



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

Departamento de Micologia

Pós-graduação em Biologia de Fungos

FABIOLA MARIA MARQUES DO COUTO

**FUNGEMIA E AÇÃO ANTIFÚNGICA E ANTITUMORAL DE ISOFLAVONAS DA
SOJA E HIDROXIPIRIDONAS**

Recife

2016

FABIOLA MARIA MARQUES DO COUTO

**FUNGEMIA E AÇÃO ANTIFÚNGICA E ANTITUMORAL DE ISOFLAVONAS DA
SOJA E HIDROXIPIRIDONAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Fungos da Universidade Federal de
Pernambuco (UFPE), como parte dos requisitos para
obtenção do título de doutor. Área de Concentração:
Micologia Aplicada
Orientação: Dra. Rejane Pereira Neves
Co-orientação: Dra. Silene Carneiro do Nascimento

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Couto, Fabiola Maria Marques do

Fungemia e ação antifúngica e antitumoral de isoflavonas da soja e hidroxipiridonas/ Fabiola Maria Marques do Couto– Recife: O Autor, 2016.

104 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Rejane Pereira Neves

Coorientadora: Silene Carneiro do Nascimento

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2016.

Inclui referência, apêndices e anexos

1. Micose 2. Infecção hospitalar 3. Câncer I. Neves, Rejane Pereira (orientadora) II. Nascimento, Silene Carneiro do (coorientadora) III. Título

614.559

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-168

FABÍOLA MARIA MARQUES DO COUTO

**FUNGEMIA E AÇÃO ANTIFÚNGICA E ANTITUMORAL DE ISOFLAVONAS DA
SOJA E HIDROXIPIRIDONAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Fungos da Universidade Federal de
Pernambuco (UFPE), como parte dos requisitos para
obtenção do título de doutor. Área de Concentração:
Micologia Aplicada

Orientação: Dra. Rejane Pereira Neves

Co-orientação: Dra. Silene Carneiro do Nascimento

Aprovada em 25/02/2013.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Rejane Pereira Neves (Orientadora) / UFPE

Dr^a Oliane Maria Correia Magalhães / UFPE

Dr^a Danielle Patricia Cerqueira Macêdo / UFPE

Dr Nicodemos Teles de Pontes Filho / UFPE

Dr^a Gláucia Manoella de Souza Lima / UFPE

A meus pais **Emerson** e **Alzinete** e esposo **Rodrigo**, pelo incentivo e segurança que me transmitiram, sempre acreditando em minha capacidade, dedico. **Amo vocês!**

"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou as que desistem deles."

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pela certeza de sua presença sempre ao meu lado.

Aos meus familiares: **pais, irmão, cunhada, sobrinho, avós, tios, primos, sogros e cunhados** pelo amor, carinho, apoio, confiança e incentivo para realização deste trabalho. À minha avó **Alzira** (*in memorian*) pelo sorriso oferecido para cada passo de minhas conquistas.

A um anjo que Deus colocou em minha vida para ser meu companheiro, cúmplice e amigo, me dando forças e incentivo e me ajudando sempre em tudo, meu esposo **Rodrigo Cahú**.

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial à minha orientadora, professora **Rejane Pereira Neves**, que tanto contribuiu para meu crescimento profissional e acadêmico, pela dedicação, amizade e companheirismo nestes 10 anos de micologia.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos (**PPGBF**) pela oportunidade de realização dos cursos de mestrado e doutorado.

À competente **equipe de professores da PPGBF** pela valiosa aprendizagem, ampliação e aprimoramento de meus conhecimentos, em especial prof.^{as} **Elaine Malosso** e **Uided Maaze** quem tanto admiro.

À prof.^a **Silene Carneiro do Nascimento** pela co-orientação, contribuição, disponibilidade e empenho.

À **Propesq/Capes** pelo apoio financeiro de fundamental importância para realização desta pesquisa.

À Coleção de Culturas - **Micoteca URM** pelos isolados concedidos. À **Eliane, Bruno, Adriana** e **Jadson** pela colaboração.

Às pessoas que fazem parte do laboratório de Antibióticos, especialmente prof.^a **Teresinha, André Barros, Jailson, Lais, Iane, Maria, Eduardo, Jaciana, Anne, Fernanda** e **Larissa** pela recepção, amizade e ajuda nas etapas deste trabalho.

Aos amigos e profs. **Lusinete Aciolle** (*in memorian*), **Oliane Magalhães, Armando Marsden**, e **Cristina Motta** pelo incentivo, paciência, cooperação e profissionalismo, exemplos a seguir.

Aos queridos “ICs”, **Silvio, Felipe e Isabela** pelo empenho, dedicação e colaboração, pessoas fundamentais nas etapas do projeto.

Ao médico do Setor de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Dr. **Evônio**, pela colaboração com o diagnóstico clínico no encaminhamento dos pacientes.

À equipe técnica do Departamento de **Patologia** pela cooperação na confecção das lâminas do histopatológico e ao prof. **Jemerson** pela avaliação destas.

Ao prof. **George Jimenez** da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela disponibilidade, receptividade e ajuda ao ceder alguns animais.

À grande amiga-irmã e companheira **Elvislene Leite**, pela sintonia e companheirismo desde o primeiro contato.

Aos amigos do curso de doutorado pelo carinho, companheirismo e empenho nos quatro anos de curso: **Allyne, Bianca, Eliene, Danielle, Indra, Roberta, Marília e Vilma**.

Aos amigos que fazem ou fizeram parte do Departamento de Micologia pela amizade, carinho e momentos de descontração, em especial **Daniele Macêdo, Bruno Severo, Reginaldo, Gustavo, Bruno Jeagger, André Ferraz, Bruno Walter, Nadja Lopes, Michele Silva, Bruno Goto, Vanessa, Suani, Carol, Patrícia, Michele Chianca, Ildinay, Heloiza, Nadyr, Evellyn, Sandra e Michelângelo**. Já tenho muitas saudades de todos. Estes fazem parte de minha história acadêmica.

Aos funcionários **Rubem, Lourdes, Giovana, Karol, Jôse** e Sr. **Wilson** pela ajuda e amizade.

Às minhas grandes amigas **Mariana Mota e Maria Carolina** pelo companheirismo nos fins de semana, que tornaram mais prazerosos os momentos de experimentos.

A todos que contribuíram de uma forma ou de outra, para a realização deste sonho.

RESUMO

Fungemia, presença de fungos no sangue, tem incidência crescente nas últimas décadas, acarretando sério problema em pacientes hospitalizados, sobretudo com câncer. Novos compostos antifúngicos e antitumorais têm sido propostos para tratamento destas doenças. Assim, o propósito desta pesquisa foi diagnosticar e traçar dados epidemiológicos de fungemia, assim como avaliar a ação antifúngica e antitumoral de isoflavonas da soja (daidzeína e genisteína) e hidroxipiridonas (ciclopirox olamina e octopirox olamina). Foram analisadas amostras de sangue de pacientes internados em hospital universitário de Recife-PE, Brasil e realizado antifungigrama dos agentes etiológicos com fluconazol, anfotericina B, isoflavonas da soja e hidroxipiridonas. Ainda, as isoflavonas e hidroxipiridonas foram avaliadas quanto à citotoxicidade às células neoplásicas (pulmão, laringe e cólon) e a ação da octopirox olamina contra candidemia e tumor sarcoma 180 em análises experimentais. Oito casos de fungemia foram diagnosticados tendo *Candida*, *Histoplasma*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* e um fungo demáceo como agentes etiológicos. A maioria dos pacientes pertencia a idade adulta, sexo masculino e eram portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida. Nenhuma das isoflavonas apresentou atividade antifúngica, contudo, a genisteína foi efetiva para câncer de laringe. Em contrapartida, as hidroxipiridonas, sobretudo, octopirox olamina, apresentaram já em baixas concentrações, ação antifúngica e antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Para tratamento de neoplasias associadas à candidemia, octopirox olamina pode ser uma alternativa promissora.

Palavras-chave: Micoses invasivas. Substancias bioativas. Câncer.

ABSTRACT

Fungemia, presence of fungi in the blood, has a rising incidence in recent decades, causing serious problem in hospitalized patients, especially cancer. New antifungal and antitumor compounds have been proposed for treating these diseases. Thus, the purpose of this research was to diagnose and trace epidemiological data fungemia as well as evaluate the antifungal and antitumour of soy isoflavones (daidzein and genistein) and hydroxypyridones (ciclopirox olamine and octopirox olamine). We analyzed blood samples from patients admitted to a university hospital in Recife-PE, Brazil and performed *in vitro* the antifungal susceptibility of the etiologic agent fluconazole, amphotericin B, and soy isoflavones hydroxypyridones. Still, isoflavones and hydroxypyridones were evaluated for cytotoxicity to tumor cells (lung, larynx and colon) and the action of candidemia and octopirox olamine against sarcoma 180 tumor in experimental analyzes. Were diagnosed eight cases of fungemia with *Candida*, *Histoplasma*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* and a dematiaceous fungus as etiological agents. Most patients belonged to adulthood, males and were carriers of acquired immunodeficiency syndrome. None of isoflavones showed antifungal activity, however, genistein was effective for larynx cancer. In contrast, hydroxypyridones especially octopirox olamine in already at low concentrations has antifungal and antitumor *in vitro* and *in vivo*. For treatment of malignancies associated with candidemia, octopirox olamine may be a promising alternative.

Keywords: Invasive mycoses. Bioactive substances. Cancer.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	12
1.1.1 Objetivo Geral	12
1.1.2 Objetivos Específicos	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 FUNGEMIA	14
2.1.1 Fatores predisponentes para fungemia	18
2.1.2 Fungemia experimental	19
2.2 FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS PARA FUNGEMIA	20
2.2.1 Azólicos	20
2.2.2 Poliênicos	21
2.3 RESISTÊNCIA FÚNGICA	22
2.4 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA	24
2.5 CÂNCER	26
2.5.1 Câncer de pulmão	28
2.5.2 Câncer de laringe	29
2.5.3 Câncer de cólon	31
2.6 NOVOS COMPOSTOS COM AÇÃO ANTIFÚNGICA E ANTITUMORAL	32
2.6.1 Isoflavonas da Soja	33
2.6.1.1 Isoflavonas da soja e ação antifúngica	34
2.6.1.2 Ação de isoflavonas da soja sobre o câncer	35
2.6.2 Hidroxipiridonas	38
2.6.2.1 Mecanismos de ação das hidroxipiridonas	38
2.6.2.2 Ciclopirox olamina e ação antifúngica	40
2.6.2.3 Ação da ciclopirox olamina sobre o câncer	40

2.6.2.4 Octopirox olamina e ação antifúngica	42
2.6.2.5 Ação da octopirox olamina sobre o câncer	44
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	45
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE	45
3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	45
3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS	45
3.4 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS <i>IN VITRO</i>	45
3.5 ATIVIDADES ANTIFÚNGICAS E ANTITUMORAIS <i>IN VIVO</i>	46
3.6 INFECÇÃO E TRATAMENTO EXPERIMENTAL DA CANDIDEMIA	46
3.7 INFECÇÃO E TRATAMENTO EXPERIMENTAL TUMORAL	47
3.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS	48
4 RESULTADOS	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES – ARTIGOS EM FASE DE SUBMISSÃO	68
Apêndice A – Octopirox olamina: Uma alternativa para...	68
Apêndice B – Avaliação <i>in vitro</i> das atividades antifúngica...	76
Apêndice C – Hidroxipiridonas: fármacos promissores...	86
Apêndice D – Efeito antitumoral e antifúngico de...	93
ANEXOS – ARTIGOS PUBLICADOS E OUTRO DOCS	101
Anexo A - Fungemia em hospital universitário...	101
Anexo B - Atividade Antifúngica da piroctone olamina...	102
Anexo C – Folha de aprovação do Comitê de ética...	103
Anexo D - Folha de aprovação do Comitê de ética...	104

1 INTRODUÇÃO

Infecções sanguíneas por fungos, também conhecidas como fungemias podem comprometer vísceras como resultado de disseminação hematogênica pelo organismo, complicações geralmente documentadas em pacientes críticos, portadores de doenças degenerativas e/ou neoplásicas. Dentre tais infecções destaca-se a candidemia, à qual se refere à presença de leveduras do gênero *Candida* na corrente sanguínea e representa altas taxas de mortalidade em pacientes imunossuprimidos, sobretudo em portadores de câncer (CAGGIANO et al, 2008; JEMAL et al, 2009; PEMÁN et al, 2012).

Câncer é o termo empregado à multiplicação anormal de células atípicas que sofreram mutações invadindo progressivamente tecidos adjacentes, podendo disseminar-se para outras regiões do corpo, processo denominado metástase (JEMAL et al, 2009).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 são válidas também para 2013 e apontam para a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, reforçando a magnitude do problema no país. Os tipos mais incidentes, após o câncer de pele são os de próstata, pulmão, cólon, reto, estômago e laringe para o sexo masculino e os de mama, colo do útero, cólon e glândula tireóide para o sexo feminino (INCA, 2011).

Tratamentos como radioterapia e quimioterapia instituídos para o câncer, causam alteração no sistema imunológico favorecendo ao desenvolvimento de diversas infecções oportunistas, dentre elas as de origem fúngica. Estas têm se apresentado de caráter grave devido a vários fatores, sobretudo ao aumento da resistência dos micro-organismos aos antifúngicos e à elevada ação tóxica destes fármacos (LIN; HEITMAN, 2006; SAPOLNIK, 2003).

O desenvolvimento da padronização de testes de susceptibilidade a antifúngicos tem sido foco de intensas pesquisas nos últimos 15 anos e atualmente estão sendo disponibilizados métodos de referência (antifungigrama) para leveduras e fungos filamentosos, tornando os laboratórios aptos a prever o sucesso da terapêutica instituída. Para o acompanhamento das diferentes manifestações clínicas de micose, destacando-se as micoses sistêmicas, vários agentes antifúngicos têm sido formulados e avaliados, nos últimos anos (CLSI, 2008; PFALLER et al, 2002; REX et al, 2001; VANDEPUTTE et al, 2012).

Novos compostos antifúngicos e antitumorais têm sido propostos como alternativas para minimizar os efeitos indesejáveis causados pelos fármacos convencionais. Para este fim, pesquisas são desenvolvidas com substâncias popularmente conhecidas por exibir

propriedades terapêuticas, como os flavonóides de frutas, vegetais e principalmente os de soja (PARK et al, 2001).

Substâncias flavonóides como isoflavonas, presentes na soja e em derivados, podem ser encontradas de diversas formas, podendo ser de fundamental importância na prevenção do câncer e doenças cardiovasculares, devido às propriedades antioxidantes (AGUIAR; PARK 2004).

Assim como fitoterápicos, fármacos ainda poucos estudados, a exemplo das hidroxipiridonas podem também apresentar vantagens terapêuticas nas micoses sistêmicas. Pesquisas relacionadas visam grandes avanços para comunidade científica e aplicação médica (Subissi et al, 2010). Nesse contexto, as hidroxipiridonas formam uma classe de antimicóticos na qual os principais representantes são ciclopirox, octopirox e rilopirox. A baixa toxicidade destes fármacos em testes experimentais vislumbra uma possível aplicação tópica no homem, porém o mecanismo de ação ainda é pouco conhecido (NIEWERTH et al, 2003).

O insucesso na terapêutica antifúngica e anticâncer, algumas vezes com desfecho fatal, geram a necessidade de pesquisas que contribuam na busca de um tratamento alternativo de baixa toxicidade, resultando em menor permanência hospitalar e melhora significativa do paciente.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Diagnosticar casos de fungemia em pacientes imunossuprimidos internados no Hospital das Clínicas, Recife-Pernambuco, assim como, avaliar a ação antifúngica e antitumoral de isoflavonas da soja, hidroxipiridonas e fármacos convencionais através de testes *in vitro* e *in vivo*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar espécies de *Candida* isoladas de sangue.
- ✓ Realizar testes de susceptibilidade a antifúngicos *in vitro* com isoflavonas da soja, hidroxipiridonas, fluconazol e anfotericina B.
- ✓ Selecionar isolados de *Candida* para testes experimentais.
- ✓ Induzir e avaliar experimentalmente infecção fúngica e tumoral.

