



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

**DANIEL SAMPAIO RODRIGUES**

**EFEITO *IN VITRO* DAS ERTRALINA ISOLADA E ASSOCIADA A ANTIFÚNGICOS  
E SUA AÇÃO SOBRE BIOFILME EM CEPAS DE *Candida spp.***

**FORTALEZA**

**2023**

**DANIEL SAMPAIO RODRIGUES**

**EFEITO *IN VITRO* DA SERTRALINA ISOLADA E ASSOCIADA A  
ANTIFÚNGICOS E SUA AÇÃO SOBRE BIOFILME EM CEPAS DE *Candida spp.***

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.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecília Rocha da Silva.

**FORTALEZA**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

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

---

- R612e Rodrigues, Daniel Sampaio.  
EFEITO IN VITRO DA SERTRALINA ISOLADA E ASSOCIADA A ANTIFÚNGICOS E SUA AÇÃO  
SOBRE BIOFILME EM CEPAS DE *Candida* spp. / Daniel Sampaio Rodrigues. – 2023.  
105 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Hêlio Vitoriano Nobre Júnior.  
Coorientação: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.
1. Infecções fúngicas. 2. *Candida* spp.. 3. Resistência antifúngica. 4. Reposicionamento de fármacos.  
5. Sertralina. I. Título.

CDD 616.9

---

**DANIEL SAMPAIO RODRIGUES**

**EFEITO *IN VITRO* DA SERTRALINA ISOLADA E ASSOCIADA A  
ANTIFÚNGICOS E SUA AÇÃO SOBRE BIOFILME EM CEPAS DE *Candida spp.***

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: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange de Oliveira Pinheiro  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selene Maia de Moraes  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, Dary e Lúcia.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por toda a sabedoria, paciência, confiança, saúde, que me dá diariamente, e a capacidade de discernimento para encarar todos os desafios, e por me fazer entender que na vida nem tudo sai como planejamos, e que isso faz parte, pois nada acontece por acaso, e sempre temos que tirar o melhor e algum aprendizado de todas as situações.

Aos meus pais, Dary e Lucia, por me oferecerem todas as oportunidades de estudo, por acreditarem e investirem em mim sem medidas, por se esforçarem mais do que 1000% para que nunca faltasse nada, sempre acreditando nos meus projetos. Obrigado por todos os ensinamentos passados, pela criação mais do que excelente, por me ensinar a seguir sempre o caminho do certo, correto, e construção de caráter, e sempre terem paciência com seus dois filhos, além de amor incondicional. Vocês são um grande presente de Deus na minha vida!

Ao melhor irmão que a vida poderia me dar, Italo, uma pessoa que eu sempre posso contar, obrigado pela nossa união, e por mesmo de longe sempre tentar estar perto, pelo companheirismo de sempre, pois somos muito mais do que irmão, mas grandes amigos. Obrigado por me entender e me aceitar do meu jeito.

À minha namorada, Izabell, que é um grande porto seguro em todos os momentos da minha vida, obrigado pela paciência e por encarar e apoiar meus projetos junto comigo, pelo amor e companheirismo que existe entre nós, pelos papos cabeça, e pela vida que compartilhamos. Você é essencial, e, como sempre digo, espero um grande futuro com você.

Aos meus padrinhos e sua filha, minha prima Mara, que desde criança são presentes na minha vida quase que diariamente, por todo amor, preocupação, por sempre estarem presentes quando eu preciso e pelos ensinamentos da vida.

À minha tia, Dora, que foi uma peça fundamental na criação minha e do meu irmão desde que nascemos, obrigado pela paciência, por tudo que nos ensinou, você faz parte da nossa educação, e com certeza contribuiu para que eu chegasse onde cheguei, e pra me tornar quem me tornei.

Aos meus familiares em geral, que sempre estão do meu lado, pela união, proporcionando momentos de harmonia, de risadas, de amor, e até de conversar bem sérias, mas sempre com muito respeito a seguir o que é correto, e sempre escutando opiniões muitas vezes contrárias

A todos os meus amigos da vida toda, sejam presentes ou não mais, que participaram de alguma forma da construção do meu ser, me apoiando ou chamando minha atenção em momentos necessários.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior, pela orientação mais do que excelente de sempre, que desde o início da minha graduação me deu a oportunidade de fazer parte desse grupo de pesquisa, e que vem acreditando em mim desde então (quase 8 anos), obrigado por todas as conversas e ensinamentos, digo com muita certeza que são de grande importância para tudo que passou até hoje e que passará.

Às professoras Dra. Cecília Rocha da Silva, Dra. Lívia Gurgel do Amaral Valente e Sá, e ao Prof. Dr. João Batista de Andrade Neto, pelas suas paciências, pelos ensinamentos, e pela credibilidade e acreditação que me dão, agradeço imensamente o tempo que sempre disponibilizam, e todas as conversas e convivência que temos.

Ao LABIMAN, laboratório o qual faço parte, e que me orgulho muito, por tudo de bom que agrega em minha vida, todos os ensinamentos diários aprendidos, e oportunidades geradas.

Aos colegas de laboratório que me acompanham nessa jornada acadêmica, em especial à Vitória Pessoa de Farias Cabral, minha dupla há muito tempo em todas as atividades e perrengues, Amanda Dias Barbosa, Lara Elloyse Almeida Moreira e Thiago Mesquita Cândido, sempre comigo debatendo tudo, contribuindo para a construção do conhecimento, suportando em tudo que preciso, obrigado pela boa amizade de todos.

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

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dr. Emmanuel Silva Marinho e Prof. Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti, pelo tempo e pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Universidade Federal do Ceará, por ser palco de todos os acontecimentos acadêmicos.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos



acostumamos a ver o mundo.” (Albert Einstein)

## RESUMO

As infecções fúngicas tem se tornado um grave problema de saúde pública, principalmente associadas a pacientes com fatores de risco como longos períodos de internação, indivíduos em unidade de terapia intensiva, uso de terapias imunomoduladoras, e portadores do vírus HIV. Dentre essas, *Candida* spp. ganha destaque por sua alta prevalência comparado aos outros fungos, descrito como quarto agente causador de infecções sanguíneas, com taxa de mortalidade chegando a 70%. Sua capacidade de desenvolver resistência aos antifúngicos disponíveis no mercado é uma preocupação crescente, visto que o número destes é reduzido quando comparados aos antibacterianos, o qual pode ocorrer devido a diferentes mecanismos, incluindo a formação de biofilme. Assim, o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas antifúngicas que apresentem atividade não apenas em células planctônicas, mas também em biofilme, se torna uma prioridade, onde o reposicionamento de fármacos e o uso combinado demonstram ser viáveis, pois reduzem tempo e custo de produção de novos medicamentos. A atividade antifúngica dos fármacos antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina frente a cepas de *Candida* spp. é descrita na literatura, e indicam que a sertralina (SER) apresenta atividade nesse microrganismo em baixas concentrações, porém, poucos estudos ainda exploram seu potencial. O presente trabalho objetivou investigar a atividade *in vitro* da SER em cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol, em sua forma planctônica e em biofilme. O efeito inibitório da SER foi avaliado por microdiluição em caldo, como indicado no documento M27-A3 do *Clinical & Laboratory Standards Institute*, a interação farmacológica com fluconazol, itraconazol e anfotericina B pelo método *checkerboard* e o índice da concentração inibitória fracionada, além da determinação do efeito sobre cepas de *Candida* spp. pela relação entre concentração fungicida mínima e concentração inibitória mínima. Seu mecanismo de ação foi avaliado utilizando testes de citometria de fluxo e ensaios *in silico*. Além disso, seu efeito sobre biofilme de *Candida* spp. maturado e em formação foi determinado *in vitro* em placa de 96 poços. Por fim, sua citotoxicidade foi averiguada pelo método do Alamar Blue em células de linfócitos humanos. Sertralina apresentou CIMs variando entre 2 a 16 µg/mL em células planctônicas de *Candida* spp. com efeito fungicida, tendo 93,75% de interações indiferentes com o fluconazol, 37,5% aditivas e 25% sinérgicas com o itraconazol, e 43,75% aditivas com a anfotericina B. O mecanismo de ação da sertralina em cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol sugere estar relacionado com a membrana e parede celular, inibindo a biossíntese

de componentes estruturais essenciais, e sua ação em biofilme. Sua atividade em biofilme ocorre também em baixas concentrações, inibindo mais de 85% do biofilme tanto maturado quanto em formação, e todas as concentrações efetivas encontradas estavam abaixo da  $CI_{50}$ , então seu efeito se dá em concentrações seguras. Assim, vemos que a sertralina é um potencial antifúngico para o tratamento de infecções por *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, tendo efeito em concentrações seguras tanto em células planctônicas quanto em biofilme.

**Palavras-chave:** Infecções fúngicas. *Candida* spp. Resistência antifúngica. Biofilme. Reposicionamento de fármacos. Sertralina.

## ABSTRACT

Fungal infections have become a serious public health problem, mainly associated to patients with risk factors such as long periods of hospitalization, in intensive care units, use of immunomodulatory therapies, and HIV carriers. Among these, *Candida* spp. stands out for its high prevalence compared to other pathogenic fungi, described as the fourth causative agent of blood stream infections, and a mortality rate reaching 70%. Its ability to develop resistance to available antifungals is a growing concern, as their number is reduced compared to antibacterials, which may be due to different mechanisms, including biofilm formation. Thus, the development of new antifungal therapeutic possibilities that present activity not only in planktonic cells, but also in biofilms, becomes a priority, where drug repositioning and combined therapy prove to be viable options, as they reduce the time and cost of new drugs developing. The antifungal activity of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant drugs against *Candida* spp. strains is described in the literature, and indicate that sertraline has an effect on this microorganism at low concentrations, however, few studies have explored its potential. The present work aimed to investigate the *in vitro* activity of SER against sensitive and resistant to fluconazole *Candida* spp. strains, in its planktonic form and in biofilm. The inhibitory effect of sertraline was evaluated according to the broth microdilution standard methodology as indicated in the document M27-A3 of the Clinical & Laboratory Standards Institute, the type of drug interaction with fluconazole, itraconazole and amphotericin B by the *checkerboard* method and the index fractional inhibitory concentration, in addition to determining the effect on *Candida* spp. by the relationship between minimum fungicidal concentration and minimum inhibitory concentration. The mechanism of action was evaluated using flow cytometry and *in silico* assays. Finally, the activity of sertraline on *Candida* spp. was determined *in vitro* in a 96-well plate, for both matured and forming, and its cytotoxicity was investigated by the Alamar blue method in human lymphocyte cells. Sertraline presented MICs ranging from 2 to 16  $\mu\text{g/mL}$  in *Candida* spp. planktonic cells with fungicidal effect, showing 93.75% of indifferent interactions with fluconazole, 37.5% additive and 25% synergistic with itraconazole, and 43.75% additive when combined with amphotericin B. The sertraline mechanism of action against strains of *Candida* spp. resistant to fluconazole seems to be related to the cell membrane and wall, inhibiting the biosynthesis of essential structural components. Its activity in biofilms also occurs at low concentrations, inhibiting more than 85% of the biofilm both matured and in formation, and all effective concentrations found were below the  $\text{IC}_{50}$ , so its effect occurs at safe concentrations. Thus, we can see that

sertraline is a potential antifungal for the treatment of infections caused by fluconazole-resistant *Candida* spp., showing an effect in safe concentrations both in planktonic cells and biofilm form.

**Keywords:** Fungal infections. *Candida* spp. Antifungal resistance. Biofilm. Drug repurposing. Sertraline.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos gerais de resistência antifúngica	19
.....	
Figura 2 – Desafios <i>in vivo</i> para o estabelecimento de infecções por <i>Candida</i> spp. em humanos.....	24
Figura 3 – Estratégias de sobrevivência e mecanismos de virulência de <i>Candida</i> spp.....	26
Figura 4 – Estágios de formação do biofilme fúngico.....	28
Figura 5 – Estrutura química da sertralina em pH fisiológico.....	40
Figura 6 – Ensaio de citometria de fluxo para identificar o provável modo de ação da SER após 24 h de exposição em cepas de <i>Candida</i> spp.....	59
Figura 7 – Fragmentação do DNA após 24 h de exposição de <i>Candida</i> spp. à SER.....	60
Figura 8 – Representação tridimensional do complexo de interação sertralina e Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase.....	64
Figura 9 – Representação tridimensional do complexo de interação sertralina e VT1 com CYP51.....	65
Figura 10 – Interações da sertralina com a proteína ALS3.....	66
Figura 11 – Efeito inibitório da SER sobre viabilidade de biofilmes maduros de cepas de <i>Candida</i> spp. em diferentes concentrações.....	68
Figura 12 – Viabilidade celular dos biofilmes de <i>Candida</i> spp. após diferentes horas de exposição à SER em diferentes concentrações.....	70
Figura 13 – Arquitetura microscópica de células planctônicas de <i>C. albicans</i> tratadas e não tratadas com SER, observadas por MEV.....	72

Figura 14 – Arquitetura microscópica de biofilmes maduros de *C. auris* tratados e não tratados com SER, observados por MEV..... 74

Figura 15 – Arquitetura microscópica do biofilme em formação de *C. auris* tratado e não tratado com SER, observados por MEV..... 76

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Doenças causadas por *Candida* spp. e os respectivos sítios 21 acometidos.....
- Tabela 2 – Infecções causadas por *Candida* spp. e as respectivas terapias 31 recomendadas..
- Tabela 3 – Efeitos da SER e dos fármacos antifúngicos frente a cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol, e suas interações 56 farmacológicas.....
- Tabela 4 – Natureza do efeito inibitório da SER frente a cepas de *Candida* spp. resistentes e sensíveis ao 57 FLC.....
- Tabela 5– Escores de interação de ligação, RMSD, Ki, pKi, aminoácidos e tipos de interações da SER dentro dos receptores de *C. albicans*..... 61
- Tabela 6 – Afinidade de ligação, RMSD, aminoácidos e distância da SER com o receptor de *C. albicans*..... 63



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UTI	Unidade de Terapia Intensiva
SER	Sertralina
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
FLC	Fluconazol
ITC	Itraconazol
AMB	Anfotericina B
ALS	Sequência semelhante a aglutinina
EAP	Proteína de Aderência Extracelular
PGA	<i>Predicted Glycosylphosphatidylinositol-Anchored</i>
EPA	Adesinas Epiteliais
SAP	Proteinases Aspárticas Secretadas
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
RTs	Reguladores Transcricionais
ORF	Quadro de Leitura Aberto
HYR	Regulado por hifa
BCR	Regulador de biofilme e parede celular
HWP	Proteína da parede da hifa
RBT	Reprimido por TUP1
SOD5	Superóxido Dismutase 5
EFG	Proteína de crescimento filamentosso aprimorada
TEC	Tirosina quinase expressa em carcinoma hepatocelular
ZAP	Proteína ativadora responsiva ao zinco
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
WHO	Organização Mundial de Saúde
CDR	Resistência aos Fármacos por <i>Candida</i>
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas
FLX	Fluoxetina
PRX	Paroxetina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>

UFC	Unidades Formadoras de Colônias
DMSO	Dimetilsulfóxido
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
CIM <sub>50</sub>	Menor concentração capaz de inibir visualmente 50% do crescimento do microrganismo
CIM <sub>100</sub>	Menor concentração capaz de inibir visualmente 100% do crescimento do microrganismo
CFM	Concentração Fungicida Mínima
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
SYN	Sinergismo
ADT	Aditivo
IND	Indiferente
ANT	Antagonismo
YND	Caldo de Fermento Nitrogênio Dextrose
IP	Iodeto de Propídio
FPG	Formamidopirimidina DNA-glicosilase
PDB	Banco de Dados de Proteínas
AGL	Algoritmo Genético Lamarckiano
Ki	Constante de inibição
pKi	Cologaritmo de Ki
RMSD	<i>Root Mean Square-Desvio</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
LYS	Lisina
ARG	Arginina
PHE	Fenilalanina
ILE	Isoleucina
GUA	Guanosina
ADE	Adenina
PRO	Prolina
GLU	Ácido Glutâmico
VAL	Valina

CYS	Cisteína
ALA	Alanina
ASN	Asparagina
TYR	Tirosina
TRP	Triptofano
LEU	Leucina
HEM	Heme
THR	Treonina
SER	Serina

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\pm$	Mais ou menos
$\text{\AA}$	Angstrom
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	A importância dos fungos e seu potencial patogênico em humanos.....	15
2.2	O problema da resistência fúngica e seus mecanismos.....	17
2.3	O gênero <i>Candida</i> e as doenças causadas em humanos.....	20
2.4	Mecanismos de virulência expressos por <i>Candida</i> spp.....	23
2.4.1	<i>Biofilmes</i> .....	27
2.5	Tratamentos indicados para candidíases .....	30
2.6	Mecanismos de resistência antifúngica desenvolvidos por <i>Candida</i> spp.....	32
2.7	Alvos moleculares de <i>Candida</i> spp. para o desenvolvimento de novos antifúngicos.....	34
2.8	Estratégias para o desenvolvimento de novos tratamentos para infecções causadas por cepas resistentes.....	36
2.8.1	<i>Associação de fármacos</i> .....	37
2.8.2	<i>Reposicionamento de fármacos</i> .....	38
2.9	SER como potencial agente antifúngico com ação em cepas de <i>Candida</i> spp.....	40
3	HIPÓTESES.....	42
4	OBJETIVOS.....	43
4.1	Objetivo geral.....	43
4.2	Objetivos específicos.....	43

<b>5</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Obtenção das cepas.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Substâncias utilizadas.....</b>	<b>44</b>
<b>5.3</b>	<b>Testes de sensibilidade às drogas.....</b>	<b>44</b>
<b>5.3.1</b>	<i>Avaliação da atividade antifúngica in vitro da SER em cepas de Candida spp..</i>	<b>44</b>
<b>5.3.2</b>	<i>Efeito da SER combinada com fármacos antifúngicos em cepas de Candida spp.....</i>	<b>45</b>
<b>5.3.3</b>	<i>Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) da SER frente a cepas de Candida spp.....</i>	<b>46</b>
<b>5.3.4</b>	<i>Natureza da atividade inibitório da SER frente a cepas de Candida spp.....</i>	<b>46</b>
<b>5.3.5</b>	<i>Análise de dados dos testes de sensibilidade.....</i>	<b>46</b>
<b>5.4</b>	<b>Ensaio para detecção de alterações celulares.....</b>	<b>46</b>
<b>5.4.1</b>	<i>Preparo dos microrganismos.....</i>	<b>46</b>
<b>5.4.2</b>	<i>Determinação da densidade numérica de células viáveis.....</i>	<b>47</b>
<b>5.4.3</b>	<i>Avaliação do potencial de despolarização transmembrana da mitocôndria (<math>\Delta\psi_m</math>).....</i>	<b>47</b>
<b>5.4.4</b>	<i>Detecção do potencial da SER em induzir a apoptose celular.....</i>	<b>47</b>
<b>5.4.5</b>	<i>Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....</i>	<b>48</b>
<b>5.4.6</b>	<i>Identificação de genotoxicidade celular causada pela SER.....</i>	<b>48</b>
<b>5.4.7</b>	<i>Análise de dados dos ensaios de alteração celular.....</i>	<b>49</b>

5.5	Ensaio <i>in silico</i> da interação entre a SER e alvos de <i>Candida</i> spp.....	49
5.5.1	Preparo dos ligantes e receptores para o docking molecular .....	49
5.5.2	Simulação e processamento de dados.....	50
5.5.3	Modos de ligação e análise dos dados de interação receptor-ligante.....	50
5.6	Ensaio de atividade contra biofilme de <i>Candida</i> spp.....	50
5.6.1	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> da SER frente a biofilme pré-formado de <i>Candida</i> spp.....	51
5.6.2	Investigação do efeito preventivo da SER na formação de biofilme de <i>Candida</i> spp.....	51
5.6.3	Análise dos dados de biofilme.....	52
5.7	Visualização das estruturas microscópicas de <i>Candida</i> por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	52
5.7.1	Células planctônicas.....	52
5.7.2	Biofilmes.....	53
5.8	Avaliação da citotoxicidade da SER em células de linfócitos humanos.....	53
5.8.1	Isolamento e preparo das células linfocitárias de sangue periférico humano....	53
5.8.2	Determinação do efeito da SER sobre a viabilidade celular de linfócitos humanos.....	54
6	RESULTADOS.....	55
6.1	SER apresenta atividade antifúngica frente a diferentes espécies de <i>Candida</i> .....	55
6.2	O uso combinado <i>in vitro</i> da SER tem efeitos diferentes dependendo do	55

	antifúngico	
	associado.....	
6.3	SER possui efeito fungicida frente a cepas de <i>Candida</i> spp.....	57
6.4	SER reduz a densidade numérica de células viáveis de <i>Candida</i> spp.....	58
6.5	SER causa despolarização mitocondrial em <i>Candida</i> spp.....	58
6.6	A exposição de <i>Candida</i> spp. ao SER leva à apoptose celular.....	58
6.7	SER induz a formação de EROs em <i>Candida</i> spp.....	58
6.8	SER tem pouco efeito oxidativo no DNA de <i>Candida</i> spp.....	60
6.9	Estudos <i>in silico</i> .....	61
6.10	SER em baixas concentrações reduz a viabilidade dos biofilmes pré-formados de <i>Candida</i> spp.....	67
6.11	SER possui atividade preventiva na formação de biofilme de <i>Candida</i> spp...	69
6.12	SER causa danos à estrutura microscópica de células planctônicas de <i>C.albicans</i> .....	71
	....	
6.13	SER causa danos estruturais à arquitetura do biofilme.....	73
6.14	SER não apresenta citotoxicidade às células de linfócitos humanos.....	77
7	DISCUSSÃO.....	78
8	CONCLUSÃO.....	85
9	REFERÊNCIAS.....	86





## 1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas tem se tornado um grave problema de saúde pública, principalmente quando associadas a pacientes que apresentam fatores de risco como longos períodos de internação, indivíduos em unidade de terapia intensiva (UTI), uso de terapias imunomoduladoras, imunossuprimidos e portadores do vírus HIV (BONGOMIN et al., 2017; FRIEDMAN; SCHWARTZ, 2019; LOCKHART; GUARNER, 2019; ZHOU et al., 2020), onde se estima cerca de 1,5 milhões de mortes anualmente, mais de 4 mil mortes diárias, são associadas a esses microrganismos (BONGOMIN et al., 2017).

Dentre as espécies de fungos patogênicos ao ser humano, o gênero *Candida* ganha destaque devido a sua alta prevalência em relação aos outros microrganismos do mesmo grupo, descrito como o quarto maior agente causador de infecções na corrente sanguínea, com taxa de mortalidade chegando a 70% (GHAZI et al., 2019; PAPPAS et al., 2018), embora estes dados provavelmente não expressem o real parâmetro epidemiológico dessas doenças devido ao seu caráter de notificação não obrigatória em vários países, o que significa que podem haver muito mais casos do que os realmente notificados (FAUSTO; RODRIGUES; COELHO, 2019).

A capacidade desses microrganismos de desenvolverem resistência aos antifúngicos disponíveis no mercado é uma preocupação crescente, visto que o arsenal é reduzido quando comparados aos antibacterianos (CHANG et al., 2017; CORTÉS et al., 2019), o que torna as doenças causadas por isolados resistentes de difícil tratamento, muitas vezes sendo necessário o uso de fármacos com toxicidade elevada, oferecendo maior risco ao paciente.

Ye et al. (2022) demonstraram em um hospital na China que, em um período de seis anos, 20% dos casos de candidemia foram causados por isolados de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos da classe dos azólicos. Corroborando com estes dados, Pfaller et al. (2019) identificaram um aumento expressivo no número de casos de infecções na corrente sanguínea por *C. glabrata*, e dentre elas mais de 10% dos isolados eram resistentes ao fluconazol. Com isso, observa-se que a resistência de *Candida* spp. aos antifúngicos é uma realidade, representando risco aos pacientes, principalmente aos que já se encontram situação grave.

Um importante mecanismo envolvido na resistência é a capacidade de produção de biofilme. Este é um complexo de microrganismos aglomerados em 3D, onde vivem em

harmonia em uma comunidade estruturalmente composta por uma matriz extracelular polimérica que recobre e protege as células de agentes oriundos de estresses ambientais, como drogas antimicrobianas, sistema imunológico e agentes mecânicos (RODRIGUES; GOMES; RODRIGUES, 2020). Várias doenças causadas por *Candida* spp. são associadas à formação de biofilme, como vulvovaginite, candidíase oral, infecções por cateteres, entre outras, o que confere uma melhor adesão do microrganismo ao sítio de infecção e/ou dispositivo médico-hospitalar, além de conferirem maior resistência aos fármacos antifúngicos recomendados para seu tratamento, como os azólicos e poliênicos, tornando o tratamento mais difícil (SARDI et al., 2013).

Diante disso, o desenvolvimento de novas opções terapêuticas antifúngicas que apresentem atividade não apenas em células planctônicas, mas também em biofilme, se torna uma prioridade. Estratégias como o reposicionamento de fármacos, que visa utilizar medicamentos já disponíveis no mercado para fins diferentes dos originais (ASHBURN; THOR, 2004; PUSHPAKOM et al., 2018); e a associação de drogas, a qual torna possível melhorar a eficácia das substâncias em concentrações mais baixas, reduzir sua toxicidade, aumentar o espectro antimicrobiano e prevenir o surgimento ou reverter a resistência (JORGE et al., 2017), podem ser utilizadas, pois reduzem o tempo e o custo de desenvolvimento de novas terapias antifúngicas.

A atividade antifúngica dos fármacos antidepressivos da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) frente a cepas de *Candida* spp. é descrita na literatura (BARBAROSSA et al., 2022; COSTA SILVA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018). No entanto, poucos estudos exploram o potencial anticandida da sertralina (SER) nas formas planctônica e biofilme, apesar de haver evidências de que sua atividade ocorre em baixas concentrações.

Assim, o presente trabalho objetivou a investigação da atividade *in vitro* da SER em cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes aos fluconazol, a natureza de seu efeito inibitório, o tipo de interação farmacológica com fluconazol (FLC), itraconazol (ITC) e anfotericina B (AMB), e seu provável mecanismo de ação, avaliado por citometria de fluxo e ensaios *in silico*, além do efeito em biofilme já formado e como preventivo de sua formação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A importância dos fungos e seu potencial patogênico em humanos

Os fungos representam um importante componente biótico dos ecossistemas, tendo como funções a fixação de nutrientes e minerais, proteção contra estresses ambientais, biocontroladores inibindo a disseminação de outros microrganismos prejudiciais, além de serem saprófitas e decomporem matéria orgânica, transferindo para o solo substâncias fundamentais para o desenvolvimento de outros organismos e mantendo a reciclagem de energia (NEWBOUND; MCCARTHY; LEBEL, 2010; PEROTTO et al., 2013).

Para o ser humano, os fungos são essenciais em muitos aspectos, pois são utilizados na indústria de alimentos e bebida devido ao seu potencial fermentativo para a fabricação de bolos e bebidas alcoólicas, por exemplo, além de servir diretamente como fonte de energia (também é um alimento); no ramo da agricultura, desempenhando papel de melhoria de solos e captação de nutrientes pelas plantas cultivadas; e biocidas, impedindo a proliferação de parasitas prejudiciais às plantações (NEWBOUND; MCCARTHY; LEBEL, 2010).

O modo de vida desses microrganismos é bem variado, podendo ser encontrado desempenhando várias formas de relações ecológicas, como mutualismo, onde age tanto beneficiando outros organismos como a si mesmo; parasita, beneficiando apenas a si e prejudicando o indivíduo parasitado; e comensalismo, retirando recursos apenas para ele sem causar prejuízo à outra espécie (KLIRONOMOS, 2007).

