima Alvo

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

5.5 Produção De Hifas

As células de *C. albicans* foram incubadas por 24 horas, e em seguida diluídas em Meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) e Glicose a 2%, com ou sem adição do fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona em diferentes concentrações. Após 16 h de incubação foi visualizado no microscópio OLYMPUS BX41TF (CALDARA; MARMIROLI, 2018).

5.6. Testes Realizados Por Citometria De Fluxo

5.6.1. Preparo das suspensões

As suspensões celulares foram preparadas a partir de culturas em fase de crescimento exponencial. As células serão colhidas, centrifugadas (1600 g por 10 min a 4°C) e lavadas duas vezes com uma solução salina 0.85% (1200 g por 5 min a 4°C), e então ressuspensas ($\sim 10^6$ células/mL) com tampão HEPES suplementado com glicose 2%, pH 7.2 (Adaptado de (DA SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

5.6.2. Tratamento das células

Para a determinação da densidade de células, a integridade da membrana, medição do potencial transmembrana mitocondrial, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos no DNA, as estirpes resistentes ao fluconazol serão expostas a concentrações variadas (CIM e 2x CIM) do composto em estudo a 37° C durante 24 h (Adaptado de (DA SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

5.6.3. Determinação da densidade celular

A morfologia celular e a integridade de membrana foram avaliadas pelo método de exclusão com iodeto de propídio (2µg/mL). A fluorescência celular será então determinada pelo citômetro de fluxo GuavaEasyCyte™ Mini System Cytometer (Guava Technologies, Inc., Industrial Blvd. Hayward, CA, USA) e o software CytoSoft 4.1 (DA SILVA et al., 2013).

5.6.4 Avaliação do potencial de membrana ($\Delta\psi_m$)

O potencial transmembrana mitocondrial foi determinado pela retenção do marcador rodamina 123 pelas células das leveduras após a exposição aos tratamentos propostos anteriormente, conforme descrito por (DA SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

5.6.5. Detecção de espécies reativas de oxigênio

As células foram incubadas com Diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) por 30 min no escuro a 37°C. Em seguida, as células serão colhidas, lavadas e ressuspensas em PBS e analisadas imediatamente por citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System) (DA SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

5.6.6. Marcação por Anexina V

Após tratamento, protoplastos de *Candida* spp. foram marcados com Anexina V e PI (iodeto de propídeo) utilizando um kit de detecção de apoptose (Guava Nexin Kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA). Subsequentemente, as células foram incubadas em tampão de ligação contendo FITC-anexina. As células foram depois analisadas no citômetro de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). Para cada experimento (n = 2), 10000 eventos serão avaliados, e os debris celulares serão omitidos da análise (DA SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

5.6.7 Análise dos dados

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

6. RESULTADOS

6.1 Atividade antifúngica do fosfato dissódico de dexametasona frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol

A concentração inibitória mínima (CIM) das cepas em estudo foi determinada através da técnica de Microdiluição em caldo. De acordo com a Tabela 1, o CIM das cepas variou de 128-1 µg/ mL para o fluconazol sendo 6 cepas sensíveis e 8 cepas resistentes, O ponto de corte considerado para resistência ao fluconazol foi: $CIM \geq 8 \mu\text{g} / \text{mL}$. DEXA apresentou atividade antifúngica em todas as cepas testadas com CIM variando de 31,25 – 500 µg/ mL (Tabela 1).

6.2 Efeito da combinação do fosfato dissódico de dexametasona com fluconazol frente a cepas de *Candida* spp.

Em relação à interação da DEXA com o FLC, foi observado sinergismo em 100% dos isolados testados ($FICI \leq 0,5$). O CIM do fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona variou de 0,97 a 125 µg/mL quando combinado ao fluconazol, apresentando uma redução de até 500 vezes quando comparado a sua concentração isolada. O CIM para o fluconazol variou de 0,0078 a 16 µg/mL (Tabela 1).

Tabela 1- Avaliação do efeito antifúngico do fosfato dissódico de dexametasona (DEXA) e do fluconazol (FLC) isolado e em combinação sobre cepas de *Candida albicans*. O sinergismo foi avaliado pelo método checkerboard para derivação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI).

Cepa	ORIGEM	Valores de CIM ^a (µg/mL) Isolado		Valores de CIM ^b (µg/mL) Associado			Interpretação
		DEXA	FLC	DEXA	FLC	FICI	
<i>C.albicans</i> 1*	SANGUE	500	64	0,97	0,125	0,003	SIN
<i>C.albicans</i> 2*	SANGUE	62,5	64	15,62	8	0,2	SIN
<i>C.albicans</i> 3	SANGUE	500	2	0,244	0,25	0,007	SIN
<i>C.albicans</i> 4*	SANGUE	125	64	0,488	0,25	0,007	SIN
<i>C.albicans</i> 5	SANGUE	62,5	64	1,953	2	0,06	SIN
<i>C.albicans</i> 6	SANGUE	250	1	7,812	0,0312	0,06	SIN
<i>C.albicans</i> 7	SANGUE	500	2	125	0,5	0,5	SIN
<i>C.albicans</i> 8	URINA	125	64	1,953	0,0078	0,007	SIN
<i>C.albicans</i> 9	URINA	125	2	3,906	0,0625	0,062	SIN
<i>C.albicans</i> 10	CVV	31,25	128	3,906	0,125	0,12	SIN
<i>C.albicans</i> 11	CVV	62,5	2	0,976	0,0312	0,03	SIN
<i>C.albicans</i> ATCC 14053		62,5	64	15,62	2	0,12	SIN
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		62,5	2	0,244	0,5	0,01	SIN
<i>C. krusei</i> ATCC 6258		250	32	3,906	16	0,2	SIN

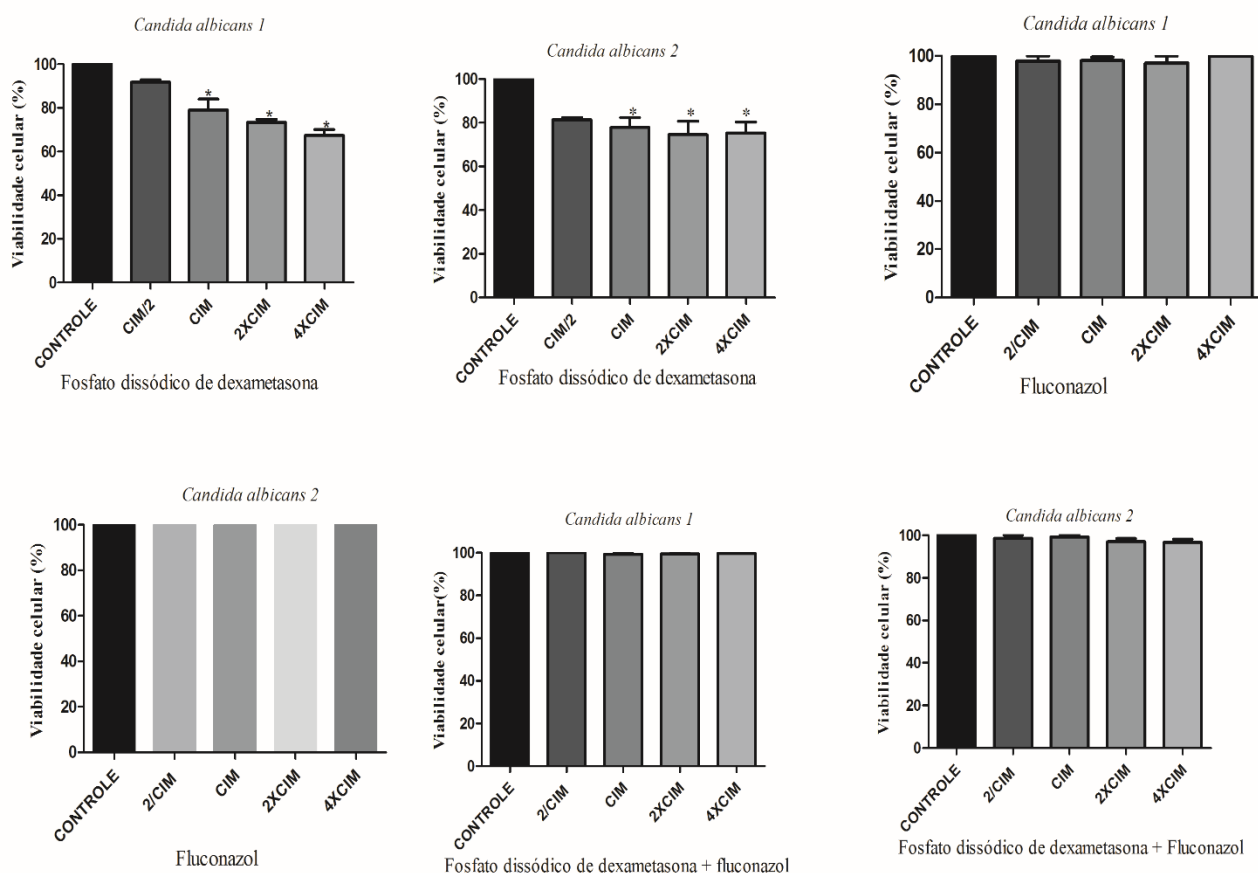
^a A CIM foi aquela capaz de promover 50% de redução do crescimento fúngico após 24 horas, de acordo com o documento M27 A3 do CLSI. Os valores de CIM são médias geométricas e foram obtidos a partir de experimentos realizados em triplicatas. ^b Combinação do fosfato dissódico de fosfato dissódico de dexametasona com fluconazol. (*) Cepa selecionada para os experimentos utilizando experimentos de citometria de fluxo e biofilme. ^c SIN: sinergismo

6.3 Avaliação da atividade antibiofilme do fosfato dissódico de dexametasona frente aos biofilmes de *Candida albicans*.

6.3.1 Atividade do fosfato dissódico de dexametasona frente aos biofilmes formados de *Candida albicans*.

Após verificar a atividade da DEXA, foi avaliado sua atividade frente aos biofilmes formados de *Candida albicans*. DEXA isolado apresentou atividade significativamente estatísticas frente a biofilmes formados nas cepas testadas de *C. albicans* nas concentrações de CIM/2, CIM, 2x CIM e 4x CIM o fluconazol não apresentou efeito sobre biofilmes de *C. albicans* quando comparado ao controle (Figura 3). O fosfato dissódico de dexametasona associado ao fluconazol também não apresentou atividade frente a biofilmes formados de *C. albicans* em nenhuma das combinações testadas (Figura 3).