- ✓ Realizar tratamento antifúngico e antitumoral *in vivo*.
- ✓ Analisar a resposta terapêutica.
- ✓ Comparar os resultados *in vivo* e *in vitro* da ação antifúngica da isoflavona, hidroxipiridonas, fluconazol e anfotericina B.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FUNGEMIA

A epidemiologia de infecções invasivas por fungos mudou durante os últimos 20 anos. A população de pacientes de risco se expandiu incluindo pessoas com problemas de saúde como Síndrome da Imunodeficiência adquirida (SIDA), câncer, pacientes submetidos a tratamentos imunossupressores, parto prematuro, idade avançada e cirurgias de grande porte (DIEKEMA et al, 2012; GIOLO et al, 2010).

Os avanços na medicina têm levado ao aumento na sobrevida de pacientes imunocomprometidos e consequentemente à ocorrência cada vez mais frequente de infecções fúngicas oportunistas, dentre estas a fungemia, que corresponde à presença de fungos na corrente sanguínea. A incidência desta infecção fúngica tem se tornado crescente nas últimas décadas, representando sério problema de saúde que envolve pacientes hospitalizados com condições predisponentes, levando a uma alta taxa de mortalidade (COLOMBO, 2003; ZAOUTIS et al, 2010).

A apresentação clínica é inespecífica sendo a febre o sinal mais comum (ALONSO-VALLE et al, 2003; VIUDES et al, 2002), o que torna o diagnóstico de fungemia um desafio, visto que as hemoculturas representam resultados conclusivos em menos de 50% dos casos (ALONSO-VALLE et al, 2003; BLOT et al, 2002). Assim, o diagnóstico frequentemente é tardio no curso da infecção, ou mesmo durante necropsia (EGGIMANN et al, 2003).

Desde a década de 80, leveduras (*C. albicans* em particular) têm sido os agentes mais comuns de fungemia e, em algumas circunstâncias, estando relacionadas com intervenções médicas específicas, tais como profilaxia antifúngica e utilização de dispositivos médicos invasivos. No entanto, na maioria dos casos, a infecção ocorre como consequência de alterações no hospedeiro, como imunossupressão (NUCCI; MARR, 2005; PEMÁN et al, 2012).

Vale salientar a relevância clínica dos casos de infecção da corrente sanguínea por espécies de *Candida*. Essa é considerada uma das leveduroses mais severas com taxas de mortalidade entre 40 a 60% dos casos. Devido à gravidade, essa doença prolonga o período de internação, o que eleva o custo da hospitalização, além de promover maiores riscos para o paciente em adquirir várias infecções nosocomiais, considerando-se, de certa forma, um problema de saúde pública, não apenas em países em desenvolvimento, como também em regiões desenvolvidas (FALAGAS et al, 2006; VIUDES et al, 2002).

A ocorrência de casos de fungemia em hospitais terciários aumentou substancialmente nas últimas décadas em diferentes partes do mundo (PEMÁN et al, 2012). No Canadá, a prevalência de agentes causadores dessas infecções foi avaliada em estudo realizado em Manitoba. Durante o período de 1976 a 1996, de um total de 816 casos de fungemia, 771 foram causados por espécies de *Candida*. Nesta casuística, observou-se que entre 1976 a 1980 as espécies de *Candida* representavam a 13ª causa de infecção de corrente sanguínea, enquanto no período de 1991 a 1996 passaram a ser a 4ª causa de infecção, perdendo em frequência apenas para infecções causadas por estafilococos coagulase-negativo, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (KARLOWSKY et al, 1997).

Farina et al, (1999) analisaram por um período de 10 anos, casos de fungemia em hospital regional italiano, constatando que a idade média dos pacientes acometidos com fungemia era de 38 anos, sexo feminino, sendo os agentes etiológicos mais frequentes *Candida* spp., seguida por *Cryptococcus*. A mortalidade total foi de 50,6% estando mais relacionada com *Candida kefyr* e *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans* e *Fusarium* spp.

A partir de estudos desenvolvidos por Colombo (2003) e Nucci e Marr (2005) observou-se que no Brasil, *Candida albicans* é responsável pela maioria dos casos de candidemia, seguido por *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. rugosa* e *C. glabrata*. Estes resultados confirmam os obtidos por Sugizaki et al, (1998), os quais constataram a prevalência de fungemia e observaram que dos 222 isolados de *Candida*, 57,8% foram identificados como *C. albicans*.

Colombo (2003) realizou um estudo de dados epidemiológicos sobre infecções da corrente sanguínea, em quatro hospitais da cidade de São Paulo, Brasil, constatando 7.038 casos de bacteremias e fungemias, sendo *Candida* responsável por 43% do total das infecções. Segundo Colombo e Guimarães (2003) a candidemia é um problema de saúde pública em hospitais terciários de todo mundo. Este panorama justifica a importância do conhecimento, por parte dos profissionais de saúde, das condutas necessárias para o diagnóstico, tratamento e controle de infecções invasivas por espécies de *Candida*.

Nucci e Marr (2005) afirmam que *C. albicans* tem sido considerada como o agente mais comum de infecção fúngica invasiva. Porém, com a usual utilização profilática ou empírica do fluconazol, a incidência global de candidemia tem diminuído por *C. albicans* e aumentado para *C. glabrata*, devido à fatores de resistência ao fármaco. Contudo, segundo Colombo e Guimarães (2003) *C. glabrata* representa, nos Estados Unidos e Europa desde o início de 1990, o segundo agente etiológico mais comum de candidemia, após *C. albicans*.

Caggiano et al, (2008) ao realizar estudo observacional sobre fungemia em um hospital universitário no sul da Itália, verificaram que *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram as espécies mais frequentes. De acordo com os autores, as infecções da corrente sanguínea por fungos estão relacionadas com fatores de riscos e a resposta clínica depende do diagnóstico e tempo para início do tratamento.

Ao realizar um levantamento epidemiológico de fungemia em um hospital universitário de Portugal durante um período de 12 meses, Costa de Oliveira et al, (2008), observaram que os principais agentes etiológicos foram *C. tropicalis* e *C. glabrata* e que 15% das espécies foram resistentes a fluconazol.

Em pesquisa sobre epidemiologia de infecções sistêmicas por fungos, Pemán et al, (2012), na Espanha, puderam verificar maiores taxas de fungemia atribuídas a *C. albicans* seguida por *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Foi possível observar um maior índice de fungemia em idosos e pacientes não críticos.

Uma revisão sobre leveduras oportunistas emergentes, foi realizada por Micelli et al, (2011) os quais observaram que a crescente população de pacientes imunossuprimidos resulta em diagnósticos cada vez mais freqüente de infecções fúngicas, incluindo aquelas causadas por leveduras consideradas de ocorrência rara. Foi demonstrado que a incidência de espécies de *Candida* não-*albicans* atualmente é alta quando comparada com *C. albicans*. Os autores ainda verificaram que diversas espécies, como *C. glabrata* e *C. krusei*, podem ser resistentes aos antifúngicos azólicos.

Além de espécies de *Candida*, outros fungos também podem estar envolvidos em casos de fungemia. Segundo Oliveira et al, (2007a) casos de histoplasmoze progressiva disseminada (HPD) tem aumentado sendo causa comum de infecção em pacientes com SIDA. Os autores relataram 21 casos de HPD associado com SIDA e os achados clínicos mais prevalentes foram febre, perda de peso, sintomas respiratórios e lesões mucocutâneas.

Mattos Oliveira et al, (2007) descreveram um caso de infecção sanguínea por *Cryptococcus gattii* em paciente com lesões pulmonares e cerebrais, porém sem evidência de patologia de base. Esta é uma manifestação comum de criptococose por esta espécie.

Segundo Pereira et al, (2009) *Trichosporon* spp. são leveduras oportunistas descritas como patógenos emergentes em infecções disseminadas e nosocomiais em UTIs. O quadro clínico da infecção por esse microorganismo é inespecífico e de mau prognóstico. Micelli et al, (2011) afirmam que *Trichosporon* spp. é o segundo agente mais comum causador de fungemia em pacientes com doença maligna hematológica, sendo caracterizado pela resistência à anfotericina B e equinocandinas.

Fungos emergentes têm se tornado cada vez mais comuns como causa de micoses invasivas, a exemplo do gênero *Exophiala*, responsável por casos de fungemia citados em estudo realizado por Hoffmann et al, (2011) em pesquisa sobre infecções sistêmicas causadas por fungos demácios e correlações anátomo-clínicas.

Gomez et al, (2010) avaliaram fatores prognósticos clínicos e epidemiológicos relacionados com a mortalidade e impacto do tratamento empírico precoce, em pacientes com candidemia nosocomial e constataram que estes pacientes tiveram uma alta taxa de mortalidade diante de uma situação de febre e sepse com gravidade aguda. Os autores concluíram que uma ação precoce de tratamento adequado é crucial para melhora significativa do paciente.

Bassetti et al, (2009) estudaram por um período de nove anos, a reincidência de candidemia por diferentes espécies de *Candida* e constataram que nos pacientes tratados com fluconazol, *C. albicans* foi a espécie mais prevalente seguida de *C. parapsilosis*.

Em pesquisa relacionada ao sucesso de tratamento invasivo em casos de candidemia, Horn et al, (2010) relataram a associação de micafungina com anfotericina B ou caspofungina como mais eficaz quando comparada a monoterapia antifúngica.

Ortega et al, (2010) estudaram a influência do tratamento antifúngico em infecções da corrente sanguínea por *Candida* e verificaram uma maior prevalência de *C. albicans* causando fungemia com mortalidade de 30% dos casos e que as equinocandinas tiveram melhores resultados quando comparadas aos triazóis. Segundo os autores, espécies de *Candida* não-*albicans* estão cada vez mais emergindo como agentes de infecções nosocomiais da corrente sanguínea.

Ao pesquisar sobre a ação da caspofungina no tratamento de fungemia em pacientes com neoplasias malignas, Pagano et al, (2010) constataram que a infecção fúngica sistêmica foi responsável pela morte de 25% dos pacientes. Para os pesquisadores, caspofungina demonstrou-se efetiva no tratamento podendo ser indicada para o tratamento de fungemias.

Hinrichsen et al, (2009) realizaram pesquisa quanto a distribuição das espécies de *Candida*, causando fungemia em hospitais do Recife. O estudo mostrou que *C. tropicalis* foi o principal agente isolado, evidenciando a importância desta espécie em infecções fúngicas nosocomiais.

Horasan et al, (2010) observaram o aumento de episódios de fungemia atribuídos a *C. parapsilosis* em pacientes internados em UTIs, relatando que quando são sugeridas infecções por espécies de *Candida* em pacientes criticamente enfermos, é importante saber quais os fatores de risco locais para um tratamento antifúngico empírico eficaz.

2.1.1 Fatores predisponentes para fungemia

Diversos fatores estão envolvidos na predisposição do hospedeiro ao acometimento de fungemia, dentre estes, o uso de antibióticos de largo espectro, tratamentos de quimioterapia, radioterapia e corticoterapia, nutrição parenteral, utilização de cateter venoso central, intubação endotraqueal, SIDA, lúpus eritematoso sistêmico, insuficiência renal e *diabetes mellitus* (FRANÇA et al, 2008; PAPPAS et al, 2003; RUIZ et al, 2012).

Doenças de base, bem como a neutropenia e outros fatores de risco, alteram substancialmente o sistema imunológico, permitindo o desenvolvimento de processos infecciosos oportunistas durante o tratamento (BOGACZ et al, 2010).

Segundo Ribeiro et al, (2009) as infecções fúngicas sistêmicas, especialmente fungemias, representam importante causa de infecção oportunista e morte dentre pacientes com SIDA, mesmo após o advento da moderna terapia antirretroviral potente ou *high activity antiretroviral therapy* (HAART).

Segundo Colombo et al, (2006), qualquer variável que cause desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal como o uso de antibióticos, jejum prolongado, nutrição parenteral total e quimioterapia, podem atuar como facilitador de translocação de *Candida* da microbiota até os capilares mesentéricos com posterior disseminação.

De acordo com Hernandez-Canaveral et al, (2009) os principais fatores inerentes ao aparecimento de infecções fúngicas endovasculares são o uso abusivo de drogas injetáveis, terapias imunossupressoras, neutropenia, doenças imunossupressoras e nutrição parenteral.

Hof (2010) em estudo sobre micoses sistêmicas em idosos constatou que *C. glabrata* desempenhou um papel relativamente importante em infecções fúngicas sanguíneas nesse grupo de pacientes. Segundo o autor, esta patologia tende a tornar-se um problema comum, devido ao aumento do número de idosos em países desenvolvidos.

A incidência de fungemia envolve ainda outros fatores de risco incluindo prematuridade, má nutrição, uso prolongado de cateter intravenoso, leucocitose e longa permanência hospitalar (PINHAT et al, 2012).

Entretanto, nas duas últimas décadas a idade adulta substituiu a idade infantil como o grupo de maior incidência para fungemia, diminuindo significativamente em bebês, como afirmam os dados de Cleveland et al, (2012), os quais consideram que a profilaxia antifúngica, melhorias no controle de infecção e mudanças nas práticas de inserção de cateteres em hospitais pediátricos podem estar contribuindo para esta redução.

A atividade de agentes antifúngicos, assim como antitumorais e ainda a patogênese da fungemia podem ser melhor avaliadas por modelos de infecções experimentais (SPELLBERG et al, 2005).

2.1.3 Fungemia experimental

Estudo conduzido por Sobel (2004), com intuito de analisar o efeito combinatório de antifúngicos para inibir agentes etiológicos de candidemia em modelo experimental, comprovou a hipótese de que terapias combinadas para o tratamento de fungemia exercem forte papel quando comparadas à monoterapia. Segundo o autor as terapias combinadas podem ser utilizadas para tratamento de fungos multirresistentes e necessita de mais investigações.

Altas doses de itraconazol (100 mg/Kg) e terbinafina (250 mg/Kg) foram testadas separadamente em ratos albinos “wistar” com candidemia, em pesquisa realizada por Meinerz et al, (2007). Na histopatologia não foi evidenciada nenhuma anormalidade, porém 25% dos animais tratados com terbinafina morreram imediatamente após a administração do fármaco.

De acordo com Micelli et al, (2011) decisões no tratamento da candidemia carecem de uma análise criteriosa do quadro clínico sobre fatores epidemiológicos e o estado imunológico da população de risco.

Flattery et al, (2011) avaliaram em modelo experimental de candidíase disseminada, a atuação da caspofungina em comparação com a anfotericina B. Os autores puderam observar que caspofungina demonstrou atividade equivalente ou superior quando comparada a anfotericina B.

Segundo Magagnin et al, (2011) pesquisas no âmbito experimental, sobretudo com terapêutica antimicrobiana, são de suma importância para confirmações de resultados obtidos *in vitro*. Entretanto, a resposta terapêutica *in vivo* pode ser afetada por diversos fatores do hospedeiro como local, natureza da infecção, bem como a farmacocinética do antimicrobiano, a ligação às proteínas e a penetração dos fármacos nos locais de infecção.

O tratamento de sucesso para micoses invasivas envolve uma abordagem combinada com o diagnóstico precoce, o ponto de início ao uso de antifúngicos, a correção do distúrbio metabólico e a reversão do quadro neutropênico quando presente. O tratamento de escolha é a anfotericina B, porém muitas vezes, a toxicidade é fatal, devido às condições inerentes ao paciente. Portanto é imprescindível a busca de novos compostos com propriedades

antifúngicas que resulte num tratamento eficaz visando uma menor permanência hospitalar e melhora significativa do estado clínico geral do paciente (FERREIRA; PINTO, 2010).