Taxonomicamente, os fungos pertencem, ao domínio *Eukarya* (apresenta um ancestral em comum com os animais), reino *Fungi*, com cerca de três milhões de espécies identificadas até então, distribuídas em vários ambientes, pois são ubíquos, e podem habitar ecossistemas terrestres, aquáticos (rios e lagos) e/ou marinhos (LÜCKING et al., 2020).

Em seres humanos, os fungos podem se tornar patógenos principalmente quando o indivíduo apresenta alguma condição de risco prévia, como imunossupressão, HIV, longo período de internação e pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI) (LOCKHART; GUARNER, 2019; ZHOU et al., 2020). Os fungos de maior importância médica como agentes patogênicos pertencem aos filos *Zygomycota*, *Basidiomycota*, *Ascomycota* e *Deuteromycetes*, onde o último estão inseridos fungos anamórficos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

As infecções fúngicas podem ocorrer em tecidos superficiais, acometendo tecidos mais externos como unhas e pele; mucosas, atingindo tecidos principalmente na região oral, genital e vulvovaginal; podem ser invasivas, adentrando em tecidos mais internos ou até na corrente sanguínea do paciente; e oportunistas, onde o paciente apresenta algum fator que o torna imunossuprimido e os microrganismos conseguem se proliferar e causar doenças sem que o sistema imune seja capaz de controlar a infecção, sendo associado com alta taxa de mortalidade (BROWN et al., 2012).

Mundialmente, essas doenças tem ganhando destaque devido sua alta taxa de morbidade e mortalidade, estimada em até 1 bilhão de indivíduos apresentando alguma doença por esses microrganismos, dentre elas mais de 150 milhões acometidos por doenças fúngicas graves, chegando a mais de 1,5 milhões de óbitos, o que representa mais de 4000 óbitos por dia anualmente, similar à tuberculose e 3 vezes maior que os relatados para malária (BONGOMIN et al., 2017).

Nos Estados Unidos, no ano de 2017, o número de hospitalizações estimadas tendo como causa doenças causadas por fungos foi de cerca de 75 mil indivíduos, representando um custo de 4,5 bilhões de dólares, além de 2,6 bilhões para atendimentos ambulatoriais por problemas de saúde ocasionados pelos mesmos agentes etiológicos. Desses, os gêneros *Candida* e *Aspergillus* foram os mais presentes, com o total de 26,735 e 14,820 mil pacientes, respectivamente (BENEDICT et al., 2019).

Já na América Latina, 6 a 15 mil casos sintomáticos de histoplasmose foram identificados em pacientes HIV positivos (aproximadamente 1 a 5 casos a cada 100 pessoas vivendo com HIV), com uma mortalidade especulada de mais de 9 mil indivíduos, maior do que as relacionadas a tuberculose reportadas nessa localidade (ADENIS et al., 2018).

Um estudo que analisou as autópsias de indivíduos no Brasil, na cidade São Paulo, revelou que antes dos anos 80 a principal causa de morte associada a infecções fúngicas invasivas era por paracoccidioidomicose, porém houve uma mudança a partir dos anos 80 com o aumento da incidência de infecções fúngicas oportunista, como candidíase, sendo associada ao aumento da urbanização juntamente com o aparecimento de novas doenças, além do surgimento da pandemia do HIV e os avanços nos cuidados médicos, muitas vezes com uso de materiais médico-hospitalares invasivos contaminados (DANTAS et al., 2021).

Ainda, Fay et al. (2019) demonstraram que no Rio Grande do Sul (RS), em 2015, *Candida albicans* foi o fungo mais isolado das amostras clínicas analisadas, causando

principalmente tanto infecções superficiais quanto sistêmicas, porém o microrganismo mais associado a infecções sistêmicas, principalmente em pacientes HIV positivos, foi *Cryptococcus neoformans*.

Por fim, em Alagoas, na região nordeste do Brasil, De Albuquerque Maranhão et al. (2019) identificaram que *Candida* spp. foi o fungo mais isolado das amostras obtidas, representando 79,8% do total, e *C. albicans* como a espécie mais frequente. Tais dados demonstram que amostras com suspeitas de fungos necessitam de grande atenção para a correta identificação, pois isto ainda é um problema devido a inexperiência no diagnóstico, podendo levar a complicações severas aos pacientes e até ao óbito quando não feito o tratamento adequado (FAUSTO; RODRIGUES; COELHO, 2019).

Os fungos descritos como maiores causadores de morbidade e mortalidade em humanos pertencem ao gênero *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp. (JANBON et al., 2019), sendo o primeiro o mais isolado dentre os citados, além de ser reportado como o quarto principal agente causador de infecções na corrente sanguínea, com taxa de mortalidade que chega a 70% (GHAZI et al., 2019; PAPPAS et al., 2018).

Apesar disso, tais dados provavelmente não refletem a real situação epidemiológica dessas infecções, visto que em muitos países não há obrigatoriedade de notificação para essas doenças (FAUSTO; RODRIGUES; COELHO, 2019). Com isso, o gênero *Candida* merece destaque, pois é um microrganismo que pode causar sérios problemas de saúde para a população e um expressivo aumento nos custos de saúde, se tornando um problema de saúde pública.

## **2.2 O problema da resistência fúngica e seus mecanismos**

A resistência aos antifúngicos é um problema emergente e preocupante, que vem ganhando destaque por dificultar o tratamento de infecções causadas por isolados resistentes aos tratamentos preconizados (FISHER et al., 2018), sejam eles de primeira linha ou alternativos.

Tal problema se revela mais grave quando levamos em consideração que a quantidade de fármacos antifúngicos disponíveis no mercado é bem inferior quando comparada aos antibacterianos (CHANG et al., 2017; CORTÉS et al., 2019), muitas vezes sendo necessário o uso de drogas que apresentam maior risco de toxicidade, como a anfotericina B (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009), devido aos

tratamentos que possivelmente eram menos tóxicos não estarem sendo efetivos, além da possibilidade de disseminação por transmissão entre pacientes e uso de materiais contaminados (CORTEGIANI; MISSERI; CHOWDHARY, 2019; MOREHEAD; SCARBROUGH, 2018).

Pfaller (2012) classificou a resistência de duas formas: microbiológica, definida quando a ação do antimicrobiano na inibição do patógeno se dá em concentrações elevadas, superiores às necessárias para sua atividade em cepas selvagens (que não possuem mecanismos de resistência adquiridos), mas podendo ainda ser utilizada em uma faixa de concentração segura para o paciente; e clínica, onde apenas em concentrações muito elevadas do fármaco, maiores das que as referenciadas como seguras, observa-se a atividade inibitória. Em suma, a resistência é identificada quando concentrações usuais dos tratamentos não demonstram efetividade, ou quando o efeito é alcançado em faixas de concentrações específicas para prováveis resistências, com eficácia clínica não comprovada (PFALLER, 2012).

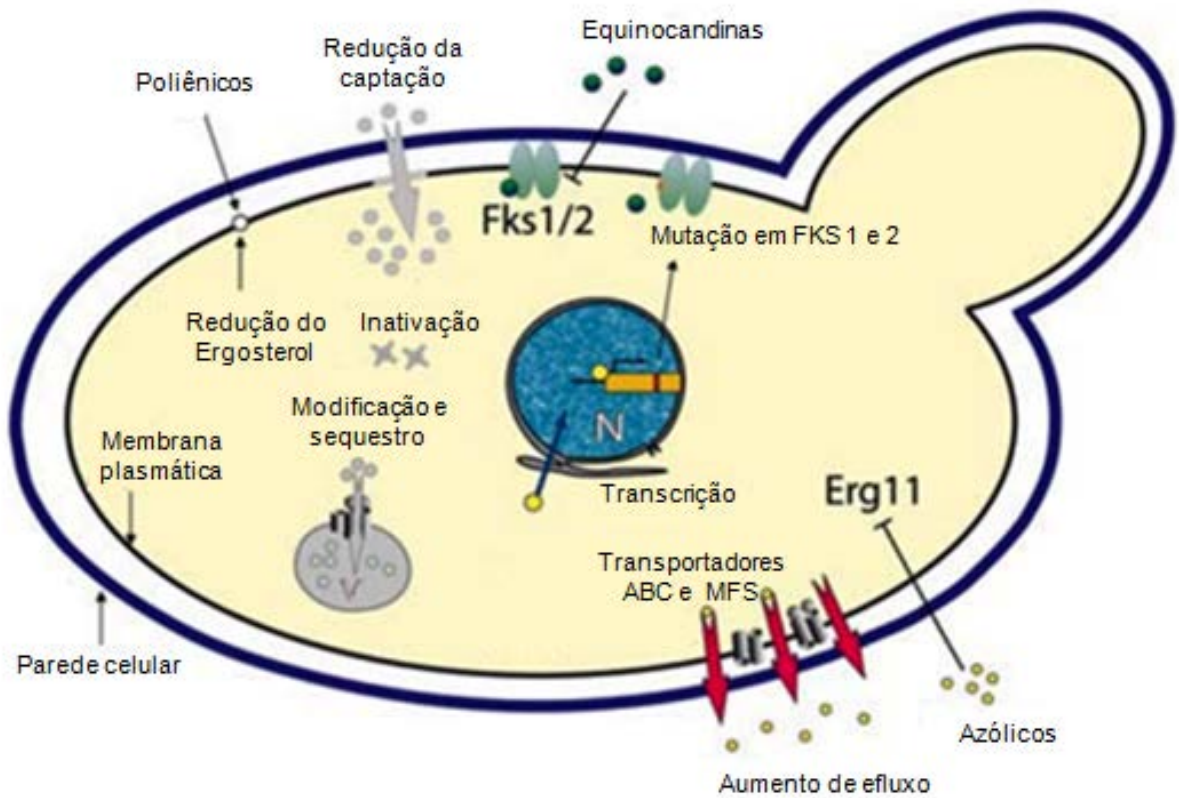
Alguns fatores podem contribuir para o desenvolvimento da resistência, como condições de estresses ambientais e pressão seletiva devido ao uso de antimicrobianos, em que cepas podem sobreviver e se multiplicarem, gerando uma comunidade que não é afetada por esses fármacos, ocorrendo principalmente pelo seu uso terapêutico indiscriminado devido à má prescrição ou automedicação; extensivo uso de droga antimicrobianas na agricultura para controle de pragas; e colonização por cepas contendo genes de resistência que podem ser transferidos para outros microrganismos (UDDIN et al., 2021).

Ainda, a resistência pode ser do tipo plasmidial ou cromossômica, sendo essa codificada por genes localizados em plasmídeos microbianos e com maior facilidade de transferência para outros microrganismos através de conjugação, por exemplo, e esta quando o mecanismo é codificado por sequências presentes no material genético nuclear, cromossômico, onde as células filhas herdaram tal característica (HARBOTTLE et al., 2006).

Os fungos podem apresentar diversos mecanismos de resistência (Figura 1), sendo eles a produção de bombas de efluxo, que tem a capacidade de expulsar o fármaco para fora da célula impedindo que se ligue ao seu receptor (quando intracelular); modificação de sítios específicos e a consequente alteração do sítio de ligação do fármaco, onde com a mudança ocasionada neste pode reduzir a afinidade da droga e reduzir sua efetividade; alterações enzimáticas, quando enzimas produzidas pelo patógeno agem inativando a droga; e a

superexpressão de genes relacionados à resistência, além de aumento na produção de substâncias alvos de moléculas antimicrobianas como uma forma de compensar as que estão sendo inibidas devido a ligação com o antifúngico, entre outros mecanismos(WHALEY et al., 2017).

Figura 1 – Mecanismos gerais de resistência antifúngica



Fonte: Adaptado de Tscherner & Schwarz Müller & Kuchler (2011)

A resistência fúngica é uma realidade presente principalmente em ambientes hospitalares, a qual causa grande preocupação devido às altas taxas de morbidade e mortalidade(BONGOMIN et al., 2017; FRIEDMAN; SCHWARTZ, 2019), pois muitas vezes esses pacientes já apresentam certa fragilidade e o microrganismo acaba causando doenças graves. Além disso, tal problema se torna exacerbado devido às opções terapêuticas antifúngicas já serem normalmente restritas, com número de fármacos reduzido quando comparado aos antibacterianos(CHANG et al., 2017; CORTÉS et al., 2019), o que torna as doenças causadas por isolados resistentes de difícil tratamento, muitas vezes sendo necessário o uso de drogas com toxicidade elevada, o que ocasiona em maior risco ao paciente.

Em um estudo realizado na África do Sul durante cerca de um ano, Govender et al. (2016) viram que de um total de mais de 2 mil casos de candidemia detectados 531 foram



causados por *Candida parapsilosis*, principalmente em neonatos, e dentre essas mais de 60% dos isolados eram resistentes ao fluconazol, além de 44% serem resistentes ao fluconazol e ao voriconazol simultaneamente, o que se torna preocupante quando leva-se em consideração que essa espécie faz parte da microbiota da pele humana, sendo mais fácil seu acesso a tecidos mais internos e corrente sanguínea quando há alguma porta de entrada nesse órgão, podendo ser devido a inserção de materiais médico-hospitalares invasivos ou por fissuras acidentais.

Nos Estados Unidos, entre os anos de 2015 e 2017, de 179 amostras isoladas de *Aspergillus fumigatus*, 26% foram consideradas resistentes tanto para o itraconazol quanto para voriconazol, o que revela uma preocupação devido a esse microrganismo ser mais associado a infecções pulmonares, como pneumonias, em indivíduos com alguma condição de imunodepressão ou imunossupressão (VERWEIJ et al., 2021).

Ainda, observa-se atualmente a emergência de patógenos fúngicos multirresistente se tornou uma preocupação ainda maior, como *Candida auris*, que apresenta sensibilidade reduzida para um largo número de antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções do gênero, como voriconazol, itraconazol, posaconazol, além de anfotericina B, com 90% dos isolados reportados com concentrações efetivas *in vitro* do fluconazol sendo maiores que 64 µg/mL (RHODES; FISHER, 2019).

A organização mundial de saúde, em 2022, emitiu um documento elencando fungos prioritários para o enfoque em pesquisa e desenvolvimento de novas terapias devido o acréscimo do número de isolados resistentes, além do controle de suas infecções e uso indiscriminado de antifúngicos, sendo as espécies *C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* consideradas de grande alerta (WHO, 2022).

Diante desses dados, as infecções fúngicas se revelam como um grave problema de saúde pública que merecem a devida atenção, sendo necessárias medidas para contenção, controle sanitário e desenvolvimento de novos tratamentos para essas doenças, para que o número de isolados resistentes não continue crescendo e, conseqüentemente, causando maiores gastos de saúde por hospitalização, aumento de morbidade e mortalidade, bem como riscos à segurança dos pacientes.

### **2.3 O gênero *Candida* e as doenças causadas em humanos**

O gênero *Candida* é responsável pela maior parte das infecções causadas por fungos em humanos, onde esses microrganismos são principalmente oportunistas, acometendo

pacientes com alguma condição de imunocomprometimento, como HIV/AIDS (KÖHLER et al., 2017). Aproximadamente 200 espécies constituem esse gênero(BORMAN; JOHNSON, 2021), porém, para humanos, as mais isoladas em amostras de infecções (> 90%) são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*(KÖHLER et al., 2017; PAPPAS et al., 2015), e mais recentemente *C. auris* vem causando grande preocupação devido sua característica de sensibilidade reduzida aos fármacos antifúngicos disponíveis(RHODES; FISHER, 2019).

*Candida* spp. são microrganismos ubíquos, comensais ao ser humano, habitando regiões de mucosa como a vulva vaginal em mulheres, trato gastrointestinal, uretra e o trato respiratório(ALONSO-VALLE et al., 2003; CIUREA et al., 2020). Esses fungos são taxonomicamente pertencentes ao reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae* e gênero *Candida*(GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Esse microrganismo vem se destacando devido a sua alta prevalência em relação a outros gêneros de fungos, sendo reconhecido como o mais isolado em amostras clínicas, principalmente em pacientes internados, responsável por cerca de 750 mil casos de doenças invasivas anualmente (BONGOMIN et al., 2017).

Dentre as espécies, *C. albicans* é relatada como a mais isolada e crítica(WHO, 2022), responsável por muitos dos casos de candidíases invasivas principalmente em pacientes com imunossupressão(PFALLER et al., 2019).No entanto,com o passar dos anos tem se observado um aumento da incidência do grupo das não-*albicans*, variando a espécie mais ascendente dependendo da região geográfica do globo e o perfil do paciente acometido, onde essa mudança é associada à existência de espécies intrinsecamente resistentes a classes de antifúngicos, como os azólicos, ou até mesmo pela alta capacidade de desenvolvimento de resistência pelo microrganismo devido ao uso indevido de terapias disponíveis, por exemplo (PFALLER et al., 2019; WHALEY et al., 2017).

*Candida* spp.é responsável por causar diversas doenças em seres humanos, podendo serem tanto superficiais, como invasivas, com alta taxa de morbidade e mortalidade principalmente em imunocomprometidos, em que o fungo precisa primeiramente se fixar na célula do hospedeiro para que, em seguida, este invada o tecido(CIUREA et al., 2020; WHALEY et al., 2017). As doenças causadas pelo gênero *Candida* estão elencadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Doenças causadas por *Candida* spp. e os respectivos sítios acometidos

<b>Sítio de infecção</b>	<b>Doença</b>
Trato respiratório superior	Faringite Sinusite Laringite Esofagite
Pulmão	Pneumonia Bola fúngica Empiema
Olhos	Endoftalmite Ceratite
Trato geniturinário	Vulvovaginite Cistite e pielonefrite Prostatite
Espaço intra-abdominal	Peritonite Abscessos viscerais
Sistema cardiovascular	Endocardite Pericardite
Sistema nevosso central	Meningites Abscessos cerebrais
Pele e tecidos moles	Feridas Superficiais e cutâneas Nódulos cutâneos
Ossos e articulações	Osteomielite Artrite
Outros	Infecções protéticas Candidemia

Fonte: Adaptado de Murray, Microbiologia Médica, 8ª ED, 2017.

Peritonites causadas por *Candida* spp. apresentaram números consideráveis em diversos países no mundo anualmente, com 17,640 mil casos relatados e incidência de 1,15 casos a cada 100,000 habitantes, sendo avaliado como cerca de 50% de todos os casos de candidíases invasivas. Porém, esse número varia entre os países, onde no México, Alemanha, Nigéria e Espanha demonstram incidência de 4,98, 4,6, 1,5 e 1,42 casos a cada 100,000 habitantes, respectivamente.

Benedict et al. (2019) analisaram casos de hospitalizações por infecções fúngicas nos EUA durante em um período de 10 anos, onde encontraram que o microrganismo mais isolado foi *Candida* spp., com um total de 26,753 mil internações, representando gastos de cerca de 1,4 bilhões de dólares.

Na América Latina, Falci & Pasqualotto (2019) avaliaram dados de 129 instituições de 14 países a respeito dos fungos isolados do total de amostras processadas, onde foi visto que cerca de 36% dos locais estudados apresentavam incidência moderada de isolados fúngicos, com *Candida* spp. sendo responsável por 94% de todos os casos. Vale salientar que apenas 9% das instituições apresentavam condições para atender aos padrões

mínimos para rotina micológica, conforme determinado pela Confederação Europeia de Micologia Médica, o que demonstra que o resultado pode não refletir a realidade nas localidades.

Na região Centro Oeste do Brasil, Santana et al. (2019) avaliaram 93 pacientes com candidúria, dentre eles *C. tropicalis* foi a mais isolada (37,6%), seguida por *C. albicans* (36,6%), *C. glabrata* (19,3%), complexo *C. parapsilosis* (4,3%), *C. lusitaniae* (1,1%; n = 1) e *C. krusei* (1,1%; n = 1), onde a antibioticoterapia e o uso de sonda vesical de demora foram os fatores predisponentes mais frequentes entre os pacientes.

Por fim, De Medeiros et al. (2019) demonstraram que, no Nordeste do Brasil, em um período de 6 anos (2011 a 2016), a incidência de candidemias foi de 2,23 episódio a cada 1000 admissões hospitalares, porém a taxa de mortalidade foi elevada, equivalente a 55,9%. *C. albicans* foi a espécie mais isolada (35,3%), seguido de *C. tropicalis* (27,4%), *C. parapsilosis* (21,6%) e *C. glabrata* (11,8%), por fim, o mesmo trabalho relatou que as infecções com maiores taxas de mortalidade foram causadas por *C. albicans* e *C. glabrata*, esta última com 100% dos pacientes sendo levado a óbito, revelando o quão grave é tal infecção.

Assim, observa-se que são diversas as doenças associadas a *Candida* spp., sendo uma grande preocupação mundial devido a sua alta incidência em várias localidades do globo, associada a uma elevada taxa de mortalidade e gastos de saúde bilionários para pacientes hospitalizados, tornando-as um grave problema de saúde pública.

#### **2.4 Mecanismos de virulência expressos por *Candida* spp.**

O gênero *Candida* é reconhecido por apresentar vários mecanismos de virulência diferentes que contribuem para que o microrganismo supere as barreiras ambientais, onde são associados à sua capacidade de sobrevivência e flexibilidade adaptativa diante de fatores ambientais (Figura2). Tais características possibilitam que os membros desse grupo exerçam funções primordiais para que se estabeleçam em diversas localidades, seja pela aquisição de nutrientes, resistindo à variação de temperatura, oferecendo possibilidade movimentação para busca de substratos energéticos, e até a resistência ao sistema imune do hospedeiro e fármacos antifúngicos (KÖHLER et al., 2017).

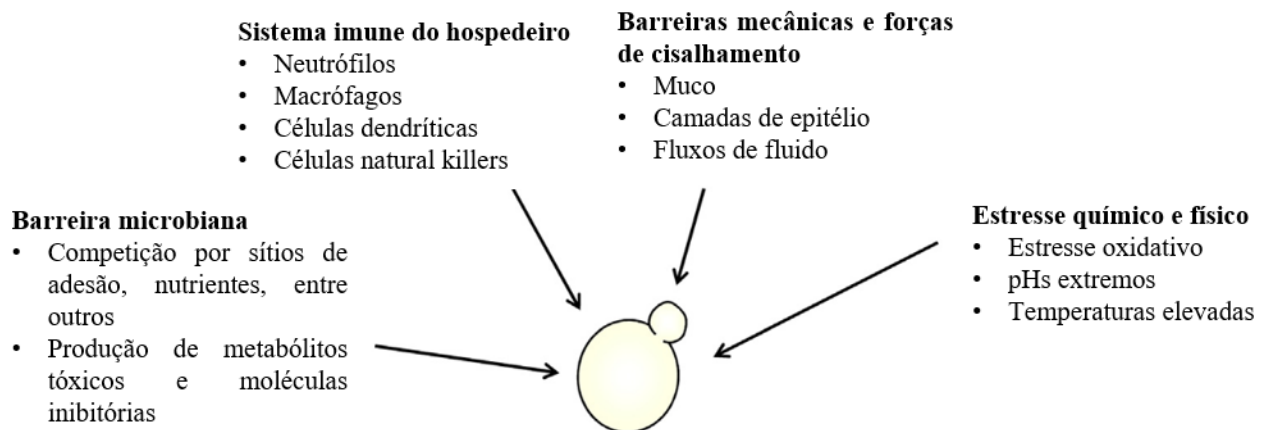


Figura 2 – Desafios *in vivo* para o estabelecimento de infecções por *Candida* spp. em humanos

Fonte: Adaptado de Polke & Hube & Jacobsen (2015)

Um dos fatores de virulência presente nesses fungos é o seu polimorfismo, ou seja, a capacidade de algumas espécies transitar entre as formas de leveduras, importante para a disseminação das células pelos diversos tecidos, e hifas ou pseudo-hifas, que é associada à manutenção da adesão do microrganismo no local de colonização, bem como a invasão ao hospedeiro, quando há algum fator de estímulo para que *Candida* spp. se torne patogênica, e evasão do sistema imune, onde a transição entre essas duas formas é desencadeada por sinais ambientais semelhantes a condições de crescimento desfavoráveis um ambiente supostamente hostil, como alta temperatura, pH neutro, baixa concentração de ácidos graxos, entre outros (CIUREA et al., 2020; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015).

A capacidade de adesão também é uma importante característica que contribui para a disseminação de *Candida* spp., seja como comensal ou como patógeno, e isso é possibilitado devido a presença de proteínas presentes na superfície do fungo chamadas de adesinas. Existem vários tipos de adesinas, como as ALS (Sequência semelhante a aglutinina), um grupo de 8 proteínas da parede celular (ALS 1-7 e 9) associadas à adesão às células do hospedeiro ou superfícies abióticas, invasão, aquisição de ferro e importante em estágios iniciais na formação de biofilme; EAP1 (Proteína de Aderência Extracelular), que contribui para a adesão *in vivo* e *in vitro*, assim como no desenvolvimento de biofilme nos estágios iniciais; PGA1 (*predicted glycosylphosphatidylinositol-anchored*), que é importante não apenas para adesão e formação de biofilme, mas também para manutenção da estabilidade da parede celular fúngica; EPA (Adesinas Epiteliais), que é essencial para adesão de *C. glabrata* ao trato urinário, entre outras proteínas (CIUREA et al., 2020; DE BARROS et al., 2020).

Quando em condições adequadas, *Candida* spp. pode invadir as células do hospedeiro e se disseminar para tecidos distantes do original, o qual previamente era um microrganismo comensal. Para isso, proteínas denominadas invasinas auxiliam nesse processo. Esse processo é normalmente considerado patogênico, e pode ocorrer pela indução da endocitose da célula fúngica ou por meio de penetração ativa através de dano à célula hospedeira (CIUREA et al., 2020).

Outro mecanismo de virulência presente em *Candida* spp. é a produção de enzimas que facilitam sua entrada nos tecidos. Algumas destas são bem estudadas, como as SAPs (Proteinases Aspárticas Secretadas), que facilitam a invasão do microrganismo à célula hospedeira degradando colágeno, fibronectina, além de neutralizar a ação do sistema imune por meio de inativação de IgG e sistema complemento; fosfolipases, que hidrolisam ligações do tipo éster em glicerofosfolipídeos presentes na membrana celular da célula hospedeira, causando sua lise; e lipases, que catalisam a hidrólise de triacilglicerol (CIUREA et al., 2020).