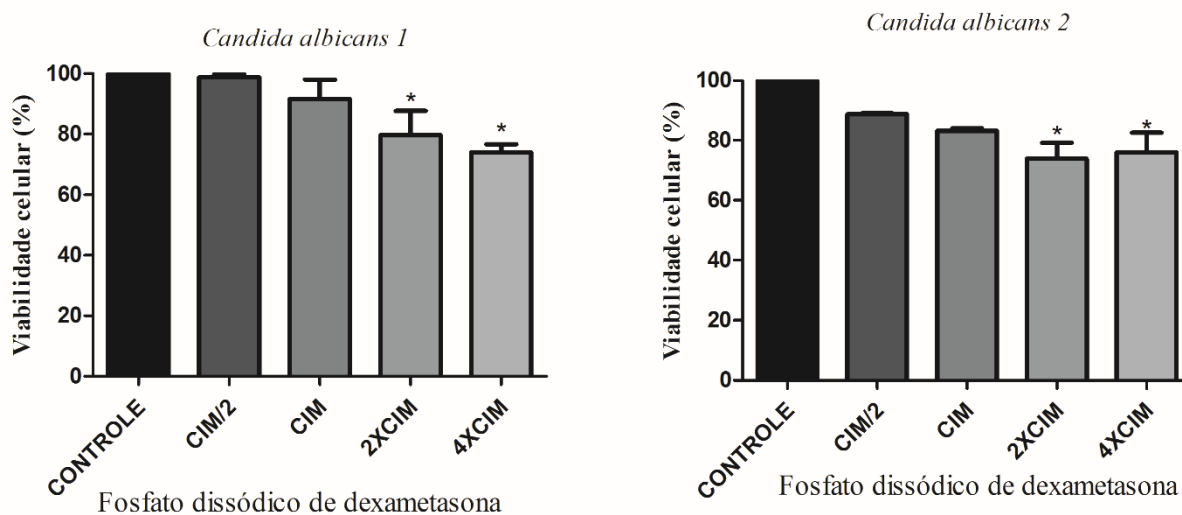
Figura 3- Atividades do fosfato dissódico dexametasona isolado e associado com fluconazol frente aos biofilmes formados de *Candida albicans*.



6.3.2 Atividade do fosfato dissódico de dexametasona frente aos biofilmes em formação de *Candida albicans*.

A atividade do fosfato dissódico de dexametasona isolado frente aos biofilmes em formação de *Candida albicans* apresentou uma diminuição discreta interferindo na formação do biofilme variação de 89% a 67% da viabilidade celular sendo capaz de inibir o biofilme nas cepas testadas. (Figura 4).

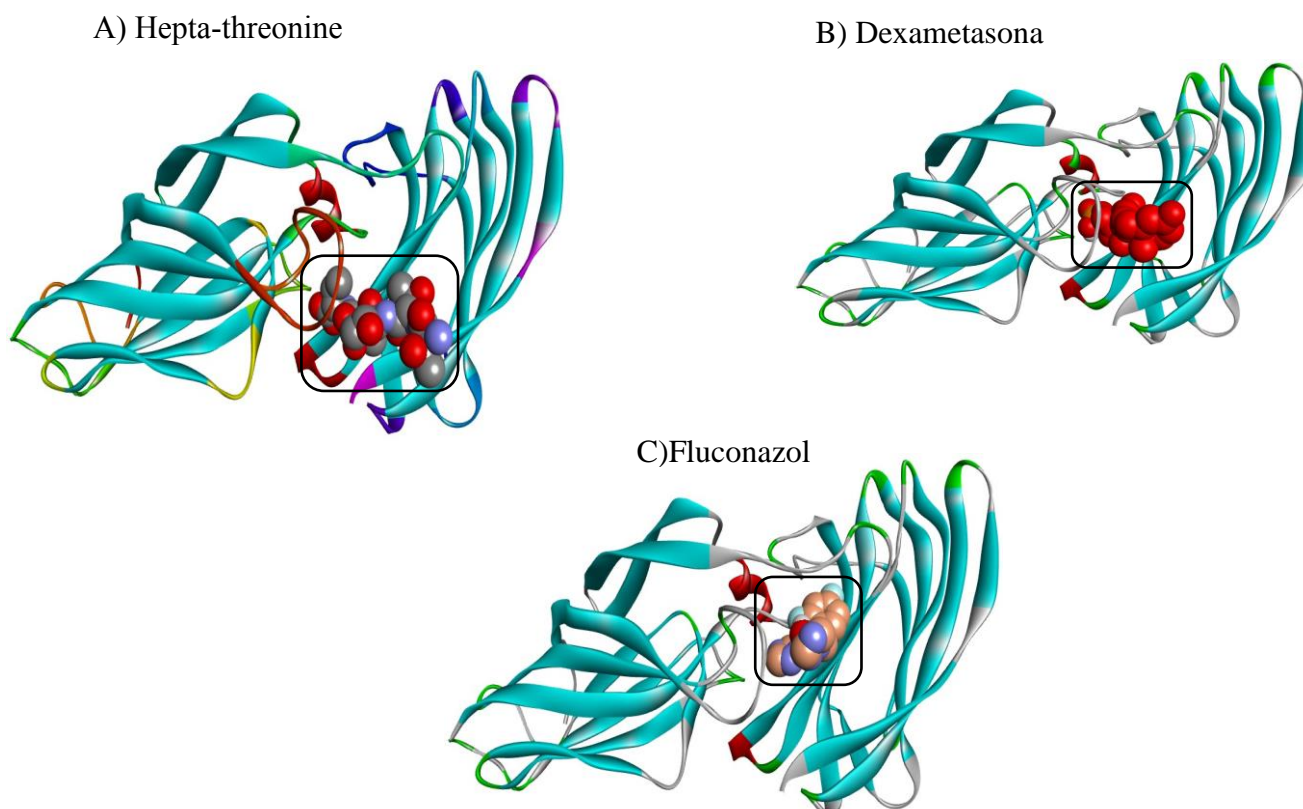
Figura 4- Atividades do fosfato dissódico dexametasona frente aos biofilmes em formação de *Candida albicans*.



6.4 Avaliação da interação do fosfato dissódico de dexametasona com ALS3 E SAP5 através de docagem molecular

Os valores de RMSD (Root Mean Square Deviation) e energia de afinidade são utilizados a partir do acoplamento molecular para a seleção das melhores conformações de docagem. Os resultados revelaram que o fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona e fluconazol apresentaram energia de ligação com variação de -7.6 kcal/mol a -6.1 kcal/mol, e RMSD variando de 1.744 Å para o fluconazol a 1.689 Å para o fosfato dissódico de dexametasona, ambos os valores estão dentro dos parâmetros de acoplamento molecular. Além de apresentar interações com os resíduos do sítio ativo do inibidor hepta-threonine, duas interações fortes do tipo ligação de Hidrogênio com a Ser170 e uma interação hidrofóbica com o resíduo Trp295. Na Figura 5, temos o docagem comparativo entre DEXA, FLC e adesina ALS3 de *Candida albicans* e destacada em (B), pode-se observar a DEXA acoplado na mesma região do ligante complexado na ALS3 (hepta-threonine), (C) o acoplamento do fluconazol próximo a hepta-threonine e em (A) ALS3 complexada com Hepta-threonine.

Figura 5- ALS3 complexada com Hepta-threonine (A) Fosfato dissódico de dexametasona (B) Fluconazol (C)



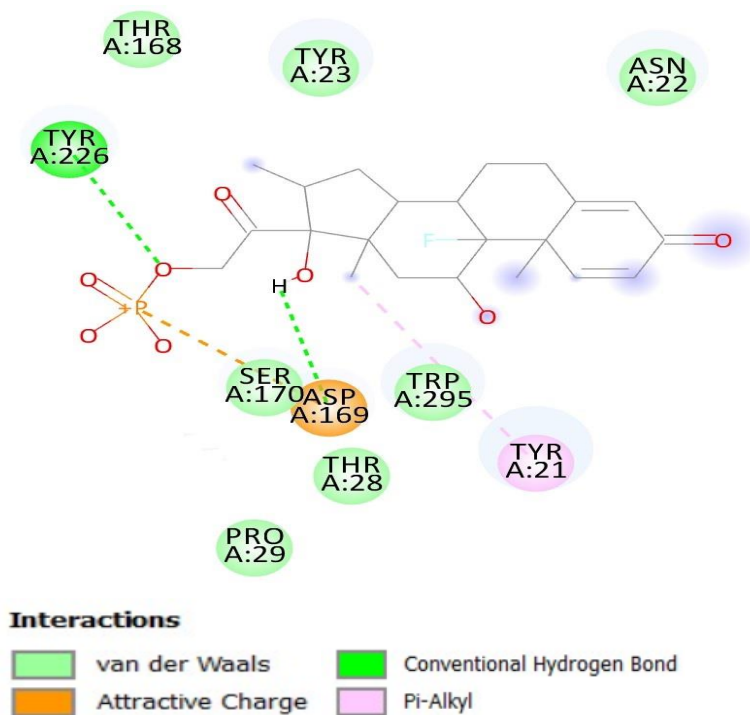
Quando analisado as distâncias do fosfato dissódico de dexametasona e os resíduos de aminoácido, foi possível observar que DEXA ficou na mesma região da hepta-threonine, ficando próximos ao resíduo Ser 170(tríade catalítica) e do resíduo de aminoácido que tem papel de adesão (Lys59), assim como de resíduos pertencentes ao PBC (Trp295, Gly297, Pro29 e Thr61), ficando a uma distância menor que o fluconazol nos resíduos Ala 116, Ser 170 e Lys 59 (Tabela 2).