2.2 FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS PARA FUNGEMIA

O tratamento das infecções causadas por fungos é um desafio, uma vez que existem muitas similaridades estruturais entre as células de fungos e as células humanas, diminuindo-se, desta forma, a disponibilidade de fármacos para tratamento destas doenças quando comparadas a doenças causadas por bactérias e vírus, além da elevada toxicidade em algumas classes de antifúngicos (IDNURM et al, 2005).

Azólicos como fluconazol, itraconazol, cetoconazol e flucitosina, e poliênicos como anfotericina B têm sido os fármacos de escolha para tratamento de micoses sistêmicas por muitos anos. No entanto, a toxicidade dos fármacos, o surgimento de cepas resistentes e a baixa eficácia podem limitar a utilização clínica desses antifúngicos. Durante as duas últimas décadas, novos antifúngicos com maior capacidade de absorção e eficácia, demonstraram ser efetivos no tratamento das infecções por fungos. Voriconazol, caspofungina, micafungina e formulações lipídicas de anfotericina B têm ampliado as escolhas para o tratamento de infecções fúngicas invasivas (ZHANG et al, 2007).

Fungos oportunistas como *C. albicans* são as principais causas de micoses superficiais e invasivas. Infecções causadas por esta levedura são frequentemente tratadas com fluconazol ou outros derivados azólicos e antimicóticos não azólicos (NIEWERTH et al, 2003).

2.2.1 Azólicos

Os azóis como fluconazol e itraconazol são compostos totalmente sintéticos com mecanismo de ação consistindo na inibição da α -14-dimetilase, um sistema enzimático microsomal dependente da enzima citocromo P450 e codificada pelo gene *erg 11*, que dessa forma, compromete a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática, levando ao acúmulo de 14-metilesteróis. Esses, por não possuírem as mesmas propriedades físicas do ergosterol, proporcionam formação da membrana com funções alteradas, que não desempenham as atividades básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Os azóis são considerados tanto fungistáticos como fungicidas e causam menos reações adversas que os poliênicos, como a anfotericina B, porém possuem menor espectro de atividade antifúngica (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

O fluconazol é um fármaco hidrossolúvel, pode ser administrado de forma intravenosa, sendo completamente absorvido pelo trato gastrointestinal, com difusão por todo o corpo, inclusive pelo líquido cefalorraquidiano. Devido a suas qualidades farmacocinéticas e ao amplo espectro de ação, fluconazol foi considerado durante os anos 90 como padrão ouro para o tratamento de infecções fúngicas. Porém, devido ao uso profilático indiscriminado, vem sendo descritos vários casos de resistência dos fungos a este fármaco (VANDEPUTTE et al, 2012).

O mecanismo responsável pelo alto índice de resistência aos azólicos em isolados clínicos de *Candida* é a expressão de bombas de efluxo, codificadas pelo gene *cdr*. Goldman et al, (2004) descreveram mecanismos de resistência ao fluconazol em *C. albicans*, onde há pontos de mutação e superexpressão do gene *erg11*.

Alterações no gene *erg3* que codifica a enzima C-5 esterol demetilase, indispensável na biossíntese do ergosterol, bem como na composição lipídica da membrana plasmática fúngica, estão envolvidas no mecanismo de resistência aos azólicos (LÖFFLER et al, 2000).

Um problema com a infecção por *C. glabrata* é a susceptibilidade diminuída dessa espécie ao fluconazol. Com os novos azóis, a resistência cruzada é também uma preocupação, porque o principal mecanismo de resistência ao fluconazol está relacionado a bombas de efluxo (NUCCI; MARR, 2005).

Tem sido observado um crescimento do número de trabalhos documentando alterações na susceptibilidade das espécies de *Candida* aos antifúngicos. Embora, muitos sejam os trabalhos que relatam a sensibilidade da maioria dos fungos patogênicos ao fluconazol, vem sendo observado um desenvolvimento de resistência quando os pacientes são previamente expostos a este fármaco, pelo uso profilático ou indiscriminado. Contudo, esta prática clínica não acontece com polienos, como por exemplo, a anfotericina B (KERSUN et al, 2008).

2.2.2 Poliênicos

Mais de 200 moléculas pertencentes à classe dos polienos apresentam atividade antifúngica, muitas destas, são produzidas por bactéria. No entanto, apenas três se destacam no uso clínico: anfotericina B, nistatina e natamicina. Entretanto, devido a alta toxicidade, principalmente devido a não afinidade com o colesterol, apenas a anfotericina B é utilizada sistematicamente (VANDEPUTTE et al, 2012).

Os antimicóticos poliênicos agem por complexação com o ergosterol na membrana celular. Este mecanismo leva a desestabilização e mudanças na permeabilidade da membrana

e, conseqüentemente, provoca a perda de proteínas, carboidratos e nucleotídeos da célula fúngica. A anfotericina B foi descoberta por Gold (1956), extraída de uma cepa do actinomiceto *Streptomyces nodosus* (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

Estruturalmente, antifúngicos poliênicos são caracterizados por um anel de macrolídeo de átomos de carbono conjugado com ligações duplas. Em geral, os poliênicos têm maior afinidade com o ergosterol, esteróis da membrana celular fúngica. Esses antifúngicos se ligam irreversivelmente ao ergosterol, resultando numa alteração da permeabilidade celular e eliminações subseqüentes de componentes intracelulares, através de poros na membrana (ZHANG et al, 2007).

Há mais de 30 anos, a anfotericina B tem sido uma das mais importantes moléculas usadas em infecções fúngicas severas. Porém, o uso é limitado devido aos vários efeitos adversos, destacando-se a nefrotoxocidade, tanto na formulação convencional quanto na lipídica (CHEN, 2002). Por ter pouca absorção no trato gastrointestinal em infecções sistêmicas, o fármaco deve ser administrado por via intravenosa (DERAY, 2002).

Alterações no gene *erg3*, que também são encontradas na resistência aos azólicos, levaram a uma menor atividade da enzima C-5 esterol desnaturase, e conseqüentemente uma menor síntese de ergosterol, local de ação dos poliênicos (KELLY et al, 1997). A enzima citocromo P450 demetilase, importante enzima envolvida na biossíntese do ergosterol, tem sido largamente estudada. Segundo Espinel-Ingroff, (2008) cepas resistentes a anfotericina B são deficientes desta enzima, apresentando menor nível de ergosterol.

Segundo Zhang et al, (2007), anfotericina B e nistatina são os dois antifúngicos poliênicos mais amplamente utilizados no tratamento de infecções fúngicas superficiais e sistêmicas. O aparecimento de cepas resistentes a esse grupo de antifúngicos é menor quando comparado aos azólicos.

2.3 RESISTÊNCIA FÚNGICA

Resistência fúngica refere-se a não susceptibilidade de um fungo a um agente antifúngico nos testes *in vitro*, em que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fármaco ultrapassa o limite de susceptibilidade para o organismo. A resistência microbiológica pode ser primária (intrínseca) ou secundária (adquirida). A primária é determinada naturalmente entre certos fungos sem exposição prévia ao fármaco e enfatiza a importância da identificação de espécies de fungos de amostras clínicas. A secundária desenvolve resistência entre as cepas

previamente sensíveis após a exposição ao agente antifúngico, que geralmente é dependente da expressão de gene alterado (KANAFANI; PERFECT, 2008).

Apesar dos avanços nas intervenções preventivas, diagnósticas e terapêuticas, infecções fúngicas invasivas causam significativa morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos. O espectro de patógenos agentes de infecções fúngicas em imunodeprimidos está crescendo, no entanto, as opções terapêuticas disponíveis são limitadas. A carga de resistência antifúngica de algumas cepas em pacientes de alto risco está se tornando motivo de grande preocupação (KANAFANI; PERFECT, 2008).

Segundo Pfaller et al, (2005) o uso crescente de agentes antifúngicos tem resultado em cepas resistentes, sendo necessária uma maior farmacovigilância quanto ao uso indiscriminado destes fármacos.

O aumento da incidência de micoses oportunistas tem sido acompanhado pelo fenômeno de resistência. Os primeiros relatos de resistência ocorreram em pacientes com candidíase mucocutânea crônica tratados com cetoconazol por longos períodos. A incidência de resistência a antifúngicos está aumentando em todo o mundo e novos fármacos estão sendo constantemente desenvolvidos para combater essa tendência (BASMA et al, 2009).

Segundo Medrano et al, (2006) a emergência de espécies de *Candida* não-*albicans* resistentes como agentes importantes de candidemia pode também estar relacionada ao uso profilático ou empírico de fármacos antifúngicos.

De acordo com Rivas e Serrano (2003) o tratamento da maioria das infecções está embasado nos resultados dos testes de sensibilidade *in vitro*, os quais podem prever a resposta clínica e esta resposta depende de fatores intrínsecos ao antifúngico e da interação entre o patógeno e o hospedeiro. Os autores afirmam ainda que pode haver diferenças entre resultados de sensibilidade *in vitro* e *in vivo*.

Algumas espécies de *Candida* comumente isoladas são pouco susceptíveis aos derivados azólicos, dificultando o tratamento das infecções. Embora a sensibilidade dessas espécies aos antifúngicos disponíveis seja previsível, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral (FENNER et al, 2006).

A falta de resposta ao tratamento antifúngico pode ser devido à resistência intrínseca do agente etiológico ou desenvolvida durante o tratamento, ou pode estar associada a fatores relacionados ao hospedeiro, ao agente antifúngico ou tipo de infecção. O sucesso terapêutico depende da escolha do antifúngico e deve ser avaliada de acordo com tratamentos instituídos para doença de base (ESPINEL-INGROFF, 2008).

Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento da resistência, sendo o mais importante, a exposição repetida às concentrações de antifúngicos, tomando como exemplos o uso profilático e até mesmo o terapêutico (GOLDMAN et al, 2004).

De acordo com MacCallum et al, (2010) cada composto antifúngico tem uma utilidade clínica específica, que depende do espectro de atividade, via de administração e propriedades farmacodinâmicas. Várias espécies de fungos têm combatido a ação dos azólicos, desenvolvendo mecanismos de resistência.

A resistência das espécies de *Candida* aos poliênicos, alilamina e equinocandinas é menos freqüente, contudo os triazólicos, imidazólicos e flucitosina são os fármacos frente aos quais mais frequentemente surgem cepas resistentes (GOLDMAN et al, 2004).

Segundo Jacobsen et al, (2010) em pesquisa *in vitro* e *in vivo* sobre a aptidão e virulência de espécies de *Candida*, a espécie *C. glabrata* tem desenvolvido com sucesso estratégias de evasão imune que permite sobrevivência, disseminação e persistência nos hospedeiros.

C. krusei é bem conhecida como um fungo bastante isolado de pacientes com doenças hematológicas malignas e em pacientes transplantados, sendo um patógeno incomum, porém multirresistente à fármacos antifúngicos. Dentre os agentes antifúngicos sistemicamente utilizados, as equinocandinas parecem ser as mais ativas contra este importante patógeno (PFALLER et al, 2008).

Baseado em trabalho realizado por França et al, (2008) *C. glabrata* e *C. krusei* naturalmente apresentam susceptibilidade reduzida ao fluconazol. No entanto, tem-se observado taxas de resistência também para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

2.4 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Testes de susceptibilidade antifúngica são métodos confiáveis e reprodutíveis imprescindíveis para indução de um tratamento mais adequado através da melhor seleção do fármaco e concentração apropriados e consequentes melhora clínica (KUPER et al, 2012).

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) publicou métodos de referência para testes de susceptibilidade de leveduras e fungos filamentosos. Essas diretrizes têm criado um padrão para comparação de dados clínicos. No entanto, permanece como desafio a interpretação dos resultados nos testes *in vitro* de suscetibilidade aos antifúngicos, pois os valores de CIM nem sempre estão diretamente associados com a resposta antifúngica

in vivo. O resultado obtido no teste visa permitir a identificação da concentração do fármaco que inibe o crescimento do fungo *in vitro* (KANAFANI; PERFECT, 2008).

Vários são os métodos usados *in vitro* para avaliar a susceptibilidade dos fungos a diferentes fármacos. As técnicas disponíveis consistem em adaptações executadas a partir dos métodos antibacterianos, e normalmente não são utilizados como rotina nos laboratórios de micologia. O aparecimento de infecções fúngicas recorrentes e a presença de resistência de determinadas leveduras ao tratamento usual estimularam o uso de testes de susceptibilidade para escolha e monitoramento do tratamento antifúngico mais adequado (BANERJEE et al, 1991; COLOMBO, 2003).

Na tentativa de difundir o uso de técnicas de antifungogramas para maior número de laboratórios, sistemas comerciais alternativos como o E-test, que consiste em uma fita plástica contendo o fármaco em diferentes concentrações expressas no reverso da tira, vêm apresentando boa correlação com a metodologia de referência. Uma das principais vantagens dessa técnica é o menor tempo de leitura (24 horas), enquanto o da microdiluição em caldo é de 48 horas, além da maior facilidade de execução. Porém, o elevado custo e a dificuldade de acesso no comércio são pontos limitantes (DIEKEMA et al, 2007).

Segundo Pfaller et al, (2008) tem sido sugerido a utilização do teste de difusão em disco, sendo de fácil manuseio e menor custo. O critério de leitura é com a medição das zonas de inibição do crescimento das leveduras da mesma forma que é executado para bactérias. Porém, não utiliza variações de concentração de antifúngico e, conseqüentemente, não define o ponto de sensibilidade, sendo os micro-organismos classificados apenas como sensíveis, doses-dependentes ou resistentes. Além disso, segundo os autores, o teste de difusão em disco não está totalmente validado para todos os antifúngicos e depende da otimização da metodologia.

Por outro lado, o antifungograma mundialmente conhecido é o teste padronizado pelo CLSI. Primeiramente, para leveduras, foi publicado o documento M27-A em 1997, a segunda edição (M27-A2) foi publicada em 2002 e a terceira, M27-A3, em 2008. A metodologia, cujo princípio é o de diluição em caldo, embora laboriosa, apresenta boa reprodutibilidade (CUENCA-ESTRELLA et al, 2002).

De acordo com Hoffmann et al, (2011) o diagnóstico precoce para fungemia é primordial, apesar da cronicidade e longa evolução desta doença. O caráter infiltrativo desta infecção é capaz de levar à seqüelas e amputações. Ainda não existe consenso quanto ao tratamento das doenças fúngicas sistêmicas, havendo apenas poucos ensaios clínicos comparando diferentes fármacos. Por outro lado, pesquisas apontam praticidade no teste de

susceptibilidade *in vitro* de cada agente causal com determinados fármacos, o que proporcionaria um tratamento mais direcionado e eficaz.

2.5 CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, as células tendem a ser muito agressivas e esta proliferação incontrolável determina a formação de tumores malignos, que podem acometer outras regiões do corpo (POSTON et al, 2005).

O câncer está ligado a doenças que têm como características comuns a autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibitórios de multiplicação, evasão de apoptose, angiogênese, ilimitado potencial de replicação, invasão dos tecidos e metástase (RUDDON, 2007).

Segundo levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo. Atualmente, sete milhões de pessoas morrem de câncer sendo 12 milhões de novos casos diagnosticados a cada ano (XIA; Lee, 2010).

A incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de cânceres estão relacionados a múltiplos fatores, incluindo sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição a carcinógenos ambientais como riscos físicos, químicos e biológicos (FONSECA et al, 2010).