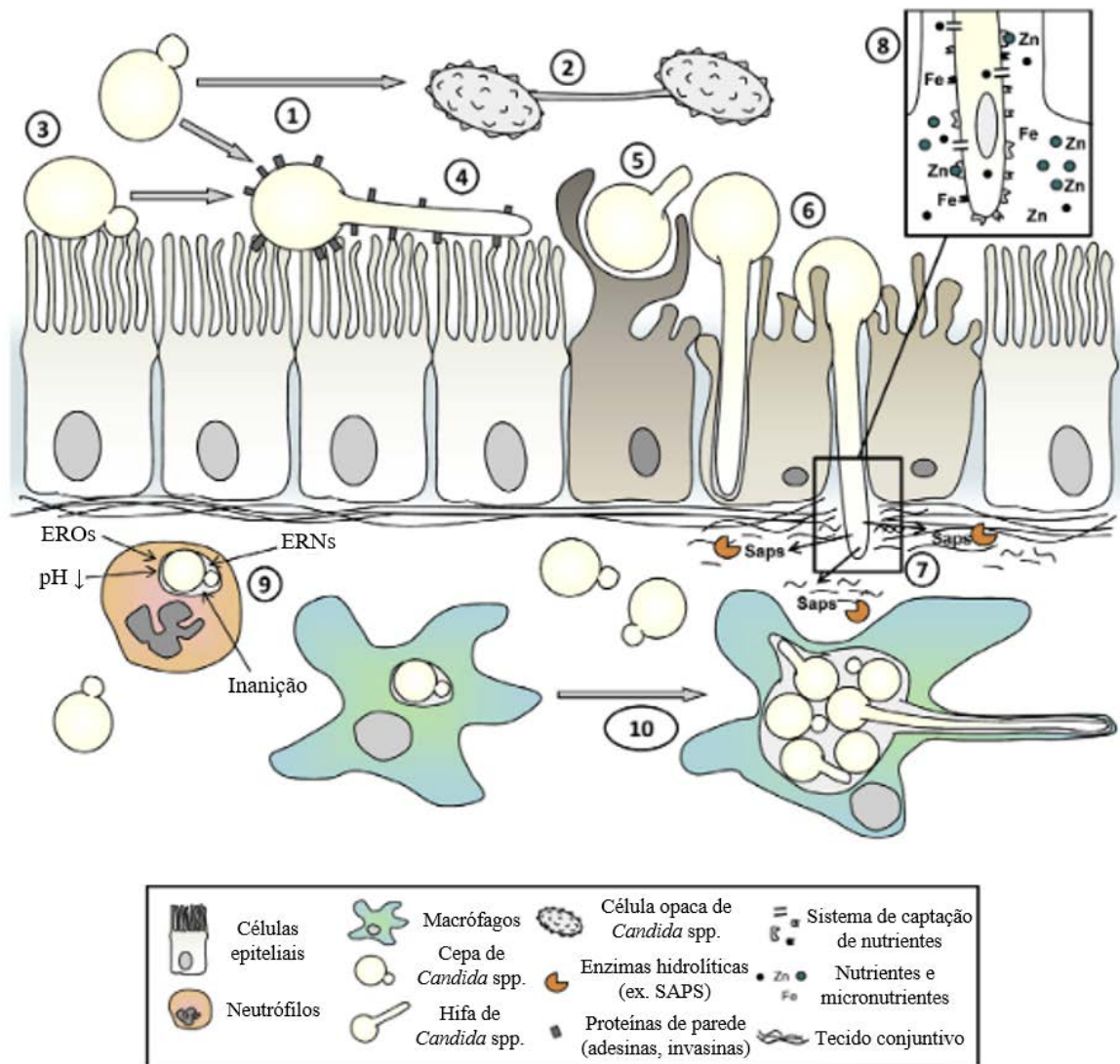
A alta plasticidade genômica ocasionada por recombinação gênica, elementos transponíveis, perda de heterozigosidade cromossômica, entre outros, também é um importante mecanismo de virulência observado em cepas de *Candida* spp. Esta característica confere ao microrganismo a capacidade de adaptação a diversos fatores ambientais, aumentando a expressão de vários mecanismos de virulência ou até mesmo desenvolvendo mecanismos de resistência a fármacos antifúngicos (CIUREA et al., 2020).

Por fim, um mecanismo de virulência muito importante é a capacidade de formar biofilme, comunidades microbianas complexas organizadas de maneira a melhorar sua sobrevivência com comunicação entre as células, que facilita a aderência, perpetuação e o sucesso da colonização e infecção microbiana em sítios bióticos ou abióticos. *Candida* spp. possui alta capacidade de produção desse, sendo muitas das doenças causadas por este microrganismo relacionadas à presença dessas estruturas, conferindo maior resistências às terapias, e conseqüentemente dificultando a cura do paciente (CIUREA et al., 2020; SARDI et al., 2013).

Diante do exposto, vemos que o gênero *Candida* apresenta diversos recursos estruturais e enzimáticos que facilitam sua proliferação no local onde se encontra, seja ele biótico ou abiótico, causando associações benéficas ou malélicas ao hospedeiro, e muitas vezes sendo capaz de escapar de suas defesas. Assim, é importante conhecermos os mecanismos de virulência microbiano (Figura3), pois é necessário entender a ecologia do fungo, seu modo de vida, para seu futuro controle, seja ele por meio de alterações ambientais,

ou pelo desenvolvimento de drogas que atuem impedindo a expressão ou atividade de tais mecanismos.

Figura 3 –Estratégias de sobrevivência e mecanismos de virulência de *Candida* spp.



Fonte: Adaptado de Polke & Hube & Jacobsen (2015). (1) Flexibilidade morfológica; (2) mudança entre estágios de reprodução e resistência; (3) filamentação induzida por contato; (4) expressão de adesinas associada a hifas; (5) invasão às células hospedeiras por endocitose induzida ou (6) penetração ativa; (7) liberação de enzimas hidrolíticas [proteases aspárticas secretadas (Saps)] que contribuem na penetração e a quebra do material tecidual; (8) aquisição de nutrientes e micronutrientes de células hospedeiras, por exemplo, sistemas de absorção de zinco e ferro; (9) vias de resposta ao estresse oxidativo, que facilitam a resistência a condições ambientais adversas, por exemplo, espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS), baixo pH e ambientes pobres em nutrientes; (10) modificação ativa do fagossoma para promover o crescimento das hifas, facilitando o dano e a fuga dos macrófagos.

### 2.4.1 Biofilmes

Biofilmes são estruturas microbianas 3D descritas como um fator chave para o estabelecimento de muitas das infecções, estimada em cerca de 80%, causadas por *Candida* spp.(NOBILE; JOHNSON, 2015). Esses são agregados microbianos complexos, os quais vivem em uma comunidade composta por uma matriz extracelular polimérica (polissacarídica) que recobre e protege as células contra diversos tipos de estresse ambiental, como o sistema imune, agentes mecânicos, ou até mesmo fármacos antifúngicos, podendo estar presente apenas uma espécie ou várias, ou até mesmo associação de fungos com bactérias, em que cada microrganismo exerce um papel contribuindo para a sobrevivência um do outro(RODRIGUES; GOMES; RODRIGUES, 2020).

As condições clínicas do paciente infectado estão mais associadas à presença do microrganismo na forma de biofilme já formado, uma vez que o diagnóstico deste como células planctônicas e/ou de biofilmes em formação previamente aos sinais e sintomas da infecção surgirem é muito difícil (ROY et al., 2018).

Biofilmes conferem maior resistência devido a vários fatores, sendo eles a limitação da entrada do fármaco ou fagocitose por macrófagos pela matriz extracelular, aumento da produção de bombas de efluxo que expulsam os antifúngicos do meio intracelular, modulação da expressão de alvos dos fármacos, presença de diferentes morfologias fúngicas e células persistentes às quais são sujeitas à ação das drogas, entre outros (PEREIRA DE MELLO et al., 2020).

A formação do biofilme se dá primeiramente pela chegada, adesão e proliferação de células leveduriformes em uma superfície de contato de natureza biótica (células hospedeiras) ou abiótica (cateteres, superfícies de bancadas, entre outras), seguida de sua transição para a forma filamentosa no topo do biofilme. Posteriormente, esta estrutura é envolvida em uma matriz extracelular autoproduzida, formando uma comunidade tridimensional pluricelular, onde as células leveduriformes se destacam e migram para outros tecidos para nova colonização ou infecção (CIUREA et al., 2020). Assim, vemos que quatro etapas são envolvidas na formação de biofilme em *Candida* spp.: adesão, proliferação, maturação e a dispersão das células (Figura 4)(KIOSHIMA et al., 2019).



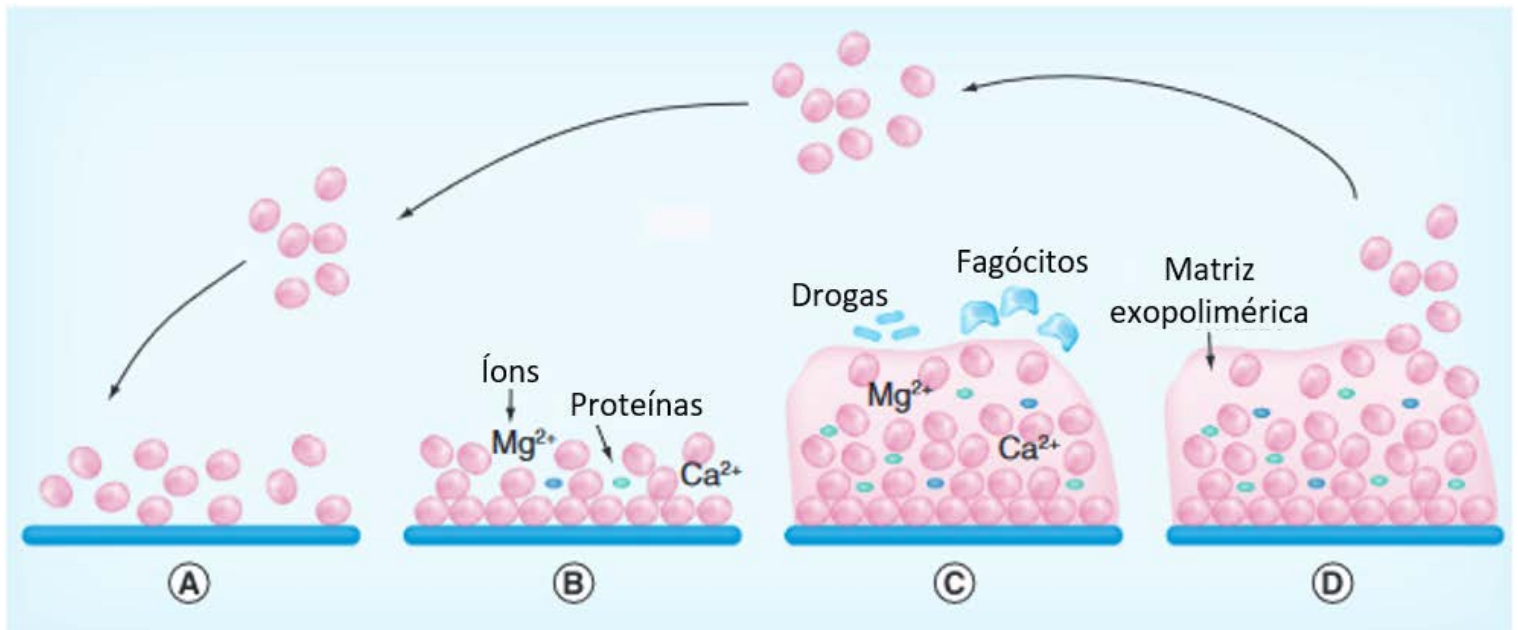


Figura 4 – Estágios de formação do biofilme fúngico

Fonte: Adaptado de Cuéllar-Cruz et al. (2012). (A) Adesão de *Candida* spp. por proteínas da parede celular, (B) proliferação de *Candida* spp. e início da formação de matriz contendo polissacarídeos, carboidratos, proteínas e outros componentes, (C) maturação do biofilme, com aumento da proteção contra células fagocitárias, drogas e substâncias tóxicas, e (D) desprendimento e dispersão de células fúngicas para colonização de tecidos ou dispositivos implantados do hospedeiro.

Para que seja possível o processo de formação do biofilme, *Candida* spp. dispõe de um arsenal de substâncias denominadas reguladores transcricionais (RT), os quais são responsáveis no controle e regulação destas estruturas devido a estímulos ambientais, por exemplo. Existem 9 principais RTs, cada um com funções primordiais em diferentes fases da formação de biofilmes tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo eles *BCR1*, *EFG1*, *NDT80*, *ROB1*, *TEC1*, *BRG1*, *FLO8*, *GAL4*, e *RFX2* (DE BARROS et al., 2020).

A fase de adesão, cuja célula se ancora na superfície e forma uma camada basal microbiana que será a base do biofilme, é regulada por genes responsáveis por atuar no início do processo (*ALS1*, *ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *EAP1*, *MSB2*, *PGA6*, *SIM1*, *ORF19.2449*, e *ORF19.5126*) e genes envolvidos na fase tardia da adesão (*HYR1*, *FAV2*, *IFF4*, *IFF6*, *PGA32*, *PGA55*, *ORF19.3988*, *ORF19.4906*, *ORF19.5813*, e *ORF19.7539.1*), onde o *ALS3* e o *BCR1* são dois genes de suma importância nesse processo, o primeiro sendo uma adesina hifa-específica de *C. albicans* descrita como um importante fator na aderência em tecidos e a outros microrganismos, e o segundo regulando a expressão dos genes mencionados, todos sendo descritos como imperativos para a adesão celular (DE BARROS et al., 2020).

Em seguida, na fase de proliferação celular, caracterizada pela transição da forma de levedura à filamentosa que leva à formação de ligações entre as células e da maior robustez

ao biofilme, outras substâncias são reconhecidas como importantes para esse processo, como adesinas (codificadas pelos genes *HWP1*, *HWP2*, *RBT1*, *ALS3*, *ALS10*, *FAV2* e *PGA55*), enzimas de degradação tecidual (codificadas pelos genes *SAP4*, *SAP5* e *SAP6*), proteínas antioxidantes (codificadas pelo gene *SOD5*), e toxinas peptídicas citolíticas (codificadas pelo gene *ECE1*). Muitos dos genes descritos como mais importantes atuam nesta fase, sendo eles *EFG1*, *ROB1*, *BCR1*, *NDT80*, *FLO8* e *TEC1*, envolvidos na regulação da transição da forma de levedura para hifa (DE BARROS et al., 2020).

A próxima fase é a maturação, que é caracterizada pela produção da matriz extracelular polimérica pelas células, importante para a sustentação da arquitetura do biofilme, além de oferecer proteção para o mesmo. A matriz é composta por diversas substâncias como enzimas, proteínas, carboidratos, e material genético, dentre elas glicoproteínas (55%), carboidratos (25%, principalmente  $\alpha$ -manana e  $\beta$ -1,6-glucana, além de  $\beta$ -1,3-glucana em menor quantidade, que é responsável pela resistência ao fluconazol), lipídios (15%) e ácidos nucleicos (5%), todos sendo fundamentais para a integridade estrutural. Os genes envolvidos na regulação da produção da matriz são *ZAPI*, *CCR4* (reguladores da produção de  $\beta$ -1,3-glucana) e *RLM1* (estimula a produção de matriz) (DE BARROS et al., 2020).

Na última fase, as células leveduriformes se desprendem da estrutura do biofilme, sendo capazes de migrar para colonizar ou causar infecção em outros sítios, e possivelmente formar novos biofilmes. Nesta fase, é crucial que a célula fúngica seja capaz de se desprender da comunidade microbiana, havendo genes reguladores para tal característica, como *UME6*, *PES1*, e *NRG1*, além de substâncias ancoradas na superfície (moduladas pelo gene *YWPI*) como chaperonas e proteínas de parede (ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol na superfície microbiana) que exercem efeito anti-adesivo (DE BARROS et al., 2020).

Com isso, vemos que o biofilme confere muitas vantagens ao microrganismo, seja para seu melhor estabelecimento em diversos sistemas, para aquisição de nutrientes, adesão, perpetuação de espécie, mas também como um importante fator de virulência relacionado à sua resistência a estresses externos, como o sistema imune, proteínas antimicrobianas e fármacos antifúngicos por meio da expressão de bombas de efluxo, presença de matriz extracelular e presença de células persistentes (NOBILE; JOHNSON, 2015), tornando, assim, as infecções por *Candida* spp. de difícil tratamento, visto sua alta capacidade formação dessas estruturas.

## 2.5 Tratamentos indicados para candidíases

*Candida* spp. é capaz de causar diversas doenças, sejam elas superficiais ou invasivas, em diferentes sítios anatômicos, como explanado no tópico anterior, e o tratamento pode variar de acordo com o local da infecção (Tabela 2). O arsenal terapêutico antifúngico é limitado, em comparação aos antibacterianos (CHANG et al., 2017; CORTÉS et al., 2019), onde existem atualmente quatro classes principais disponíveis no mercado: azólicos, poliênicos, equinocandinas e as pirimidinas (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; COLOMBO et al., 2013; PAPPAS et al., 2015).

Os azólicos são os agentes antifúngicos mais utilizados devido ao seu menor risco de toxicidade em relação às outras classes, amplo espectro de ação, além de possuir apresentações tanto orais como injetáveis, além de tópicas, onde o fluconazol é o fármaco mais utilizado. O efeito antifúngico dessas drogas se dá por meio da inibição seletiva da via biossintética do ergosterol, importante esteroide componente estabilizante da membrana celular dos fungos, se ligando à enzima 14- $\alpha$ -desmetilase e impedindo a conversão do lanosterol à ergosterol, um processo fundamental para a manutenção da viabilidade celular do microrganismo (COLOMBO et al., 2013; PAPPAS et al., 2015).

Poliênicos são uma classe de antifúngicos naturais que também apresentam amplo espectro, sendo seus representantes a nistatina e a anfotericina B, os quais são utilizados principalmente para infecções superficiais e candidíases invasivas, respectivamente. Seu mecanismo de ação está relacionado à ligação aos esteróis ancorados na membrana da célula fúngica, formando poros na célula, causando desequilíbrio osmótico e extravasamento de material intracelular, levando à morte do microrganismo (COLOMBO et al., 2013; PAPPAS et al., 2015).

A classe das equinocandinas é relativamente nova, em comparação com as anteriores citadas, utilizadas exclusivamente por via intravenosa para o tratamento de diversos tipos de candidíases invasivas, sendo bem distribuída por quase todos os tecidos do corpo, menos para o olho. Diferente dos fármacos já citados, seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição da produção da parede celular fúngica, onde ela se liga à 1,3- $\beta$ -D-glucana sintase, enzima importante para a síntese do 1,3- $\beta$ -D-glucano, componente da parede

celular fúngica fundamental para sua estruturação (COLOMBO et al., 2013; PAPPAS et al., 2015).

As pirimidinas tem como representante a flucitosina, ou 5-fluorocitosina, utilizado normalmente em associação com outros antifúngicos, tem como grande vantagem sua ação ser seletiva à célula fúngica, não interagindo com as células de mamíferos, o que implica em um baixo potencial de geração de efeitos adversos (PAPPAS et al., 2015). Esse fármaco age como antimetabólico, onde, para que exerça seu efeito antifúngico, ele é captado para dentro da célula a partir da enzima citosina permease e transformado pela citosina desaminase em sua forma ativa 5-fluorouracil, assim esta substância se incorpora ao RNA fúngico no lugar da base nitrogenada uracila, causando falha na síntese proteica microbiana e, conseqüentemente, morte celular. Além disso, o 5-fluoroacil também tem atividade em DNA através da sua conversão em ácido fluoro-desoxiuridílico, a qual inibe a ação da enzima timidilato sintase, enzima chave na síntese do DNA (EDLIND; KATIYAR, 2010; HOUŠŤ; SPÍŽEK; HAVLÍČEK, 2020).

Tabela 2 – Infecções causadas por *Candida* spp. e as respectivas terapias recomendadas

<b>Tipo de infecção</b>	<b>Fármacos utilizados</b>
Candidemia	Fluconazol Voriconazol Caspofungina Micafungina Anidulafungina Anfotericina B
Candidíase crônica disseminada (hepatosplênica)	Anfotericina B Micafungina Caspofungina Anidulafungina Fluconazol
Candidíase disseminada neonatal	Fluconazol Anfotericina B Equinocandinas Flucitosina
Candidíase intra-abdominal	Fluconazol Voriconazol Caspofungina Micafungina Anidulafungina Anfotericina B Drenagem da lesão
Candidíase intra-abdominal	Peritonite Abscessos viscerais
Endocardite	Anfotericina B Flucitosina Caspofungina Micafungina Anidulafungina Fluconazol

	Voriconazol Troca da válvula, se houver
Osteomielite e artrite séptica	Fluconazol Caspofungina Micafungina Anidulafungina Anfotericina B Desbridamento cirúrgico
Sistema nervoso central	Fluconazol Anfotericina B Flucitosina
Candidúria, cistite e pielonefrite	Fluconazol Anfotericina B Eliminação da causa
Candidíase vulvovaginal	Fluconazol Itraconazol Posaconazol Caspofungina Micafungina Anidulafungina Anfotericina B

Fonte: Adaptado de Pappas et al. (2015).

## 2.6 Mecanismos de resistência antifúngica desenvolvidos por *Candida* spp.

O desenvolvimento de resistência à terapia é um grande problema que vem ganhando destaque na área da saúde devido aos vários mecanismos apresentados para várias classes de drogas e a velocidade de ocorrência que vem sendo observada, onde dados apontam que, não havendo controle adequado, até 2050 o maior problema de mortalidade mundial será relacionado a doenças causadas por isolados resistentes às terapias disponíveis, com números de cerca de 10 milhões de óbitos diários (WHO, 2019).

Nesse contexto, o aumento numérico de infecções por cepas de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos aprovados, em comparação aos antibacterianos, se torna uma grande preocupação, visto que poucas opções terapêuticas se encontram a disposição para o tratamento de doenças por fungos desse gênero (CHANG et al., 2017; CORTÉS et al., 2019). De acordo com Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em 2019 foram relatados 34,800 mil casos de candidíases hospitalares causadas por cepas resistentes ao fluconazol nos Estados Unidos, em que 1,700 mil desses pacientes foram a óbito, números maiores dos que os revelados para *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos.

Os mecanismos de resistência que *Candida* spp. pode expressar são diversos, ocorrendo devido à sua plasticidade genômica que permite a sua ativação ou hiperativação de genes de resistência já presentes, ou até mesmo modificação de genes que codificam proteínas alvos, tornando-as menos susceptíveis à ligação com os antifúngicos. Assim, a eficiência do

fármaco pode ser reduzida devido a alteração no sítio alvo da droga, aumento na expressão de bombas de efluxo, modulação da resposta ao estresse, modificações genômicas e até resistência intrínseca do microrganismo (LEE et al., 2021).

Devido ao grande potencial adaptativo de *Candida* spp., um dos grandes fatores principais que contribuem para o surgimento de resistência é o uso desenfreado de antifúngicos, seja para profilaxias, uso incorreto por períodos menores do que os indicados, ou até mesmo devido à prescrição equivocada, induzindo o desenvolvimento de resistência dos microrganismos, ou emergindo cepas intrinsecamente resistentes que antes eram raras (LEE et al., 2021).

A resistência aos antifúngicos azólicos se dá principalmente por superexpressão ou mutações no gene *ERG11* que codifica a produção da enzima 14- $\alpha$ -desmetilase, tornando-a menos susceptível à ligação com fármacos dessa classe devido à substituição de aminoácidos da cadeia, ou seja, reduzindo sua afinidade. Além disso, a super expressão de transportadores de membrana (bombas de efluxo), principalmente do tipo *CDR1* e *CDR2*, além de *MDR1*, são responsáveis por expulsar a droga para fora da célula, impedindo que chegue ao seu sítio de ligação (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

Mutações nos genes *ERG3* e *ERG6*, embora mais raras, são associadas à resistência aos poliênicos, onde a biossíntese do ergosterol se torna mais branda, causando um acúmulo dos esteróis de maneira alternada, além de reduzir as quantidades desse na membrana do microrganismo, assim o fármaco não consegue interagir de maneira eficiente com seu sítio de ligação. Ainda, estudos indicam que a resistência aos poliênicos, principalmente à anfotericina B, pode estar associada à redução do estresse oxidativo no microrganismo através da modulação de Hsp90, uma importante substância que regula o estresse oxidativo intracelular, como a diminuição de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelulares (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; LEE et al., 2021).

A classe das equinocandinas é relativamente nova no mercado, possuindo drogas potentes no combate a candidíases. Porém cepas resistentes a esses fármacos estão sendo cada vez mais isoladas (PRISTOV; GHANNOUM, 2019). Tal mecanismo se dá principalmente por meio de mutações nos genes *FKS1* e *FKS2*, reduzindo as quantidades da enzima 1,3- $\beta$ -D-glucana sintase e, conseqüentemente, tornando essas drogas inefetivas (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; LEE et al., 2021).

Por fim, resistência à 5-fluorocitosina já foi descrita na literatura, e está relacionada à inativação de alguma das enzimas (citosina permease, citosina desaminase e

fosforibosil transferase) que participam do processo de metabolismo e ativação intracelular do fármaco (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

Com tudo exposto, fica claro que os fungos são seres vivos altamente adaptáveis às mais diversas circunstâncias e adversidades ambientais, sendo capazes de tolerarem ambientes com fatores limitantes ao seu desenvolvimento, como a atividade do sistema imune, buscarem nutrientes ou competirem com outros microrganismos, e até resistirem à ação de substâncias prejudiciais, como proteínas antimicrobianas e drogas antifúngicas, através de mudanças em suas características.

## **2.7 Alvos moleculares de *Candida* spp. para o desenvolvimento de novos antifúngicos**

A busca e caracterização de componentes fundamentais para a sobrevivência microbiana é um desafio para a indústria farmacêutica que visa o planejamento e produção de drogas antifúngicas, às quais utilizam esses como alvo de seu mecanismo de ação. Tais moléculas podem possuir diversas funções, como serem parte de rota metabólica, como a citosina desaminase, alvo da flucitosina; enzimas relacionadas à produção de elementos estruturais, como a 1,3- $\beta$ -D-glucana sintase, alvo das equinocandinas; ou substâncias estabilizadoras de organelas celulares, como os esteróis ancorados na membrana da célula, alvo dos poliênicos (COLOMBO et al., 2013; EDLIND; KATIYAR, 2010; HOUŠŤ; SPÍŽEK; HAVLÍČEK, 2020; PAPPAS et al., 2015).

Componentes fúngicos que já possuem drogas disponíveis no mercado com ação nestes são uma opção viável para o desenvolvimento de novos fármacos, apesar de dificilmente resolverem o problema da resistência, em contraste à busca por novos alvos, que se torna vantajosa no combate e prevenção do surgimento de infecções por fungos resistentes (LIU et al., 2018). A seguir serão detalhadas algumas opções de possíveis alvos para o desenvolvimento de novas moléculas antifúngicas.

A *DNA polymerase ETA* ( $\eta$ ) é uma polimerase encontrada em células fúngicas (também encontrada em células procarióticas humanas), importante no processo de replicação normal e no reparo do DNA após lesão por diversos estresses ambientais, com luz UV ou radiação ionizante, por exemplo, agindo na replicação do substrato contendo dímeros de pirimidina de ciclobutano T-T e incorporando os nucleotídeos corretos eficientemente quanto os resíduos T-T não danificados, portanto a ação de fármacos nessa proteína impede que o

microrganismo repare danos sofridos ao seu DNA, bem como na síntese do material genético, e, conseqüentemente, o leva a morte celular (ACHARYA et al., 2019).

O *Loop J4/5* do Grupo I de íntrons, composto por dois pares centrais de Adenina e flanqueada por um par de Guanina ligada a Uracila em uma região terminal e dois pares das mesmas na outra porção terminal (5'GAAGG3'/3'UAAUU5'), é importante para o dobramento e funcionalidade das moléculas de RNA na síntese proteica, além de agir no processo de automaturação (*autosplicing*) do RNA, estando presente em diversos microrganismos, dentre eles *Candida* spp., assim drogas que inibem sua função alteram a síntese proteica, causando defeitos estruturais e/ou metabólicos e ocasionando na destruição do microrganismo (ZNOSKO et al., 2004).

Outro alvo relacionado ao genoma de *Candida* spp. é o telômero Cdc13 OB4, que são complexos de DNA-proteína com sequências repetidas de Guanina de fita dupla e uma saliência curta de fita simples também com Guanina na porção 3', o qual está presente na porção terminal do DNA fúngico, garantindo a replicação do material genético, conferindo proteção e estabilidade ao seu genoma, deste modo, se houver falha na função da estrutura por ação de fármacos, o microrganismo passa a ter sua replicação prejudicada e menor proteção ao seu material genético, levando a célula à morte (GE et al., 2020).

Uma importante enzima relacionada com a proteção ao estresse oxidativo de *Candida* spp. é a Superóxido Dismutase 5 (SOD5), molécula ligada ao cobre, que catalisa a conversão do radical superóxido ( $O_2^-$ ), o qual pode ser prejudicial ao microrganismo por ser um forte agente oxidante, em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ), reduzindo seus efeitos deletérios, além de ser relacionada à defesa contra o estresse oxidativo gerada pelo hospedeiro durante a infecção, onde quando há inibição da função enzimática por meio de fármacos, há o aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo, um importante fator associado à morte do fungo (GLEASON et al., 2014; SCHATZMAN et al., 2020; ZHENG et al., 2020).