Tabela 2- Distâncias de resíduos ALS3 *Candida albicans*

Resíduo	Fosfato dissódico de dexametasona	Fluconazol	Hepta-threonine
Ala19	6.75 Å	8.1 Å	3.8 Å
Pro29	4.49 Å	6.4 Å	4.1 Å
Lys59*	4.30 Å	8.5 Å	2.6 Å
Ala116*	6.02 Å	9.1 Å	5.4 Å
Ser170*	*2.13Å *3.08 Å	4.3 Å	3.3 Å
Leu293	6.62 Å	7.3 Å	4.6 Å
Trp295	* 3.19 Å	4.5 Å	4.1 Å
Gly297	7.31 Å	9.8 Å	3.5 Å

Analisando as interações intermoleculares da DEXA com a ALS3 de *Candida albicans*, foram encontradas três interações com a DEXA, Ser 170, Trp 295(van der Waals), Tyr226 (Conventional hydrogen bond) e Asp169 (Attractive charge). Isso demonstra um forte indicativo que a fosfato dissódico de dexametasona possui a capacidade de interagir com o sítio da Hepta-Treonina mais fortemente que o Fluconazol. (Figura 6).

Figura 6- Complexo de interação do fosfato dissódico de dexametasona com a ALS3



Em relação ao resultado do sítio de ligação SAP5 a figura 7 mostra que o fosfato dissódico de dexametasona apresentou uma energia de afinidade um pouco superior à do FLC, na ordem de -7,1 Kcal/mol, no entanto ficou distante do sítio do inibidor Pepstatin A. Com relação às interações apresentou 4 interações fortes do tipo ligação de Hidrogênio (Tabela 3) com os resíduos ALA578, ARG 546 da cadeia B e com os resíduos SER 165 e THR166 da cadeia A e duas interações Hidrofóbicas, uma com o resíduo Tyr333 da cadeia A e com a TRP577 da cadeia B (Tabela 4). Estes resultados são um forte indicativo que fosfato dissódico de dexametasona possui a capacidade de interagir com a SAP5, no entanto em uma região diferente do fluconazol e do inibidor PEPSTAIN, sugerindo assim a possibilidade de efeito sinérgico com Fluconazol. Na Figura 8 também foi possível observar uma interação tipo Halogênio Bond com o resíduo TYR332 da cadeia A.

Figura 7- Sítio de ligação SAP5

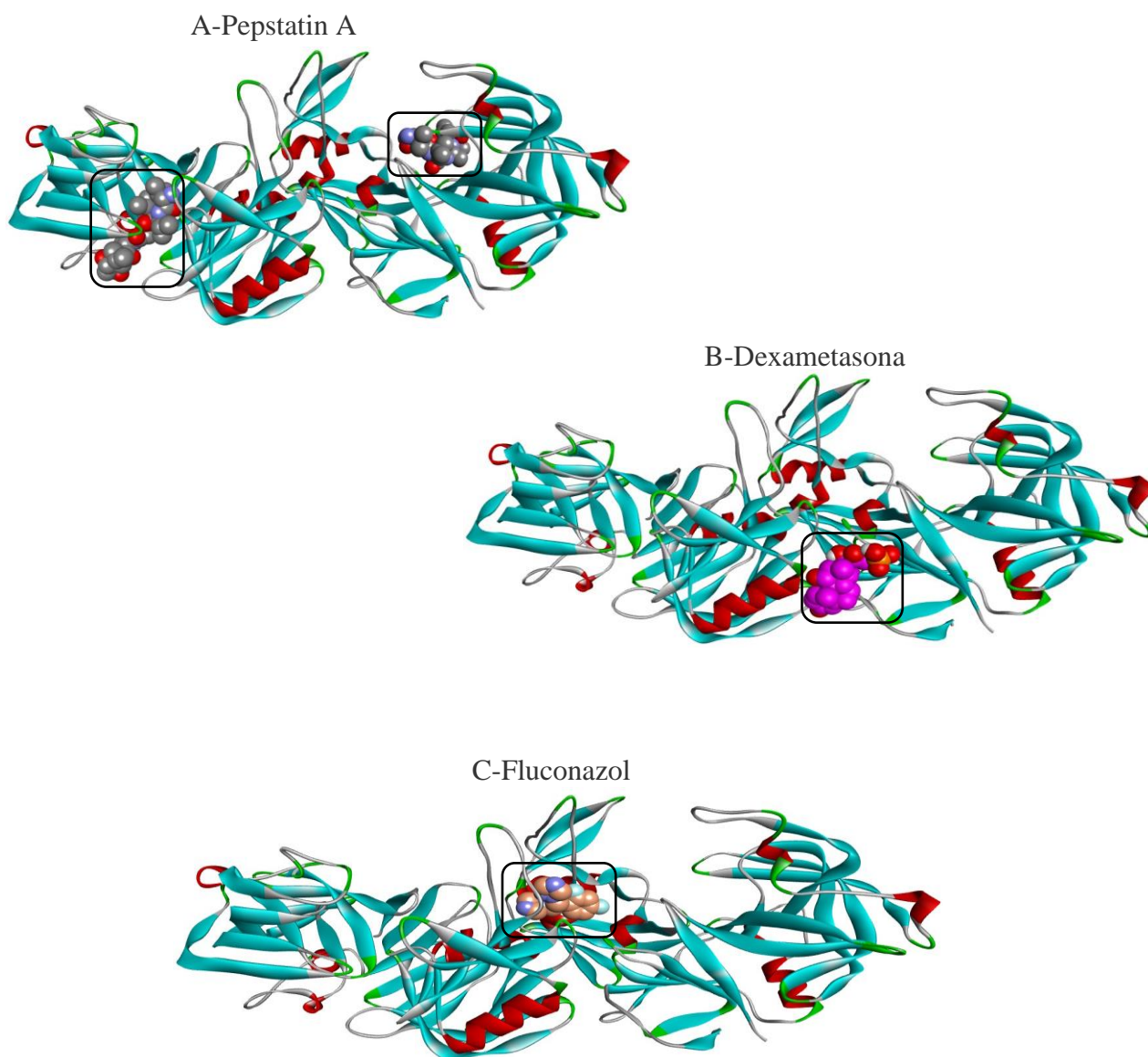


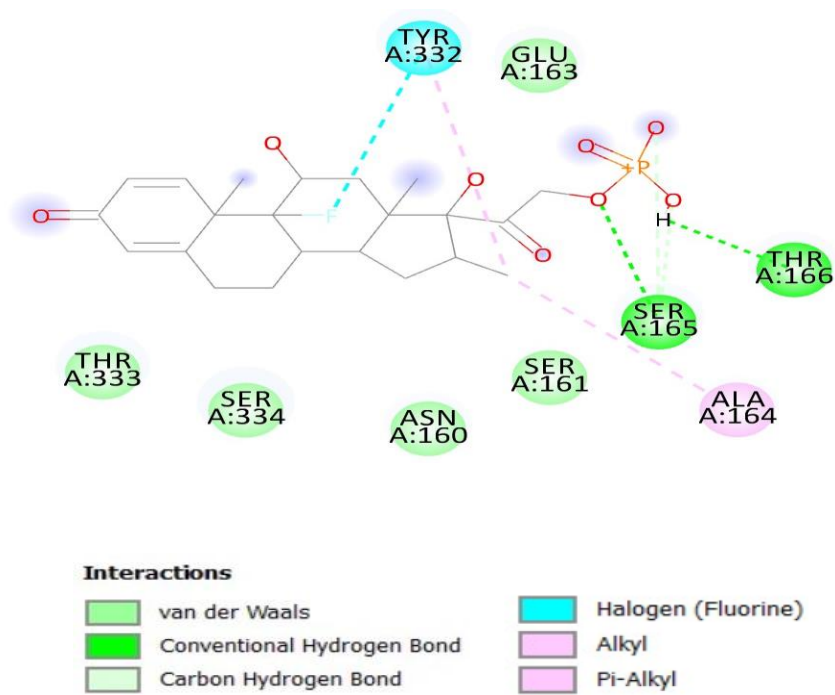
Tabela 3- Ligação de Hidrogênio

Resíduo	AA	Distance H-A	Classificação	Donor Atom	Acceptor Atom
165A	SER	2.55	Forte	1578 [Nam]	24 [O3]
166A	THR	1.97	Forte	30 [O3]	1592 [O3]
546B	ARG	2.67	Forte	1609 [Nam]	27 [O3]
578B	ALA	2.13	Forte	28 [O3]	5499 [O2]

Tabela 4- Interações Hidrofóbicas

Resíduo	AA	Distância	Ligand Atom	Protein Atom
333A	TYR	3.82	18	3192
577B	TRP	3.51	20	5491

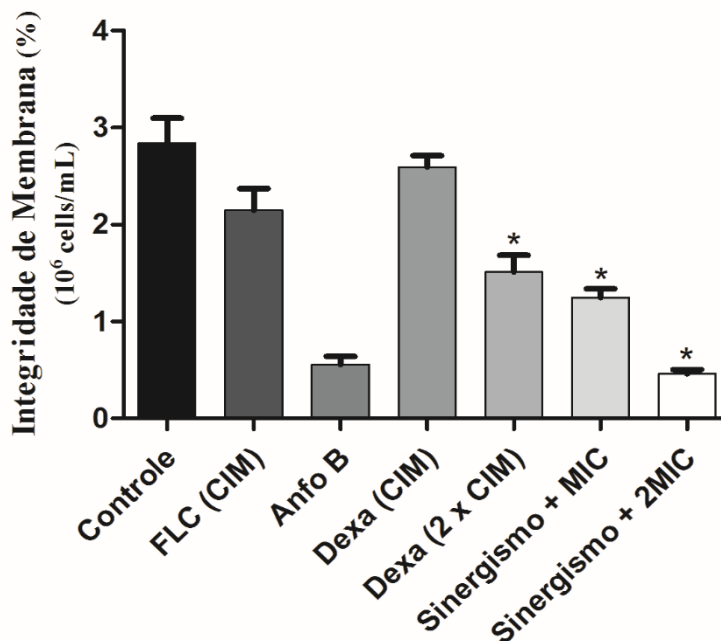
Figura 8- Complexo de interação do fosfato dissódico de dexametasona com a SAP5