O câncer resulta do acúmulo de mutações sequenciais múltiplas e alterações moleculares que culminam com metástases, sendo a segunda principal causa de mortalidade no Brasil (FORTES; NOVAES, 2006). Alguns tumores podem crescer de forma rápida, espalhando-se para outros órgãos e podendo levar à morte. Outros, porém, crescem de forma lenta, não ameaçando a saúde geral do homem (TANAKA et al, 2003). Essa patologia não possui sintomas ou sinais próprios, podendo ser detectada em vários estágios de evolução clínica e histopatológica (INCA, 2011; Silva, 2012).

Cerca de 35% dos diversos tipos de câncer ocorrem em decorrência de dietas inadequadas, caracterizadas pelo alto teor de gordura saturada, colesterol e açúcares, baixo aporte de verduras, frutas, legumes e cereais integrais. Tabagismo, obesidade, atividade física deficiente, exposição a determinados tipos de vírus, bactérias, parasitas, além do contato freqüente com substâncias carcinogênicas (químicas, físicas ou biológicas) também merecem ser destacados (FORTES; NOVAES, 2006).

As mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e o estilo de vida adotados pelas pessoas, podem determinar diferentes tipos de câncer. Dentre estes fatores, o tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, medicamentos, fatores ocupacionais e radiação solar (FONSECA et al, 2010; ZAMBONI, 2002).

As taxas de mortalidade por câncer têm mostrado tendência declinante em vários países desenvolvidos, como os Estados Unidos e a maior parte da Europa Ocidental (POSTON et al, 2005; XIA; LEE, 2010).

Nos países em desenvolvimento são escassos os estudos que revelem a tendência de mortalidade por câncer. Em 2002, foi publicado trabalho que analisou uma série histórica sobre a mortalidade por câncer no Brasil, apresentando a queda destas taxas (FONSECA et al, 2010).

Segundo Fortes e Novaes (2006), todos os cânceres invadem ou metastatizam, mas cada tipo específico tem características biológicas e clínicas singulares que precisam ser avaliadas para o apropriado diagnóstico, tratamento e estudo. A precocidade no diagnóstico e tratamento é importante para evitar o crescimento local acentuado ou agravos conseqüentes à metástase. Em contrapartida alguns fármacos utilizados para o tratamento do câncer não garantem total sucesso, devido à resistência das células neoplásicas ao fármaco e toxicidade às células normais.

A resistência do câncer a determinados fármacos pode estar associada ao fato de que células estão sujeitas, em todo momento, a processos oxidativos e tal fato resulta em outras mutações e esta resistência pode ser intrínseca, no início do tratamento ou adquirida, durante o tratamento (RUDDON, 2007).

A maior parte dos medicamentos até hoje utilizados foram introduzidos na metade do século XX. Estes agentes se mostravam tóxicos não apenas diante de células malignas, mas também contra células sadias, como folículos capilares e epitélio gástrico, além de apresentarem uma série de efeitos adversos como perda de cabelo e mucosites (SPENCE; JONHSTON, 2001).

O aumento da incidência de casos de câncer associado à crescente taxa de mortalidade atribuída tem direcionado pesquisadores de várias áreas a realizar diversos estudos na busca de novos compostos antineoplásicos em modelos animais. O Sarcoma 180 ou tumor de Crocker faz parte de uma linhagem ATCC indiferenciada que foi encontrada em ratos albinos em 1914, primariamente classificado como carcinoma mamário. Sendo geneticamente semelhante a tumores humanos é amplamente utilizado em pesquisas com modelos animais (QI; XU, 2006).

2.5.1 Câncer de pulmão

De doença rara no passado, o câncer do pulmão transformou-se em uma das doenças neoplásicas mais comuns e mais mortais, em todo o mundo, apresentando aumento de 2% ao ano (FRANÇA et al, 2011; ZAMBONI, 2002).

Estimam-se 17.210 novos casos de câncer de pulmão em homens e 10.110 em mulheres, no Brasil, para o ano de 2012, sendo válido também para 2013. Em 90% dos casos diagnosticados, o câncer de pulmão está associado ao consumo de derivados do tabaco. No fim do século XX, este se tornou uma das principais causas de morte evitáveis (INCA, 2011).

Segundo Zamboni (2002), uma vez que o consumo de derivados do tabaco origina 90% dos casos de câncer de pulmão, evitar fumar é a primeira medida preventiva para doença. De acordo com os autores, em comparação com pessoas não fumantes, os tabagistas têm cerca de 20 a 30 vezes mais risco de desenvolver câncer de pulmão. Em geral, as taxas de incidência em um determinado país refletem o consumo de cigarros.

Além disso, manter alto consumo de frutas e verduras é recomendado. Deve-se evitar, ainda, a exposição a certos agentes químicos (como o arsênio, asbesto, berílio, cromo, radônio, urânio, níquel, cádmio, cloreto de vinila, gás de mostarda e éter de clorometil), encontrados principalmente no ambiente ocupacional (BARROS et al, 2006).

Exposição à poluição do ar, infecções pulmonares de repetição, deficiência e excesso de vitamina A doença pulmonar obstrutiva crônica (enfisema pulmonar e bronquite crônica), fatores genéticos e história familiar de câncer de pulmão também são fatores para o desenvolvimento desse tipo de câncer, de acordo com Melo; Kowalski (2009).

Segundo Barros et al, (2006) a broncoscopia deve ser realizada para avaliar a árvore traqueobrônquica e, eventualmente, permitir a biópsia. Uma vez obtida a confirmação da doença, é feito o estadiamento, que avalia o estágio de evolução, ou seja, verifica se a doença está restrita ao pulmão ou disseminada por outros órgãos. O estadiamento é feito através de vários exames de sangue e radiológicos.

Turkington et al, (2002) realizaram pesquisa relacionada ao diagnóstico de câncer de pulmão. Os autores observaram que a falha do radiologista em reconhecer anormalidades foi o motivo mais comum pelo qual o diagnóstico não foi realizado na avaliação de radiografias de tórax.

Do ponto de vista anatomo-patológico, o câncer de pulmão é classificado em dois tipos principais: pequenas células e não pequenas células (85%). O tumor de não pequenas células corresponde a um grupo heterogêneo composto de três tipos histológicos principais e

distintos: carcinoma epidermóide, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células, ocorrendo em cerca de 75% dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão. Dentre os tipos celulares restantes, destaca-se o carcinoma indiferenciado de pequenas células, com os três subtipos celulares: linfocitóide (*oat cell*), intermediário e combinado (células pequenas mais carcinoma epidermóide ou adenocarcinoma) (FRANÇA et al, 2011).

Segundo Henry et al, (2008) a expressão *oat cell* ganhou importância na linguagem médica por ser um subtipo especial de câncer pulmonar. As principais características são de rápido crescimento, grande capacidade de disseminação e invasão. Os autores afirmam que apesar do alto grau de resposta ao tratamento, apresenta baixo percentual de cura.

De acordo com Barros et al, (2006) os sintomas mais comuns do câncer de pulmão são tosse, dor torácica e sangramento pelas vias respiratórias. Pneumonia de repetição pode ser outra manifestação inicial da doença, sendo a maneira mais fácil de diagnosticar o câncer de pulmão, através de raio-X do tórax complementado por tomografia computadorizada.

Segundo Oliveira et al, (2007b) as formas clínicas e sintomas do câncer de pulmão é similar a criptococose pulmonar, sendo ideal, para confirmação da infecção fúngica, o diagnóstico imunológico para criptococose.

Zamboni (2002) afirma que os fumantes devem ser estimulados a parar de fumar e as crianças e adolescentes devem ser convencidos a não iniciar a prática tabagista, sendo o melhor método para prevenção do câncer de pulmão. O autor também ressalta que o tabaco deve ser incluído no grupo de drogas que causam dependência e deve ser banido da sociedade.

O tabagismo contribui não somente para o aumento da carga de câncer de pulmão em nosso país, mas também para o aumento da incidência de outros tipos de câncer, incluindo o de laringe (GUERRA et al, 2005).

2.5.2 Câncer de laringe

O câncer de laringe ocorre predominantemente em homens e é um dos mais comuns entre os que atingem a região da cabeça e pescoço. Representa cerca de 25% dos tumores malignos e 2% de todas as doenças malignas. A incidência tem aumentado no mundo nas últimas décadas, acompanhando o aumento no consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas (SARTOR et al, 2007). Estima-se cerca de 6.110 novos casos de câncer de laringe para o ano de 2012 e válidos para 2013. Em 2011, foi responsável por 3.618 mortes, sendo 3.189 de homens (INCA, 2011).

A ocorrência desta doença pode se dar em uma das três porções em que se divide o órgão: laringe supraglótica, glote e subglote. Aproximadamente 2/3 dos tumores surgem na corda vocal verdadeira localizada na glote, e 1/3 acomete a laringe supraglótica, sendo o tipo histológico mais prevalente, o carcinoma epidermóide (AMAR et al, 2010).

Segundo Berto et al, (2010) o álcool e o tabaco são os maiores inimigos da laringe. Entretanto, os fumantes têm 10 vezes mais chances de desenvolver câncer neste órgão. Os autores ainda ressaltam que a má alimentação, estresse e mau uso da voz também são prejudiciais, devendo ser evitados alimentos muito temperados, gordurosos e líquidos muito quentes ou muito frios. Além disso, falar muito alto e sem pausas causa os chamados calos vocais.

Os sintomas do câncer de laringe estão diretamente ligados à localização da lesão. Assim, a dor na garganta sugere tumor supraglótico, e rouquidão indica tumor glótico ou subglótico. O câncer supraglótico geralmente é acompanhado de outros sinais, como alteração na qualidade da voz, disfagia leve e incômodo na garganta. Nas lesões avançadas das cordas vocais, além da rouquidão, podem ocorrer dor na garganta, disfagia e dispnéia (OLIVEIRA et al, 2012).

Amar et al, (2010) afirmam que o diagnóstico para o câncer da laringe necessita de procedimento histopatológico. A biópsia é obrigatória antes de qualquer planejamento terapêutico, pois a laringe pode abrigar tipos diversos de lesões benignas que aparentam malignidade. A biópsia pode ser realizada com anestesia local, com uso de endoscópios flexíveis dotados de canal de biópsia, ou sedação geral e laringoscopia direta. O estadiamento em que se encontra o tumor e suas características determinam a escolha do melhor tratamento do ponto de vista oncológico e funcional.

De acordo com a localização e a extensão do tumor de laringe, o mesmo pode ser tratado com cirurgia e/ou radioterapia ou associações. A laringectomia total (retirada da laringe) implica na perda da voz fisiológica e em traqueostomia definitiva (abertura de um orifício artificial na traqueia, abaixo da laringe). Como a preservação da voz é importante na qualidade de vida do paciente, algumas vezes a quimioterapia pode ser primeiramente empregada, quando a radioterapia não for suficiente para controlar o tumor (RAMIREZ et al, 2003; PORTAS et al, 2011).

2.5.3 Câncer de cólon

O câncer de cólon, também denominado colorretal, abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto, e configura-se como um dos tipos de câncer mais comuns entre as mulheres (LASSANCE et al, 2012). Para o Brasil, nos anos de 2012, válido para 2013, esperam-se 14.180 casos novos de câncer do cólon em homens e 15.960 em mulheres (INCA, 2011).

O tumor de colon é tratável e, na maioria dos casos, curável, ao ser detectado precocemente e quando não acontecem metástases. Grande parte desses tumores se inicia a partir de pólipos, lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso. Assim, uma maneira de prevenir o aparecimento dos tumores seria a detecção e a remoção destes pólipos antes de se tornarem malignos (INCA, 2011).

Santos-Júnior et al, (2008) afirmam em seu trabalho que um dos aspectos desfavoráveis ao câncer colorretal é o desenvolvimento silencioso e diagnóstico tardio, devido ao longo período em que as lesões e o tumor permanecem assintomáticas.

Uma dieta rica de vegetais e laticínios e pobre em gordura, além da rotina de atividades físicas previnem o câncer colorretal, devendo-se também evitar o consumo exagerado de carne vermelha. De acordo com Zandonai et al, (2012) alguns fatores aumentam o risco de desenvolvimento da doença, como idade acima de 50 anos, história familiar de câncer colorretal, história com outros tipos de câncer, baixo consumo de cálcio, além de obesidade e sedentarismo.

Segundo Zandoná et al, (2011) outros fatores de risco também podem ser mencionados, como doenças inflamatórias do intestino, a retocolite ulcerativa crônica, doença de Crohn, além de doenças hereditárias, como polipose adenomatosa.

Em esquisa realizada sobre fatores de risco de câncer colorretal, Altenburg et al, (2009) ressaltam a importância da endoscopia gastrointestinal superior e inferior, sobretudo em maiores de 50 anos com quadro de anemia de origem indeterminada e que apresentem suspeita de perda crônica de sangue. Mudança no hábito intestinal, desconforto abdominal, sangramento nas fezes, sangramento anal, perda de peso, cansaço, fezes pastosas de cor escura, náuseas e vômitos também são sinais de alerta para a busca de orientação médica.

De acordo com Funari et al, (2011) o tumor de cólon pode ser detectado precocemente através de pesquisa de sangue oculto nas fezes e colonoscopia.

O tratamento do câncer colorretal depende principalmente do tamanho, localização e extensão do tumor e, cirurgia, radioterapia e quimioterapia são frequentemente utilizadas. As

chances de cura tornam-se reduzidas quando a doença evolui para metástases e atinge principalmente fígado, pulmão e rins (MENDES et al, 2010).

As terapias em longo prazo, além da ação tóxica de fármacos quimioterápicos, conduzem pacientes imunocomprometidos com doenças neoplásicas, a uma maior susceptibilidade a infecções oportunistas. Contudo, as complicações infecciosas decorrentes das terapias imunossupressoras tornaram-se as principais causas de morbidade e mortalidade nesse grupo de pacientes (VELASCO et al, 2000).

2.6 NOVOS COMPOSTOS COM AÇÃO ANTIFÚNGICA E ANTITUMORAL

A revolução biotecnológica tem fornecido informações extremamente úteis para a descoberta de fármacos. Os avanços expressivos da química e biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo (GUIDO et al, 2010).

O fato das infecções fúngicas representarem parasitismo de um organismo eucariótico sobre outro também eucariótico faz com que sejam necessários que fármacos antifúngicos tenham uma aplicação clínica adequada, com o mínimo de efeitos colaterais (LACAZ et al, 2002).

A eficácia dos fármacos tais como paclitaxel, docetaxel, etoposide e vinca alcalóide, e de antibióticos importantes, como a vancomicina e penicilina, representam alguns exemplos da importância de produtos naturais no desenvolvimento de medicamentos. Além disso, pouco se sabe sobre a farmacologia ou fitoquímica de plantas e animais representativos da biodiversidade encontrada em países como o Brasil (VAN DER HEIJDEN et al, 2004).

Baseado em trabalho realizado por Younes et al, (2007) várias novas moléculas têm sido desenvolvidas em fármacos disponíveis comercialmente que se originam de extratos derivados de recursos naturais.

Segundo Hussar (2000) continuam em expansão as linhas de pesquisas para novos compostos antineoplásicos e avaliação em vários sistemas tumorais e cultura de tecidos, objetivando selecionar compostos mais efetivos.

De acordo com Roque e Forones (2006) para aperfeiçoar a reabilitação de lesões, inclusive tumorais, podem-se utilizar biomateriais compreendidos como materiais interativos

capazes de estabelecer uma afinidade apropriada com tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa do hospedeiro.

Segundo Shao et al, (2006) a associação de fármacos é uma forma promissora usada para aumentar o sucesso no tratamento das enfermidades, porém, se fazem necessários mais estudos para verificar a atuação e eficácia de fármacos combinados em diversas infecções, assim como verificar a toxicidade destes.

Naturalmente, fármacos antifúngicos e antitumorais podem ser derivados de plantas, tecidos animais, ou micro-organismos. As deficiências dos medicamentos disponíveis comercialmente impulsionam a descoberta de novos agentes farmacoterapêuticos em extratos de plantas, como exemplo das isoflavonas (BOGACZ et al, 2010).