Outra enzima fundamental para o gênero *Candida* é a exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase, que apresenta função de hidrolase e transferase na síntese de glucano, componente estrutural fundamental da parede celular fúngica, agindo assim na sua estabilização e remodelamento, onde drogas que apresentem atividade inibitória dessa enzima ocasionam em uma falha na produção do glucano e desestabilização da parede celular, permitindo a entrada descontrolada de substâncias extracelulares, perca da forma microbiana, e morte (CUTFIELD; SULLIVAN; CUTFIELD, 2000; PATRICK et al., 2010).



A proteína Mep2 é uma proteína de membrana encontrada em fungos como *Candida* spp., que funciona como sensor e transportador de amônia (nitrogênio) do ambiente, sendo induzidos principalmente quando há carência do seu substrato, e está envolvida na mudança das formas de levedura para filamentosa (hifa ou pseudohifa), melhorando sua capacidade de invasão e/ou patogênese, onde fármacos que apresentam atividade nessa proteína são capazes de prevenir esta mudança, reduzindo as possibilidades do microrganismo buscar sítios que apresentem seu substrato em concentrações necessárias para sua sobrevivência (VAN DEN BERG et al., 2016).

Outra enzima importante para a estrutura de *Candida* spp. é a CYP51 (esterol 14- $\alpha$ -desmetilase), uma enzima importante na via biosintética do ergosterol, componente fundamental da membrana fúngica que confere estabilidade a esta, em que essa proteína já é visada como alvo de fármacos antifúngicos comerciais da classe dos azólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol), onde o fármaco inibindo sua função acarreta em desestabilização da membrana plasmática, acúmulo de intermediários tóxicos à célula e, conseqüentemente, redução do crescimento (ROSAM; MONK; LACKNER, 2021).

Uma enzima importante para a replicação do DNA fúngico é a timidilato quinase, a qual participa da síntese de timidina (precursor de DNA) em *Candida* spp., catalisando a conversão de timidina monofosfato (dTMP) em timidina difosfato (dTDP), que é subsequentemente fosforilada pela nucleosídeo difosfato quinase (NDPK) para formar timidina trifosfato (dTTP), que é uma molécula chave para a produção de DNA, então fármacos que inibem a atividade dessa enzima acarretam em falha na replicação do material genético, inviabilizando a célula (HUANG et al., 2019; SINHA; RULE, 2017).

Por fim, *Yeast Cytochrome BCI Complex* é um complexo enzimático de células eucarióticas, presente também em *Candida* spp., e procarióticas, a qual em fungos participa do processo de respiração celular mitocondrial conservando e convertendo a energia próton motiva da membrana da organela gerada durante esse processo a partir da oxidação catabólica do ubiquinol pelo citocromo c em um gradiente de prótons transmembrana, que pode ser aproveitado para outros processos catabólicos, em que drogas inibindo esse processo geram falhas na respiração celular microbiana e, conseqüentemente, na obtenção de ATP (FISHER; MEUNIER; BIAGINI, 2020).

## **2.8 Estratégias para o desenvolvimento de novos tratamentos para infecções causadas por cepas resistentes**

O desenvolvimento de novos fármacos é um grande desafio enfrentado pela indústria farmacêutica, pois demanda altos custos de produção e desenvolvimento, tanto com materiais como com profissionais qualificados, além de longos períodos para que todos os testes sejam realizados, desde ensaios *in vitro*, testes pré-clínicos, até os testes clínicos em humanos, e sua liberação de comercialização.

Estima-se que cerca de 15 anos e 2,6 bilhões de dólares são investidos para que a droga chegue ao mercado com eficácia e segurança devidamente comprovadas, ainda no meio processo tendo possibilidades de em qualquer etapa a substância ser descontinuada devido a problemas inesperados que inviabilizem seu uso (DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2014).

Pushpakom et al. (2018) associaram a difícil validação de metodologias, burocracia envolvida, altos custos e tempo gerados por estes, o risco de efeitos adversos e toxicidade inesperados evidenciados em testes mais avançados, e a possibilidade de não recuperação do total investido como fatores limitantes do desenvolvimento de novas drogas. Em adição a isso, o desenvolvimento de antimicrobianos se torna ainda mais complicado devido à rápida adaptação e desenvolvimento de resistência, tornando o fármaco inviável em pouco tempo.

Para a solução de alguns dos problemas citados, estratégias para o desenvolvimento e descobrimento de novas drogas antimicrobianas podem ser adotadas, como o reposicionamento de fármacos e a associação de duas ou mais drogas, sendo estas com atividade clássica para a doença em questão ou não, como a associação de antifúngicos com não-antifúngico. Tais opções serão detalhadas nas seções subsequentes.

### **2.8.1 Associação de fármacos**

A associação de fármacos é uma opção promissora para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas. A possibilidade de associação de dois ou mais fármacos, sejam eles já utilizados como antifúngicos, ou até mesmo associação de antifúngicos com não antifúngicos, de certa forma mesclando as estratégias destacadas de reposicionamento de fármacos e associação.

Muitas vantagens são vistas com o uso dessa estratégia, como a possibilidade de se reduzir a concentração efetiva do fármaco, visto que a ação em conjunto pode facilitar a entrada ou chegada das drogas em seu sítio de ação, por exemplo, onde o microrganismo, de

certa forma, se torna mais susceptível a ela (as), assim revertendo a resistência e prevenindo seu surgimento (diferentes drogas com mecanismos distintos aumentam o número de processos intracelulares), reduzindo riscos de toxicidade e efeitos adversos, além de ampliar o espectro antimicrobiano de terapias já utilizadas (JORGE et al., 2017; LEE et al., 2021).

Os mecanismos pelos quais as drogas podem agir associadas são diversos. Um destes descritos na literatura é a capacidade de uma droga aumentar a biodisponibilidade de outra droga, permitindo que maiores concentrações desta possam interagir com o sítio alvo e por maiores períodos, exercendo seu efeito antimicrobiano com maior efetividade (LEE et al., 2021).

A atividade de duas drogas em vias paralelas que convergem para a mesma função de uma rota biossintética também pode contribuir para a potencialização dos seus efeitos, visto que o produto gerado pelas duas seria o mesmo, assim havendo redução de sua produção, ou até mesmo a facilitação para que uma das drogas se ligue ao sítio. Ainda, a interação pode ocorrer por meio da inibição causada por uma droga na resposta ao estresse fúngico, impedindo que haja degradação ou inativação do outro fármaco e possibilitando que este realize sua atividade (LEE et al., 2021).

Atualmente a terapia combinada é uma estratégia amplamente utilizada para o tratamento de diferentes doenças infecciosas, como malária (cloroquina+ primaquina, por exemplo) (BRASIL, 2020), tuberculose (rifampicina + isoniazida + pirazinamida + etambutol) (BRASIL, 2022a), e HIV (tenofovir + lamivudina + dolutegravir) (BRASIL, 2022b).

Apesar disso, o grande potencial dessa estratégia terapêutica ainda não é muito explorado no âmbito de tratamentos antifúngicos, sendo recomendada apenas para terapias de criptococose através da associação de anfotericina B + flucitosina ou fluconazol + flucitosina (WHO, 2018).

### ***2.8.2 Reposicionamento de fármacos***

O reposicionamento de fármacos é uma ótima estratégia para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Esse é conceituado como o processo de encontrar para substâncias que já estão sendo comercializadas no mercado novos efeitos e usos terapêuticos, diferentes dos indicados originalmente (ASHBURN; THOR, 2004; PUSHPAKOM et al., 2018).

Para as indústrias farmacêuticas, um reduzido tempo de desenvolvimento de novas drogas é essencial, porém isso normalmente é associado a um maior risco de efeitos tóxicos que podem inviabilizar seu uso, descontinuando seu desenvolvimento ou comercialização. A aplicação de reposicionamento de fármacos tem como grande vantagem uma diminuição considerável de tempo e risco para o desenvolvimento de novos tratamentos, visto que os candidatos já passaram por testes antes de terem sido introduzidos no mercado para seu fim original, então parâmetros como farmacocinética, toxicidade, etc., já são conhecidos (ASHBURN; THOR, 2004; PUSHPAKOM et al., 2018).

Três passos são necessários para reposicionamento de fármacos: o primeiro é dito como a etapa crucial, pois envolve a identificação de substâncias potencialmente ativas para o fim que se deseja uma ação (ensaios *in vitro*, por exemplo), o segundo com testes pré-clínicos, e o terceiro para avaliação da eficácia em testes clínicos de fase 2 (é considerado que há dados suficientes de fase 1)(PUSHPAKOM et al., 2018).

Algumas abordagens podem ser aplicadas em reposicionamento de fármacos, sendo elas computacionais ou experimentais. As computacionais, denominadas ensaios *in silico*, envolvem análises sistemáticas de dados utilizando como recursos de simulações virtuais, seja para análise de expressão genética, estrutura química, genótipo ou dados de proteínas, e como exemplo temos o docking molecular, que avalia a complementaridade do sítio de ligação entre o ligante e o alvo; enquanto as experimentais utilizam de modelos reais, com ensaios *in vitro* e *in vivo*, para avaliar a atividade de alguma substância, como ensaios cromatográficos para identificação de compostos, ou até mesmo triagem fenotípica de várias drogas para avaliar potencial clínico (PUSHPAKOM et al., 2018).

O reposicionamento é uma realidade presente atualmente. Minoxidil, que originalmente foi produzido e comercializado com indicação para hipertensão, hoje em dia é utilizado para queda de cabelo ou crescimento de barba (PUSHPAKOM et al., 2018). A sildenafil, originalmente desenvolvida para o tratamento de angina pectoris, atualmente é mais utilizada para disfunção erétil (HERNANDEZ et al., 2017). Ainda, o tamoxifeno, medicamento cuja indicação original era para câncer de mama metastático, hoje já é aprovado para distúrbios de bipolaridade (PARVATHANENI et al., 2019).

Trabalhos publicados demonstram atividade antifúngica de fármacos antidepressivos da classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), como a sertralina (SER) em cepas de *Aspergillus* spp., sendo efetiva em concentrações variando entre 20 e 100 µg/mL. Estudos também demonstram atividade inibitória não só da SER, mas

também fluoxetina (FLX) e paroxetina (PRX) frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol tanto na sua forma planctônica (BARBAROSSA et al., 2022; COSTA SILVA et al., 2017) quanto em biofilme já formado (OLIVEIRA et al., 2018), todas em concentrações consideradas baixas. Ainda, a SER foi vista como droga ativa em cepas de *Coccidioides immitis* matando o microrganismo, sendo um fármaco fungicida, revelando seu potencial em diferentes gêneros fúngicos (PAUL; MORTIMER; MITCHELL, 2016).

Apesar do seu resultado promissor e em baixas concentrações, poucos trabalhos explorando a atividade inibitória da SER em cepas de *Candida* spp. são presentes na literatura, necessitando de mais estudos para avaliar como se dá seu efeito e como a molécula age no microrganismo, além de sua segurança ao paciente nas concentrações antifúngicas efetivas.

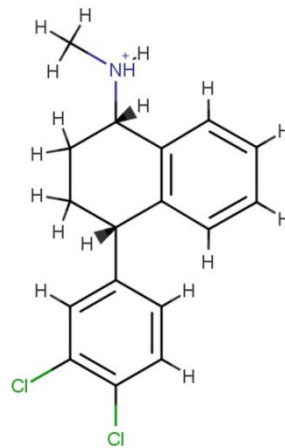
## **2.9 SER como potencial agente antifúngico com ação em cepas de *Candida* spp.**

Estudos publicados demonstram potencial atividade de fármacos antidepressivos da classe dos ISRS frente a cepas de *Candida* spp., como a sertralina, paroxetina e fluoxetina, o primeiro exercendo efeito inibitório em concentrações menores que os demais citados (BARBAROSSA et al., 2022; COSTA SILVA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

A SER é um antidepressivo da classe dos ISRS, e é um dos fármacos indicado como primeira linha para o tratamento de ansiedade, depressão e distúrbios afetivos. Sua ação original se dá pela sua ligação e bloqueio de transportadores neuronais pré-sinápticos, evitando que a serotonina seja retirada da fenda sináptica, a qual fica mais disponível para realizar seu efeito estimulatório (RANG et al., 2016).

Sua fórmula química é  $C_{17}H_{17}Cl_2N$  (Figura5)[IUPAC: (1S,4S)-4-(3,4-diclorofenil)-N-metil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-amina], onde se apresenta como pó branco e cristalino (RODRIGO et al., 2004). A apresentação comercial da SER se dá na forma de cloridrato em comprimidos revestidos em doses de 50 e 100 mg, com administração máxima diária indicada de 200 mg. Sua farmacocinética é linear, ou seja, quanto maior a dose administrada, maiores são os níveis plasmáticos, com pico de concentração ocorrendo entre 4,5 a 8,4 horas após a ingestão, e a concentração terapêutica plasmática variando entre 10 a 150 ng/mL (HUDDART et al., 2020).

Figura 5 – Estrutura química da sertralina em pH fisiológico



Fonte: Autor.

A meia vida do fármaco é de 22 a 36 horas, com cerca de 98% de ligação às proteínas plasmáticas. Por fim, seu volume de distribuição de apresenta alto em modelo animais, com extenso metabolismo hepático de primeira passagem, não tendo sua biodisponibilidade alterada quando ingerido juntamente com alimentos (EUROFARMA S.A., 2017).

O potencial antifúngico da SER em cepas de *Candida* spp. tem sido descrito na literatura. Costa Silva et al. (2017) evidenciou que essa droga apresentava efeito inibitório de 50% no crescimento das cepas em concentrações variando entre 10 e 20 µg/mL em cepas planctônicas resistentes ao fluconazol. Essa atividade já havia sido demonstrada por Lass-Flörl et al. (2001), com concentrações entre 3 e 29 µg/mL sendo eficazes e inibindo o crescimento de 100% do microrganismo.

A atividade anticandida da SER também foi demonstrada em cepas de grande importância clínica devido ao caráter multirresistente, como *C. auris*, em que sua atividade se manteve em baixas concentrações, assim como nos trabalhos já comentados, com concentrações variando entre 20 e 40 µg/mL (GOWRI et al., 2020).

Por fim, o efeito em biofilme pré-formado da SER foi demonstrado por Oliveira et al. (2018), onde a droga foi capaz de reduzir mais de 80% da viabilidade celular dessa estrutura em concentrações de 240 µg/mL para cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, onde se pode observar que sua a atividade não se restringe apenas à forma planctônicas.

Diante do exposto, vemos que a SER é um potencial fármaco a ser estudado para fins de tratamento de candidíases, com atividade até em formas reconhecidas como mais resistentes e extenso espectro de ação dentro do gênero. Porém, ainda poucos estudos publicados exploram essa atividade, apesar de ser efetiva em baixas concentrações,

necessitando de parâmetros mais robustos que determinem e comprovem sua real eficácia e segurança como droga antifúngica, além da elucidação de seu mecanismo de ação, para que seja possível seu planejamento como formulação para tratamento e inserção no mercado.

### 3 HIPÓTESES

- A sertralina possui atividade inibitória *in vitro* frente a cepas planctônicas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.
- Sertralina tem efeito fungicida frente a cepas planctônicas de *Candida* spp.
- A sertralina tem efeito sinérgico *in vitro* quando combinado com o fluconazol, itraconazol e anfotericina B em cepas planctônicas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.
- A sertralina age induzindo a apoptose celular fúngica em cepas planctônicas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.
- A sertralina apresenta efeito inibitório sobre biofilme maturado de diferentes espécies do gênero *Candida*.
- A sertralina tem ação preventiva na formação de biofilme em diferentes espécies do gênero *Candida*.
- Sertralina age inibindo a formação de biofilme desde os estágios iniciais.
- Sertralina não apresenta citotoxicidade *in vitro* em células de mamíferos nas concentrações obtidas como efetivas nas formas planctônica e biofilme.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliação do potencial antifúngico da sertralina frente a cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol, nas formas planctônicas e em biofilme.

### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol, itraconazol e anfotericina B em cepas planctônicas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da sertralina em cepas planctônicas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.
- Determinar o tipo de atividade *in vitro* da sertralina em cepas planctônicas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.
- Avaliar o tipo de interação farmacológica *in vitro* entre a combinação da sertralina com fluconazol, itraconazol e anfotericina B em cepas planctônicas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.
- Avaliar o mecanismo de ação da sertralina em cepas planctônicas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol através de citometria de fluxo e ensaios *in silico* frente a alvos relacionados à membrana plasmática, parede celular, DNA, RNA, e transição entre a forma filamentosa e de levedura.



- Verificar o efeito inibitório da sertralina frente a biofilme maturado de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.
- Verificar o potencial preventivo da sertralina na formação de biofilme de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.
- Avaliar o potencial de ligação da sertralina à proteína ALS3 de *C.albicans*.
- Avaliar a citotoxicidade da sertralina em linfócitos humanos nas concentrações efetivas em células planctônicas e em biofilme de *Candida* spp.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Obtenção das cepas

Foram utilizadas treze cepas de *Candida* spp. no presente estudo (Nº SISGEN: A10AE23), entre elas sensíveis (2 *C. albicans*, 2 *C. tropicalis* e 2 *C. parapsilosis*) e resistentes ao fluconazol (2 *C. albicans*, 2 *C. tropicalis*, 2 *C. parapsilosis* e 1 *C. glabrata*), todas de origem clínica, além das padrões *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6528e *C. auris* 01256P. Todos os microrganismos foram obtidos do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC), as quais se encontravam armazenadas em meio caldo Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (dinâmica, São Paulo, Brasil) em freezer a -20°C.

As cepas foram recuperadas através da transferência de uma alíquota de 100 µL da amostra mãe para 1000 µL de meio caldo Sabouraud dextrose, incubadas em seguida por 24 h a 35 ± 2°C. Após isso, com auxílio de alça bacteriológica, aproximadamente 10 µL da suspensão foi semeada em meio de cultura ágar batata dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia), incubando-as novamente por 24 h a 35 ± 2°C. Todos os processos citados foram realizados seguindo normas de biossegurança nível 2 (DA SILVA et al., 2013).

### 5.2 Substâncias utilizadas

As drogas utilizadas foram a sertralina (SER)(Sigma-chemical, St. Louis, MO, USA), fluconazol (FLC) (Sigma-chemical),itraconazol (ITC) (Sigma-chemical) e anfotericina B (AMB) (Sigma-chemical). SER, ITC e AMB foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-chemical) em concentração de 2,5% (v/v), para que não interferisse no teste, enquanto o FLC foi dissolvido em água destilada estéril.

### 5.3 Testes de sensibilidade às drogas

#### 5.3.1 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* da SER em cepas de *Candida spp.*

A atividade antifúngica da SER frente a cepas de *Candida spp.* foi avaliada utilizando a metodologia padrão ouro de microdiluição em caldo preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), documento M27-A3 (CLSI, 2008). Primeiramente, as cepas foram repicadas em meio ágar batata dextrose e incubadas durante 24 h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  para que se encontrassem em fase exponencial de crescimento. O inóculos foram preparados suspendendo os microrganismos em solução salina estéril (0,85%) até que fossem obtidas turvações semelhantes à escala 0,5 de McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil), referente à concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL. Após isto, estes foram diluídos até concentrações de 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (pH 7,0) tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS, Sigma-chemical).

Em placas de 96 poços com fundo U, 100  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640 foram adicionados nos poços das colunas 1 e de 3 a 12. Nos poços da coluna 2 foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  das drogas em concentrações referentes ao dobro da concentração inicial a ser testada, as quais foram realizadas diluições seriadas na ordem 2 até os poços da coluna 11. Por fim, 100  $\mu\text{L}$  dos inóculos diluídos foram adicionados aos poços das colunas 2 a 12. As colunas 1 e 12 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. As placas foram incubadas por 24 h a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  em estufa bacteriológica e sua leitura realizada visualmente.

A concentração inibitória mínima (CIM) das drogas foi definida como a menor concentração a qual houve inibição visual de 50% do crescimento do microrganismo, em relação ao controle positivo, e os pontos de corte para os antifúngicos determinados de acordo com o documento M27-S4 (CLSI, 2012), onde as cepas foram consideradas resistentes ao fluconazol quando  $\text{CIM} \geq 8 \mu\text{g/mL}$ , com exceção da *C. glabrata*, a qual é considerada resistente quando  $\text{CIM} \geq 64 \mu\text{g/mL}$ . Todos os testes foram realizados em triplicata, e as cepas

padrões *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6528 utilizadas como controle de qualidade para os fármacos antifúngicos. SER foi testada em concentrações variando de 1024 a 2 µg/mL, FLC de 64 a 0,125 µg/mL, e ITC e AMB de 16 a 0,03 µg/mL.

### **5.3.2 Efeito da SER combinada com fármacos antifúngicos em cepas de *Candida* spp.**

Para avaliação da interação farmacológica entre as drogas quando utilizadas simultaneamente, a SER e os antifúngicos foram combinados em concentrações de CIM<sub>50</sub>, e o tipo de interação foi determinado de acordo com Jorge et al. (2017) calculando o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). As interações farmacológicas foram classificadas em sinérgicas (SYN; ICIF ≤ 0,5), aditivas (ADT; 0,5 < ICIF ≤ 1,0), indiferentes (IND; 1 < ICIF ≤ 4,0) ou antagonistas (ANT; ICIF > 4,0).

### **5.3.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) da SER frente a cepas de *Candida* spp.**

A CFM foi avaliada de acordo com metodologia descrita por Siddiqui et al. (2013), com adaptações. A partir das placas preparadas anteriormente, 10 µL de cada poço onde não foram observados crescimentos visuais dos microrganismos foram transferidos para placas de petri contendo meio ágar batata dextrose, sendo incubadas durante 24 h a 35 ± 2°C em estufa bacteriológica. A leitura dos resultados foi feita considerando o crescimento dos microrganismos no meio, e a CFM definida como a menor concentração onde não houve crescimento de nenhuma colônia na placa.

### **5.3.4 Natureza da atividade inibitório da SER frente a cepas de *Candida* spp.**

O tipo de atividade inibitória da SER em *Candida* spp. foi determinada pela relação CFM/CIM, considerando a CIM como a menor concentração onde visualmente não foi observado crescimento fúngico. Para CFM/CIM ≥ 4, o efeito inibitório foi considerado fungistático, ou seja, a droga age parando o metabolismo microbiano, mas não o matando; já quando CFM/CIM ≤ 4, foi considerado efeito fungicida, a qual a droga age matando diretamente o microrganismo (SIDDQUI et al., 2013).

### **5.3.5 Análise de dados dos testes de sensibilidade**

Os testes para avaliação da sensibilidade foram realizados em triplicata em dias diferentes, considerando a reprodutibilidade dos métodos. O resultado final de cada teste foi determinado como a média aritmética dos valores de cada replicata.

## **5.4 Ensaios para detecção de alterações celulares**

### ***5.4.1 Preparo dos microrganismos***

Os seguintes ensaios foram realizados com as cepas *Candida albicans* 1, *C. auris* e *C. glabrata*, visto suas importâncias epidemiológicas. O tratamento dos microrganismos foi efetuado de acordo com o descrito por Neto et al. (2014) com adaptações, onde esse foi incubado em caldo YND (Extrato de levedura nitrogênio e dextrose, Becton Dickinson) durante 24 h a 37°C para que atingisse sua fase de crescimento exponencial.

Em seguida, as células foram lavadas com solução salina (0,85% NaCl) e ressuspensas em concentração de  $10^6$  células/mL em meio RPMI 1640 (pH 7,0) tamponado com MOPS (Sigma-chemical), sendo expostas a concentrações de SER (CIM/2, CIM e 2xCIM), FLC (CIM) e AMB (4 µg/mL), e incubadas por 24 h a 35°C. FLC e AMB foram usados como controle positivo para morte celular. Estas amostras foram utilizadas para avaliar o efeito da SER na integridade da membrana celular, despolarização mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ), estresse oxidativo, dano ao DNA e indução de apoptose celular.

### ***5.4.2 Determinação da densidade numérica de células viáveis***

O efeito da SER sobre a densidade de células microbianas viáveis foi avaliado de acordo com Da Silva et al. (2013) e Neto et al. (2014) pelo método de exclusão de iodeto de propídio (IP). As células tratadas foram incubadas com 2 mg/L de IP e a fluorescência analisada por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). 10.000 eventos foram avaliados em cada ensaio, e os restos celulares omitidos da análise.

### ***5.4.3 Avaliação do potencial de despolarização transmembrana da SER ( $\Delta\psi_m$ )***

As células tratadas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato e expostas a rodamina 123 (5 mg/L) por 30 min a 37°C ao abrigo da luz. A despolarização

mitocondrial foi detectada por citometria de fluxo (FACSCalibur), e 10.000 eventos foram avaliados em cada ensaio, sendo os restos celulares omitidos da análise (DA SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

#### ***5.4.4 Detecção do potencial da SER em induzir a apoptose celular***

Os microrganismos expostos às drogas foram centrifugados (1.600 g por 10 min a 4°C) e digeridas por 2 h a 30°C, para remoção da parede celular fúngica, em solução de tampão fosfato de potássio (pH 6,0) adicionado de sorbitol 1 M e zimoliase 20T em concentração de 2 mg/mL (Seikagaku Corp., Abingdon, UK). Os protoplastos, células sem parede celular, foram corados por um kit de detecção de apoptose FITC-Anexina V (Guava Nexin Kit, Guava Technologies) e lavados com solução de tampão fosfato de potássio e incubados por 20 min com tampão de ligação de anexina (5 ml/ml FITC-Anexina V e 5 ml de PI). Por fim, as amostras foram analisadas por citômetro de fluxo (FACSCalibur), e 10.000 eventos foram avaliados em cada ensaio, com os restos celulares omitidos da análise (DA SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

#### ***5.4.5 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)***

A detecção da produção de EROS foi realizada conforme descrito por Da Silva et al. (2013) e Neto et al. (2014), em que as células tratadas com as drogas foram incubadas durante 30 min com 20 µM de CM-H<sub>2</sub>DCFDA [5-(e-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína acetil éster] e lavadas com PBS. A fluorescência foi analisada por citômetro de fluxo (FACSCalibur).

#### ***5.4.6 Identificação de genotoxicidade celular causada pela SER***

Para detecção da fragmentação do DNA, o ensaio do cometa alcalino foi realizado na presença ou não de um sistema de ativação metabólica exógena de fígado de rato (fração S9) (Moltox inc., Boone, NC, EUA), a fim de simular o metabolismo hepático da SER e avaliação do efeito dos produtos gerados, e formamidopirimidina DNA-glicosilase (FPG), para aumentar a sensibilidade na identificação de bases purinas oxidadas (BioLabs, Nova Inglaterra, EUA) (CAVALCANTI et al., 2020a; MILOSHEV; MIHAYLOV; ANACHKOVA, 2002; PINKERTON et al., 2010).

Resumindo, uma eletroforese (20 min a 0,5 V/cm e 24 mA) foi realizada com as células expostas às drogas, onde foram tratadas com zimoliase 20T 2 mg/ml (Seikagaku Corp.) durante 20 min a 30°C, depois tratadas com NaOH (30 mM), NaCl (1 M), lauril sarcosina (0,1%) e EDTA (50 mM, pH 12,3) por 1 h.

Para o ensaio do cometa alcalino modificado (presença de FPG), as amostras foram lavadas com uma solução de tampão Hepes 40 mM (pH 8,0), KCl 100 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mM, 0,2 mg/mL de albumina de soro bovino (ASB), e depois incubadas com FPG por 30 min a 37°C.

As amostras foram submetidas a solução de 1 mg/ml de brometo de etídio, sendo visualizadas em seguida por microscopia de fluorescência (Olympus, Tóquio, Japão). 100 células foram escolhidas aleatoriamente de cada grupo para análise de imagem, e o índice de dano (ID) foi atribuído para cada amostra, classificado de 0 (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (dano máximo: 100 células x 4).

#### **5.4.7 Análise de dados dos ensaios de alteração celular**

A significância estatística de cada ensaio foi analisada pelo GraphPad Prism (versão 6 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) usando análise de variância two-way (ANOVA) e teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ) para comparar os valores médios de cada teste em relação ao controle. Todos os testes foram realizados em três ensaios independentes.