6.5 Fosfato dissódico de dexametasona isolado e associado com fluconazol reduziram a integridade da membrana de *C. albicans* resistente ao fluconazol

Não foi observada redução significativa no número de células viáveis quando as cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol foram tratadas com FLC (CIM=64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em comparação com o controle. ($p < 0,05$) (Figura 9). Em contraste, as células resistentes ao fluconazol quando submetidas aos seguintes tratamentos: DEXA (CIM=500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DEXA (2X CIM=1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DEXA + FLC (CIM=0,97/0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e DEXA + FLC (2X CIM=1,94/0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h, exibiram uma diminuição significativa da viabilidade celular ($p < 0,05$) em relação ao controle. Para a anfotericina B utilizada como controle positivo foi observado uma diminuição quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Figura 9- Avaliação da integridade de membrana em cepa de *C. albicans* resistente ao FLC tratadas com fosfato dissódico de dexametasona, fluconazol isolados e em associação.

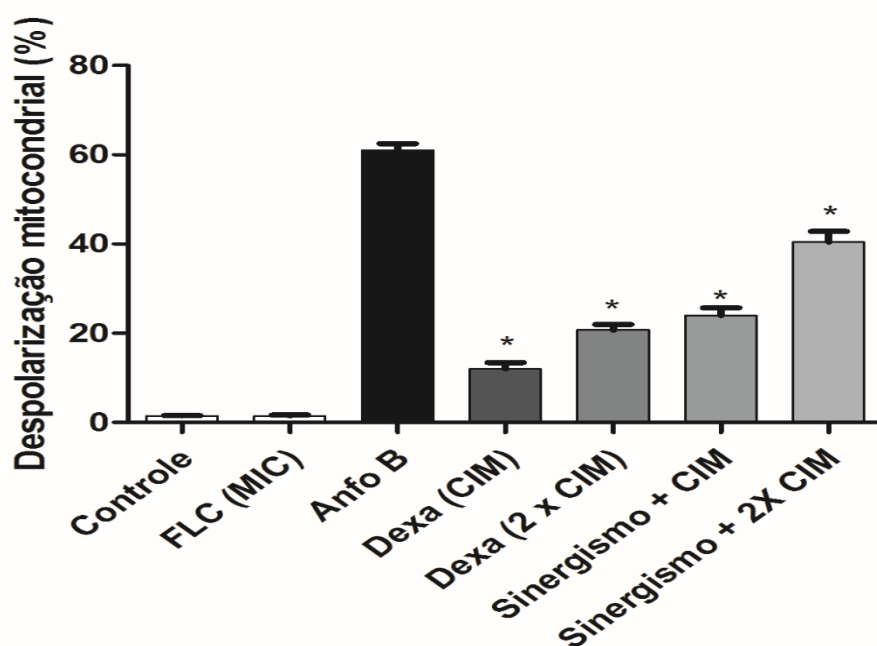


As células foram tratadas com DEXA (CIM= 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DEXA (2X CIM=1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), FLC (CIM=64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DEXA+FLC (CIM=0,97/0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DEXA mais FLC (2X CIM=1,94/0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e AMB (CIM= 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; controle de morte), e RPMI (controle negativo) e depois de 24 horas, corados com rodamina 123 e analisado por citometria de fluxo. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.5.1 Despolarização mitocondrial é induzida por fosfato dissódico de dexametasona em *C. albicans* resistente ao fluconazol

Após 24 h de exposição, alterações significativas ($p < 0,05$) na despolarização mitocondrial foram observadas em células de *C. albicans* resistente ao fluconazol quando submetidas aos seguintes tratamentos: DEXA (CIM=500 $\mu\text{g/ml}$) e (2X CIM=1000 $\mu\text{g/ml}$), DEX+FLC (CIM=0,97/0,125 $\mu\text{g/ml}$) e (2X CIM=1,94/0,25 $\mu\text{g/ml}$) em comparação com o controle. (Figura 10). A anfotericina B foi usada como um controle positivo. Para a anfotericina B utilizada como controle positivo foi observado um aumento do percentual de células com baixo potencial mitocondrial quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Figura 10- Avaliação da despolarização mitocondrial em cepa de *C. albicans* resistente ao FLC tratadas com fosfato dissódico de dexametasona e fluconazol isolados e em associação.

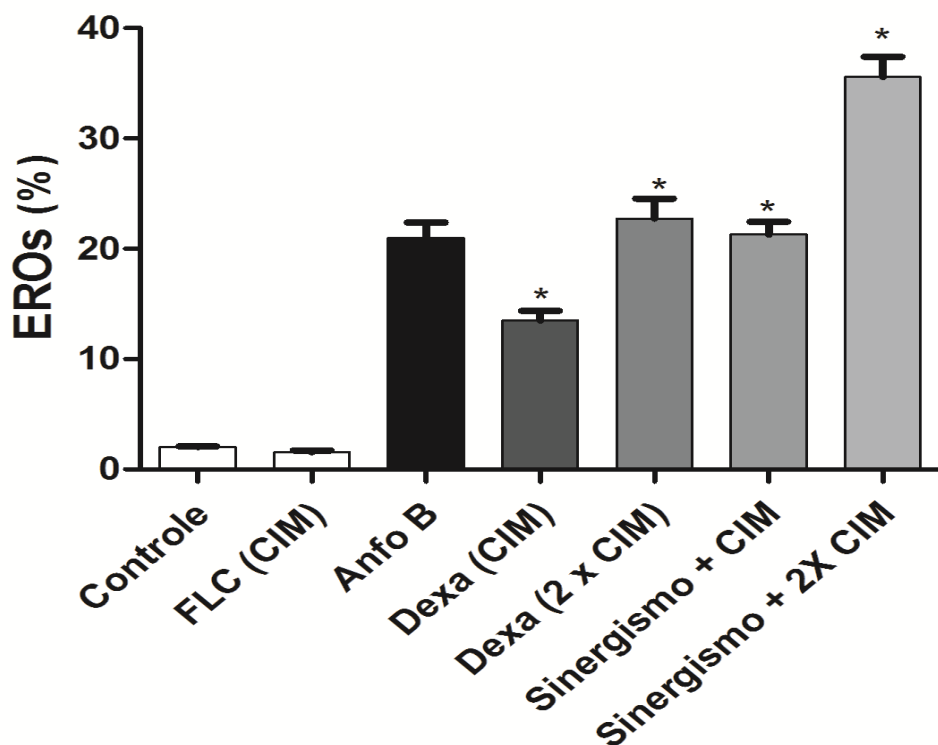


As células foram tratadas com DEXA (CIM= 500 $\mu\text{g/ml}$), DEXA (2X CIM=1000 $\mu\text{g/ml}$), FLC (CIM=64 $\mu\text{g/mL}$), DEXA+FLC (CIM=0,97/0,125 $\mu\text{g/ml}$), DEXA mais FLC (2X CIM=1,94/0,25 $\mu\text{g/ml}$) e AMB (CIM= 4 $\mu\text{g/mL}$; controle de morte), e RPMI (controle negativo) e depois de 24 horas, corados com rodamina 123 e analisado por citometria de fluxo. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.5.2 Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células de *C. albicans* após exposição ao fosfato dissódico de dexametasona e fluconazol isolados e em associação

Conforme apresentado na Figura 11 investigamos o efeito do fosfato dissódico de fosfato dissódico de dexametasona na geração de espécies reativas de oxigênio usando o corante DCFH2-DA. Após exposição de 24 h, células de *C. albicans* resistentes a fluconazol que foram tratadas com DEXA (CIM=500 µg/ml), DEXA (2X CIM=1000µg/ml), FLC (CIM=64 µg/mL), DEXA+FLC (CIM=0,97/0,125 µg/ml), DEXA + FLC (2X CIM=1,94/0,25 µg/ml) e AMB (CIM= 4 µg/mL; controle de morte) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de células com altos níveis de produção de ROS em todos os tratamentos avaliados quando comparados ao controle, com exceção do FLC. A anfotericina B foi usada como um controle positivo.

Figura 11- Avaliação da produção de EROs em *C. albicans* resistente ao fluconazol.