2.6.1 Isoflavonas da soja

As plantas medicinais são auxílios terapêuticos importantes para várias doenças. Entretanto, estima-se que um montante de 20.000 espécies vegetais de várias famílias seja útil para esse fim. Além disso, cerca de 80% da população mundial utiliza fármacos à base de plantas. As experiências científicas sobre as propriedades antimicrobianas dos vegetais foram documentadas pela primeira vez no final do século XIX (KUETE et al, 2008).

Isoflavonóides são substâncias presentes principalmente na soja e em derivados, sendo encontradas em diversas formas. Tais flavonóides são de potencial importância na prevenção do câncer e doenças cardiovasculares devido às propriedades antioxidantes (AGUIAR; PARK, 2004).

As isoflavonas pertencem a classe dos isoflavonóides que tem sido amplamente estudada pelo potencial na prevenção de várias doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, osteoporose, câncer, dentre outras. A soja e produtos derivados (tofu, tempeh, miso, natto, leite de soja, iogurtes de soja e sobremesas a base de soja) são as únicas fontes de fornecimento de grandes quantidades de isoflavonas na dieta humana. O consumo da isoflavona foi estimado em 25-50 mg/dia nos países asiáticos e em torno de 100 mg/dia, para homens idosos japoneses (MESSINA et al, 2006).

O conhecimento sobre efeitos benéficos dos flavonóides, sobretudo no alívio dos sintomas pós-menopausa, levou a população a realizar a autosuplementação com alimentos ricos em isoflavonas ou suplementos dietéticos. Daidzeína, genisteína e gliciteína são isoflavonas do tipo agliconas contidas na soja e benéficas ao organismo. Segundo Steiner et

al, (2008) os aspectos estruturais de similaridade de agliconas com 17 β -estradiol lhes dá a capacidade de se ligar aos receptores de estrogênio e induzir efeitos hormonais.

De acordo com Ajdzanovic et al, (2009) a natureza polifenólica de genisteína permite a atuação desta substância como antioxidante. Sobretudo, os fitoestrógenos da soja, como a genisteína e daidzeína, tornaram-se uma alternativa popular para mulheres que se submetem ao tratamento dos sintomas da menopausa. Estas isoflavonas também são comumente usadas na medicina tradicional na prevenção e tratamento da osteoporose, doenças cardiovasculares e câncer. Entretanto, apesar da ampla utilização de preparações de soja como alimentos funcionais e suplementos alimentares, os dados relativos à segurança, bem como as interações entre medicamentos fitoterápicos e fármacos sintéticos, especialmente com agentes antineoplásicos, ainda são escassos (BOGACZ et al, 2010).

Ricciotti et al, (2005) estudaram os efeitos da daidzeína nos sintomas da menopausa, observando uma redução na frequência de calor. Ainda relatam que as isoflavonas são biotransformadas no intestino pela ação de enzimas bacterianas, que as transformam de glicosiladas (daidzinas e genistinas) para agliconas (daidzeínas e genisteínas).

Além das atividades antiestrogênicas e antioxidantes, a genisteína é um potente inibidor da família da tirosina quinase, o que certamente é a causa do efeito antiproliferativo de células tal como demonstrado *in vitro* e *in vivo* (AJDZANOVIC et al, 2009).

Existe atualmente um número crescente de pessoas que utilizam a medicina complementar e alternativa para o tratamento de doenças persistentes ou crônicas. Os pacientes freqüentemente se voltam para terapias alternativas, como medicamentos fitoterápicos e acupuntura, para controle da dor, quando tratamentos tradicionais são ineficazes. Soja e metabólitos (principalmente isoflavonas) têm o potencial para diminuição da dor pela inibição das proteínas tirosina quinase, citocinas pró-inflamatórias ou atividade da ciclooxigenase-2, atuando também como antioxidante. Além disso, a genisteína pode inibir diretamente a excitabilidade dos neurônios (Borzan et al, 2010). Segundo Kang et al, (2010) evidências de estudos epidemiológicos sobre a associação das isoflavonas e o risco de câncer ainda é limitada.

2.6.1.1 Isoflavonas da soja e ação antifúngica

Existe atualmente uma grande variabilidade de opções de antifúngicos, tópicos e sistêmicos, porém a disponibilidade terapêutica ainda é restrita, sendo clara a necessidade de

pesquisas de novas substâncias com capacidade antifúngica com maior eficácia e menor toxicidade (ALMEIDA et al, 2009).

Chen-Chang et al, (1995) estudaram as atividades biológicas das isoflavonas e da topoisomerase I. Os autores constataram tratar-se de uma possível substância eficaz com atividades antifúngica, antibacteriana, anti-nematóides e inseticida.

Orhan et al, (2007) realizaram estudo sobre quantificação de daidzeína e genisteína do óleo de soja, assim como verificaram a bioatividade destas substâncias em micro-organismos. Os autores verificaram atividade antifúngica de 8 µg/mL contra cepas de *C. albicans*.

Kuete et al, (2008), estudaram a atividade antimicrobiana de extratos brutos de flavonóides em *Ficus chlamydocarpa*, *Ficus cordata*, contra 16 cepas de microrganismos, dentre elas, fungos e bactérias, e observaram que a genisteína foi capaz de inibir o crescimento de 7 (39%) das espécies microbianas testadas.

Li et al, (2008) estudaram as atividades antifúngica e antibacteriana de derivados de desoxibenzoína da genisteína contra *Aspergillus niger*, *C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescense* e *Staphylococcus aureus* e constataram que a maioria dos compostos demonstraram atividade antibacteriana, porém nenhum composto apresentou ação antifúngica.

De acordo com Salas et al, (2011) em pesquisa sobre a atividade antifúngica de flavonóides naturais e modificados enzimaticamente, extraídos de plantas do gênero *citrus* contra espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*, os flavonóides podem mostrar pequena atividade antifúngica, não inibindo totalmente o crescimento dos fungos. Contudo, segundo Steiner et al, (2008) os processos biológicos modulados por isoflavonas, especialmente, pela genisteína, têm sido extensivamente estudados, mas sem levar a uma compreensão clara dos mecanismos celulares e moleculares de ação.

2.6.1.2 Ação de isoflavonas da soja sobre o câncer

A ação da genisteína na prevenção e tratamento do câncer, tem se mostrado difícil, porém é indefinida a eficácia clínica da substância devido ao pequeno número de pacientes analisados, redução no tempo de tratamento e falta de formulação padronizada. Entretanto, experimentos bem conduzidos com animais, podem apoiar a crença das isoflavonas como fármaco anticâncer. Os autores recomendaram o uso da genisteína apenas com intenção de prevenir o câncer e não de tratá-lo (PERABO et al, 2008; BORZAN et al, 2010; KANG et al, 2010).

Segundo Chiesa et al, (2008) em estudo experimental, uma dieta diária com concentrados de isoflavonas, inibe a progressão do tumor e desenvolvimento de possíveis metástases.

De acordo com Steiner et al, (2008) os mecanismos de ação das isoflavonas em relação ao câncer ainda não foram estabelecidos. Abordagens clássicas moleculares têm sido utilizadas, muitas vezes em modelos *in vitro*, para explorar hipóteses específicas. Contudo, os resultados ainda precisam ser validados *in vivo* em condições alimentares. Segundo os autores, novas hipóteses sobre os mecanismos celulares e moleculares de ação das isoflavonas são elaboradas e não há dúvida de que outras vão emergir rapidamente a partir da crescente utilização de abordagens nutricionais e grandes descobertas sobre os mecanismos de ação e variabilidade de acordo com os indivíduos, a dose ou tempo de exposição ainda parece concebível.

Raynal et al, (2008) em pesquisa sobre a atividade antileucêmica da genisteína *in vitro* e *in vivo*, evidenciaram a atividade antineoplásica mielóide e linfóide contra células leucêmicas. Além disso, observaram que uma dieta enriquecida de genisteína produziu um moderado, mas significativo efeito anti-leucemico em camundongos.

Boucher et al, (2008) analisaram o consumo infantil da soja e o risco de desenvolver câncer. Os autores relataram que o consumo de leite de soja na alimentação infantil reduz a susceptibilidade cancerígena.

Baseado em pesquisa realizada por Mc Tiernan et al, (2008) sobre a prevenção do câncer em países com diversos recursos, comportamentos saudáveis incluindo aleitamento, atividade física regular, consumo de alimentos a base de soja, diminuíram o risco de câncer.

De acordo com Tolman et al, (2008) a alta ingestão de selênio e isoflavonas reduzem fatores de risco para o câncer e a combinação dos dois produtos pode otimizar maiores efeitos quimiopreventivos quando comparado com a ação individual.

Num estudo *in vitro* sobre o efeito de isoflavonas da soja e saponinas na proliferação de carcinoma de cólon, HT-29, Jim et al, (2008) verificaram apoptose das células neoplásicas expostas às substâncias.

O risco de recorrência do câncer em camundongos foi avaliado por Guha et al, (2009) os quais confirmaram a hipótese de que o consumo de 25-50 mg/dia de soja reduz os níveis de recorrência. Resultado semelhante foi relatado por Rossi et al, (2010) em estudo entre 1992 e 1999, na Itália, sobre flavonóides e o risco de câncer de ovário em 1.031 mulheres com casos de câncer de ovário reincidente.

De acordo com Kang et al, (2009) isoflavonas são freqüentemente utilizadas como terapia de reposição hormonal para aliviar os sintomas da menopausa. Uma vez que o estrógeno tenha sido considerado como um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama, os autores demonstraram que as isoflavonas foram capazes de diminuir a proliferação e apoptose *in vitro* e *in vivo*, demonstrando efeitos antitumorais e antiangiogênicos.

A ação de fitoestrógenos dietéticos em resposta ao nível de estradiol em ratas, foi avaliada por Paulina et al, (2009), as quais relataram que fontes alimentares de lignanas e isoflavonas podem modular a sinalização de estrógenos.

Barnes (2010) estudou a química, bioquímica e fisiologia de isoflavonas e produtos derivados, e verificou que as isoflavonas se ligam aos receptores de estrógenos fisiológicos, inibem a tirosina quinase, tem atividade antioxidante e ativam reguladores de peroxissomos. Isso explica a menor incidência de câncer na Ásia, local onde o consumo de soja é diário.

Em pesquisa sobre a síntese, caracterização e atividade antitumoral de isoflavonas conduzido por Chen et al, (2010) foi possível observar que alguns complexos obtidos de isoflavonas atuam sobre células tumorais, inibindo-as.

Hisamitsu et al, (2010), estudaram os efeitos combinados inibitórios do câncer de próstata pelas isoflavonas da soja associada com a curcumina através de níveis de antígeno prostático específico (PSA) e concluíram que as duas substâncias, em tratamento combinado, inibem níveis de testosterona em indivíduos com níveis normais de PSA, podendo esta combinação ter vantagens terapêuticas para pacientes com altos níveis.

Singh-Gupta et al, (2010) estudaram os efeitos da daidzeína e genisteína na potencialização da radioterapia, instituída para o tratamento do câncer *in vitro* e *in vivo* e constataram que a genisteína pura pode promover comprometimento dos linfonodos, porém a mistura das duas substâncias potencializa o tratamento de radioterapia.

Segundo Xu et al, (2010) no processamento térmico de produtos derivados de soja, as isoflavonas sofrem degradação das agliconas sendo significativamente afetada na química e atividade antioxidante, além de atividades anticâncer e perfis fitoquímicos.

Zhang et al, (2010) relataram que o consumo de alimentos de soja e isoflavonas da soja esta inversamente associado com o risco de câncer de mama entre mulheres chinesas, especialmente em pré-menopausa, residentes em Guangdong.

A atividade antiinflamatória da soja e do chá verde no câncer de próstata foi avaliada por Hsu et al, (2010). Segundo os autores, a soja e o chá verde possuem efeito direto na redução de incidência deste tipo de câncer.

Segundo Kang et al, (2010), além das isoflavonas, outras substâncias presentes na soja, em efeitos sinérgicos ou antagonistas, se combinam para propiciar um efeito benéfico final dos bioativos na saúde.

Assim como fitoterápicos, os fármacos ainda poucos estudados, como exemplo as hidroxipiridonas podem apresentar também vantagens terapêuticas para micoses sistêmicas. Pesquisas relacionadas visam grandes avanços para comunidade científica (SUBISSI et al, 2010).

2.6.2 Hidroxipiridonas

As hidroxipiridonas compõem quimicamente uma classe de antimicóticos não relacionadas com qualquer outra classe de agentes antifúngicos, sendo nos últimos anos, ciclopirox olamina, octopirox olamina (piroctona olamina) e rilopirox, os fármacos disponibilizados. Os representantes desta classe são ativos contra um amplo espectro de fungos de importância médica, incluindo dermatófitos e leveduras. A baixa toxicidade no teste experimental tornou possível a aplicação tópica (SOARES; CURY, 2001; NIEWERTH et al, 2003).

De acordo com Korting; Grundmann-Kollmann (1997) a experiência clínica desta classe de fármaco diz respeito, em particular, a dermatofitose e a candidíase vaginal, mas o potencial de ação terapêutica nas micoses sistêmicas deve ser investigado.

Em contraste com antifúngicos azóis e poliênicos, o modo de ação das hidroxipiridonas não está totalmente esclarecido. A inibição da captação celular de compostos essenciais, bem como a perda de outros compostos parece ser apenas um efeito secundário de uma ação principal que não é conhecida (SIGLE et al, 2006).

2.6.2.1 Mecanismos de ação das hidroxipiridonas

O mecanismo de ação das hidroxipiridonas é diferente de outros antifúngicos tópicos, que geralmente agem através da inibição do ergosterol. A alta afinidade desta classe para os cátions de metais trivalentes resulta na inibição das enzimas dependentes de metal que são responsáveis pela degradação dos peróxidos na célula fúngica, esse parece ser o principal determinante da atividade antifúngica. Este mecanismo único e com vários níveis de ação prevê um potencial muito baixo para o desenvolvimento de resistência em fungos (JONES, 2003; SCHALKA; NETO, 2012).

Ensaios clínicos com a ciclopirox olamina tiveram início em 1980 e permanecem sendo desenvolvidos. Primeiramente, foi testado para infecções fúngicas da pele e candidíase vaginal, e atualmente está bem estabelecido nestas indicações. O fármaco também foi avaliado clinicamente na dermatite seborréica e onicomicoses, mostrando boa eficácia e excelente tolerabilidade (JONES, 2003).

Foi observado por Iwata e Yamaguchi (1981) que a ciclopirox olamina provoca a inibição da síntese de RNA e DNA no crescimento de células fúngicas, possivelmente através do bloqueio da captação de precursores das macromoléculas ou da absorção de íons essenciais, tais como íons de potássio e fosfato. Além disso, na presença de concentrações mais elevadas do fármaco, a célula sofre perda de substâncias e íons de potássio. Em contraste com a membrana, a parede celular fúngica não parece ser funcionalmente afetada.

Segundo Niewerh et al, (2003) para esse fármaco, em contraste com os azólicos e outros fármacos antimicóticos, o modo de ação específico ainda é pouco entendido. Estudos realizados por esses autores revelam que a atividade antifúngica deste fármaco pode estar associada com a presença do ferro.

O modo de ação de rilopirox, um fármaco da família das hidroxipiridonas, frente a *C. albicans* e *C. glabrata* foi estudado por Harada et al, (1997) e os mesmos constataram que o efeito fungicida do fármaco é diminuído na presença de Fe^{3+} , o que acontece como os demais fármacos pertencentes à mesma classe.

Segundo Almeida et al, (2007) além da capacidade fungicida, ciclopirox olamina também causa alterações na morfologia nuclear, e condensação da cromatina em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, esse fármaco tem sido utilizado com frequência com notável sucesso frente espécies de *Candida* azol-resistentes.