### **5.5 Ensaios *in silico* da interação entre a SER e alvos de *Candida* spp.**

#### **5.5.1 Preparo dos ligantes e receptores para o docking molecular**

A estrutura química do SER (CID68617) foi obtida do repositório PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Em seguida, o conformero menos energético foi usado em pH fisiológico através do código MarvinSketch (CSIZMADIA, 1999) e otimizado pelo código Avogadro (HANWELL et al., 2012), configurado com o algoritmo steepest descent e ciclos de 50 interações, aplicando o Merck Molecular Force Field (MMFF94) (BATISTA DE ANDRADE NETO et al., 2021; HALGREN, 1996).

As estruturas alvo utilizadas foram “Yeast DNA Polymerase ETA” (PDB 1JIH) (TRINCAO et al., 2001); “Loop J4/ do Grupo I de íntrons de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*” (PDB 1TUT) (ZNOSKO et al., 2004); “Estrutura cristalina da proteína de

telômero de levedura Cdc13 OB4” (PDB 3RMH) (YU et al., 2012); “*Candida albicans* Superóxido Dismutase 5 (SOD5), Cu(I)” (PDB 4N3T) (GLEASON et al., 2014); “Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase de *Candida albicans*” (PDB 1EQP) (CUTFIELD; SULLIVAN; CUTFIELD, 2000); “Estrutura cristalina de *Candida albicans* Mep2” (PDB 5AEZ) (VAN DEN BERG et al., 2016); “Estrutura de cristal de estero1 14- $\alpha$ -desmetilase (CYP51) de *Candida albicans* em complexo com o candidato a fármaco antifúngico à base de tetrazol VT1161 (VT1)” (PDB 5TZ1) (HARGROVE et al., 2017); “Estrutura de Timidilato Quinase de *Candida albicans* revela origem de ampla especificidade de substrato e um novo elemento estrutural” (PDB 5UIV) (SINGH et al., 2015); “Yeast Cytochrome BC1 Complex” (PDB 1KB9) (LANGE et al., 2001); e “adesina ALS3 de *Candida albicans*” (PDB 4LEB)(DO AMARAL VALENTE SÁ et al., 2020), todos obtidos do repositório *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>).

O preparo dos receptores de *C. albicans* foi realizada de acordo com Huey et al.(HUEY; MORRIS; FORLI, 2011), na qual os resíduos foram removidos, adicionados hidrogênios polares e as cargas de Gasteiger foram calculadas (OLEGA; ARTHUR, 2010) pelo código Autodocktools™ (PETTERSEN et al., 2004). O reencaixe de VT1 cocrystalizado, um inibidor de CYP51, foi usado para comparação com o sítio de ligação deste alvo.

### **5.5.2 Simulação e processamento de dados**

Os códigos AutodockVina (TROTT; OLSON, 2009), Algoritmo Genético Lamarckiano (AGL) e Exhaustiveness 64 (MARINHO et al., 2020) foram usados para as simulações de docking molecular do SER contra os alvos. Cinquenta simulações independentes foram realizadas e 20 poses por simulação foram geradas, aplicando-se o parâmetro estatístico RMSD (root mean square-desvio) com valores de até 2,0 Å (YUSUF et al., 2008) e a seleção da *best pose* foi definida como a ligação que apresentou energia de afinidade menor que -6,0 kcal/mol (TRINCAO et al., 2001; ZNOSKO et al., 2004).

### **5.5.3 Modos de ligação e análise dos dados de interação receptor-ligante**

Os códigos UCSF Chimera™ (YU et al., 2012), Discovery studio visualizer™ viewer e códigos Pymol (GLEASON et al., 2014) foram usados para a análise dos dados. Para calcular as interações moleculares e as ligações de hidrogênio, foi utilizado o código visualizador Discovery studio visualizer™ (GLEASON et al., 2014). A partir disso, as

constantes de inibição ( $K_i$ ) foram calculadas a partir da aplicação da equação 1, considerando a energia de afinidade de cada complexo formado (VAN DEN BERG et al., 2016). A força das ligações de H foi determinada pelas distâncias entre os átomos aceitadores e doadores, classificados como Forte (2,5-3,1 Å), Médio (3,1-3,55 Å) e Fraco (> 3,55 Å) (HARGROVE et al., 2017).

$$K_i = e^{(\Delta G/RT)} \quad (1)$$

## 5.6 Ensaios de atividade contra biofilme de *Candida* spp.

Foram selecionadas 5 cepas de diferentes espécies de *Candida* como representativas, sendo elas *C. albicans* 1, *C. tropicalis* 2, *C. parapsilosis* 4, *C. glabrata* 1, e a cepa padrão *C. auris* 01256P, todas obtidas do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas da Universidade Federal do Ceará (LABIMAN/UFC).

### 5.6.1 Avaliação da atividade *in vitro* da SER frente a biofilme pré-formado de *Candida* spp.

A avaliação do efeito da SER em biofilme pré-formado foi realizada de acordo com metodologia descrita por Pierce et al. (2008). Os microrganismos foram cultivados em caldo YND (Extrato de levedura nitrogênio e dextrose, Becton Dickinson) por 24 h a 35°C até que se encontrassem em sua fase de crescimento exponencial. As células foram centrifugadas (2500 rpm, 5 min) e lavadas três vezes com solução salina (0,85% NaCl), onde após isto os microrganismos foram suspensos em meio caldo RPMI (pH 7,0) tamponado com MOPS 0,165 M (Sigma-Chemical) até que se atingisse turbidez equivalente a 0,5 McFarland. 200 µL destes inóculos foram adicionados a placas de 96 poços e estas incubadas por 24 h a 35°C para que os biofilmes fossem formados.

Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução salina, sendo colocado 200 µL da SER em cada poço em variadas concentrações (CIM/2, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM). As amostras foram incubadas por 24 h a 35°C em estufa bacteriológica. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com solução salina e então expostas ao brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em concentração de 1 mg/mL durante 24 h a 35°C. Por fim, o sobrenadante foi retirado e em seguida adicionado DMSO em cada poço para solubilização do cristal de formazan formado a partir do metabolismo do MTT pelas células que se mantiveram viáveis, onde as soluções foram transferidas para novas placas e lidas em



leitor de microplacas Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) em comprimento de onda de 492 nm.

### **5.6.2 Investigação do efeito preventivo da SER na formação de biofilme de *Candida* spp.**

O efeito preventivo antibiofilme da SER foi avaliado de acordo com Xie, Liu e Zhou (2020), com adaptações. Resumidamente, os microrganismos foram preparados conforme descrito na metodologia anterior e incubados por diferentes tempos (6, 12, 24 e 48 h) a 35°C juntamente com a SER em concentrações de CIM/2, CIM, 2xCIM, 4xCIM e 8xCIM para cada cepa testada,afim avaliar a partir de qual tempo a droga começava a exercer seu efeito.

Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução salina e as amostras foram expostas à solução de MTT (1 mg/mL) por 24 h a 35°C. Por fim, o sobrenadante foi retirado de todos os poços, cada um lavado mais três vezes com solução salina e adicionado DMSO para solubilização do cristal de formazan que veio a ser formado nos poços onde existiam células viáveis. O conteúdo foi transferido para outra placa e a leitura realizada em leitor de microplacas Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) a 492 nm.

### **5.6.3 Análise dos dados de biofilme**

A significância estatística de cada ensaio de biofilme foi analisada através do programa GraphPad Prism (versão 6 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) e teste de Turkey ( $p < 0,05$ ), os quais os valores médios das absorbâncias de cada teste foi comparada com o controle. Todos os ensaios foram realizados em três replicatas independentes e a média dos resultados foi calculada.

## **5.7 Visualização das estruturas microscópicas de *Candida* por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

### **5.7.1 Células planctônicas**

A MEV foi realizada para avaliar o efeito da SER nas estruturas microscópicas do microrganismo na forma planctônica, segundo Do Amaral Valente Sá et al. (2020) com modificações. Para isso, a cepa *Candida albicans* 1 foi escolhida como representativa, a qual foi repicada em meio ágar batata dextrose e incubada em estufa bacteriológica por 24 h a 35°C até que se encontrasse em fase exponencial de crescimento. Os inóculos foram preparados em meio caldo RPMI1640 (pH 7,0) tamponado com MOPS até turvação referente à escala 0,5 de McFarland, sendo diluídos até concentração de aproximadamente 0,5 a 2,5 x 10<sup>3</sup> UFC/mL e incubados por 24 h a 35°C expostos à SER (CIM e CFM).

Em seguida, as amostras foram centrifugadas (2500 rpm, 5 min), lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato, e aderidas a lamínulas circulares de vidro (13 mm) pré-tratadas com silano 2,5% durante 2 h até sua total secagem. Logo após, as células foram fixadas com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15 M e azul alcian (0,01%) e incubadas durante a noite a 4°C.

As células foram expostas a concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%) para desidratação. As amostras foram então submetidas a hexametildisilazano (Sigma-chemical) até secagem completa e revestidas com 20 nm de ouro. As células fúngicas foram observadas por microscópio eletrônico de varredura Quanta 450-FEG em modo de alto vácuo.

### **5.7.2 Biofilmes**

A MEV foi utilizada para visualizar melhor o efeito da SER em estruturas microscópicas do biofilme fúngico (DO AMARAL VALENTE SÁ et al., 2020). A cepa *Candida auris* foi escolhida como representativa devido à sua relevância clínica. Primeiramente, o microrganismo foi suspenso e incubado em caldo YND por 24 h a 35°C. As células foram centrifugadas (2500 rpm, 5 min) e lavadas com solução salina três vezes, depois suspensas (0,5 McFarland) em meio caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS e adicionadas a uma placa de 12 poços contendo lamínulas circulares (13 mm), incubando-as por 24 h a 35°C para a formação do biofilme na superfície do material.

Em seguida, SER em concentrações de CIM e 8xCIM, diluídas em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, foram colocadas em cada poço e as placas incubadas mais uma vez nas mesmas condições já mencionadas. Para a observação do efeito da SER em biofilme

em formação, o microrganismo e o fármaco (CIM, 4xCIM e 8xCIM) foram adicionados concomitantemente à placa e incubados.

As amostras foram fixadas por solução de glutaraldeído 2,5% adicionada de tampão cacodilato de sódio 0,15 M e azul alcian (0,01%) e incubadas durante a noite a 4°C. Em seguida, foi realizada a desidratação alcoólica (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100% de etanol). Por fim, as amostras foram submetidas à solução de hexametildisilazano (Sigma-chemical) para a secagem completa e revestidas com 20 nm de ouro. O biofilme fúngico foi observado utilizando microscópio eletrônico de varredura Quanta 450-FEG em modo de alto vácuo.

## **5.8 Avaliação da citotoxicidade da SER em células de linfócitos humanos**

### ***5.8.1 Isolamento e preparo das células linfocitárias de sangue periférico humano***

Os linfócitos humanos foram isolados pelo método de centrifugação por gradiente de densidade sobre Histopaque-1077, de acordo com o descrito por Cavalcanti et al. (2020b), de 3 pacientes saudáveis ( $24 \pm 3,05$  anos) do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará (Brasil). Todo procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará (COMEPE-UFC – protocolo número 281/09). Fitohemaglutinina (2,5%) foi adicionado à amostra, e meio RPMI 1640 (20% soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 171,9  $\mu$ M de estreptomicina) utilizado para suspender as células previamente lavadas e depois incubadas a 35°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### ***5.8.2 Determinação do efeito da SER sobre a viabilidade celular de linfócitos humanos***

A viabilidade celular dos linfócitos tratados com a droga foi determinada se aplicando o teste de Alamar Blue (CAVALCANTI et al., 2020b). As células suspensas em concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL foram expostas à SER (1,09 a 140  $\mu$ g/mL) em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Depois disso, foi adicionado Alamar Blue (Resazurin, Sigma-Aldrich) em concentração de 312  $\mu$ g/mL em cada poço e a placa incubada mais uma vez por 24 h. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 570 e 595 nm em leitor de microplacas (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter®) e comparada com o controle não tratado.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 SER apresenta atividade antifúngica frente a diferentes espécies de *Candida***

Considerando as cepas clínicas utilizadas neste estudo, cerca de 54% (7) eram resistentes ao FLC, 8% (1) sensíveis dose dependentes e 38,5% (5) sensíveis, cujas CIMs variaram de 8 a 64  $\mu\text{g/mL}$  (resistentes) e 0,25 a 1,5  $\mu\text{g/mL}$  (sensível). Em relação ao SER, a CIM<sub>50</sub> variou de 2 a 16  $\mu\text{g/mL}$  para todas as cepas utilizadas. ITC CIM<sub>50</sub> variou de 0,03 a 4  $\mu\text{g/mL}$  e AMB CIM<sub>100</sub> de 0,5 a 1,5  $\mu\text{g/mL}$ . Todos esses resultados estão detalhados na Tabela 3. Todos os antifúngicos estavam dentro da faixa de concentração recomendada para as cepas de controle de qualidade.

### **6.2 O uso combinado *in vitro* da SER tem efeitos diferentes dependendo do antifúngico associado**

Interações do tipo indiferente foram observadas em quase todas as cepas (93,75%) quando SER foi combinado com FLC, apenas uma apresentando interação antagonista. Na associação entre SER e ITC, observou-se maior heterogeneidade, sendo 37,5% aditiva, 25% sinérgica, 31,25% indiferente e, semelhante à associação com FLC, apenas uma cepa com interação antagonista. Além disso, na combinação de SER e AMB os resultados foram aditivos em 43,75% e indiferentes em 56,25%. Esses e outros resultados podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3 – Efeitos da SER e dos fármacos antifúngicos frente a cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol, e suas interações

Cepas	CIM isolada ( $\mu\text{g/mL}$ )				CIM associada ( $\mu\text{g/mL}$ )								
	SER	FLC	ITC	AMB	SER/FLC	ICIF	Interação	SER/ITC	ICIF	Interação	SER/AMB	ICIF	Interação
<i>C. albicans</i> 1* <sup>+</sup>	16	16	2	0,5	16/16	2	IND	4/0,5	0,5	SYN	8/0,25	1	ADT
<i>C. albicans</i> 2	2	32	1	1,5	2/32	2	IND	1/0,5	1	ADT	2/1,5	2	IND
<i>C. albicans</i> 3	8	0,25	0,125	0,5	16/0,5	3	IND	8/0,13	2	IND	8/0,5	2	IND
<i>C. albicans</i> 4	8	0,25	0,125	0,5	16/0,5	3	IND	8/0,13	2	IND	8/0,5	2	IND
<i>C. parapsilosis</i> 1	5	8	0,03	1	10/16	3	IND	10/0,06	3	IND	5/1	2	IND
<i>C. parapsilosis</i> 2	2	4	0,5	0,5	2/4	2	IND	0,5/0,13	0,6	ADT	1/0,25	1	ADT
<i>C. parapsilosis</i> 3	2	0,5	0,05	0,5	2/0,5	2	IND	1/0,03	1	ADT	1/0,25	1	ADT
<i>C. parapsilosis</i> 4 <sup>+</sup>	8	8	0,5	0,5	16/16	3	IND	1/0,06	0,25	SYN	4/0,25	1	ADT
<i>C. tropicalis</i> 1	4	32	1,5	2	4/32	2	IND	1/0,03	0,25	SYN	2/1	1	ADT
<i>C. tropicalis</i> 2 <sup>+</sup>	4	32	1	1	4/32	2	IND	1/0,25	0,5	SYN	4/1	2	IND
<i>C. tropicalis</i> 3	4	0,25	0,06	0,5	32/2	16	ANT	16/0,25	9	ANT	4/0,5	2	IND
<i>C. tropicalis</i> 4	8	0,25	0,06	0,5	16/0,5	3	IND	8/0,06	2	IND	8/0,5	2	IND
<i>C. glabrata</i> * <sup>+</sup>	8	64	4	1,5	8/64	2	IND	4/2	1	ADT	4/0,75	1	ADT
<i>C. auris</i> 01256P* <sup>+</sup>	4	1,5	0,25	1,5	4/1,5	2	IND	2/0,13	1	ADT	2/0,75	1	ADT
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	8	1	0,5	1	8/1	2	IND	4/0,25	1	ADT	8/1	2	IND
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	4	32	0,5	1	4/32	2	IND	4/32	2	IND	4/1	2	IND

farmacológicas.

CIM: concentração inibitória mínima; ICIF: Índice da concentração inibitória fracionada; SER: Sertralina; FLC: Fluconazol; ITRA: Itraconazol; AMB: Anfotericina B; SYN: Sinergismo; ADT: Aditivo; IND: Indiferente; ANT: Antagonismo.

*C. glabrata* foi considerada resistente ao fluconazol se CIM  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ , as outras espécies quando CIM  $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ , com exceção da *C. auris*, que não há parâmetro de corte de sensibilidade ainda definido.

\*Cepa utilizada nos ensaios de citometria de fluxo.

<sup>+</sup>Cepa utilizada nos ensaios de biofilme.

Os valores de CIM e ICIF são medias geométricas dos experimentos realizados em triplicata.

### 6.3 SER possui efeito fungicida frente a cepas de *Candida* spp.

Foi encontrado para a SER que sua CFM, concentração que inibiu o crescimento total do microrganismo no meio de cultura ágar, variou de 8 a 32 µg/mL considerando todas as cepas testadas, e o maior valor da relação CFM/CIM não ultrapassou 2, portanto se observou que o fármaco apresenta efeito fungicida contra *Candida* spp., de acordo com a metodologia utilizada (Tabela4).

Tabela4: Natureza do efeito inibitório da SER frente a cepas de *Candida* spp. resistentes e sensíveis ao FLC.

Cepas	CIM <sub>100</sub>	CFM	CFM/CIM	Efeito
<i>C. albicans</i> 1	16	32	2	Fungicida
<i>C. albicans</i> 2	8	16	2	Fungicida
<i>C. albicans</i> 3	16	16	1	Fungicida
<i>C. albicans</i> 4	32	32	1	Fungicida
<i>C. parapsilosis</i> 1	16	32	2	Fungicida
<i>C. parapsilosis</i> 2	8	16	2	Fungicida
<i>C. parapsilosis</i> 3	8	8	1	Fungicida
<i>C. parapsilosis</i> 4	16	16	1	Fungicida
<i>C. tropicalis</i> 1	8	8	1	Fungicida
<i>C. tropicalis</i> 2	8	16	2	Fungicida
<i>C. tropicalis</i> 3	16	16	1	Fungicida
<i>C. tropicalis</i> 4	16	32	2	Fungicida
<i>C. glabrata</i> 2	16	32	2	Fungicida
<i>C. auris</i> 01256P	8	16	2	Fungicida
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	32	32	1	Fungicida
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	8	16	2	Fungicida

CIM<sub>100</sub>: Concentração inibitória mínima, menor concentração que apresentou 100% de inibição visual do crescimento fúngico.

O efeito é classificado como fungistático quando  $CFM/CIM \geq 4$  e fungicida quando  $CFM/CIM \leq 4$ .

Os valores de CIM<sub>100</sub>eCFM foram obtidos através de ensaios realizados em triplicatas.

#### **6.4 SER reduz a densidade numérica de células viáveis de *Candida* spp.**

Conforme visto na Figura 6, após 24 h de exposição ao SER houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) na densidade celular dos microrganismos em relação ao controle negativo (microrganismo não tratado com as drogas), para todas as concentrações testadas. AMB causou alta redução da densidade celular (mais da metade em comparação com o controle). O FLC não causou redução relevante na densidade celular dos microrganismos em relação às demais drogas, permanecendo semelhante ao controle positivo.

#### **6.5 SER causa despolarização mitocondrial em *Candida* spp.**

Em relação ao controle, a SER foi capaz de causar despolarização mitocondrial transmembrana significativa ( $p < 0,05$ ) em todas as concentrações testadas após 24 h de tratamento ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo (Figura 6B). O mesmo efeito foi observado para a AMB. O FLC não mostrou nenhum efeito sobre a despolarização mitocondrial para *C. albicans* e *C. glabrata*, mas foi significativo ( $p < 0,05$ ) na cepa de *C. auris*.

#### **6.6 A exposição de *Candida* spp. ao SER leva à apoptose celular**

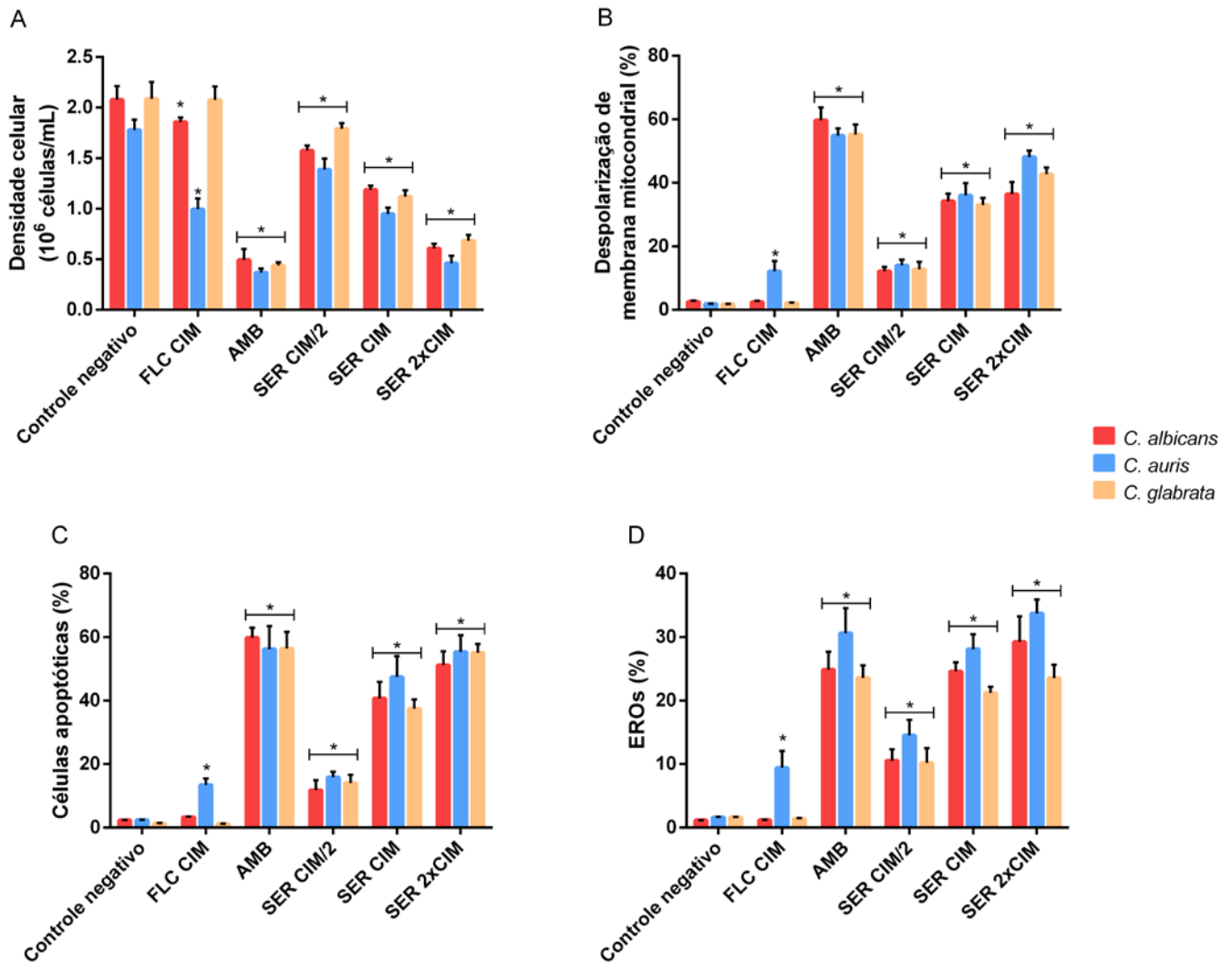
SER induziu significativamente ( $p < 0,05$ ) apoptose em *Candida* spp. como visto na Figura 6C, aumentando a porcentagem de células apoptóticas para 40 e 51% em CIM e 2x CIM, respectivamente, em relação ao controle não tratado. AMB induziu apoptose celular em todas as cepas testadas, enquanto para o FLC apenas foi observada na cepa *C. auris*.

#### **6.7 SER induz a formação de EROs em *Candida* spp.**

As cepas tratadas com SER apresentaram níveis de EROs intracelular aumentados ( $p < 0,05$ ) em comparação ao controle não tratado, chegando a mais de 30% em 2xMIC para *C. auris*. AMB também induziu o aumento de EROs em todas as cepas testadas, enquanto para o FLC esse efeito foi observado apenas em *C. auris* (ver Figura 6D).



Figura 6 – Ensaios de citometria de fluxo para identificar o provável mecanismo de ação do SER após 24 h de exposição em cepas de *Candida* spp.

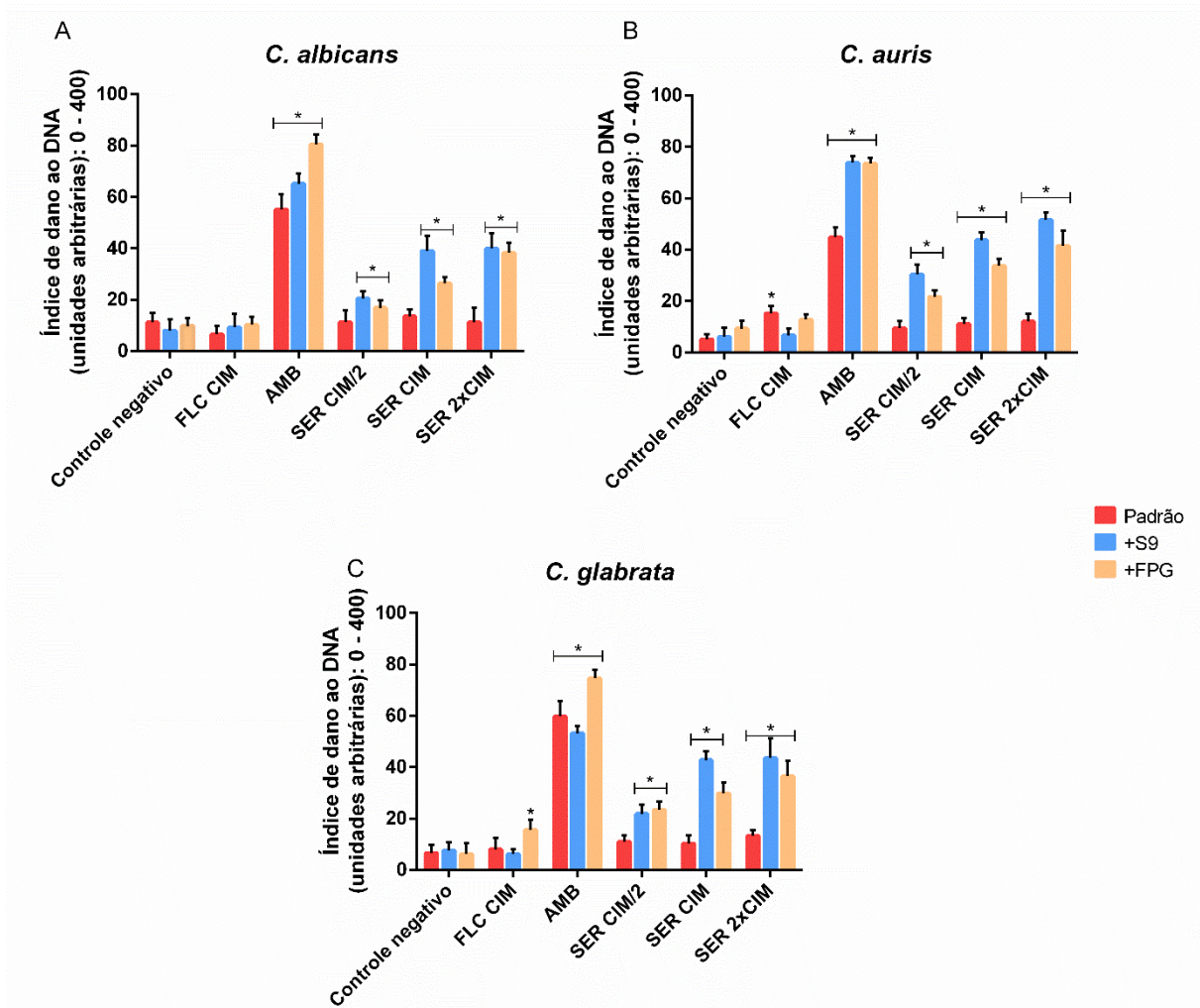


Fonte: Autor. *C. albicans*: FLC CIM (16 µg/mL); SER CIM/2 (8 µg/mL); SER CIM (16 µg/mL); e SER 2xCIM (32 µg/mL). *C. auris*: FLC CIM (1,5 µg/mL); SER CIM/2 (2 µg/mL); SER CIM (4 µg/mL); e SER 2xCIM (8 µg/mL). *C. glabrata*: FLC CIM (64 µg/mL); SER CIM/2 (4 µg/mL); SER CIM (8 µg/mL); e SER 2xCIM (16 µg/mL). A significância entre a diferença do teste e do controle ( $p < 0,05$ ) foi avaliada pelo teste de Dunnett.