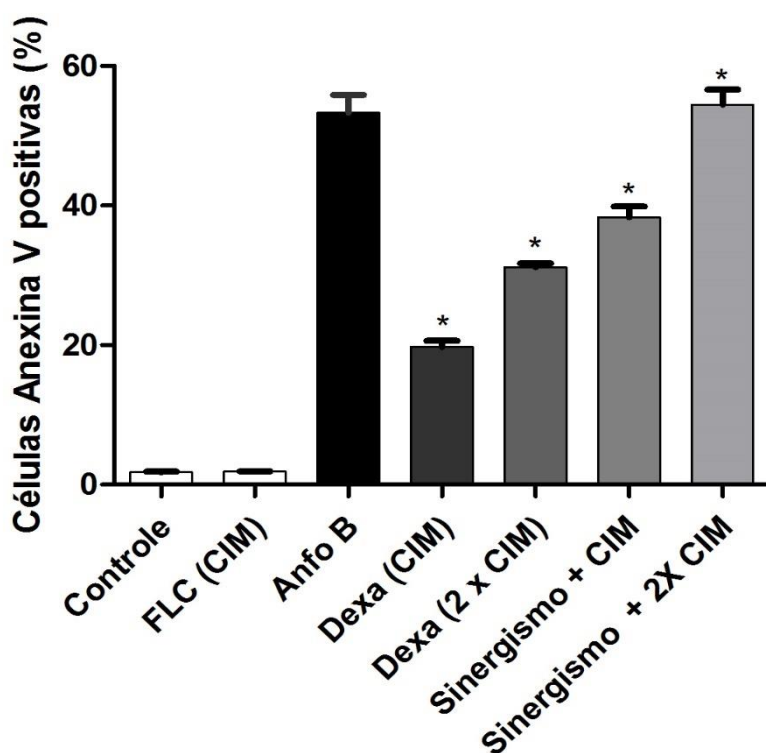


As células foram tratadas com DEXA (CIM= 500 µg/ml), DEXA (2X CIM=1000µg/ml), FLC (CIM=64 µg/mL), DEXA+FLC (CIM=0,97/0,125 µg/ml), DEXA mais FLC (2X CIM=1,94/0,25µg/ml) e AMB (CIM= 4 µg/mL; controle de morte), e RPMI (controle negativo) e depois de 24 horas, corados com rodamina 123 e analisado por citometria de fluxo.* $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.5.3 Externalização de fosfatidilserina (PS) em células de *C. albicans* após exposição ao fosfato dissódico de dexametasona e fluconazol isolados e em associação

A externalização da fosfatidilserina após 24 horas de tratamento não ocorreu quando as células foram tratadas com fluconazol, observamos as células claramente induzidas morte semelhante à da anfotericina B, que foi usada como controle positivo houve um aumento significativo na fosfatidilserina externalizada ($p < 0,05$) (Figura 12).

Figura 12- Externalização de fosfatidilserina em *C. albicans* resistentes ao fluconazol após exposição ao fosfato dissódico de dexametasona e fluconazol isolados e em associação.

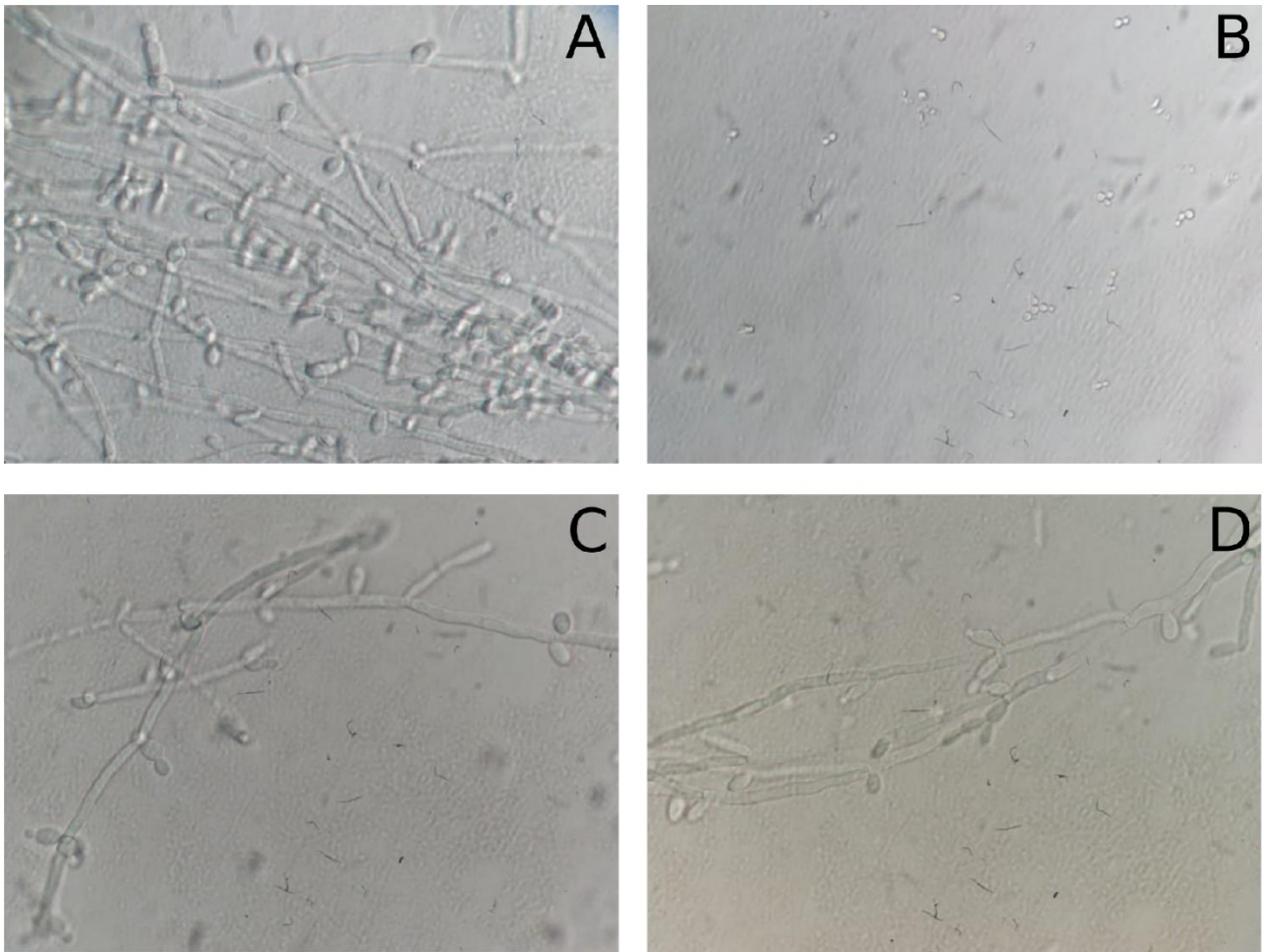


As células foram tratadas com DEXA (CIM= 500 $\mu\text{g/ml}$), DEXA (2X CIM=1000 $\mu\text{g/ml}$), FLC (CIM= 64 $\mu\text{g/mL}$), DEXA+FLC (CIM=0,97/0,125 $\mu\text{g/ml}$), DEXA mais FLC (2X CIM=1,94/0,25 $\mu\text{g/ml}$) e AMB (CIM= 4 $\mu\text{g/mL}$; controle de morte), e RPMI (controle negativo) e depois de 24 horas, corados com rodamina 123 e analisado por citometria de fluxo.* $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.6 A formação de hifas é inibida pela presença de fosfato dissódico de dexametasona

Para analisar o efeito da DEXA no crescimento das hifas, as células foram cultivadas em meio contendo um indutor de hifas (10% de FBS) junto com FLC e DEXA. As amostras de controle, sem tratamento, exibiram forte crescimento de hifas (Fig. 13 A). Para amostras incubadas com FLC (Fig. 13 B), a quantidade de crescimento de hifas e formação celular alongada foram reduzidos significativamente, assim como o tratamento com DEXA (CIM) (Fig 13 C) e DEXA associado ao FLC (CIM) (Fig 13 D).

Figura 13- Redução da formação de hifas em *C. albicans*. A controle; B:Fluconazol; C:Fosfato dissódico de dexametasona; D: Fosfato dissódico de dexametasona + Fluconazol (100X no microscópio óptico).



FONTE: LABIMAN,2021.

7. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, *Candida albicans* tem sido o principal agente causal de infecções invasivas com risco de vida, com taxas de mortalidade próximas de 40%, apesar do tratamento. A adesão e colonização de uma superfície do hospedeiro são etapas críticas para o estabelecimento de infecções, no entanto, o desenvolvimento terapêutico baseado na prevenção da colonização em superfícies por *C. albicans* é surpreendentemente raro (CHEN et al., 2020; VARGHESE et al., 2013).

No presente estudo, foram utilizadas cepas resistentes e sensíveis ao fluconazol, visto que a importância clínica desse medicamento se deve ao fato de ser o fármaco de primeira escolha recomendado no tratamento das infecções causadas por *Candida* spp. por apresentar poucos efeitos colaterais e baixo custo (LI et al., 2014).

Várias técnicas, *in vitro*, são utilizadas para avaliar as interações medicamentosas, como o *checkerboard*, métodos de difusão em ágar e curvas de morte. Atualmente, a técnica mais utilizada é o método *checkerboard* (BIDAUD et al., 2021). Os resultados do estudo demonstraram que o fosfato dissódico de fosfato dissódico de dexametasona apresenta efeito antifúngico contra cepas de *Candida albicans* resistentes e sensíveis ao fluconazol com concentrações inibitórias mínimas variando entre 31,25-500 µg/mL. O efeito sinérgico entre FLC e fosfato dissódico de fosfato dissódico de dexametasona apresentou sinergismo 100%, sendo assim significativamente maior que seus efeitos independentes quando utilizados de forma separada.

Esses dados corroboram com encontrados por Li e colaboradores (2016) que descreveram que a budesonida, um corticosteroide inalatório, possui potencial efeito antifúngico contra cepas de *C. albicans* resistentes ao FLC tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A combinação de fluconazol e budesonida pôde reverter a resistência de *Candida albicans* por inibir a função de transportadores de drogas, reduzir a formação de biofilmes, promover apoptose e inibir a atividade de fosfolipase extracelulares.

O estudo publicado por Sun et al. (2017) demonstrou sinergismo entre DEXA e FLC contra *C. albicans* resistentes, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Os resultados *in vitro* indicaram que mesmo a DEXA não apresentando efeito antifúngico isolado na faixa testada (com CIM 128 µg/ml), demonstrou efeito sinérgico com FLC contra *C. albicans* resistente (com FICI <0,5).

Biofilmes são comunidades estruturadas e compactadas de células microbianas aderidas às superfícies, sendo consideradas o estado de crescimento natural para a grande maioria dos

microrganismos. A capacidade de formar biofilmes é um fator de virulência importante para a maioria dos patógenos, incluindo o patógeno fúngico humano oportunista *Candida albicans*, que é o patógeno fúngico humano mais comumente encontrado em ambientes clínicos (LOHSE et al., 2018; PERRY; HERNDAY; NOBILE, 2020).