Sigle et al, (2006) realizaram investigações *in vitro* sobre o modo de ação dos antimicóticos hidroxipiridonas, rilopirox e octopirox sobre *C. albicans* e afirmam que o efeito antifúngico *in vitro* depende do meio utilizado. A indução da produção de hifas de *C. albicans* é inibida por antimicóticos hidroxipiridonas, mas esse efeito é compensado por íons de ferro, e há indícios de que as espécies aeróbicas são partes importantes no modo de ação dos antimicóticos hidroxipiridonas, rilopirox e octopirox.

Schmidt-Rose et al, (2011) estudaram a eficácia de octopirox olamina / xampu climbazol, em comparação com um xampu piritionato de zinco em indivíduos com moderada a severa produção de caspa e concluíram que a formulação de xampu com octopirox olamina 0,5% e 0,45% de climbazol, efetivamente reduz a quantidade de caspa e, ao mesmo tempo, oferece vantagens de condicionamento ao cabelo.

2.6.2.2 Ciclopirox olamina e ação antifúngica

Ciclopirox olamina é um agente antimicótico cujo perfil antimicrobiano inclui leveduras, dermatófitos e outros fungos filamentosos clinicamente relevantes (Subissi et al, 2010). Esse fármaco foi relatado pela primeira vez como um possível agente antifúngico em 1973. Tem um amplo espectro de atividade, podendo inibir até o crescimento de espécies frequentemente azol-resistentes como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Além disso, esse fármaco atua contra uma ampla gama de bactérias, incluindo as patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (NIEWERTH et al, 2003).

O ciclopirox olamina, tem sido introduzido para o tratamento clínico há mais de duas décadas, sendo frequentemente usado para tratar micoses superficiais ou candidíase vaginal. Nenhum caso de resistência fúngica tem sido relatado e dentre os mecanismos de resistência dos fungos aos medicamentos, as bombas de efluxo estão entre as mais importantes para a resistência a uma grande variedade de fármacos antifúngicos e moléculas tóxicas (NIEWERTH et al, 2003).

Ciclopirox tem amplo espectro de ação com atividade fungistática ou fungicida *in vitro* contra dermatófitos (*Trichophyton* spp, *Microsporum* spp., *Epidermatophyton floccosum*), leveduras (*Candida* spp, *Malassezia* spp, *Cryptococcus neoformans*), fungos dimórficos (*Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*), actinomicetos e vários outros, espécies como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phialophora* e *Fusarium*, entre outros (ZHANG et al, 2007).

Matsuki et al, (2006) estudaram os efeitos de fármacos antifúngicos na proliferação de *C. albicans*. Os resultados apontaram a ciclopirox olamina como o antifúngico mais eficaz em condições aeróbicas, indicando o melhor uso em micoses superficiais. Entretanto, Oliveira et al, (2010) sugerem que este fármaco pode ser eficaz para o tratamento de micoses sistêmicas em estudo *in vitro* realizado com espécies de *Cryptococcus*.

Além de antifúngico, ciclopirox olamina também exibe leves efeitos antiinflamatórios, em modelos bioquímicos e farmacológicos e estão disponíveis em várias formulações tópicas, adequadas para administração na pele, unhas e vagina. No entanto, as apresentações orais deste medicamento não estão disponíveis (WEIR et al, 2011). As formas farmacêuticas mais encontradas são: creme, loção, spray, xampu, solução e gel (SOARES; CURY, 2001).

Os recursos de segurança de ciclopirox são bem conhecidos, sendo a medicação tópica desprovida de reações adversas sistêmicas. Reações locais leves podem ser observadas como uma sensação de queimação na pele, irritação, dor, vermelhidão ou prurido, geralmente em

menos de 5% dos pacientes tratados. Com a aplicação nas unhas, o evento adverso mais comum é o aparecimento de eritema leve em 5% da população (SUBISSI et al, 2010).

A liberação do fármaco *in vitro* para medicamentos líquidos e semisólidos que contenham antifúngicos é altamente dependente dos fatores de formulação, uma influência considerável a ser atribuída à solubilidade do fármaco e a viscosidade para o papel na resistência à difusão global (MANESCU et al, 2011).

Estudo realizado por Manescu et al, (2011) mostrou a melhor eficácia do ciclopirox olamina em creme quando comparado ao clotrimazol, em pacientes com infecções superficiais por dermatófitos e leveduras. De acordo com os referidos autores, ciclopirox olamina penetra nas unhas e tem sido utilizada com sucesso para onicomicoses. Porém, mais estudos são necessários para estabelecer seu papel no tratamento de outras micoses.

A atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas do ciclopirox pode ser uma forma eficaz no tratamento de tinea pedis interdigital com crescimento bacteriano secundário (dermatofitose-complexo). Os efeitos adversos são raros. Menos de 5% dos pacientes apresentam efeitos colaterais na maioria dos estudos. Os mais comuns incluem irritação, sensação de queimação, dor, vermelhidão ou prurido (ZHANG et al, 2007).

Soares e Cury (2001) avaliaram a atividade *in vitro* de antifúngicos e antissépticos frente a dermatófitos isolados de amostras clínicas de pacientes com *tinea pedis* e constataram que para ciclopirox olamina a atividade, em termos de CIM, variou de 8µg/mL a 32 µg/mL. No entanto, a maioria das cepas de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* e dois isolados de *E. floccosum* foram inibidas na concentração de 16µg/mL. A Concentração inibitória fungicida variou entre 16 µg/mL e maiores que 128 µg/mL. A ação fungicida em relação ao *T. mentagrophytes* foi observada nas concentrações até 64 µg/mL.

De acordo com Weir et al, (2011) as informações sobre a baixa toxicidade, sugere que ciclopirox olamina seja melhor investigada e possivelmente reposicionada como uma nova alternativa para tratamento do câncer.

2.6.2.3 Ação do ciclopirox olamina sobre o câncer

A ação de ciclopirox olamina na leucemia e mieloma foi constatada em ratos por Eberhard et al, (2011), os quais observaram uma diminuição no crescimento e viabilidade das células malignas com a adição de concentrações farmacologicamente viáveis.

Embora inicialmente desenvolvido como um agente antifúngico tópico, estudos recentes têm demonstrado que esse fármaco induz a morte celular de células malignas *in vitro* e *in vivo*, como mostrado por Balabanov et al, (2007). Os autores verificaram que ciclopirox olamina inibe o crescimento de células malignas em pacientes com leucemia mielóide crônica, em baixas concentrações molares.

Semelhante ao provável mecanismo de ação como um agente antifúngico, os efeitos antitumorais de ciclopirox olamina também estão relacionados à capacidade de ligação com o ferro intracelular. Como tal, a farmacocinética no plasma ou soro após a administração oral é desconhecida. Contudo, o tempo de semivida de ciclopirox olamina pode ser curto. Contudo, esse fármaco deverá ser administrado em várias doses, várias vezes por dia para atingir efetivas concentrações antitumorais (WEIR et al, 2011).

Estudo realizado por Eberhard et al, (2009) mostrou que a ciclopirox olamina foi capaz de promover a diminuição do crescimento e viabilidade celular de linhagens de tumores sólidos, dentre eles, HT-29, em concentrações que são farmacologicamente realizáveis. Além disso, os autores ainda verificaram que ciclopirox causou diminuição do peso e volume do tumor, sem evidências toxicidade em órgãos.

Zhou et al, (2010) estudaram a capacidade antitumoral de ciclopirox olamina sobre células de câncer e verificaram inibição da proliferação do tumor, com apoptose em rabdomiossarcoma humano, carcinoma de mama e adenocarcinoma de cólon. Os autores apontam ciclopirox como um agente antitumoral em potencial.

Segundo Kim et al, (2011) ciclopirox olamina tem características químicas semelhantes ao octopirox olamina e são pertencentes à classe das hidroxipiridonas.

2.6.2.4 Octopirox olamina e ação antifúngica

Octopirox olamina ou piroctona olamina (2-Hidroxi-4-metil-6-(2,4,4-trimetil pentil)2(1H)-piridone, sal monoetanolamínico) é um agente anticaspa de baixíssima toxicidade, indicado para formulações de xampus, condicionadores, tônicos, incluindo géis capilares e desodorantes. As propriedades fungicidas e antioxidantes atuam diretamente sobre *Malassezia*, fungo aliado à formação da caspa, e permitem a utilização da substância como conservante ou agente desodorante em produtos cosméticos em razão das propriedades antimicrobianas (DUBINI et al, 2005).

A octopirox olamina apresenta uma ampla atividade bacteriana e antifúngica *in vitro*, que não é influenciada pelas matérias-primas cosméticas. Inibe ainda o crescimento de

substâncias irritantes no couro cabeludo, que constituem os fatores externos para a formação da caspa (SIGLE et al, 2006).

Nolen et al, (1989) estudaram, em ratos em crescimento, os efeitos da suplementação de ferro na dieta sobre a toxicidade do octopirox olamina, afirmando que o mecanismo de toxicidade do fármaco é a prevenção da absorção do ferro alimentar por quelação *in situ*.

Em estudo sobre a susceptibilidade *in vitro* de 22 cepas de *Malassezia furfur*, Schmidt; Rühl-Hörster (1996) verificaram intervalo de CIM entre 16 a 64 $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$ para octopirox olamina.

Allgood et al, (1991) realizaram estudo para determinar o efeito da octopirox olamina, um ativo anticaspa, sobre o desempenho reprodutivo, fecundidade, viabilidade neonatal e crescimento de ratos machos e fêmeas. Os autores concluíram que crescimento neonatal não foi afetado com 100 mg/Kg, e os demais parâmetros avaliados, incluindo a capacidade de acasalamento e desempenho reprodutivo, não foram afetados pelo tratamento em qualquer nível da dosagem testada.

Lodén; Wessman (2000) compararam a eficácia de um xampu anticaspa contendo octopirox olamina e ácido salicílico com xampu de piritionato de zinco contra espécies de *Malassezia* e concluíram que octopirox olamina e ácido salicílico tem maior poder antifúngico que o piritionato de zinco.

A comparação entre cetoconazol, octopirox olamina e formulações de piritionato de zinco foi realizada por Piérard-Franchimont et al, (2002), constatando que os três tipos de fármacos reduzem significativamente a queda de cabelo, diminuindo a produção de sebo do couro cabeludo.

Segundo Piérard-Franchimont et al, (2003) a caspa é controlada por xampus com atividade fungistática frente a espécies de *Malassezia*, removendo também as escamas epidérmicas frouxamente ligadas. Os autores também afirmaram que o tratamento com octopirox olamina obteve melhor resultado quando comparado ao tratamento com cetoconazol durante cinco minutos de exposição.

Dubini et al, (2005) estudaram a atividade antifúngica *in vitro* da octopirox olamina frente alguns patógenos de unhas, como *C. parapsilosis*, *Scopulariopsis brevicaulis* e *T. rubrum*. O resultado do CIM obtido pelo método de diluição em caldo variou entre 0,0003% e 0,006% para todos os patógenos testados.

O perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de amostras clínicas de pacientes com insuficiência renal crônica foi avaliado por Magagnin et al, (2011). Os autores testaram nove antifúngicos comercialmente utilizados. Octopirox olamina apresentou

efeito fungicida na faixa de 2 a 16µg / mL⁻¹. Segundo os autores, o sucesso terapêutico previsto *in vitro* pode não ocorrer *in vivo*, devido a vários fatores intínsecos ao fármaco e ao hospedeiro, sendo de crucial importância a realização de análises experimentais complementares.

2.6.2.5 Ação da octopirox olamina sobre o câncer

A relação entre octopirox olamina e células neoplásicas foi observada por Kim et al, (2011) em estudo sobre o aumento da eficácia *in vivo* de lenalidomida com a adição de octopirox olamina. Os autores verificaram que houve uma maior atividade apoptótica em mielomas humanos e murinos, em várias linhas de células de linfoma, bem como em células humanas primárias com a adição de octopirox olamina. *In vivo*, o crescimento do tumor, bem como a sobrevida global, foi significativamente reduzido nos ratos tratados com octopirox olamina em comparação com não tratados. Esse é o único relato que demonstra a ação deste fármaco frente a células neoplásicas.

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Amostras de sangue foram procedentes de pacientes internos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e processadas no Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

3.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para o processamento das amostras de sangue, foi realizado o exame direto a fresco (sem adição de clarificante e corante) e corado com Giemsa. Para cultura, foi realizado semeio em placas contendo meio ágar Sabouraud e *Brain Heart Infusion* acrescido de 50mg/L de cloranfenicol (SAB+C e BHI+C), mantidas à temperatura de 30° C e 37°C por um período de até 15 dias.

Após o surgimento de colônias, estas foram purificadas, através da suspensão dos fragmentos da colônia em água destilada esterilizada adicionada de 50 mg de cloranfenicol/L. Desta suspensão, 0,2ml foram semeados na superfície do meio SAB+C contido em placa de Petri para posterior identificação.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

A identificação foi conduzida através da observação das características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas, segundo, Kurtman; Fell, (1998), Barnett et al, (2000), Hoog et al, (2000), Lacaz et al, (2002). Foram selecionadas para testes de susceptibilidade *in vitro* todas as espécies de *Candida*. Todos os isolados foram posteriormente estocados sob óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca URM- UFPE.

3.4 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS *IN VITRO*

Os testes de susceptibilidade foram realizados com as linhagens de *Candida* recém isoladas de amostra de sangue e seguiu o método da microdiluição em caldo, de acordo com a padronização publicada no documento M27-A2 pelo CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI, 2005). Para controle de qualidade foram incluídas nos

testes linhagens *C. krusei* 6528 e *C. parapsilosis* 22019 como recomendadas pelo documento (BARRY et al, 2000; CLSI, 2005).

As isoflavonas testadas foram daidzeína e genisteína (SIGMA) e hidroxipiridonas foram ciclopirox e octopirox olamina. O meio de cultura utilizado foi RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) com L-glutamina, 2,0g/l de glicose, sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) a concentração final de 0,165 mol/L e pH 7,0.

A concentração final de inóculo da levedura foi de 10^3 UFC/mL. O fluconazol e anfotericina B foram usadas como drogas convencionais (controle), em concentrações que variaram entre 0,125 a 64 µL/mL para fluconazol e 0,03 µL/mL a 16 µL/mL para anfotericina B. Dois poços controles, isentos de antifúngico e levedura, foram incluídos no ensaio. A concentração inibitória mínima (CIM) foi a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível dos isolados testados, em relação ao poço controle (PFALLER et al, 2004a).

3.5 ATIVIDADES ANTIFÚNGICAS E ANTITUMORAIS *IN VIVO*

A atividade antifúngica e antitumoral *in vivo* foi analisada através de um modelo de infecção experimental de candidemia e tumor Sarcoma 180 em camundongos Suíços de ambos os sexos, com 21-23 dias de idade, provenientes do biotério do Departamento de Antibióticos UFPE. Os animais foram manejados de acordo com a política institucional instituída pelo comitê de ética em experimentação animal e divididos ao acaso em quatro grupos: CO- controle (sadios), TU – animais com tumor, TC – tumor e candidemia, C- animais com candidemia. Doses de extrato de isoflavonas e concentrações de hidroxipiridonas foram administradas diariamente aos grupos de acordo com a CIM pré-determinada.

3.6 INFECÇÃO E TRATAMENTO EXPERIMENTAL DA CANDIDEMIA

O teste experimental para a candidemia foi conduzido, utilizando-se o isolado de *Candida* que apresentou *in vitro* maior sensibilidade aos antifúngicos. A imunossupressão dos camundongos foi realizada através da administração de 5 mg de dexametasona intraperitonealmente durante três dias consecutivos e em seguida com intervalo de quatro dias. Para confirmação da imunossupressão, amostras de sangue foram colhidas por punção para contagem dos leucócitos em câmara de Neubauer sob microscopia óptica.