### 6.8 SER tem pouco efeito oxidativo no DNA de *Candida* spp.

SER causou pouco dano ao DNA no ensaio cometa alcalino padrão em 2xCIM para *C. auris* e *C. glabrata* (Figura 7B E 7C). Não foi observado aumento significativo comparado ao controle no mesmo teste em todas as concentrações de SER testadas para *C. albicans*. Com FPG, foi detectado padrão migratório de bases púricas oxidadas, em todas as concentrações testadas para todas as cepas. Utilizando fração S9, danos ao DNA foram identificados em todas as concentrações do fármaco em todas as cepas. AMB induziu a fragmentação do DNA em todas as cepas testadas e o FLC causou baixo dano ao DNA (Figura 7).

Figura 7– Fragmentação do DNA após 24 h de exposição de *Candida* spp. à SER.



Fonte: Autor. *C. albicans*: FLC CIM (16 µg/mL); SER CIM/2 (8 µg/mL); SER CIM (16 µg/mL); e SER 2xCIM (32 µg/mL). *C. auris*: FLC CIM (1,5 µg/mL); SER CIM/2 (2 µg/mL); SER CIM (4 µg/mL); e SER 2xCIM (8 µg/mL). *C. glabrata*: FLC CIM (64 µg/mL); SER CIM/2 (4 µg/mL); SER CIM (8 µg/mL); e SER 2xCIM (16 µg/mL). Padrão: Teste do cometa alcalino padrão; +S9: Teste do cometa alcalino modificado com fração S9; +FPG: Teste do

cometa alcalino modificado com FPG. A significância entre a diferença do teste e do controle ( $p < 0,05$ ) foi avaliada pelo teste de Dunnett.

### 6.9 Estudos *in silico*

SER apresentou menor energia de afinidade (complexos mais estáveis) com os alvos Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase e CYP51 (-9,0 kcal/mol e -9,1 kcal/mol, respectivamente). Com base nos valores de Ki e pKi, a SER precisaria de uma concentração menor para inibir os respectivos receptores [Ki:  $2,53 \times 10^{-7}$ ], pKi 6,59 para Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase; Ki:  $2,14 \times 10^{-7}$ , pKi 6,67 para CYP51], uma vez que esses complexos apresentaram os menores valores de Ki e os maiores pKi. Esses e outros resultados podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5 –Escore de interação de ligação, RMSD, Ki, pKi, aminoácidos e tipos de interações da SER dentro dos receptores *C. albicans*

Receptor-Sertralina	Escore (kcal/mol)	RMSD (Å)	Ki	pKi	Resíduo	Interação	Distância Å
Yeast DNA Polymerase ETA <sup>a</sup>	-7.6	1.930	$2.69 \times 10^{-6}$	5.57	Lys 140A	Hidrofóbica	5.48
					Lys 143A	Hidrofóbica	4.39
					Lys 143A	Hidrofóbica	4.56
					Lys 143A	Hidrofóbica	4.98
					Arg 163B	Hidrofóbica	3.64
					Arg 163B	Hidrofóbica	3.81
					Arg 163B	Hidrofóbica	5.32
					Phe 166B	Hidrofóbica	4.81
Loop J4/5 do Grupo I de íntrons <sup>b</sup>	-5.1	1.269	$1.83 \times 10^{-4}$	3.74	Ile 10B	Ligação de Hidrogênio	2.56
					Gua 3A	Hidrofóbica	5.08
					Ade 16B	Hidrofóbica	4.27
					Ade 16B	Ligação de Hidrogênio	3.44
					Ade 16B	Ligação de Hidrogênio	3.60
					Gua 3A	$\pi$ - $\pi$ em forma de T	4.68
					Gua 3A	$\pi$ - $\pi$ em forma de T	5.94
					Ade 2A	Carga Atrativa	4.74
Cdc13 OB4 <sup>c</sup>	-6.8	1.154	$1.04 \times 10^{-5}$	4.98	Gua 3A	Carga Atrativa	5.50
					Ile 676B	Hidrofóbica	5.15
					Pro 723B	Ligação de Hidrogênio	2.27
					Pro 723B	Ligação de Hidrogênio	2.61
Superóxido Dismutase 5 (SOD5) <sup>d</sup>	-6.0	1.801	$4.00 \times 10^{-5}$	4.40	Glu 681B	Carga Atrativa	5.26
					Val 81A	Hidrofóbica	4.88
					Val 81A	Hidrofóbica	5.12

					Lys 85A	Hidrofóbica	3.57
					Lys 85A	Hidrofóbica	4.04
					Lys 85A	Hidrofóbica	4.51
					Cys 162A	Hidrofóbica	4.14
					Ala 163A	Hidrofóbica	5.37
					Glu 35A	Cl	3.20
					Asn 164A	Doador-Doador Desfavorável	1.66
Exo-β-(1,3)-glucanase <sup>e</sup>	-9.0	1.504	$2.53 \times 10^{-7}$	6.59	Phe 144A	Hidrofóbica	4.78
					Tyr 255A	Hidrofóbica	4.87
					Phe 258A	Hidrofóbica	4.58
					Tyr 29A	Ligação de Hidrogênio	2.76
					Phe 258A	π-π empilhado	3.84
					Phe 258A	π-π empilhado	4.72
					Phe 229A	π-π em forma de T	5.38
					Tyr 255A	π-Cátion	4.54
					Glu 292A	Carga Atrativa	5.01
Mep2 <sup>f</sup>	-6.6	1.867	$1.45 \times 10^{-5}$	4.84	Phe 92A	Hidrofóbica	4.74
					Phe 92A	Hidrofóbica	4.80
					Phe 92A	Hidrofóbica	5.00
					Trp 165A	Hidrofóbica	5.85
					Trp 172A	Hidrofóbica	3.60
					Ala 390A	Hidrofóbica	4.75
					Trp 394A	Hidrofóbica	4.05
					Trp 172A	π-Cátion	4.53
					Phe 92A	π-π empilhado	3.72
					Trp 394A	π-π empilhado	5.74
					Trp 165A	π-π em forma de T	4.90
CYP51 <sup>g</sup>	-9.1	1.778	$2.14 \times 10^{-7}$	6.67	Ile 131A	Hidrofóbica	3.47
					Ile 131A	Hidrofóbica	4.86
					Phe 228A	Hidrofóbica	5.27
					Ile 304A	Hidrofóbica	4.23
					Ile 304A	Hidrofóbica	5.35
					Leu 376A	Hidrofóbica	5.38
					HEM 601A	Hidrofóbica	3.21

					HEM 601A	Hidrofóbica	3.67
					HEM 601A	Hidrofóbica	4.87
					Tyr 118A	$\pi$ - $\pi$ em forma de T	4.91
					Phe 126A	$\pi$ - $\pi$ em forma de T	5.10
					HEM 601A	Positivo-positivo desfavorável	5.31
Timidilato Quinase <sup>h</sup>	-5.7	1.149	$6.64 \times 10^{-5}$	4.18	Ile 124A	Hidrofóbica	3.53
					Ile 124A	Hidrofóbica	4.53
					Ile 177A	Hidrofóbica	4.67
					Thr 224A	Carga Atrativa	5.03
Yeast Cytochrome BC1 Complex <sup>i</sup>	-8.2	1.439	$9.79 \times 10^{-7}$	6.01	Trp 29C	Hidrofóbica	4.97
					Ala 98C	Hidrofóbica	4.15
					Lys 99C	Hidrofóbica	5.17
					Tyr 102C	Hidrofóbica	5.27
					Phe 326C	Hidrofóbica	4.83
					Phe 326C	Hidrofóbica	5.43
					Phe 327C	Hidrofóbica	4.64
					Glu 82G	Carga Atrativa	5.28
					Trp 29C	$\pi$ - $\pi$ empilhado	4.37
					Trp 29C	$\pi$ - $\pi$ empilhado	4.74
					Tyr 102C	$\pi$ - $\pi$ empilhado	4.25
					Trp 29C	$\pi$ - $\pi$ em forma de T	5.54
					Phe 52H	$\pi$ - $\pi$ em forma de T	5.55

a. Estrutura cristalina da “Yeast DNA Polymerase ETA” – PDB ID: 1JIH.

b. Estrutura cristalina do “Loop J4/ do Grupo I de íntrons de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*” – PDB ID: 1TUT.

c. Estrutura cristalina da proteína de telômero de levedura “Cdc13 OB4” – PDB ID: 3RMH.

d. Estrutura cristalina da “Superóxido Dismutase 5 (SOD5)” – PDB ID: 4N3T.

e. Estrutura cristalina da “Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase” – PDB ID: 1EQP.

f. Estrutura cristalina da “Mep2” – PDB ID: 5AEZ.

g. Estrutura cristalina da “CYP51” – PDB ID: 5TZ1.

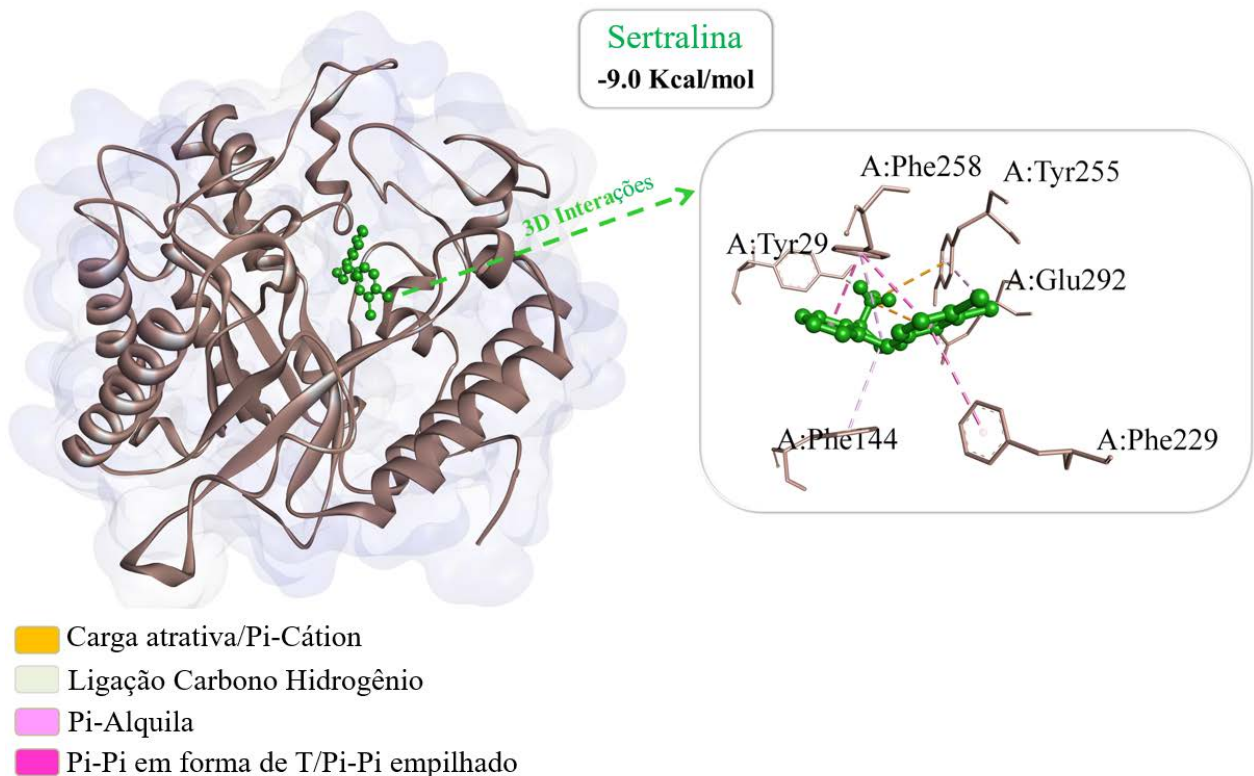
h. Estrutura cristalina da “Timidilato Quinase” – PDB ID: 5UIV.

i. Estrutura cristalina da “Yeast Cytochrome BC1 Complex” – PDB ID: 1KB9.

Sobre os tipos de interação, três foram hidrofóbicas: duas com a cadeia lateral apolar dos resíduos Phe 144A e Phe 258A, e uma com a cadeia lateral polar não carregada do resíduo Tyr 255A. Encontramos uma forte ligação de H com a estrutura OH do resíduo de cadeia lateral polar não carregado Tyr 29A (-CH...OH-; 2,76 Å), bem como duas interações  $\pi$ - $\pi$  empilhadas com a cadeia lateral apolar do Phe Resíduo 258A, um  $\pi$ - $\pi$  em forma de T com uma cadeia lateral apolar do resíduo Phe 229A, um cátion Pi com uma cadeia lateral polar não

carregada do resíduo Tyr 255A e uma carga atrativa com um resíduo de cadeia lateral ácido Glu 292A entre Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase e SER (Figura8).

Figura 8 – Representação tridimensional do complexo de interação sertralina e Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase.

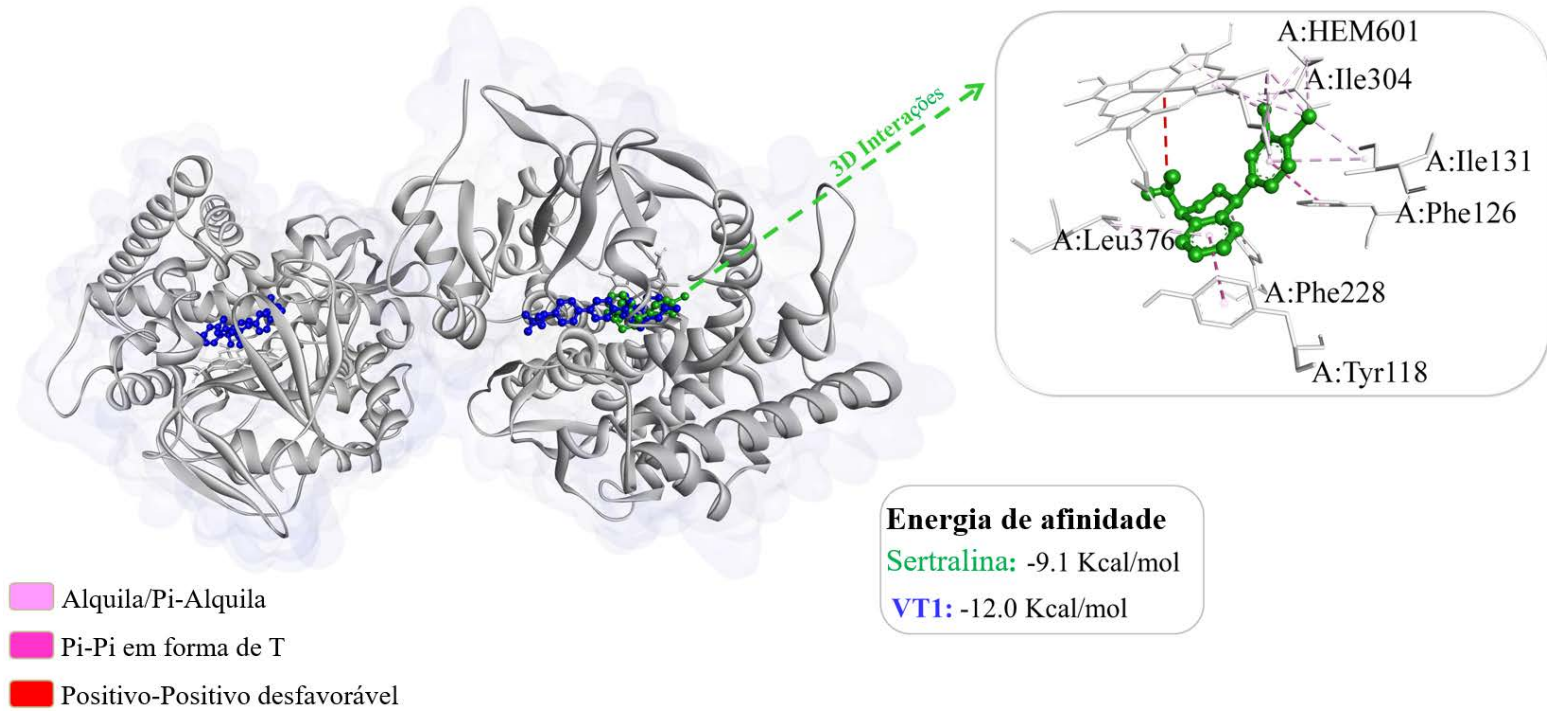


Fonte: Autor

CYP51 e SER (Figura9) tiveram interações hidrofóbicas com o resíduo HEM 601A e com a cadeia lateral não polar dos resíduos Ile 131A, Phe 228A, Ile 304A, Leu 376A; duas interações  $\pi$ - $\pi$  em forma de T; um com a cadeia lateral polar não carregada do resíduo Tyr 118A; um com a cadeia lateral não polar do resíduo Phe 126A; e uma interação positiva-positiva desfavorável com HEM 601A.

O redocking de VT1 com CYP 51 apresentou valores de -12,0 kcal/mol (energia de afinidade),  $1,60 \times 10^{-9}$  (Ki) e 8,79 (pKi). O sítio de ligação foi composto pelos resíduos alvo Tyr 64, Tyr 118, Leu 121, Thr 122, Phe 126, Ile 131, Tyr 132, Phe 228, Pro 230, Phe 233, Gly 303, Ile 304, Gly 307, Gly 308, Thr 311, Leu 376, His 377, Ser 378, Phe 380, Tyr 505, Ser 507 e Met 508. Sertralina ligada às mesmas regiões que VT1, tendo em comum interações com os resíduos Tyr 118, Phe 126, Ile 131, Phe 228, Ile 304 e Leu 376.

Figura 9– Representação tridimensional do complexo de interação sertralina e VT1comCYP51.



Fonte: Autor.

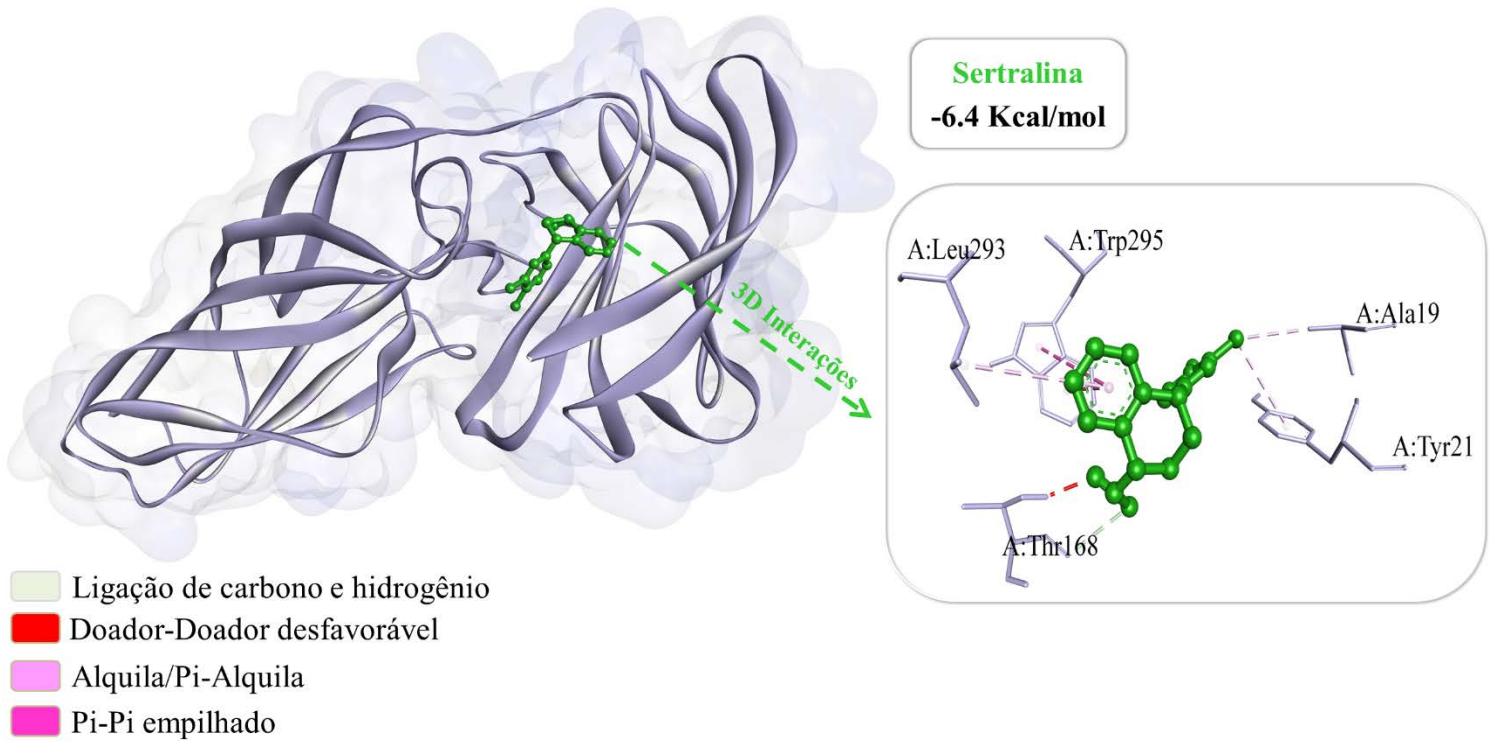
A ligação da SER com ALS3 apresentou baixa energia de afinidade ( $< 6,0$  kcal/mol) com valor de  $-6,4$  kcal/mol e RMSD  $1,591 \text{ \AA}$  (Tabela6). Menores distâncias foram observadas entre SER e ALS3 para os resíduos Leu293 e Trp295 por interações  $\pi$ -alquil e  $\pi$ - $\pi$ empilhadas (atrativas e não covalentes), respectivamente (Figura 10), ambas ligações entre os aminoácidos e um anel aromático.

Tabela 6 – Afinidade de ligação, RMSD, aminoácidos e distância da SER como receptor de *C. albicans*

Receptor-Sertralina	Afinidade (kcal/mol)	RMSD ( $\text{\AA}$ )	Resíduo	Distância ( $\text{\AA}$ )
ALS3 <sup>a</sup>	-6.4	1.591	Leu293	4.2
			Trp295	3.4
			Gly297	7.7
			Ala19	5.9
			Ala116	11.6
			Pro29	8.4
			Thr61	11.3
			Phe58	12.2
			Ser170	4.2
			Lys59	6.5

Estrutura cristalina da ALS3 – PDB ID: 4LEB.

Figura 10 –Interações da sertralina com a proteína ALS3.



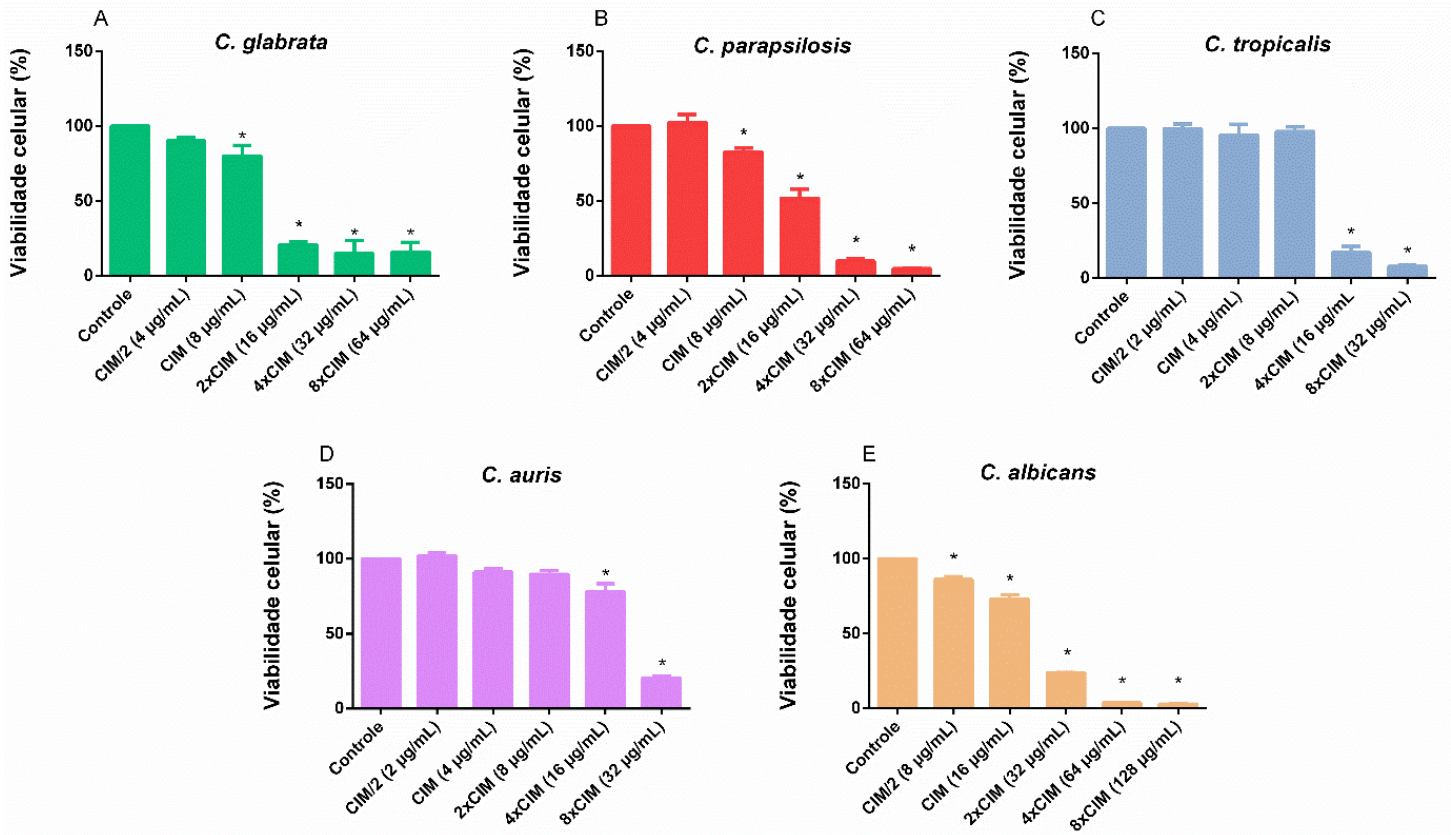
Fonte: Autor. (A) ligação 3D da SER com ALS3, (B) molécula da SER e interações com os resíduos de aminoácidos da proteína ALS3.