No nosso estudo foi demonstrado que a atividade do DEXA isolado não apresentou atividade frente a biofilmes formados em nenhuma das cepas testadas de *C. albicans* nas concentrações de CIM/2=62,5µg/ mL, CIM=125µg/ mL, 2x CIM=250µg/ mL e 4x CIM=500µg/ mL, assim como o fluconazol o fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona associado ao fluconazol também não apresentou atividade frente a biofilmes formados de *C. albicans* em nenhuma das combinações testadas. Outro estudo mostrou que a combinação fosfato dissódico de dexametasona com fluconazol pode inibir o biofilme em formação ao longo de 4,8,12 h não corroborando com os nossos resultados. Isso pode estar relacionado ao tempo testado, já que os nossos testes foram de 24 h e biofilmes com menos tempo provavelmente são menos robustos que os de 24 horas, No entanto, com biofilmes formados (formados ao longo de 24 h), o sinergismo foi raramente observado (FICI de > 0,5), reforçando o resultado que encontramos quando testado o biofilme formado (SUN et al., 2017).

Entretanto a atividade do fosfato dissódico fosfato dissódico de dexametasona isolado frente aos biofilmes em formação de *Candida albicans* apresentou uma variação de 89% a 67% da viabilidade celular sendo capaz de inibir o biofilme nas cepas testadas possivelmente porque o biofilme em formação tem maior facilidade de ser destruído do que o formado que já tem o seu processo de maturação completo. A matriz extracelular do biofilme é o principal contribuinte para a resistência, sequestrando moléculas antifúngicas e evitando sua penetração nas profundezas do biofilme, portanto, as células dentro dos biofilmes são protegidas da morte por neutrófilos, macrófagos e monócitos, que normalmente desempenham papéis importantes na resposta imune contra a candidíase disseminada (TAFF et al., 2014; WALL et al., 2020).

Uma vez formado o biofilme maduro, ainda existe a possibilidade de disseminação de células do biofilme da progênie que se desprendem migrando para outros nichos para formar mais biofilme. Para que a formação do biofilme de *C. albicans* seja eficiente em uma superfície depende da textura da superfície (por exemplo, rugosidade, hidrofobicidade), das condições ambientais (por exemplo, disponibilidade de nutrientes, forças de cisalhamento, disponibilidade de O₂, pH e níveis de CO₂), a capacidade intrínseca do fungo para formar biofilmes e a presença e atividade de células imunes do hospedeiro (ARAÚJO et al., 2014; CHANDRA et al., 2001; JONATHAN S. FINKEL; AARON P. MITCHELL, 2011).

C. albicans pode formar células hifais tanto em culturas planctônicas quanto durante a etapa de maturação da formação de biofilme. As extensas redes de hifas observadas em biofilmes maduros de *C. albicans* são uma marca registrada que distingue os biofilmes de *C. albicans* daqueles de espécies intimamente relacionadas, como *Candida parapsilosis*, que tendem a ter menos hifas e são mais curtas (HOLLAND et al., 2014; LOHSE et al., 2018).

Analisamos o efeito da DEXA no crescimento das hifas e podemos observar que a DEXA tanto isolada como em associação com fluconazol promoveu uma redução na produção de hifas. As hifas, que representam uma fase importante no processo da doença, podem causar danos aos tecidos ao invadir as células epiteliais da mucosa, levando à infecção do sangue (CHEN et al., 2020).

Outros fatores de virulência importantes expressos após a formação de hifas são as adesinas, que incluem aglutinina, Als1, hifa e integrina . Atualmente estudos demonstram que genes altamente expressos codificam fatores de virulência, como enzimas dissolventes da parede celular, e fatores de adesão, como proteases aspárticas segregadas (Saps) e sequência similar a aglutinina (Als) que facilitam que *C. albicans* possam aderir, invadir e danificar células epiteliais e esses fatores podem aumentar a virulência de *Candida albicans*. O redirecionamento de fármacos, em conjunto com métodos de docagem molecular, pode ser utilizado visando o desenvolvimento mais rápido de novos antifúngicos para o combate a microrganismos (DA SILVA et al., 2021; FAN et al., 2013; VARGHESE et al., 2013). Nos últimos anos, abordagens tecnológicas como ferramentas *in silico* foram criados para orientar a prospecção de novos medicamentos, otimizando assim o tempo, reduzindo custos e aumentando as chances de sucesso. Ao procurar novos agentes antimicrobianos, docagem molecular é a ferramenta mais usada para simular o acoplamento entre moléculas bioativas e alvos proteicos em microrganismos (DO AV SÁ et al., 2019).

Portanto, para avaliação de fatores de adesão foi utilizado técnicas de ancoragem molecular que têm sido usadas para acelerar o processo de desenvolvimento de medicamentos focados nas proteínas essenciais ou importantes para a patogenicidade de agentes infecciosos. Nossos resultados demonstram um forte indicativo que a DEXA possui a capacidade de interagir com a SAP5; no entanto em uma região diferente do Fluconazol e do inibidor PEPSTATIN, sugerindo assim a possibilidade de efeito sinérgico com Fluconazol ficando em regiões diferentes por não competição com o sítio ativo pelas duas substâncias atuando em regiões próximas e não competitiva, mostrando que ocorre uma modulação do sítio estérico. O fosfato dissódico de dexametasona possui a capacidade de interagir com o sítio da Hepta-Treonina mais fortemente que o fluconazol e que a DEXA possui a capacidade de interagir com a SAP5. (ROZADA et al., 2019; SEKI et al., 2019).

Alguns autores têm investigado os alvos ALS3 e SAP 5 em *C. albicans*, buscando explicar seu papel no processo de adesão e relação com o biofilme nessa espécie. O estudo em que se analisou o acoplamento do etomidato que é um anestésico intravenoso pode se observar que permaneceu no sítio ALS3. Além disso, o etomidato diminuiu a expressão de manoproteínas na superfície de *C. albicans* (DO AMARAL VALENTE SÁ et al., 2020). Outro estudo demonstrou que o Diazepam apresentou interação entre os fatores de virulência, ALS3 e SAP5. Como já demonstrado em outros estudos os sítios de ação ALS3 e SAP5 são alvos importantes para que ocorra inibição da adesão que é um fator de virulência. (DA SILVA et al., 2021).

A fim de compreender os possíveis mecanismos de ação do fosfato dissódico de fosfato dissódico de dexametasona, foram realizados testes de integridade da membrana, alteração do potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e externalização de fosfatidilserina. O teste do Iodeto de Propídio (PI) é utilizado para avaliar a integridade da membrana celular, sendo capaz de marcar com fluorescências células com dano de membrana. Além disso, poucos processos apoptóticos independentes de ROS foram descritos em fungos (BALZAN et al., 2004; CARMONA-GUTIERREZ et al., 2018; FANNJIANG et al., 2004; POLIAKOVA et al., 2002; TRANCÍKOVA et al., 2004).

Estudo realizado por Abdoul-azize et al. (2016) o fosfato dissódico de dexametasona é um medicamento usado no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) devido à sua capacidade de induzir apoptose foi feita uma análise adicional que mostrou o Co-tratamento com DEXA e Pyr3 resulta na despolarização do potencial da membrana mitocondrial e na produção de espécies reativas de oxigênio em células LLA. Outro estudo demonstrou também que os glicocorticoides induzem a apoptose em diferentes tipos de células. Nossos resultados mostraram que células de *C. albicans* tratadas com fosfato dissódico de fosfato dissódico de dexametasona isolado e associado ao fluconazol foram marcadas com PI que é um marcador hidrofílico e só consegue penetrar na membrana caso ocorra algum dano na sua estrutura. Houve alteração do potencial de membrana mitocondrial nas células. Como as mitocôndrias desempenham uma etapa crucial na indução do apoptose celular, e a apoptose celular induzida por DEXA foi associada ao colapso do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e produção de espécies reativas de oxigênio. A DEXA pode induzir a morte celular apoptótica e necrótica em células MC3T3-E1, de maneira dependente da dose e do tempo. A morte celular tem como sequência pela eliminação celular, apresentando perda da integridade da célula, sendo assim, a parede celular precisa ser (parcialmente) digerida, a fim de tornar

a fosfatidilserina externalizada disponível à anexina V e permitir a ligação (FENG et al., 2018; MARTIN; GREEN, 1995; SUWANJANG et al., 2013; YI et al., 2016).

As principais características fenotípicas de um processo semelhante a apoptose são a exposição à fosfatidilserina, condensação da cromatina nuclear, degradação do DNA e aumento dos níveis intracelulares de EROS. Na avaliação das espécies reativas de oxigênio do presente trabalho, as células de *C. albicans* tratadas com DEXA isolada e associada ao FLC apresentou níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio, quando comparada com o controle e pode se observar aumento na externalização de PS, mostrando que os resultados corroboram com o estudo realizado por Li e colaboradores (2016) demonstrou que budesonida usado com FLC resultou em um nível significativamente aumentado de EROS, diversos estudos relataram que EROS é necessário e suficiente para induzir a apoptose em *C. albicans*, reforçando a participação da via apoptótica no processo de morte celular. A fosfolipase extracelular é crucial para a virulência de *C. albicans*, tornando-se um alvo possível para o desenvolvimento de novos antifúngicos (GHANNOUM et al., 2000; KERR et al., 1994; SILWAL et al., 2020).

Apesar da análise de alguns eventos apoptóticos podemos afirmar que houve dano de membrana que foi provocado diretamente pela ação do fosfato dissódico de dexametasona que foi uma consequência gerada por eventos que sucedem o processo apoptótico. Atualmente não existe na literatura sobre a ocorrência desses danos apoptóticos causado pelo fosfato dissódico de dexametasona, mostrando carência no desenvolvimento desses estudos. Portanto, com mais estudos podemos futuramente pensar na possibilidade do fosfato dissódico de dexametasona ser utilizada em formulações como adjuvantes ou na atuação de prevenção de biofilme em dispositivos médicos o que pode levar a identificação de novos potenciais antifúngicos, podendo ter mais um novo olhar no tratamento para os pacientes.