O estabelecimento de um modelo de micose profunda experimental em camundongos, e a dose infectante das células de leveduras capaz de gerar sinais clínicos nos animais foi baseado na DL_{50} (Dose Letal para 50% dos animais) e determinado após infecção intraperitoneal com diferentes concentrações do isolado. Inicialmente, dois grupos de animais (seis animais/grupo) foram infectados com 0,1 mL na concentração de 10^4 , 10^6 e 10^8 céls/mL da levedura. O grupo controle recebeu apenas 0,1 mL de solução salina. A taxa de mortalidade será acompanhada diariamente até 28 dias após infecção. Para o cálculo da DL_{50} foi utilizado o Modelo Probit através de Análise de Regressão Linear (FINNEY, 1974).

Estabelecido o modelo da candidíase experimental, os animais foram infectados por via intraperitoneal com 0,1 mL da DL_{50} da levedura e tratados separadamente com isoflavonas, ciclopirox, octopirox, fluconazol e anfotericina B. O grupo controle recebeu salina estéril em substituição a substância e será infectado tal como descrito para os animais experimentais. A taxa de mortalidade foi acompanhada até 28 dias da infecção. A confirmação da infecção pelos isolados, foi baseada na avaliação dos sintomas clínicos típicos e análise micológica de amostras de sangue

O tratamento da candidemia foi realizado após sete dias da infecção com administração intraperitoneal de 0,1 mL de solução de isoflavonas, testadas separadamente, na concentração inibitória mínima das substâncias previamente determinada. Fluconazol e anfotericina B foram usadas como controle. A avaliação clínica dos animais foi diária durante 15 dias.

Para contagem das unidades formadoras de colônias foi realizada uma punção e o sangue resultante foi plaqueado em ágar Sabouraud e as colônias contadas após incubação durante 24h-72h a 37°C. Posteriormente foi realizado retrocultivo para confirmação da espécie previamente inoculada.

A ação terapêutica das isoflavonas e hidroxipiridonas foi considerada eficaz quando houve crescimento da levedura.

3.7 INFECÇÃO E TRATAMENTO EXPERIMENTAL TUMORAL

Para realização do teste antitumoral *in vivo*, o tumor Sarcoma 180 na forma ascítica, com sete dias de implantado, foi transplantado a partir de animal doador, para animais sadios, dos grupos experimentais previamente marcados para permitir sua identificação.

A contagem das células foi realizada em câmara Malassez, permitindo a preparação de uma suspensão equivalente a 25×10^6 célula/mL, da qual 0,2 mL (5×10^6 célula/mL) foram

injetados na região axilar direita dos animais do grupo experimental. O tempo decorrido entre a remoção do tumor do animal doador até seu implante nos animais receptores, não ultrapassou 60 min., conforme recomendado (GERAN et al, 1972).

Antes de iniciado o experimento, os animais foram pesados e os grupos serão formados aleatoriamente.

Após 24h do implante do tumor, foi iniciado o tratamento, mediante administração intraperitoneal das moléculas teste no grupo tratado e 0,2 mL de salina para animais controle, durante sete dias consecutivos.

Ao término do tratamento, os animais foram pesados e sacrificados com éter etílico, para retirada dos tumores e avaliação da inibição tumoral sendo o mesmo procedimento adotado para o grupo controle para a comparação de peso e aspecto dos tumores segundo Geran et al, (1972).

3.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise estatística da contagem de leucócitos e UFC foram avaliadas de acordo com o teste t Student e os dados de mortalidade, analisados pelo teste Fisher. Os cálculos foram realizados com o aplicativo para análises estatísticas STATISTICA 6.0.

Maiores detalhes sobre a metodologia estão descritos nos artigos subsequentes.

4 RESULTADOS

Os resultados das etapas propostas, assim como análises e discussão estão redigidos em forma de artigos abaixo descritos e localizados nos apêndices e anexos desta tese.

Nossos primeiros resultados apontaram vários agentes etiológicos como causadores de fungemia, incluindo fungos emergentes como *C. membranifaciens* e *Exophiala* sp., em oito amostras de sangue obtidas de pacientes internados em hospital público do Recife-PE. Este foi o primeiro relato que aponta *C. membranifaciens* como agente etiológico de fungemia.

No artigo intitulado “Fungemia em hospital universitário: uma abordagem epidemiológica” (Anexo A) traçamos uma importante análise que constata a síndrome da imunodeficiência adquirida como uma das doenças de base mais prevalentes no grupo de pacientes estudados.

A segunda etapa da pesquisa foi resultante de taxas de resistência e sensibilidade de espécies de *Candida* envolvidas em infecção fúngica invasiva contra fármacos convencionais e novas moléculas. Estando corroborado com recentes estudos, verificamos que algumas espécies de *Candida* como *C. tropicalis* podem apresentar resistência ao fluconazol. Esta pesquisa também aponta cepas de *C. parapsilosis* apresentando resistência ao referido fármaco.

Por apresentar bioatividade pouco provada contra os cânceres de mama e próstata, as isoflavonas da soja (genisteína e daidzeína) foram testadas nesta pesquisa contra espécies de *Candida* e linhagens de células tumorais humanas (câncer de pulmão, laringe e cólon), contudo as isoflavonas apresentaram bioatividade antifúngica e antitumoral baixa ou nenhuma, como mostra o artigo intitulado “Avaliação in vitro das atividades antifúngica e antineoplásica das isoflavonas da soja”, presente no apêndice B.

Moléculas pouco estudadas, como as da família de antifúngicos hidroxipiridonas, sobretudo octopirox olamina, são alvos de várias pesquisas, porém nunca antes testadas como tratamento de micoses profundas. O artigo intitulado “Octopirox olamina: Uma alternativa para tratamento da candidemia” relata que este fármaco, comercialmente usado em formulações de xampus de tratamento antifúngico, possui alto poder fungicida, e pode, futuramente, ser uma alternativa para tratamento de candidemias ou outras micoses invasivas. Podemos salientar que este é o primeiro estudo que relaciona este fármaco com o tipo de micose exposta (Apêndice A).

Além da octopirox olamina, outro representante da mesma família, o ciclopirox olamina, também foi testado in vitro contra fungos do gênero *Candida* e células neoplásicas

de pulmão, laringe e cólon. Foi constatado que estas duas moléculas atuam fortemente contra os tipos de cânceres testados, além de leveduras do gênero *Candida*, causando apoptose nestas células. Estes resultados estão inseridos no artigo intitulado “Hidroxi piridonas: fármacos promissores para tratamento do câncer - um estudo in vitro” (Apêndice C).

Com base na boa atuação antifúngica da octopirox olamina verificada através testes in vitro, realizamos também etapas in vivo de infecção intra-abdominal em camundongos Suíços e albinos, previamente imunossuprimidos com posterior tratamento do fármaco. Os resultados apontaram a eliminação total e parcial de infecção sistêmica comparada à fármaco padrão. Estes resultados estão descritos no artigo publicado intitulado “Antifungal activity of the piroctone olamine in experimental intra-abdominal candidiasis” (Anexo B).

Além de infecção fúngica sistêmica, grupos de camundongos também receberam células tumorais de Sarcoma 180, causando infecção neoplásica local. Como mostra o artigo de título “Efeito antitumoral e antifúngico de octopirox olamina em camundongos portadores de tumor S180 e candidemia” (Apêndice D). O tratamento com octopirox olamina permitiu uma inibição do crescimento do tumor, podendo ser considerado fármaco potencial para tratamento de micoses invasivas com ou sem associação neoplásica.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa é possível concluir:

- *Candida albicans*, *C. membranifaciens*, *Cryptococcus* sp., *Histoplasma capsulatum*, *Exophiala* sp. e *Trichosporon* são agentes etiológicos de fungemia.
- *Candida albicans* permanece como a espécie mais frequente para casos de fungemia em imunocomprometidos.
- Fungos emergentes como *C. membranifaciens* e *Exophiala* sp. podem causar infecção sanguínea em pacientes imunocomprometidos.
- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida é uma das doenças de base mais relacionada aos casos de fungemia.
- Cepas de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* podem apresentar resistência *in vitro* ao fluconazol.
- Daidzeína e genisteína não apresentam atividade antifúngica frente cepas de *Candida* isoladas de infecções sanguíneas.
- Ciclopirox olamina e octopirox olamina têm comportamento fungicida *in vitro* frente a espécies de *Candida*.
- Daidzeína não apresenta atividade antitumoral em células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão (NCI-H292), carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2) e adenocarcinoma de cólon (HT-29).
- Genisteína possui significativa atividade antitumoral contra células de carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2).
- Ciclopirox olamina e octopirox olamina têm capacidade de inibição tumoral frente células de carcinoma mucoepidermóide de pulmão (NCI-H292), carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2) e adenocarcinoma de cólon (HT-29).
- Octopirox olamina apresenta capacidade de inibição de crescimento do tumor sarcoma 180 *in vivo*.

- Octopirox olamina pode ter ação na inibição de metástases.
- Camundongos Suíços albinos são susceptíveis a infecção da corrente sanguínea por *Candida albicans*, quando imunossuprimidos.
- Por apresentarem atividades antifúngica e antitumoral *in vitro* e *in vivo*, octopirox olamina pode ser considerado fármaco potencial para tratamento da candidemia, associada ou não a presença de tumor.

REFERÊNCIAS

- Aguilar, C.L., Park, Y.K. 2004. Conversão de daidzina e genistina de soja por β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*, **b. ceppa** 22 (1): 183-195.
- Ajdzanovic, V., Susic-Jurjevic, B., Filipovic, B., Trifunovic, S. M., Manojlovic-Stojanoski, M., Sekulic M., Milosevic, V. 2009. Genistein-Induced Histomorphometric and Hormone Secreting Changes in the Adrenal Cortex in Middle-Aged Rats. **Experimental Biology and Medicine** 234: 148-156.
- Albuquerque, C.O., Hermosilla, G.D., Tapia, P.C. 2009. Distribución y susceptibilidad a fluconazol de leveduras del género *Candida* aisladas en pacientes hospitalizados y ambulatorios. **Revista chilena de infectología** 26 (5): 435-439.
- Allgood, G.S., Miller, J.M., Schardein, J.L. 1991. The effect of piroctone olamine on reproduction of male and female rats. **Fundamental and Applied Toxicology** 16(1):31-40.
- Almeida, B., Sampaio-Marques, B., Carvalho, J., Silva, M.T., Leão, C., Rodrigues, F., Ludovico, P. 2007. An atypical active cell death process underlies the fungicidal activity of ciclopirox olamine against the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research** 7(3): 404-12.
- Almeida, L.M.M., Bianchi, D.B., Souza, E.A.F., Svidzinski, T.I.E. 2009. Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 84(3): 249-55.
- Alley, M.C. 1988. Feasibility of drug screening with panels of tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research** 48: 589-601.
- Alonso-Valle, H., Acha, O., Garcia-Palomo, J.D., Farinas-Álvarez, C., Fernandez-Mazarrasa, C., Farinas, M.C. 2003. Candidemia in Tertiary Care Hospital: Epidemiology and Factors Influencing Mortality. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** 22: 254-257.
- Altenburg, F.L., Biondo-Simões, M.L.P., Bahten L.C.V. 2009. Faecal Occult Blood (FOB) Test Associated with a Questionnaire of Signs and Symptoms in Screening for Colorectal Câncer. **Revista Brasileira de Coloproctologia** 29(1): 57-62.
- Alves, A.P.N.N., Guedes, R.C., Costa-Lotufo, L.V. 2004. Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker. **Acta Cirúrgica Brasileira** 19(4): 251-258.
- Amar, A., Chedid, H.M., Franzi, S.A., Rapoport, A. 2010. Diagnostic and therapeutic delay in patients with larynx câncer at a reference public hospital. **Brazilian urnal of otorhinolaryngology** 76(6): 700-703.
- Balabanov, S., Gontarewicz, A., Ziegler, P. 2007. Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A(eIF5A): a novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach. **Blood** 109: 1701–1711.
- Banerjee, S.N., Emori, T.G., Culver, D.H., Gaynes, R.P., Jarvis, W.R., Horan, T., Edwards, J.R., Tolson, J., Henderson, T., Martone, W.J. 1991. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. **American Journal of Medicine** 91: 86-89.
- Barnes S. 2010. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. **Lymphatic Research and Biology** 8(1): 89-98.

- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. 2000. Yeasts: characteristics and identification. Third edition.
- Barros, J.A., Valladares, G., Faria, A.R., Fugita, E.M., Ruiz, A.P., Vianna, A.G.D., Trevisan, G.L., De Oliveira, F.A.M. 2006. Early diagnosis of lung câncer: the great challenge Epidemiological variables, clinical variables, staging and treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia** 32(3): 221-7.
- Basma, R., Barada, G., Ojaimi, N., Khalaf R.A. 2009. Susceptibility of *Candida albicans* to common and novel antifungal drugs, and relationship between the mating type locus and resistance, in Lebanese hospital isolates. **Mycoses** 52: 141–148.
- Bassetti, M., Ansaldi, F., Nicolini, L., Malfatto, E., Molinari, M.P., Mussap, M., Rebesco, B., Bobbio, Pallavicini, F., Icardi, G., Viscoli, C. 2009. Incidence of candidaemia and relationship with fluconazole use in an intensive care unit. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 64(3): 625-9.
- Bergold, A.M., Georgiadis, S. 2004. New antifúngic drugs: A review. Curitiba-PR, **Visão Acadêmica** 5(2): 159-172.
- Berto, S.J.P., Carvalhaes, M.A.B.L., Moura, E.C. 2010. Smoking associated with other behavioral risk factors for chronic non-communicable diseases. **Caderno de Saúde Pública** 26(8): 1573-1582.
- Bezerra, D.P., Castro, F.O., Alves, A.P.N.N., Pessoa, C., Moraes, M.O., Silveira, E.R., Lima, M.A.S., Elmiro, F.J.M., Costa-Lotufo, L.V. 2006. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 39: 801–807.
- Blot, S.I., Vandewoude, K.H., Hoste, E.A., Colardyn, F.A. 2002. Effects of Nosocomial Candidemia on Outcomes of Critically ill Patients. **American Journal of Medicine** 113:480-485.
- Bogacz, A., Mrozikiewicz, P.M., Bartkowiak-Wieczorek, J., Czerny, B., Karasiewicz, M., Kujawski, R., Mikołajczak, P.L., Seremak-Mrozikiewicz, A., Grześkowiak, E., Bobkiewicz-Kozłowska, T. 2010. The influence of a standardized soybean extract (Glycine max) on the expression level of CYP3A enzymes and pregnane X receptor in in vivo model. **Ginekologia Polska** 81(11): 814-820.
- Borges, A.S., Ferreira, M.S., Túlio, M., Silvestre, M.T.A., Nishioka, A.S., Rocha, A. 1997. Histoplasmosse em pacientes imunodeprimidos: estudo de 18 casos observados em Uberlândia, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 30: 119-124.
- Borzan, J., Tall, J.M., Zhao, C., Meyer, R.A., Raja, S.N. 2010. Effects of soy diet on inflammation-induced primary and secondary hyperalgesia in rat. **European Journal of Pain** 14(8): 792-8.
- Boucher, B.A., Cotterchio, M., Kreiger, N., Thompson, L.U. 2008. Soy formula and breast câncer risk. **Epidemiology** 19(1): 165-6.
- Caggiano, G., Iatta, R., Laneve, A., Manca, F., Montagna, M.T. 2008. Observational study on candidaemia at a university hospital in southern Italy from 1998 to 2004. **Mycoses** 51(2): 123-8.
- Carvalho, A.C.B., Nunes, D.S.G., Baratelli, T.G., Shuqair, M.S.A.Q., Netto, E.M. 2007. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T e C Amazônia**, 5(11): 26-32.