### **6.10 SER em baixas concentrações reduz a viabilidade dos biofilmespré-formados de *Candida* spp.**

SER apresentou redução significativa ( $p < 0,05$ ) da viabilidade do biofilme em relação ao controle positivo desde concentração subinibitória (CIM/2) para a cepa de *C. albicans*. Em *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, foi observada inibição a partir da CIM. SER na concentração de 2xCIM foi capaz de reduzir em quase 80% a viabilidade do biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata*. *C. tropicalis* e *C. auris* demonstraram inibição significativa da viabilidade celular ( $p < 0,05$ ) apenas a partir de 4xCIM, a primeira com mais de 80% de declínio. 8xCIM inibiu quase toda a viabilidade do biofilme de todas as cepas testadas. Os resultados são apresentados na Figura 11.

Figura 11– Efeito inibitório da SER sobre viabilidade de biofilmes maduros de cepas de *Candida* spp. em diferentes concentrações.



Fonte: Autor.

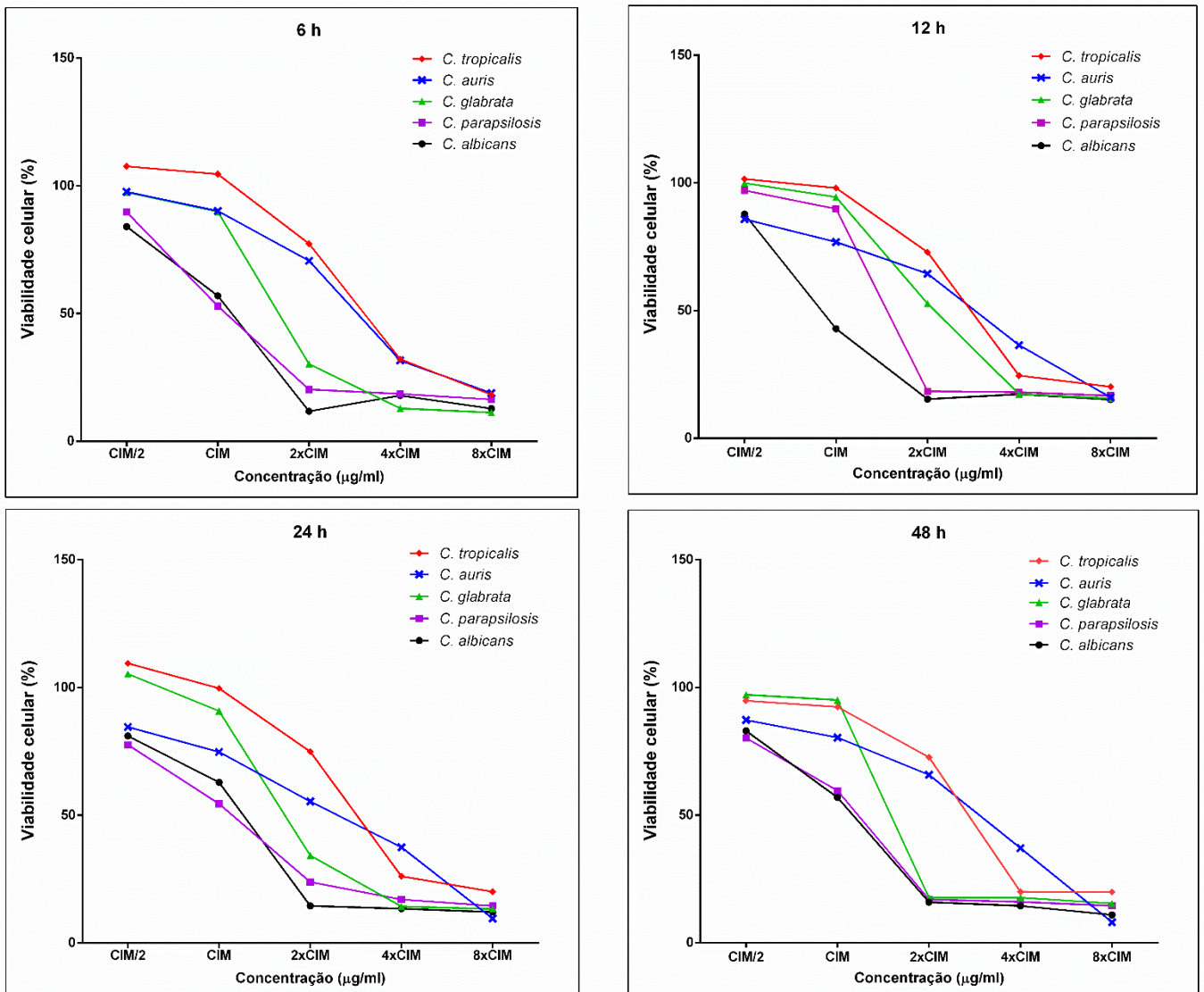
### 6.11 SER possui atividade preventiva na formação de biofilme de *Candida* spp.

O efeito preventivo da SER na formação de biofilme de *Candida* spp. foi observado desde o início da exposição dos microrganismos ao fármaco (6 h) para todas as cepas testadas. O biofilme de *C. albicans* e *C. parapsilosis* mostrou mais sensível à droga SER no tempo inicial de formação (6 h), com redução significativa da viabilidade ( $p < 0,05$ ) em CIM/2 e quase 50% em CIM, em relação ao controle positivo.

A SER inibiu a maturação de mais de 50% do biofilme de *C. glabrata* em concentrações de 2xCIM. *C. tropicalis* teve cerca de 30% de inibição em 2xCIM e mais de 70% para concentrações mais altas. Já *C. auris*, a CIM/2 apresentou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da viabilidade do biofilme, em relação ao controle positivo, após 12 h de exposição ao SER, mas maiores níveis de inibição foram observados a partir de 2xCIM (mais de 40%).

Concentrações mais altas (4xCIM e 8xCIM) apresentaram a melhor redução da viabilidade do biofilme para todas as cepas testadas. Comparando as inibições causadas por cada concentração entre cada tempo analisado, observou-se que não houve diferenças maiores quanto maior o tempo de exposição ao fármaco. Em contrapartida, nos mesmos tempos testados, quanto maior a concentração do fármaco, maior a inibição da formação de biofilme. Assim, observa-se que a SER apresentou efeito concentração-dependente, e não tempo-dependente. Os dados citados são demonstrados na Figura 12.

Figura 12– Viabilidade celular dos biofilmes de *Candida* spp. após diferentes horas de exposição à SER em diferentes concentrações.



Fonte: Autor. *C. tropicalis* e *C. auris*: MIC/2 (2 µg/mL), MIC (4 µg/mL), 2xMIC (8 µg/mL), 4xMIC (16 µg/mL), 8xMIC (32 µg/mL); *C. glabrata* e *C. parapsilosis*: MIC/2 (4 µg/mL), MIC (8 µg/mL), 2xMIC (16 µg/mL), 4xMIC (32 µg/mL), 8xMIC (64 µg/mL); *C. albicans*: MIC/2 (8 µg/mL), MIC (16 µg/mL), 2xMIC (32 µg/mL), 4xMIC (64 µg/mL), 8xMIC (128 µg/mL). A atividade concentração-dependente pode ser observada comparando a inibição com o aumento da concentração da SER em cada tempo indicado.

### **6.12 SER causa danos à estrutura microscópica de células planctônicas de *C.albicans*.**

SER causou danos à estrutura externa de *C. albicans*, deformando sua morfologia. As Figuras 13C a F demonstram as alterações celulares em relação ao controle não tratado (Figuras 13A e B), com a presença de fragmentos celulares. O mesmo aspecto pode ser observado para o controle tratado com AMB (Figuras 13G e H).

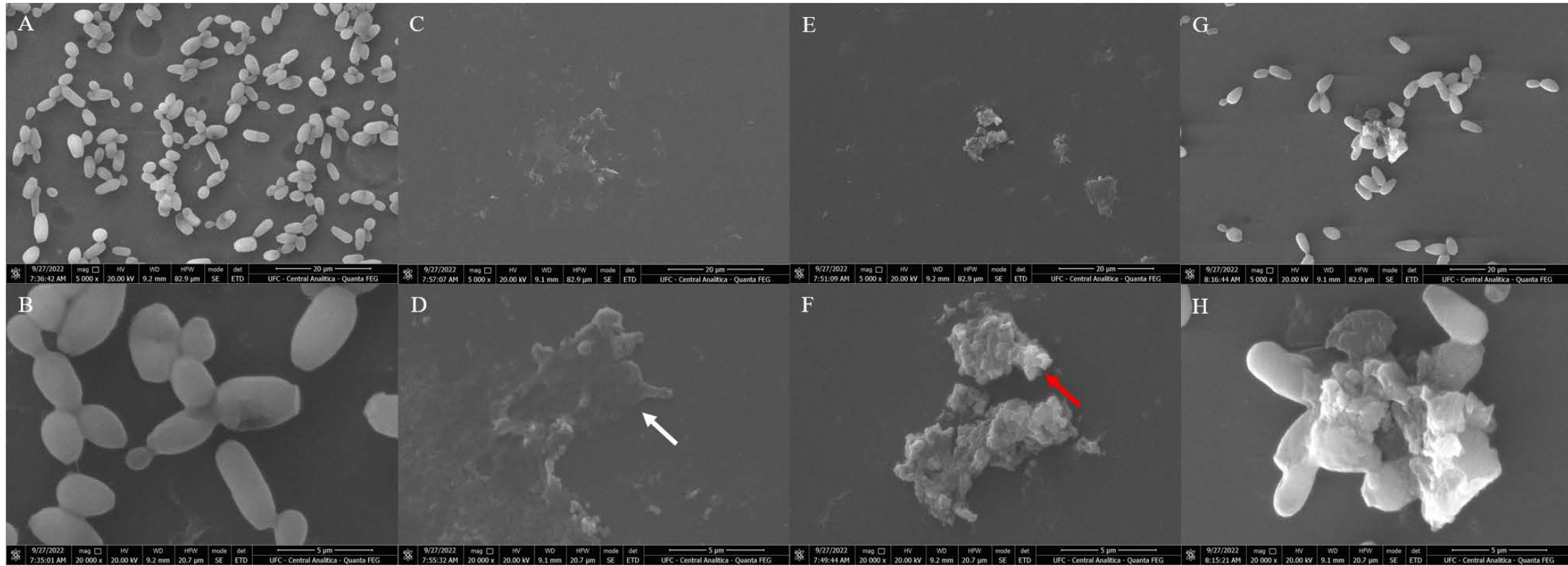


Figura 13 – Arquitetura microscópica de células planctônicas de *C. albicans* tratadas e não tratadas com SER, observadas por MEV.

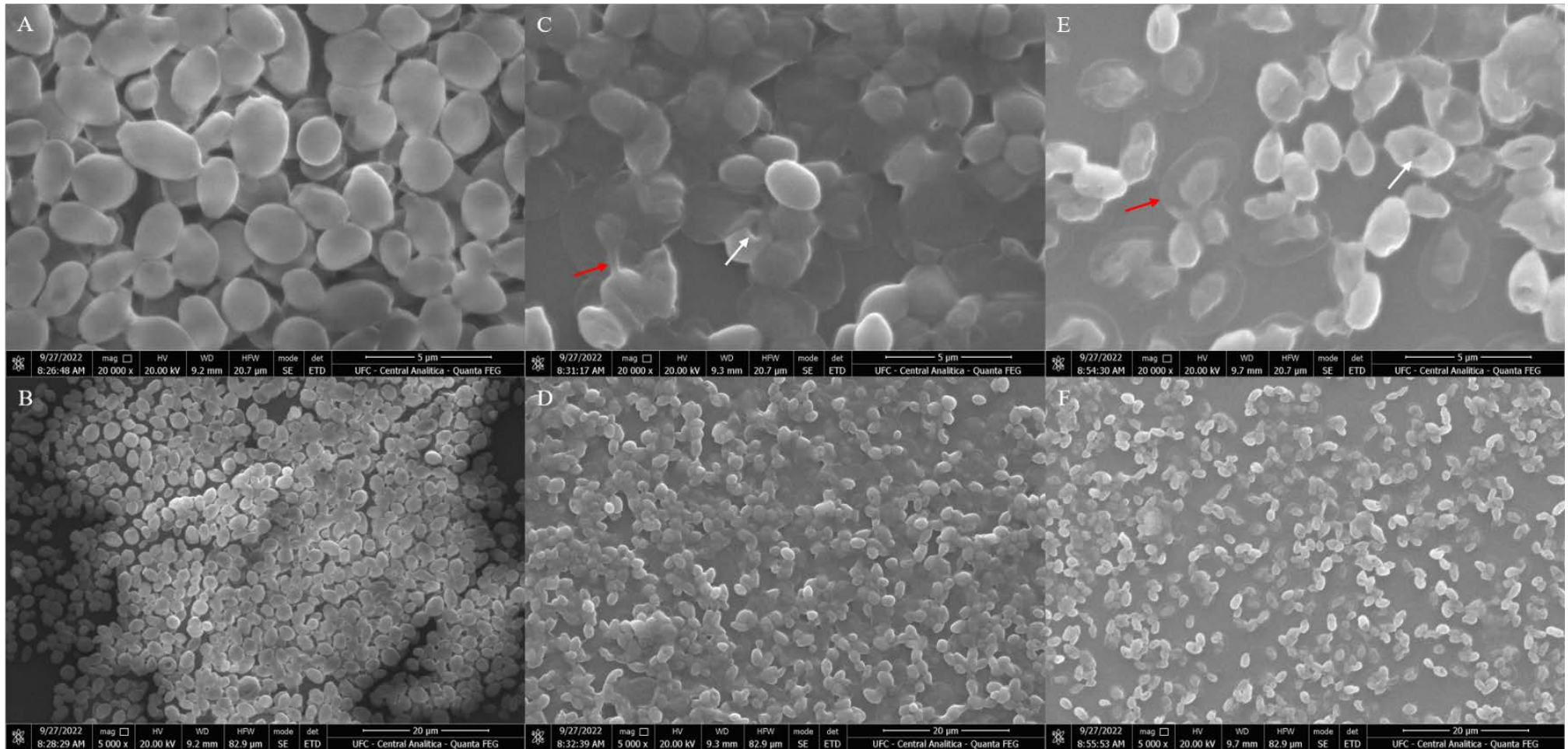
Fonte: Autor. (A; B) Controle, (C; D) células tratadas com CIM (16 µg/mL) de SER, (E; F) células tratadas com 2xCIM (32 µg/mL) de SER, (G; H) células tratadas com AMB (4 µg/mL) como controle de morte. Detritos celulares podem ser vistos (seta branca), bem como deformações na estrutura celular (seta vermelha).

### **6.13 SER causa danos estruturais à arquitetura do biofilme.**

Para observação das alterações morfológicas causadas pela SER no biofilme de *C. auris*, MEV foi utilizado e pôde ser observado que o fármaco causa danos estruturais ao microrganismo. Para o biofilme pré-formado, o controle apresentou uma aglomeração de células intactas de *C. auris* (Figura 14A e 14B) em conformação 3D característica do biofilme, com presença de células em divisão celular, indicativo de viabilidade da mesma.

Sobre as amostras tratadas, a Figura 14C demonstra alterações celulares em relação ao controle, mas grande parte das células ainda se mantém íntegras, como pode ser visto na Figura 14D. Nas concentrações mais altas, observam-se deformações na estrutura externa das células e extravasamento de material intracelular (Figura 14E), mas com maior número de células alteradas, o que pode ser indicativo de que estas não estão mais viáveis, e menor densidade populacional (Figura 14F) em relação às amostras já citadas.

Figura 14– Arquitetura microscópica de biofilmes maduros de *C. auris* tratados e não tratados com SER, observados por MEV.



Fonte: Autor. (A; B) Controle, (C; D) biofilme maduro tratado com CIM (4 µg/mL) da SER, (E; F) biofilme maduro tratado com 8xCIM (32 µg/mL) da SER. Deformações na estrutura externa das células como encolhimento (seta branca), além de extravasamento de material intracelular (seta vermelha) podem ser observadas, principalmente em 8xCIM, também com menor densidade populacional em relação ao controle.



As mesmas alterações celulares foram encontradas para o biofilme em formação (Figura 15), em adição da presença de células colapsadas, com redução visualmente maior da densidade populacional do microrganismo entre as maiores concentrações (4x e 8xCIM) e o controle, além de quando comparado com a quantidade de células observadas para as mesmas concentrações do biofilme pré-formado.

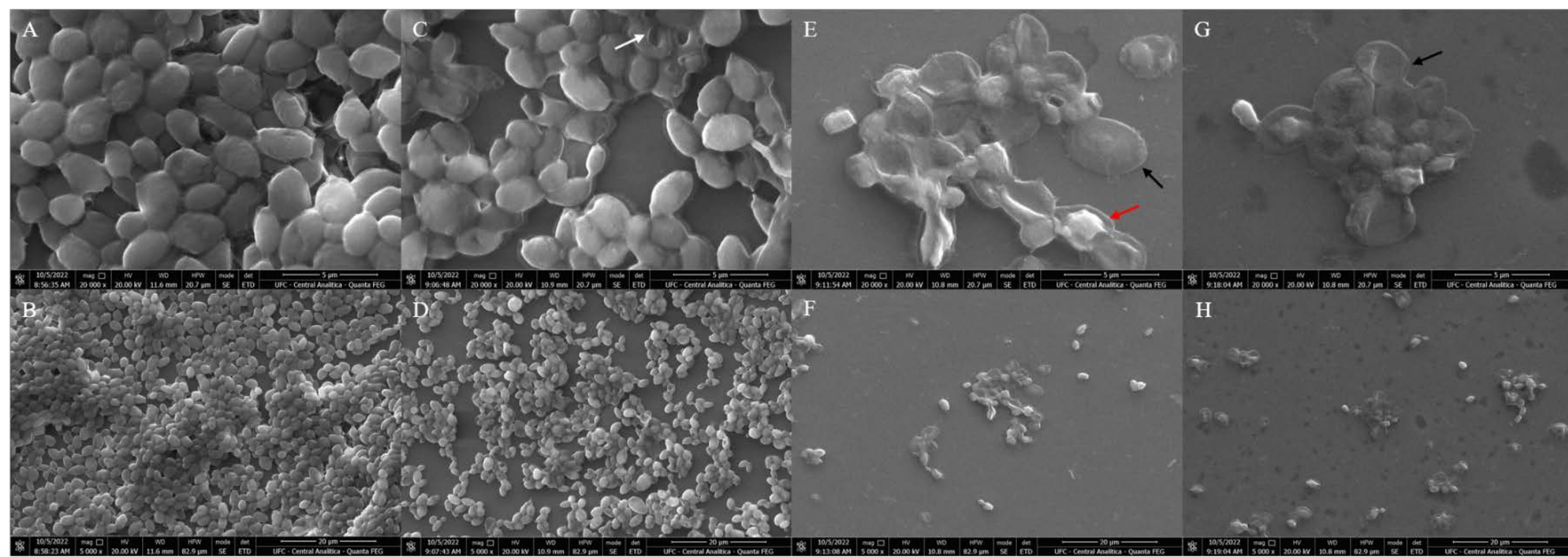


Figura 15– Arquitetura microscópica do biofilme em formação de *C. auris* tratado e não tratado com SER, observados por MEV.

Fonte: Autor. (A; B) Controle, (C; D) biofilme em formação com CIM (4 µg/mL) de SER, (E; F) desenvolvimento de biofilme tratado com 4xCIM (16 µg/mL) de SER, (G; H) desenvolvimento de biofilme tratado com 8xCIM (32 µg/mL). As células tratadas apresentaram deformações na estrutura externa como encolhimento (seta branca), extravasamento de material intracelular (seta vermelha) e colapso celular (seta preta), além de uma redução visualmente maior da população celular em relação às amostras maduras, como pode ser observado principalmente em 4x e 8xCIM.

#### **6.14 SER não apresenta citotoxicidade às células de linfócitos humanos.**

Em relação à exposição dos linfócitos à SER, a concentração inibitória da droga (CI<sub>50</sub>) é superior à concentração máxima testada (> 140 µg/mL) após 24 h de exposição, com intervalo de confiança de 95%.

## 7. DISCUSSÃO

O aumento contínuo da incidência de infecções em humanos causadas pelo gênero *Candida* se tornou um grave problema de saúde pública, principalmente aquelas onde o agente etiológico é resistente às principais terapias preconizadas, pois estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade (BONGOMIN et al., 2017; FRIEDMAN; SCHWARTZ, 2019), enquanto as opções terapêuticas antifúngicas se tornam ainda mais limitadas e mais propensas a apresentarem efeitos tóxicos e riscos graves ao paciente. Assim, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos deve ser uma prioridade, e o reposicionamento de fármacos, além da associação de agentes antifúngicos e não antifúngicos, são estratégias promissoras, pois oferecem menor tempo de desenvolvimento e a possibilidade de redução da toxicidade de do tratamento, respectivamente (JORGE et al., 2017; PUSHPAKOM et al., 2018).

O presente trabalho demonstrou que a SER é uma droga promissora como agente antifúngico e seu efeito inibitório se dá em baixas concentrações para todas as cepas de *Candida* spp. testadas, o que demonstra que o fármaco não age apenas em espécies específicas, mas apresenta amplo espectro dentro do gênero. CIMs semelhantes foram encontrados por Costa Silva et al. (2017) e Alanís-Ríos et al. (2022), que obtiveram 50% de inibição do crescimento celular em 10 a 20 µg/mL e de 4 a 8 µg/mL, respectivamente, reforçando a hipótese de que o SER possui atividade anticandida.

Comparando as concentrações inibitórias da SER com as obtidas para os fármacos antifúngicos, esta apresentou CIMs menores em relação ao FLC, porém superiores aos demais antifúngicos. Apesar disso, para alguns antifúngicos o efeito tóxico é observado mesmo em baixas concentrações, pois possuem uma janela terapêutica curta, como a AMB (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). O presente trabalho demonstrou que o efeito tóxico da SER em células de linfócitos humanos não foi observado em nenhuma das concentrações testadas. Corroborando com isto, Costa Silva et al. (2017) viram que, em concentrações de até 100 µg/mL, a citotoxicidade não foi observada em células de fibroblastos murinos (L929).

Alguns antifúngicos já utilizados, como a AMB, possuem estreita janela terapêutica, e mesmo em concentrações baixas (como as CIMs observadas para as cepas testadas), ou com pequenas variações dos seus níveis séricos, já é capaz de ocasionar efeitos tóxicos graves como nefrotoxicidade, dores abdominais, urticárias, arritmias e anemia, por

exemplo (LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Assim, vemos que a SER é superior quanto à sua segurança, mesmo em concentrações maiores do que as obtidas para os antifúngicos utilizados no trabalho.

Além disso, a SER apresentou efeito fungicida em todas as cepas testadas, dado não encontrado em outros estudos antes para cepas de *Candida* spp., o que oferece vantagem por estar relacionado ao sucesso terapêutico precoce, além de reduzir a probabilidade de infecções persistentes ou recorrentes (KUMAR et al., 2018), aspecto importante para o tratamento principalmente na terapia de pacientes imunocomprometidos/imunossuprimidos. Paul, Mortimer & Mitchell (2016) também demonstraram que a SER age como fungicida em cepas de *Coccidioides immitis*, dado que revela uma possível semelhança no modo de ação entre diferentes gêneros de fungos, porém mais estudos devem ser realizados para elucidar tais mecanismos e obter resultados conclusivos.

Sobre a associação da SER com FLC, ITC e AMB em cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC, não há dados disponíveis na literatura. Os ensaios *in vitro* mostraram que o tipo de interação varia de acordo com o antifúngico associado. SER com ITC foi a combinação mais promissora, apresentando interações aditivas em 37,5% das cepas testadas, além de 25% sinérgicas. Esses resultados demonstram que há um ganho considerável no efeito anticandida com a associação de SER e ITC, reduzindo as concentrações efetivas contra o microrganismo, conseqüentemente diminuindo a possibilidade de efeitos tóxicos, e melhorando a terapia do paciente, reduzindo assim a mortalidade. Cong et al. (2016) demonstraram interação sinérgica da SER com ITC em cerca de 43% (9) das cepas testadas e indiferentes em 57% (12) frente a *Trichosporon asahii*, sem que houvesse interações do tipo antagônicas, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho, podendo ocorrer devido às drogas agirem em sítios semelhantes, em que as duas em conjunto contribuem para o ganho de efeito e, conseqüentemente, redução das CIMs.

Quando associada a FLC e AMB, não foi observada redução das concentrações inibitórias e interações antagônicas, exceto para uma cepa quando associada SER e FLC, o que significa que o uso concomitante dessas drogas não prejudica o efeito anticandida, sendo considerado um resultado positivo. De acordo com Cong et al. (2016), a SER havia demonstrado interações farmacológicas do tipo sinérgicas com AMB e FLC em *T. asahii* em cerca de 90% e 62% das cepas testadas, respectivamente. Essas diferenças sugerem que, quando combinadas, os fármacos apresentam interação possivelmente em sítios de ligação semelhantes ou iguais, aumentando o efeito de cada droga e reduzindo as CIMs. No entanto, o

alvo de ação pode ser diferente entre os gêneros fúngicos, o que explicaria o não sinergismo quando as cepas de *Candida* spp. foram expostas aos agentes combinados.

O mecanismo de ação da SER em *Candida* spp. ainda não foi completamente elucidado. Os testes de citometria de fluxo mostraram uma ação concentração-dependente e, juntamente com os ensaios *in silico*, revelou que a SER causa danos à membrana e parede ao se ligar a importantes enzimas e inibir a biossíntese dessas estruturas, provavelmente levando à apoptose celular, identificada a partir da externalização da fosfatidilserina, consequentemente reduzindo a densidade celular (causando morte celular).

Conforme demonstrado pelo docking molecular, a energia de afinidade foi menor para os alvos relacionados à membrana e parede celular em relação aos demais, portanto, é possível que sejam os sítios primários e essenciais para a atividade da SER. Gowri et al. (2020) também relacionaram o efeito anticandida da SER a danos na membrana celular para cepas de *C. auris*, o qual levava ao aumento da permeabilidade da membrana e extravazamento de DNA. Além disso, as ligações nas mesmas regiões identificadas entre o CYP51 com VT1 e SER indicaram que estas substâncias possuem ação semelhante, o que sustenta a hipótese de que este seja o principal sítio de ação da SER.

Após esses eventos, a entrada da SER na célula torna-se mais fácil devido ao aumento da permeabilidade das estruturas externas. Assim, o fármaco pode se ligar a outros sítios intracelulares, como as mitocôndrias, e causar lesões às células, tornando a morte celular multifatorial. A despolarização mitocondrial está, em muitos casos, associada ao aumento da formação de EROs (TIAN et al., 2012), e sua liberação para o citoplasma da célula. As EROs são importantes para a regulação da apoptose celular (SENA; CHANDEL, 2012), mas quando presentes em maiores concentrações podem ser precursoras do desequilíbrio celular, causando danos no DNA e na membrana e levando à apoptose celular (CHO; LEE, 2011).

Danos ao DNA só foram detectados quando o ensaio do cometa alcalino foi modificado com a adição de FPG, o qual identificou que a exposição ao SER leva à oxidação das bases purinas do microrganismo. Essa atividade também pode estar associada à presença de EROs, que é descrita na literatura como um importante fator que pode levar à genotoxicidade (CHO; LEE, 2011). No entanto, esta atividade pode não ser relevante para o mecanismo antifúngico da SER sobre cepas de *Candida* spp., já que o cometa alcalino padrão não detectou nenhum dano, ocorrendo provavelmente porque o microrganismo havia reparado

o dano causado pela droga, semelhante ao descrito por Cavalcanti et al. (2020b) para o etomidato em células de linfócitos.

Além disso, foi observado que os produtos do metabolismo da SER, gerados após exposição à fração S9, também apresentaram genotoxicidade nas cepas de *Candida* spp. testadas, revelando a possibilidade de ação anticandida dos subprodutos originados após o metabolismo hepático do fármaco, contribuindo para seu efeito antifúngico, porém, para a confirmação dessa hipótese, mais estudos precisam ser realizados a fim de identificar as moléculas geradas e seus efeitos citotóxicos em células tanto fúngicas quanto de mamíferos.