8. CONCLUSÃO

Conclui-se que o fosfato dissódico de dexametasona exerce atividade antifúngica frente a células isoladas e em biofilmes em formação de *Candida albicans*, interage sinergicamente com fluconazol e promove redução na produção de hifas. Seu mecanismo de ação pode estar relacionado a danos e alterações estruturais das membranas celulares, como externalização de fosfatidilserina, perda do potencial de membrana e produção de espécies reativas de oxigênio.

9. REFERENCIAS

- A CALDERONE, R.; A FONZI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends In Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 629–633, 2001.
- ABDOUL-AZIZE, S. et al. Pyr3, a TRPC3 channel blocker, potentiates dexamethasone sensitivity and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells by disturbing Ca²⁺ signaling, mitochondrial membrane potential changes and reactive oxygen species production. **European Journal of Pharmacology**, v. 784, p. 90–98, 2016.
- ALVENDAL, Cathrin *et al.* Anti-biofilm activity of chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* vaginal isolates. **Plos One**, v. 15, n. 9, p. 1-10, 17 set. 2020. Public Library of Science (PLoS).
- ARAÚJO, A. et al. Microbial Pathogenesis Environmental pH influences *Candida albicans* biofilms regarding its structure, virulence and susceptibility to fluconazole. **Microbial Pathogenesis**, v. 70, p. 39–44, 2014.
- ARENDRUP, M. C.; PERLIN, D. S. Echinocandin resistance: An emerging clinical problem? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 484–492, 2014.
- ARSAND, D. R. **Anti-inflamatório Fosfato dissódico de dexametasona: Estudos de Biodegradabilidade, Toxicidade, Ocorrência e Degradação Oxidativa Avançada em Efluente Hospitalar**. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 2010.
- BALZAN, R. et al. Aspirin commits yeast cells to apoptosis depending on carbon source. **Microbiology**, v. 103, p. 109–115, 2004.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 27, p. 22–38, 2010.
- BASSETTI, M. et al. Diagnosis and Treatment of Candidemia in the Intensive Care Unit. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 40, n. 4, p. 524–539, 2019.
- BEARDSLEY, J. et al. Responding to the emergence of antifungal drug resistance: Perspectives from the bench and the bedside. **Future Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 1175–1191, 2018.
- BIDAUD, A. et al. Techniques for the Assessment of In Vitro and In Vivo Antifungal Combinations. **Journal of Fungi**, v. 7, p. 113–128, 2021.
- BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588–594, 2006.
- CALDARA, M.; MARMIROLI, N. Tricyclic antidepressants inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 4, p. 500–505, 2018.

- 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.
- CARMONA-GUTIERREZ, D. et al. Guidelines and recommendations on yeast cell death nomenclature. **Microbial Cell**, v. 5, n. 1, p. 4–31, 2018.
- CASADEVALL, A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 130–132, 2007.
- CASADEVALL, A. Fungal Diseases in the 21st Century: The Near and Far Horizons. **Pathogens and Immunity**, v. 3, n. 2, p. 183, 2018.
- CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 122, n. 6, p. 785–794, 2015.
- CATALDI, V. et al. *Candida* species isolated from different body sites and their antifungal susceptibility pattern: Cross-analysis of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Medical mycology**, v. 55, n. 6, p. 624–634, 2017.
- CHA, Y. et al. Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 2, p. 168–180, 2018.
- CHAN, A. K. Y. et al. Aspirin as an antifungal-lock agent in inhibition of candidal biofilm formation in surgical catheters. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 1427–1433, 2021.
- CHANDRA, J. et al. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385–5394, 2001.
- CHEN, H. et al. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 337–348, 2020.
- CLOUT, A. E. et al. Drug repurposing in neurological diseases: An integrated approach to reduce trial and error. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 90, n. 11, p. 1270–1275, 2019.
- COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: A nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, 2006.
- COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.
- CORTÉS, J. C. G. et al. The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, p. 107352, 2019.

- DA SILVA, C. R. et al. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691–1700, 2013.
- DA SILVA, C. R. et al. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1468–1478, 2014.
- DA SILVA, L. J. et al. Diazepam's antifungal activity in fluconazole-resistant *Candida* spp. And biofilm inhibition in *C. albicans*: Evaluation of the relationship with the proteins ALS3 and SAP5. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1–11, 2021.
- DALLE, F. et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 248–271, 2010.
- DE ANDRADE NETO, J. B. et al. Action mechanism of naphthofuranquinones against fluconazole-resistant *Candida tropicalis* strains evidenced by proteomic analysis: The role of increased endogenous ROS. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, n. December 2017, p. 32–42, 2018.
- DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 16, n. 1, p. 51–65, 2018.
- DENNING, D. W.; BROMLEY, M. J. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1414–1416, 2015.
- DIMASI, J. A. et al. Trends in risks associated with new drug development: Success rates for investigational drugs. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 87, n. 3, p. 272–277, 2010.
- 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.
- DO AV SÁ, L. G. et al. Synergistic anticandidal activity of etomidate and azoles against clinical fluconazole-resistant isolates. **Future Microbiology**, v. 14, n. 17, p. 1477–1488, 2019.
- DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2016.
- FAN, Y. et al. Hyphae-Specific Genes HGC1, ALS3, HWP1, and ECE1 and Relevant Signaling Pathways in *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 176, p. 329–335, 2013.
- FANNJIANG, Y. et al. Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. **Genes & Development**, p. 2785–2797, 2004.
- FENG, M. et al. Necrostatin-1 inhibits the cell death of osteoblasts induced by glucocorticoid. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 11, n. 2, p. 675–684, 2018.
- FERREIRA, L. G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 2015.

- FIGUEIREDO, A. I. P. DE. **Estudo comparativo dos perfis de libertação de implantes oftalmológicos de fosfato dissódico de dexametasona**. Universidade de Coimbra, 2013.
- FIRACATIVE, C. Invasive fungal disease in humans: Are we aware of the real impact? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, n. 9, p. 1–9, 2020.
- FREIRES, I. A. et al. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 4, p. 681–686, 2017.
- FU, J. et al. Epidemiology of *Candida albicans* and non-*C. albicans* of neonatal candidemia at a tertiary care hospital in Western China. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–6, 2017.
- GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 308–329, 1990.
- GHANNOUM, M. A. et al. A large-scale North American study of fungal isolates from nails: The frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, p. 641–648, 2000.
- GNS, H. S. et al. An update on Drug Repurposing: Re-written saga of the drug's fate. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, n. October 2018, p. 700–716, 2019.
- GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 6, p. 5–10, 2014.
- HALGREN, T. A. Performance of MMFF94*. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, p. 490–519, 1996.
- HANAOKA, M.; DOMAE, E. IL-1 α released from oral epithelial cells upon candidalysin exposure initiates an early innate epithelial response. **International Immunology**, v. 33, n. 3, p. 1–31, 2020.
- HANWELL, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 8, 2012.
- HINRICHSEN, S. L. et al. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394–398, 2008.
- HO, V. et al. An Amyloid Core Sequence in the Major *Candida albicans* Adhesin Als1p Mediates Cell-Cell Adhesion. **mbio**, v. 10, n. 5, p. 1–11, 2019.
- HOLLAND, L. M. et al. Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1–18, 2014.
- HOSSEINI, S. S. et al. Zinc Oxide Nanoparticles Inhibition of Initial Adhesion and ALS1 and ALS3 Gene Expression in *Candida albicans* Strains from Urinary Tract Infections. **Mycopathologia**, v. 0123456789, 2019.
- HOUANG, E. T. S. et al. Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. **Journal of Clinical Pathology**, v. 50, n. 7, p. 563–565, 1997.

- JONATHAN S. FINKEL; AARON P. MITCHELL. GENETIC CONTROL OF CANDIDA ALBICANS BIOFILM DEVELOPMENT. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 109–118, 2011.
- JUÁREZ-LÓPEZ, D.; SCHCOLNIK-CABRERA, A. Drug Repurposing: Considerations to Surpass While Re-directing Old Compounds for New Treatments. **Archives of Medical Research**, v. 52, n. 3, p. 243–251, 2021.
- KERR, J. F. R. et al. Apoptosis Its Significance in Cancer and Cancer Therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2013–2026, 1994.
- KHAN, M. S. A. et al. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to Candida albicans. **Combating Fungal Infections: Problems and Remedy**, p. 1–539, 2010.
- KILIC, A. U. et al. Epidemiology and cost implications of candidemia, a 6-year analysis from a developing country. **Mycoses**, v. 60, n. 3, p. 198–203, 2017.
- KIRATISIN, P.; APISARNTHANARAK, A.; KAEWDAENG, S. Synergistic activities between carbapenems and other antimicrobial agents against Acinetobacter baumannii including multidrug-resistant and extensively drug-resistant isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 3, p. 243–246, 2010.
- KISCHKEL, B. et al. Therapies and Vaccines Based on Nanoparticles for the Treatment of Systemic Fungal Infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. September 2020.
- KULLBERG, B. J. et al. Efficacy of anidulafungin in 539 patients with invasive candidiasis: A patient-level pooled analysis of six clinical trials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2368–2377, 2017.
- LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. Savier ed. São Paulo: v. 37
- LEE, Y. et al. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in Candida albicans and beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390–3411, 2021.
- LI, H. et al. A promising approach of overcoming the intrinsic resistance of Candida krusei to fluconazole (FLC) – combining tacrolimus with FLC. **FEMS Yeast Research**, v. 14, p. 2005–2008, 2014.
- LI, X. et al. Synergistic Effects and Mechanisms of Budesonide in Combination with Fluconazole against Resistant Candida albicans. **PLOS ONE**, v. 11, p. 1–20, 2016.
- LIN, J. et al. The peptide-binding cavity is essential for ALS3-mediated adhesion of Candida albicans to human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 26, p. 18401–18412, 2014.
- LOHSE, M. B. et al. Development and regulation of single- and multi-species Candida albicans biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19–31, 2018.
- LYU, X. et al. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 1161–1171, 2016.

- MAGILL, S. S. et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198–1208, 2014.
- MALDONADO, I. et al. Identification of *Candida* yeasts: Conventional methods and MALDI-TOF MS. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 35, n. 3, p. 151–154, 2018.
- MARTIN, H.; KAVANAGH, K.; VELASCO-TORRIJOS, T. Targeting adhesion in fungal pathogen *Candida albicans*. **Future Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 313–334, 2021.
- MARTIN, S. J.; GREEN, D. R. Protease Activation during Apoptosis: Death by a Thousand Cuts? Minireview. **Cell**, v. 82, p. 349–352, 1995.
- MAYER, L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013.
- MCCARTY, T. P.; WHITE, C. M.; PAPPAS, P. G. Candidemia and Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics Of North America**, v. 35, n. 2, p. 389–413, 2021.
- MEDEIROS, M. **Avaliação in vitro e in vivo de Efeitos Sinérgicos de Antibacterianos para o Tratamento de Infecções por *Acinetobacter baumannii* Multirresistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêCIMas no Brasil** CIMheli Medeiros CIMheli Medeiros **Avaliação in vit.** UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE, 2012.
- MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. The extracellular matrix of fungal biofilms. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 931, p. 21–35, 2016.
- MORRELL, M. R.; CIMEK, S. T.; KOLLEF, M. H. The Management of Severe Sepsis and Septic Shock. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 485–501, 2009.
- MUSHI, M. F. et al. Oral candidiasis among African human immunodeficiency virus-infected individuals: 10 years of systematic review and meta-analysis from sub-Saharan África. **Journal of Oral Microbiology**, v. 9, n. 1, 2017.
- NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 400–428, 2003.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5476>>.
- NETO, J. B. A. et al. Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: A special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.
- NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annu Rev Microbiol**, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2016.
- NOBLE, S. M.; GIANETTI, B. A.; WITCHLEY, J. N. *Candida albicans* cell type switches and functional plasticity in the mammalian host. **Nat Rev Microbiol**, v. 15, n. 2, p. 96–108, 2018.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

World Health Organization. **Antimicrobial resistance**.2019

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2015.

PAWLAK, Z. et al. Identification of Fungi Isolated from Oral Cavity of Patients with HIV Using MALDI–TOF MS. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 8, p. 1570, 2021.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 7, n. 4, p. 453–460, 2009.

PERRY, A. M.; HERNDAY, A. D.; NOBILE, C. J. Unraveling How Candida albicans Forms Sexual Biofilms. **Journal of Fungi**, v. 6, p. 1–19, 2020.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1 SUPPL., p. S3–S13, 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; SHEEHAN, D. J. Interpretive breakpoints for fluconazole and Candida revisited: A blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 435–447, 2006.

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.

PIERCE, C. G. et al. A novel small molecule inhibitor of candida albicans biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. **npj Biofilms and microbiomes**, v. 1, n. June, p. 1–8, 2015.

PIERCE, C. G. et al. The Candida albicans biofilm matrix: Composition, structure and function. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, 2017.

POLIAKOVA, D. et al. The antiapoptotic protein Bcl-x L prevents the cytotoxic effect of Bax, but not Bax-induced formation of reactive oxygen species, in Kluyveromyces lactis. **Microbiology**, v. 148, n. 9, p. 2789–2795, 2002.

PONDE, N. O. et al. Candida albicans biofilms and polymicrobial interactions. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 91–111, 2021.

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.

QUINDÓS, G. et al. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 24, n. 2, p. e172–e180, 2019.

- RAJENDRAN, R. et al. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 1, p. 87–93, 2016.
- ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 71, p. 753–775, 2017.
- ROLLENHAGEN, C. et al. Stimulation of cell motility and expression of late markers of differentiation in human oral keratinocytes by *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 946–966, 2009.
- ROZADA, A. M. et al. Novel 4-methoxynaphthalene-N-acylhydrazones as potential agents for the treatment of paracoccidioidomycosis and tuberculosis. **Future Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 587–598, 2019.
- RUHNKE, M. et al. Treatment of invasive fungal diseases in cancer patients—Revised 2019 Recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). **Mycoses**, v. 63, n. 7, p. 653–682, 2020.
- SAFAVIEH, M. et al. Advances in *Candida* detection platforms for clinical and point-of-care applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 441–458, 2017.
- SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73–85, 2002.
- SCHEIBLER, E. et al. Use of nystatin and chlorhexidine in oral medicine: Properties, indications and pitfalls with focus on geriatric patients. **Gerodontology**, v. 34, n. 3, p. 291–298, 2017.
- SEKI, E. et al. Selection of potential anti-adhesion drugs by in silico approaches targeted to ALS3 from *Candida albicans*. **Biotechnology Letters**, v. 6, 2019.
- SELMECKI, A.; FORCHE, A.; BERMAN, J. GenoCIM plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 7, p. 991–1008, 2010.
- SHAFIEI, M. et al. History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, n. August, p. 104240, 2020.
- SHAPIRO, N. I.; HOWELL, M.; TALMOR, D. A blueprint for a sepsis protocol. **Academic Emergency Medicine**, v. 12, n. 4, p. 352–359, 2005.
- SHIGEMURA, K. et al. Comparison of the clinical risk factors between *Candida albicans* and *Candida non-albicans* species for bloodstream infection. **Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 4, p. 311–314, 2014.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro 2004.
- SILVA, D. R. et al. In silico approaches for screening molecular targets in *Candida albicans*: A proteomic insight into drug discovery and development. **European Journal of Pharmacology**, v. 842, p. 64–69, 2019.

SILVA, R. A. C. **ATIVIDADE ANTI-CANDIDA IN VITRO DOS INIBIDORES SELETIVOS DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA FRENTE ÀS CEPAS RESISTENTES AO FLUCONAZOL E SUA ATIVIDADE EM ISOLADOS FORMADORES DE BIOFILME.** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ CENTRO, 2016.

SILVA, S. et al. Biofilms of non-Candida albicans Candida species: Quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, n. 7, p. 681–689, 2009.

SILWAL, P. et al. Mitochondrial Reactive Oxygen Species: Double-Edged Weapon in Host Defense and Pathological Inflammation During Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1–10, 2020.

SOBOUTI, B. et al. Candidemia in pediatric burn patients: Risk factors and outcomes in a retrospective cohort study. **Current Medical Mycology**, v. 6, n. 3, p. 33–41, 2021.

SOPIRALA, M. M. et al. Synergy testing by etest, Microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant Acinetobacter baumannii. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4678–4683, 2010.

SPRUNG, C. L. et al. Hydrocortisone Therapy for Patients with Septic Shock Charles. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 25, p. 2605–2615, 2009.

STEIMBACH, L. M. et al. Efficacy and safety of amphotericin B lipid-based formulations—A systematic review and meta-analysis. **Mycoses**, v. 60, n. 3, p. 146–154, 2017.

SUN, W. et al. Strong synergism of dexamethasone in combination with fluconazole against resistant Candida albicans mediated by inhibiting drug efflux and reducing virulence Respiration Medicine, Qianfoshan Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan, Pharmaceu. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2017.

SUWANJANG, W. et al. Cell Calcium Glucocorticoids reduce intracellular calcium concentration and protects neurons against glutamate toxicity. **Cell Calcium**, v. 53, n. 4, p. 256–263, 2013.

TAFF, H. et al. Mechanisms of Candida biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1–19, 2014.

TALAPKO, J. et al. Candida albicans-the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 1–19, 2021.

TOURNU, H.; VAN DIJCK, P. Candida biofilms and the host: Models and new concepts for eradication. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

TRANCÍKOVA, A. et al. Production of reactive oxygen species and loss of viability in yeast mitochondrial mutants: protective effect of Bcl-x L. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 149–156, 2004.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. NA-NA, 2009.

- TUMBARELLO, M. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1843–1850, 2007.
- TUMBARELLO, M. et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–9, 2012.
- UPPULURI, P. et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 3, 2010.
- VAN DAELE, R. et al. Antifungal drugs: What brings the future? **Medical Mycology**, v. 57, p. S328–S343, 2019.
- VARGHESE, N. et al. Surface control of blastospore attachment and ligand-mediated hyphae adhesion of *Candida albicans*. **Chemical Communications**, v. 49, p. 10418–10420, 2013.
- VERMA, A.; GAFFEN, S. L.; SWIDERGALL, M. Innate Immunity to Mucosal *Candida* Infections. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 1–15, 2017.
- VIDOTTO, V. et al. Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 20, n. 2, p. 52–54, 2003.
- VILA, T. et al. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 150–158, 2017.
- VILLAR, C. C. et al. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2126–2135, 2007.
- WALL, G. et al. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 1–6, 2020.
- WILLE, M. P. et al. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: Analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 288–292, 2013.
- XUE, A.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Advances in fungal cheminformatics for the discovery of new antifungal agents. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 1–18, 2020.
- YI, J. et al. Pharmacological Reports In vivo protective effect of betulinic acid on dexamethasone induced thymocyte apoptosis by reducing oxidative stress. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 1, p. 95–100, 2016.
- ZHANG, M. et al. Determination of dexamethasone and dexamethasone sodium phosphate in human plasma and cochlear perilymph by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 1, p. 17–24, 2011.

ZHENG, M. et al. Computational cheCIMal biology and drug design: Facilitating protein structure, function, and modulation studies. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 3, p. 914–950, 2018.

ZHENG, Y. et al. Epidemiology, species distribution, and outcome of nosocomial *Candida* spp. bloodstream infection in Shanghai: an 11-year retrospective analysis in a tertiary care hospital. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 20, n. 34, p. 1–10, 2021.

ZILBERBERG, M. D. et al. Epidemiology and outcomes of *Clostridium difficile*-associated disease among patients on prolonged acute mechanical ventilation. **Chest**, v. 136, n. 3, p. 752–758, 2009.