Assim, nota-se que a SER é um fármaco promissor para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., agindo provavelmente através da despolarização mitocondrial transmembrana e, conseqüentemente, induzindo o aumento dos níveis de EROs intracelulares, causando danos oxidativos à membrana e levando à apoptose e morte celular. Costa Silva et al. (2017) descreveram mecanismo de ação semelhante para a SER em cepa de *C. albicans*, sem a avaliação da indução de EROs. Além disso, corroborando com esses estudos, Gowri et al. (2020) identificaram que a SER exibe danos na membrana celular em cepa de *C. auris*, o que foi relacionado ao aumento da permeabilidade da membrana, evidenciado pelo vazamento de DNA.

A respeito de mecanismo de resistência fúngica, a produção de biofilme é um importante mecanismo de virulência associado às infecções por *Candida* spp., conferindo maior adesão a diversos sítios bióticos e abióticos, além de torná-los mais resistentes a muitas terapias antifúngicas disponíveis, como os azólicos e polienos (RODRIGUES; GOMES; RODRIGUES, 2020; SARDI et al., 2013). Portanto, o desenvolvimento de novas drogas que apresentem atividade também em biofilme desse fungo é um importante alvo de pesquisa.

Os dados encontrados no presente estudo mostraram que a SER tem efeito inibitório frente aos biofilmes já formados em todas as cepas testadas, sendo sua maior concentração observada de até 64 µg/mL. Foi observado maior redução da viabilidade do biofilme para as cepas *C. glabrata* e *C. tropicalis* em menores concentrações (16 µg/mL) inibiu mais de 80% da viabilidade celular, o que pode estar associado à maior sensibilidade de seu biofilme à SER.

O efeito da SER em biofilme maturado de *Candida* spp. também foi demonstrado Oliveira et al. (2018) em concentrações de 240 µg/mL, superiores às observadas nos resultados aqui apresentados, inibindo mais de 80% da viabilidade do biofilme não apenas para *C. glabrata* e *C. tropicalis*, mas também para *C. albicans*. Apesar disso, ambos os

estudos confirmam que a atividade da sertralina em biofilme ocorre em baixas concentrações, reduzindo em quase 100% a viabilidade dessa estrutura.

Considerando o atual destaque das infecções causadas por *C. auris* devido à sua elevada CIM em relação às outras cepas, multirresistência e altas taxas de mortalidade (ČERNÁKOVÁ et al., 2019), além de maior resistência associada ao biofilme do que as demais espécies (KEAN et al., 2018), a inibição de cerca de 80% da viabilidade do seu biofilme na concentração de 32 µg/mL torna a SER um fármaco promissor, atuando em baixas concentrações mesmo quando esta estrutura está totalmente amadurecida, e até mesmo em biofilmes descritos como mais resistentes. Um trabalho publicado por Gowri et al. (2020) corroborou com nossos resultados, mostrando a mesma redução em concentração de 20 µg/mL.

O efeito preventivo antibiofilme também é um aspecto importante que deve estar presente nos fármacos, principalmente para seu uso em tratamentos profiláticos, pois deve ser capaz de evitar que o microrganismo se instale no paciente ou material médico hospitalar e/ou seja capaz de maturar seu biofilme. O presente estudo mostrou que a SER atua não apenas sobre biofilmes maduros, mas também impedindo o seu desenvolvimento desde o início em concentrações inferiores às encontradas para os pré-formados em todas as cepas de *Candida* spp. testadas, executando seu efeito como dose-dependente, mas não como tempo-dependente, pois não houve diferença relevante entre as inibições com o aumento do tempo de exposição ao fármaco.

A capacidade da SER de inibir a formação de biofilme em concentrações subinibitórias desde os estágios iniciais de maturação (6 h) nas cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* é um achado importante. Ainda, destaca-se que a SER reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ), comparado com o controle positivo, a formação de biofilme de *C. auris* em concentração referente à CIM/2 a partir de 12 h de exposição, o que revela que mesmo em espécies com maior virulência associada ao biofilme, o fármaco é capaz de atuar em concentrações mais baixas do que aquelas encontradas como efetivas em células planctônicas.

A partir do ensaio *in silico*, observa-se que a atividade preventiva antibiofilme da SER pode estar associada à sua ligação à proteína ALS3 de *Candida* spp., um importante componente microbiano envolvido na adesão (DE BARROS et al., 2020), então o fármaco provavelmente interfere bloqueando a atividade desta proteína, impedindo os estágios iniciais de formação do biofilme. Esse resultado corrobora o que foi encontrado nos testes de formação de biofilme, nos quais o fármaco apresentou inibição a partir do primeiro tempo



analisado (6 h).SER parece ligar-se aos resíduos ALS3 no domínio central, uma sequência de aminoácidos repetida em tandem (OH et al., 2021), por interações não covalentes. Embora essas interações não sejam consideradas muito fortes (ZHANG et al., 2022), elas são importantes para a atividade da SER, uma vez que a energia de afinidade encontrada foi inferior a -6,0 kcal/mol, revelando que a atividade do fármaco nessa proteína pode ser importante para seu efeito inibitório na formação de biofilme.

Apesar disso, numericamente, a atividade da SER demonstra semelhança entre as espécies, uma vez que inibiu significativamente a formação de biofilme ( $p < 0,05$ ) de 4 a 8  $\mu\text{g/mL}$ , comparado ao controle positivo, atingindo seu maior efeito inibitório de mais de 80% da viabilidade celular em 16 a 32  $\mu\text{g/mL}$  para todas as cepas testadas. Essa semelhança pode ser explicada devido ao seu mecanismo antibiofilme não estar relacionado a uma espécie específica, mas a um sítio alvo comum entre elas, embora mais estudos devam ser realizados para avaliar como o fármaco atua nessas estruturas.

Ainda, a partir dos resultados expostos, percebe-se que a SER não possui um espectro de atividade limitado, atuando nas espécies de *Candida* mais clinicamente prevalentes em baixas concentrações, mesmo naquelas descritas como mais resistentes. As alterações dos biofilmes foram evidenciadas como redução de tamanho, extravasamento de material intracelular, presença de irregularidades na estrutura externa do microrganismo (encolhimento celular, que pode estar associado ao rompimento da membrana celular) e o colapso do microrganismo, além de uma redução relevante na sua densidade populacional, principalmente quando o biofilme ainda está no início de sua formação, evidenciando o efeito preventivo da SER.

Não há dados disponíveis relatando a atividade preventiva da SER na formação e maturação de biofilmes de *Candida* spp. Tal aspecto é importante devido sua atividade ser observada em baixas concentrações, significando redução dos riscos de toxicidade ou efeitos colaterais para o uso em terapia profilática, por exemplo, ou até mesmo revestimento de materiais médico hospitalares para impedir que o microrganismo se instale e venha a desenvolver um biofilme, e futuramente uma infecção ao paciente.

Vale ressaltar que os dados obtidos para citotoxicidade em células de mamíferos (linfócitos humanos) demonstraram que o uso da SER é seguro em concentrações acima da maior testada em biofilme (128  $\mu\text{g/mL}$ ), um grande achado quando pensa-se na segurança e proteção ao paciente que utilizaria a SER para a terapia anticandida, pois o risco de manifestar efeitos colaterais ou ineficácia do tratamento por subdosagem seria bastante reduzido,

podendo ser utilizadas em concentrações que seriam efetivas e seguras tanto para ação em células planctônicas quanto em doenças causadas por *Candida* spp. associadas à biofilme.

Apesar da SER apresentar efeito anticandida em concentrações baixas, características farmacocinéticas da substância devem ser levadas em consideração para possíveis aplicações terapêuticas. A concentração plasmática para que a SER exerça seu efeito antidepressivo varia entre 10 – 150 ng/mL (HUDDART et al., 2020), a qual é superior à concentração obtida frente a cepas de *Candida* spp. tanto para as formas planctônicas quanto em biofilme. Como forma de evitar possíveis efeitos a nível de sistema nervoso central, formulações tópicas podem ser alternativas viáveis, bem como a aplicação como protetor em superfícies abióticas, como cateteres, por exemplo.

## 8. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a sertralina é um promissor agente antifúngico, pois possui atividade em cepas de *Candida* spp. tanto na forma planctônica quanto em biofilme já formado e/ou impedindo sua formação, incluindo em cepas descritas como mais resistentes, com efeito relacionado principalmente à dano de membrana e parede celular, para as formas planctônicas, e inibindo substâncias fundamentais nos estágios iniciais de formação do biofilme, agindo em concentrações baixas e não tóxicas, além de poder ser utilizada em associação ao fluconazol, itraconazol ou anfotericina B, respondendo às hipóteses formuladas de maneira satisfatória, e gerando perspectivas de novos estudos para que seja possível sua aplicação como fármaco ativo em formas farmacêuticas ou até mesmo aplicado como protetor em dispositivos médico-hospitalares.

## 9. REFERÊNCIAS

- ACHARYA, N. et al. Multifaceted activities of DNA polymerase  $\eta$ : beyond translesion DNA synthesis. **Current Genetics** Springer Verlag, , 1 jun. 2019.
- ADENIS, A. A. et al. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 10, p. 1150–1159, 1 out. 2018.
- ALANÍS-RÍOS, S. A. et al. Evaluation of the synergistic antifungal activity of micafungin and voriconazole plus sertraline against *Candida auris*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 29 ago. 2022.
- ALONSO-VALLE, H. et al. Candidemia in a tertiary care hospital: Epidemiology and factors influencing mortality. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 254–257, 1 abr. 2003.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. **Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs**. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2004.
- BARBAROSSA, A. et al. **Non-Antibiotic Drug Repositioning as an Alternative Antimicrobial Approach**. **Antibiotics**, MDPI, 1 jun. 2022.
- BATISTA DE ANDRADE NETO, J. et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, 2021.
- BENEDICT, K. et al. Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 11, p. 1791–1797, 17 maio 2019.
- BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. **Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance**. **Antibiotics**, MDPI AG, 1 jun. 2020.
- BONGOMIN, F. et al. **Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision**. **Journal of Fungi**, MDPI AG, 1 dez. 2017.
- BORMAN, A. M.; JOHNSON, E. M. **Name changes for fungi of medical importance, 2018 to 2019**. **Journal of Clinical Microbiology**, American Society for Microbiology, 1 fev. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Tratamento**. Brasília, 2022b. Disponível em: <<https://www.gov.br/aids/pt-br/assuntos/hiv-aids/tratamento>>, acesso em: 02 nov. 2020.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Esquemas Recomendados para o Tratamento da Malária não Complicada no Brasil**. Brasília, 2020. Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/malaria/esquemas-tratamento-malaria\\_15out21\\_internet.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/malaria/esquemas-tratamento-malaria_15out21_internet.pdf)>, acesso em: 02 nov. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Tuberculose**. Brasília, 2022a. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/tuberculose>>, acesso em: 02 nov. 2022.
- BROWN, G. D. et al. **Hidden killers: Human fungal infections**. *Science Translational Medicine*, 19 dez. 2012.
- CAVALCANTI, B. C. et al. Etomidate is devoid of genotoxicity and mutagenicity in human lymphocytes and in the Salmonella typhimurium/microsomal activation test. *Toxicology in Vitro*, v. 68, 1 out. 2020b.
- CAVALCANTI, B. C. et al. Evaluation of Genotoxicity and Mutagenicity of Ketamine on Human Peripheral Blood Leukocytes and in Salmonella typhimurium. *Toxicology in Vitro*, v. 62, 1 fev. 2020a.
- CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019**. Disponível em: <<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>>.
- ČERNÁKOVÁ, L. et al. Novel Therapies for Biofilm-Based Candida spp. Infections. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer, 2019. v. 1214p. 93–123.
- CHANG, Y. L. et al. **New facets of antifungal therapy**. *Virulence*, 2017.
- CHO, J.; LEE, D. G. Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in Candida albicans. *Biochimie*, v. 93, n. 10, p. 1873–1879, out. 2011.
- CIUREA, C. N. et al. **Candida and candidiasis—opportunism versus pathogenicity: A review of the virulence traits**. *Microorganisms*, MDPI AG, 1 jun. 2020.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition M27-A3**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.clsi.org](http://www.clsi.org)>.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts fourth informational supplement M27-S4**. [s.l.: s.n.].
- CLORIDRATO DE SERTRALINA. Dra. Maria Benedita Pereira. Itapevi, SP: Eurofarma Laboratórios S.A., 2017. Disponível em:

<<https://eurofarma.com.br/produtos/bulas/healthcare/bula-sertralina-cloridrato-de.pdf>>, acesso em: 02 nov. 2022.

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, maio 2013.

CONG, L. et al. In Vitro antifungal activity of sertraline and synergistic effects in combination with antifungal drugs against planktonic forms and biofilms of clinical *Trichosporon asahii* Isolates. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, 1 dez. 2016.

CORTEGANI, A.; MISSERI, G.; CHOWDHARY, A. **What's new on emerging resistant Candida species. Intensive Care Medicine**, Springer Verlag, 1 abr. 2019.

CORTÉS, J. C. G. et al. **The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. Biotechnology Advances**, 2019.

COSTA SILVA, R. A. et al. In vitro anti-Candida activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 341–348, 1 jun. 2017.

CSIZMADIA, P. **MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.reprints.net/ecsoc-3.htm](http://www.reprints.net/ecsoc-3.htm)>.

CUÉLLAR-CRUZ, M. et al. Candida species: New insights into biofilm formation. **Future Microbiology**, jun. 2012.

CUTFIELD, J. F.; SULLIVAN, P. A.; CUTFIELD, S. M. Minor structural consequences of alternative CUG codon usage (Ser for Leu) in *Candida albicans* exoglucanase. **Protein Engineering**, v. 13, n. 10, 2000.

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, 2013.

DANTAS, K. C. et al. A single-centre, retrospective study of the incidence of invasive fungal infections during 85 years of autopsy service in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

DE ALBUQUERQUE MARANHÃO, F. C. et al. Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 969–978, 1 out. 2019.

- DE BARROS, P. P. et al. **Candida Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges.** *Mycopathologia*, Springer, 1 jun. 2020.
- DE MEDEIROS, M. A. P. et al. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, 1 ago. 2019.
- DO AMARAL VALENTE SÁ, L. G. et al. Antifungal activity of etomidate against growing biofilms of fluconazole-resistant *Candida* spp. strains, binding to mannoproteins and molecular docking with the ALS3 protein. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 1221–1227, 7 set. 2020.
- EDLIND, T. D.; KATIYAR, S. K. Mutational analysis of flucytosine resistance in *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4733–4738, nov. 2010.
- FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Clinical mycology in Latin America and the Caribbean: A snapshot of diagnostic and therapeutic capabilities. **Mycoses**, 2019.
- FAUSTO, A.; RODRIGUES, M. L.; COELHO, C. **The still underestimated problem of fungal diseases worldwide.** *Frontiers in Microbiology*, Frontiers Media S.A., 2019.
- FAY, V. DA S. et al. A 12-year study of fungal infections in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 36, n. 2, p. 55–60, 1 abr. 2019.
- FISHER, M. C. et al. **Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security.** *Science*, 2018.
- FISHER, N.; MEUNIER, B.; BIAGINI, G. A. The cytochrome bc1 complex as an antipathogenic target. **FEBS Letters**Wiley Blackwell, , 1 set. 2020.
- FRIEDMAN, D. Z. P.; SCHWARTZ, I. S. **Emerging fungal infections: New patients, new patterns, and new pathogens.** *Journal of Fungi*, MDPI AG, 1 set. 2019.
- GE, Y. et al. Structural insights into telomere protection and homeostasis regulation by yeast CST complex. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 27, n. 8, p. 752–762, 1 ago. 2020.
- GHAZI, S. et al. **The epidemiology of *Candida* species in the Middle East and North Africa.** *Journal de Mycologie Medicale*, Elsevier Masson SAS, 1 set. 2019.
- GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. ESTIVALET. **Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia Phisiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia.** [s.l: s.n.].

- GLEASON, J. E. et al. *Candida albicans* SOD5 represents the prototype of an unprecedented class of Cu-only superoxide dismutases required for pathogen defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 16, 2014.
- GOVENDER, N. P. et al. Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: Results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 1994–2004, 1 jul. 2016.
- GOWRI, M. et al. Sertraline as a promising antifungal agent: inhibition of growth and biofilm of *Candida auris* with special focus on the mechanism of action in vitro. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 426–437, 1 fev. 2020.
- HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5–6, 1996.
- HANWELL, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 8, 2012.
- HARBOTTLE, H. et al. Genetics of antimicrobial resistance. **Animal Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 111–124, 1 dez. 2006.
- HARGROVE, T. Y. et al. Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 $\alpha$ -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 16, 2017.
- HERNANDEZ, J. J. et al. **Giving drugs a second chance: Overcoming regulatory and financial hurdles in repurposing approved drugs as cancer therapeutics.** **Frontiers in Oncology**, Frontiers Media S.A., 14 nov. 2017.
- HOUŠŤ, J.; SPÍŽEK, J.; HAVLÍČEK, V. **Antifungal drugs.** **Metabolites**, MDPI AG, 1 mar. 2020.
- HUANG, C. Y. et al. The Ca-loop in thymidylate kinase is critical for growth and contributes to pyrimidine drug sensitivity of *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 27, p. 10686–10697, 5 jul. 2019.
- HUDDART, R. et al. PharmGKB summary: Sertraline pathway, pharmacokinetics. **Pharmacogenetics and Genomics**, p. 26–33, 2020.
- HUEY, R.; MORRIS, G. M.; FORLI, S. **Using AutoDock 4 and Vina with AutoDockTools: A Tutorial.** [s.l.: s.n.].
- JANBON, G. et al. **Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches.** **Microbes and Infection**, Elsevier Masson SAS, 1 jun. 2019.



- JORGE, P. et al. Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* single- and double-species biofilms. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, 2017.
- KEAN, R. et al. The comparative efficacy of antiseptics against *Candida auris* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 5, 2018.
- KIOSHIMA, E. S. et al. Selection of potential anti-adhesion drugs by in silico approaches targeted to ALS3 from *Candida albicans*. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 12, p. 1391–1401, 1 dez. 2019.
- KLIRONOMOS, J. The Actions of Fungi in Ecosystems. **BioScience**, v. 57, n. 11, p. 981–982, 1 dez. 2007.
- KÖHLER, J. R. et al. Fungi that Infect Humans. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, 19 maio 2017.
- KUMAR, A. et al. Fungicidal versus fungistatic therapy of invasive *Candida* infection in non-neutropenic adults: a meta-analysis. **Mycology**, v. 9, n. 2, p. 116–128, 3 abr. 2018.
- LANGE, C. et al. Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc1 complex structure. **EMBO Journal**, v. 20, n. 23, 2001.
- LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología** Asociación Espanola de Micología, , 2009.
- LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. **Amphotericin B: side effects and toxicity**. **Revista Iberoamericana de Micología**, Asociación Espanola de Micología, 2009.
- LASS-FLÖRL, C. et al. **Antifungal Activity against Candida Species of the Selective Serotonin-Reuptake Inhibitor, Sertraline**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/33/12/e135/366606>>.
- LEE, Y. et al. **Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in Candida albicans and beyond**. **Chemical Reviews**, American Chemical Society, 24 mar. 2021.
- LIU, N. et al. Emerging New Targets for the Treatment of Resistant Fungal Infections. **Journal of Medicinal Chemistry** American Chemical Society, , 12 jul. 2018.
- LOCKHART, S. R.; GUARNER, J. **Emerging and reemerging fungal infections**. **Seminars in Diagnostic Pathology**, W.B. Saunders, 1 maio 2019.
- LÜCKING, R. et al. Unambiguous identification of fungi: Where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? **IMA Fungus**, v. 11, n. 1, 10 jul. 2020.

- MARINHO, E. M. et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, 2020.
- MILOSHEV, G.; MIHAYLOV, I.; ANACHKOVA, B. **Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells** *Mutation Research*. [s.l: s.n.].
- MOREHEAD, M. S.; SCARBROUGH, C. **Emergence of Global Antibiotic Resistance. Primary Care - Clinics in Office Practice**, W.B. Saunders, 1 set. 2018.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Medical microbiology*. 8th edition ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2016.
- 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, 2014.
- NEWBOUND, M.; MCCARTHY, M. A.; LEBEL, T. **Fungi and the urban environment: A review. Landscape and Urban Planning**, Elsevier, 15 jun. 2010.
- NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. **Candida albicans Biofilms and Human Disease. Annual Review of Microbiology**, Annual Reviews Inc., 15 out. 2015.
- OH, S. H. et al. Pursuing Advances in DNA Sequencing Technology to Solve a Complex Genomic Jigsaw Puzzle: The Agglutinin-Like Sequence (ALS) Genes of *Candida tropicalis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 20 jan. 2021.
- OLEGA, T.; ARTHUR, O. Software News and Update 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, 2010.
- OLIVEIRA, A. S. et al. Anti-Candida activity of antidepressants sertraline and fluoxetine: effect upon pre-formed biofilms. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 207, n. 3–4, p. 195–200, 1 ago. 2018.
- 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**, Oxford University Press, 4 nov. 2015.
- PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, 11 maio 2018.
- PARVATHANENI, V. et al. **Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. Drug Discovery Today**, Elsevier Ltd, 1 out. 2019.

- PATRICK, W. M. et al. Carbohydrate binding sites in *Candida albicans* exo- $\beta$ -1,3-glucanase and the role of the Phe-Phe “clamp” at the active site entrance. **FEBS Journal**, v. 277, n. 21, p. 4549–4561, nov. 2010.
- PAUL, S.; MORTIMER, R. B.; MITCHELL, M. Sertraline demonstrates fungicidal activity in vitro for *Coccidioides immitis*. **Mycology**, v. 7, n. 3, p. 99–101, 2 jul. 2016.
- PAUL, S.; MORTIMER, R. B.; MITCHELL, M. Sertraline demonstrates fungicidal activity in vitro for *Coccidioides immitis*. **Mycology**, v. 7, n. 3, p. 99–101, 2 jul. 2016.
- PEREIRA DE MELLO, T. et al. **PERSPECTIVE IN MEDICINAL CHEMISTRY Drug Repurposing Strategy against Fungal Biofilms** *Perspective in Medicinal Chemistry Current Topics in Medicinal Chemistry*. [s.l: s.n.].
- PEROTTO, S. et al. **Interactions of fungi with other organisms**. *Plant Biosystems*, 2013.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, 2004.
- PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1 SUPPL., jan. 2012.
- PFALLER, M. A. et al. Twenty years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* species from 1997-2016. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, p. S79–S94, 15 mar. 2019.
- 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.
- PINKERTON, D. M. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of synthetically derived tambjamines C and E-J, BE-18591, and a related alkaloid from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, n. 5, 2010.
- POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* survival strategies. **Advances in Applied Microbiology**, v. 91, p. 139–235, 2015.
- PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. **Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide**. *Clinical Microbiology and Infection*, Elsevier B.V., 1 jul. 2019.
- PUSHPAKOM, S. et al. **Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations**. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018.
- RHODES, J.; FISHER, M. C. **Global epidemiology of emerging *Candida auris***. *Current Opinion in Microbiology*, Elsevier Ltd, 1 dez. 2019.

- RODRIGO, M. D. et al. Sertralina. Eficacia y tolerabilidad como tratamiento antidepresivo coadyuvante en pacientes con dolor crónico. **Rev. Soc. Esp. del Dolor**, v. 11, p. 87–93, mar. 2004.
- RODRIGUES, M. E.; GOMES, F.; RODRIGUES, C. F. **Candida spp./bacteria mixed biofilms**. **Journal of Fungi**, MDPI AG, 1 mar. 2020.
- ROSAM, K.; MONK, B. C.; LACKNER, M. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase ligand-binding pocket-mediated acquired and intrinsic azole resistance in fungal pathogens. **Journal of Fungi** MDPI AG, , 1 jan. 2021.
- ROY, R. et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence** Taylor and Francis Inc., , 1 jan. 2018.
- SANTANA, M. M. P. DE et al. Epidemiological profile of patients hospitalized with candiduria in the Central-Western region of Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 36, n. 4, p. 175–180, 1 out. 2019.
- SARDI, J. C. O. et al. Candida species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, 2013.
- SARDI, J. C. O. et al. **Candida species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options**. **Journal of Medical Microbiology**, 2013.
- SCHATZMAN, S. S. et al. Copper-only superoxide dismutase enzymes and iron starvation stress in Candida fungal pathogens. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 2, p. 570–583, 10 jan. 2020.
- SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Molecular Cell** Cell Press, , 26 out. 2012.
- SIDDIQUI, Z. N. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, 2013.
- SINGH, S. B. et al. Tricyclic 1,5-naphthyridinone oxabicyclooctane-linked novel bacterial topoisomerase inhibitors as broad-spectrum antibacterial agents-SAR of left-hand-side moiety (Part-2). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 9, 2015.
- SINHA, K.; RULE, G. S. The Structure of Thymidylate Kinase from Candida albicans Reveals a Unique Structural Element. **Biochemistry**, v. 56, n. 33, p. 4360–4370, 22 ago. 2017.

- TIAN, J. et al. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 17 jan. 2012.
- TRINCAO, J. et al. Structure of the Catalytic Core of *S. cerevisiae* DNA Polymerase  $\eta$ . **Molecular Cell**, v. 8, n. 2, 2001.
- 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**, p. NA-NA, 2009.
- TSCHERNER, M.; SCHWARZMÜLLER, T.; KUCHLER, K. Pathogenesis and Antifungal Drug Resistance of the Human Fungal Pathogen *Candida glabrata*. **Pharmaceuticals**, v. 4, n. 1, p. 169–186, jan. 2011.
- UDDIN, T. M. et al. **Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects**. **Journal of Infection and Public Health**, Elsevier Ltd, 1 dez. 2021.
- VAN DEN BERG, B. et al. Structural basis for Mep2 ammonium transceptor activation by phosphorylation. **Nature Communications**, v. 7, 2016.
- VERWEIJ, P. E. et al. **Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use?****The Lancet Infectious Diseases**, Lancet Publishing Group, 2021.
- WHALEY, S. G. et al. **Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* Species**. **Frontiers in Microbiology**, Frontiers Media S.A., 12 jan. 2017.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International organizations unite on critical recommendations to combat drug-resistant infections and prevent staggering number of deaths each year**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>>. Acesso em: 23 nov. 2022.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV-Infected Adults, Adolescents and Children Supplement to the 2016 Consolidated Guidelines on the use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection**. [s.l: s.n.].
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. , 2022.

- XIE, Y.; LIU, X.; ZHOU, P. In vitro antifungal effects of berberine against candida spp. In planktonic and biofilm conditions. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 87–101, 2020.
- YE, N. et al. Systematic Characterization of Epidemiology, Antifungal Susceptibility, Risk Factors and Outcomes of Candidaemia: A Six-Year Chinese Study. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p. 4887–4898, 2022.
- YU, E. Y. et al. Analyses of Candida Cdc13 Orthologues Revealed a Novel OB Fold Dimer Arrangement, Dimerization-Assisted DNA Binding, and Substantial Structural Differences between Cdc13 and RPA70. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 1, 2012.
- YUSUF, D. et al. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, 2008.
- ZHANG, T. et al. Pi-Pi Stacking Complex Induces Three-Component Coupling Reactions to Synthesize Functionalized Amines. **Angewandte Chemie International Edition**, 13 out. 2022.
- ZHENG, P. et al. A Cu-only superoxide dismutase from stripe rust fungi functions as a virulence factor deployed for counter defense against host-derived oxidative stress. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 12, p. 5309–5326, 1 dez. 2020.
- ZHOU, L. H. et al. Risk-based estimate of human fungal disease burden, china. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 9, p. 2137–2147, 1 set. 2020.
- ZNOSKO, B. M. et al. Structural features and thermodynamics of the J4/5 loop from the Candida albicans and Candida dubliniensis group I introns. **Biochemistry**, v. 43, n. 50, 2004.