- Chang, A., Neofytos, D., Horn, D. 2008. Candidemia in the 21st century. **Future Microbiology** 3: 463-472.
- Chen-Chang, Y., Nair, M.G., Nitiss, J.L. 1995. Metabolites of Daidzein and Genistein and Their Biological Activities. **Journal of Natural Products** 58 (12): 1901–1905.
- Chen, S.C.A. 2002. Cryptococcosis in Australasia and the treatment of cryptococcal and other fungal infections with liposomal amphotericin B. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy** 49: 57-61.
- Chen, X., Tang, L.J., Sun, Y.N., Qiu, P.H., Liang, G. 2010. Syntheses, characterization and antitumor activities of transition metal complexes with isoflavone. **Journal of Inorganic Biochemistry** 104(4): 379-84.
- Cleveland, M. Farley, M.MHarrison, L.H., Stein, B., Hollick, R., Lockhart, S.R., Magill, S.S.M., Derado, G., Park, B.J., Chiller, T.M. 2012. Changes in Incidence and Antifungal Drug Resistance in Candidemia: Results From Population-Based Laboratory Surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. **Clinical Infect Disease** 55(10): 1352-61
- Chiesa, G., Rigamonti, E., Lovati, M.R., Disconzi, E., Soldati, S., Sacco, M.G., Catò, E.M., Patton, V., Scanziani, E., Vezzoni, P., Arnoldi, A., Locati, D., Sirtori, C.R. 2008. Reduced mammary tumor progression in a transgenic mouse model fed an isoflavone-poor soy protein concentrate. **Molecular Nutrition & Food Research** 52(10): 1121-9.
- Clinical and Laboratory Standards Intitute (CLSI). 2008. *Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard-thrird edition M27-A3*. Wayne, PA.
- Colombo, A.L. 2003. Contribuições para o entendimento da epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. e para sua abordagem terapêutica. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36(5): 599-6-7.
- Colombo, A.L., Guimarães, T. 2003. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36: 599-607.
- Colombo, A.L., Nucci, M., Park, B.J., Nouér, S.A., Arthington-Skaggs, B., da Matta, D.A., Warnock, D., Morgan, J. 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nation wide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology** 44: 2816-2823.
- Cuenca-Estrella, M., Lee-Yang, W., Ciblak, M.A., Arthington-Skaggs, B.A., Mellado, E., Warnock, D.W., Rodriguez-Tudela, J.L. 2002. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and Eucatest broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 46(11): 3644-3647.
- De Hoog, G.S., Guarro, J. 2001. *Atlas of Clinical Fungi*. Central bureau voor Schimmel cultures, Universitat Rovira i Virgili.
- Deray, G. 2002. Amphotericin B nephrotoxicity. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 49: 37-41.
- Di Bonaventura, G., Pompilio, A., Picciani, C., Iezzi, M., D'Antonio, D., Piccolomini, R. 2006. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** 50: 3269-76.
- Diekema, D.J., Messer, S.A., Boyken, L.B., Hollis, R.J., Kroeger, J., Tendolkar, S., Pfaller, M.A. 2007. *In vitro* activity of seven systemically active antifungal agents against a large

- global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. **Journal of Clinical Microbiology** 47(10): 3170-3177.
- Diekema, D., Arbefeville, S., Boyken, L., Kroeger, J., Pfaller, M. 2012. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease** 73 (1): 45-48. 2012.
- Dignani, M.C., Solomkin, J.S., Anaissie, E. 2003. *Candida*. In: Anaissie, E., McGinnis, M.R., Pfaller, M.A. (eds) **Medical Mycology** 195-239.
- Dubini, F., Bellotti, M.G., Frangi, A., Monti, D., Saccomani, L. 2005. *In vitro* antimycotic activity and nail permeation models of a piroctone olamine (octopirox) containing transungual water soluble technology. **Arzneimittelforschung** 55(8): 478-83.
- Eberhard, Y., McDermott, S.P., Wang X., Venugopal, M.G.A., Wood, T.E., Hurren, R., Datti, A., Batey, R. A., Wrana, J., Antholine, W.E., Schimmer, Dick, J.E.A.D. 2011. Chelation of intracellular iron with the antifungal agent ciclopirox olamine induces cell death in leukemia and myeloma cells. **Blood** 114(14): 3064-3073.
- Eggimann, P., Garbino, J., Pittet, D. 2003. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. **Lancet Infect Diseases** 3: 772-85.
- Espinel-Ingroff. 2008. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micología** 25: 101-106.
- Falagas, M.E., Apostolou, K.E., Pappas, V.D. 2006. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** 25: 419-425.
- Farina, C., Vailati, F., Manisco, A., Goglio, A. 1999. Fungaemia survey: a 10-year experience in Bergamo, Italy. **Mycoses** 42(9-10): 543-8.
- Fenner, R., Betti, A.H., Mentz, L.A., Rates, S.M.K.. 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas** 42(3): 369-394.
- Ferreira, V.F., Pinto, A.C. 2010. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova** 33(9): 1829-1829.
- Filippin, F.B., Souza, L.C. 2006. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences** 42: 167-194.
- Flattery, A.M., Hickey, E., Gill, C.J., Powles, M.A., Misura, A.S., Galgoci, A.M., Ellis, J.D., Zhang, R., Sandhu, P., Ronan, J., K. Abruzzo, G.A. 2011. Efficacy of Caspofungin in a Juvenile Mouse Model of Central Nervous System Candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 55(7): 3491-3497.
- Fonseca, L.A.M., eluf-neto, J., Wunsch Filho, V. 2010. Tendências da mortalidade por câncer nas capitais dos estados do Brasil, 1980-2004. **Revista da Associação Médica Brasileira** 56(3): 309-12.
- Fortes, R.C., Novaes, M.R.C.G. 2006. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos Agaricales e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. **Revista Brasileira de Câncerologia** 52(4): 363-371.
- França, J.C.B., Ribeiro, C.E.L., Queiroz-Telez, F. 2008. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(1): 23-28.

- França, L.B., Oliveira, M.A., Small, I.Á., Zukin, M., Araújo, L.H.L. 2011. Adjuvant therapy for non-small cell lung câncer. **Jornal Brasileiro de Pneumologia** 37(3): 354-359
- Franci, R., Pecile, P. 2005. Central venous catheter-related infection due to *Candida membranaefaciens*, a new opportunistic azole-resistant yeast in a câncer patient: a case report and a review of literature. **Mycoses** 48:357-359.
- Funari, P.G., Andres, R.S., Hamilton P., Vilhordo, D.W., Breigeiron, R. 2011. Colorectal câncer: epidemiology, diagnosis and treatment. **Acta médica** 32: 61-70.
- Geran, R.I., Greenberg, N.H., Macdonald, M.M., Schumacher A.M., Abbott B.J. 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal and other biological systems. **Câncer Chemotherapy Reports** 3: 1-102.
- Giolo, M.P., Svidzinski, T.I.E. 2010. Phisiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 46(3): 225-234.
- Girmenia, C., Pizzarelli, G., Cristini, F., Barchiesi, F., Spreghini, E., Scalise, G., Martino, P. 2006. *Candida guilliermondii* Fungemia in Patients with Hematologic Malignancies. **Journal of Clinical Microbiology** 44: 2458-2464.
- Godoy, P., Tiraboschi, I.N., Severo, L.C., Bustamante, B., Calvo, B., Almeida, L.P., da Matta, D.A., Colombo, A.L. 2003. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp bloodstream isolates from latin american hospitals. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98: 401-405.
- Goldman, G.H., Ferreira, M.E.S., Marques E.R., Savoldi, M., Perlin, D., Park, S., Martinez, P.C.G., Goldman, M.H., Colombo, A.L. 2004. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 50(1): 25-32.
- Gómez, J., García-Vázquez, E., Espinosa, C., Ruiz, J., Canteras, M., Hernández-Torres, A., Baños, V., Herrero, J.A., Valdés, M. 2010. Nosocomial candidemia at a general hospital: prognostic factors and impact of early empiric treatment on outcome (2002-2005). **Medicina Clinica** 23(1): 1-5.
- Guha, N., Kwan, M.L., Quesenberry, C.P., Weltzien, E.K., Castillo, A.L., Caan, B.J. 2009. Soy isoflavones and risk of câncer recurrence in a cohort of breast câncer survivors: the Life After Câncer Epidemiology study. **Breast Câncer Research and Treatment** 118(2): 395-405.
- Guedes, R.C.M., Nogueira, N.G.P., Fusco-Almeida, A.M., Souza, C.R.F, Oliveira, W.P. 2009. Atividade Antimicrobiana de Extratos Brutos de *Petiveria alliacea* L. **Latin American Journal of Pharmacy** 28 (4): 520-4.
- Guerra, M.R., Gallo, C.V.M., Mendonça, G.A.S. 2005. The risk of câncer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies. **Revista Brasileira de Câncerologia** 51(3): 227-234.
- Guido, R.V.C., Andricopulo, A.D., Oliva, G. 2010. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados** 24: 81-98.
- Harada, I., Mitsui, K., Uchida, K., Yamaguchi, H. 1997. *In vitro* antifungal activity of rilopirox, a new hydroxypyridone antimycotic agent. **Journal of the Japan Antibiotics Research** 50(2): 195-9.

- Hernández-Cañaveral, I., Becerra, G., Jiménez-Cordero, A., Jean-Baptiste Michel, J.B., Plascencia, A., Domínguez-Hernández M. 2009. *Candida albicans* isolated from human fungaemia induces apoptosis in an experimental endocarditis model. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 104: 858-861.
- Henry, M.A.C.A., Lerco, M.M., Oliveira, W.K., Tomal, K.T., Costa, A.C.F., Michelin, O.C., Rodrigues, M.A.M. 2008 Small cell carcinoma of the esophagus: clinical pathologic study of two cases. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva** 21(1): 38-40.
- Hinrichsen, S.L., Falcão, É., Vilella, T.A.S., Rêgo, L., Lira, C., Almeida, L. 2009. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 40(2): 325-328.
- Hisamitsu I.D., Tokiwa, S., Sakamaki, K., Nishio, K., Isotani, S., Muto, S., Hama, T., Masuda, H., Horie, S. 2010. Combined inhibitory effects of soy isoflavones and curcumin on the production of prostate-specific antigen. **The Prostate**. 70(10): 1127-1133.
- Hof, H. Mycoses in the elderly. 2010. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 29: 5-13.
- Hoffmann, C.C., Danucalov, I.P., Purim, K.S.M., Queiroz-Telles, F. 2011. Infecções causadas por fungos demácios e suas correlações anátomo-clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 86(1): 138-141.
- Horasan, E.S., Ersöz, G., Göksu, M., Otag, F., Kurt, A.O., Karaçorlu, S., Kaya, A. 2010. Increase in *Candida parapsilosis* fungemia in critical care units: a 6-years study. **Mycopathologia** 170(4): 263-8.
- Horn, D.L., Ostrosky-Zeichner, L., Morris, M.I., Ullmann, A.J., Wu, C., Buell, D.N., Kovanda, L.L., Cornely, O.A. 2010. Factors related to survival and treatment success in invasive candidiasis or candidemia: a pooled analysis of two large, prospective, micafungin trials. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** 29(2): 223-9.
- Hsu, A., Bray, T.M., Ho, E. 2010. Anti-inflammatory activity of soy and tea in prostate cancer prevention. **Experimental Biology and Medicine** 235(6): 659-67.
- Hussar, D. A. 2000. New drugs. Part I. **Nursing** 30: 55-62.
- Idnurm, A., Bahn, Y.S., Nielsen, K., Lin, X., Fraser, J.A., Heitman, J. 2005. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews Microbiology** 3: 753-764.
- Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2010. Incidência de Câncer no Brasil. Brasília: **INCA**; 2009.
- Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2012. Incidência de Câncer no Brasil. 2011. **Revista Brasileira de Câncerologia** 57(4): 557.
- Iwata, K., H. Yamaguchi. 1981. Studies on the mechanism of antifungal action of ciclopiroxolamine. **Drug Research** 31: 1323-1327.
- Jacobsen, I.D., Brunke, S., Seider, K., Schwarzmüller, T., Firon, A., Kuchler, K., Hube B. 2010. *Candida glabrata* Persistence in Mice Does Not Depend on Host Immunosuppression and Is Unaffected by Fungal Amino Acid Auxotrophy. **Infection and Immunity** 78(3): 1066-1077.

- Jarvis, J.N., Bicanic, T., Harrison, T.S. 2009. Treatment of HIV-associated Cryptococcal Meningitis in South Africa: The Case for Amphotericin B over conventional dose fluconazole for initial therapy. **Southern African Journal of HIV Medicine** 36-39.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thum, M.J. 2009. Câncer Statistics, 2009. **Câncer Journal clinical** 59: 225-249.
- Jones, E.D. 2003. Onychomycosis: Current Treatment Options. **Journal of the American Academy of Nurse Practitioners** 15: 165–169.
- Kanafani Z.A., Perfect J.R. 2008. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. **Clinical Infectious Diseases** 46: 120-128.
- Kang, J., Badger, T.M., Ronis, M.J., Wu, X. 2010. Non-isoflavone phytochemicals in soy and their health effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58(14): 8119-33.
- Kang, X., Jin, S., Zhang, Q. 2009. Antitumor and antiangiogenic activity of soy phytoestrogen on 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene-induced mammary tumors following ovariectomy in Sprague-Dawley rats. **Journal Food of Science** 74(7): 237-42.
- Karlowsky, J.A., Zhanel, G.G., Klyma, K.A., Hobana, D.J., Kabani, A.M. 1997. Candidemia in a Canadian tertiary care hospital from 1976 to 1996. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 29(1): 5-9.
- Kelly, S.L., Lamb, D.C., Baldwin, B.C., Corran, A., Diane, J., Kelly, E. 1997. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, Sterol delta 22-Desaturase, and Inhibition by Azole Antifungal Agents. **The Journal of Biological Chemistry** 272: 9986-9988.
- Kersun, L., Reilly, A. Ingram, M. Nicholaou, M. McGowan, K. Antifungal susceptibility against yeasts isolated from pediatric oncology patients. 2008. **Medical Mycology** 46: 337-43.
- Kim, Y., Alpmann, P., Blaum-Feder, S., Krämer, S., Endo, T., Lu, D., Carson, D., Schmidt-Wolf, I.G. 2011. Increased *in vivo* efficacy of lenalidomide by addition of piroctone olamine. **In Vivo** 25(1):99-103.
- Korting, H.C., Grundmann-Kollmann, M. 1997. The hydroxypyridones: a class of antimycotics of its own. **Mycoses** 40: 243–247.
- Kuete, V., Ngameni, B., Simo, C.C., Tankeu, R.K., Ngadjui, B.T., Meyer, J.J., Lall, N., Kuate, J.R. 2008. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology** 120: 17–24.
- Kuper KM, Coyle EA, Wanger A. 2012. Antifungal susceptibility testing: a primer for clinicians. **Pharmacotherapy** 32(12): 1112-22.
- Lacaz, C.S., Porto, E.M., Costa, J.E., Heins-Vaccari, E.M., Melo, N.T. 2002. **Tratado de micologia médica**. 9ªed. São Paulo: Sarvier.
- Lassance, F.AC., Lassance, P.M.S., Garicochea, B., Cotti, G.C.C., Cutait, R. 2012. Câncer colorretal e síndromes hereditárias. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília** 1(1): 34-50.
- Li, H., Xue, J., Shi, L., Lei, G., Zhu, H. 2008. Synthesis, crystal structure and antimicrobial activity of deoxybenzoin derivatives from genistein. **European Journal of Medicinal Chemistry** 43(3): 662–667.
- Lin, X., Heitman, J. 2006. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex, **Microbiology** 60: 69-105.

- Lodén, M., Wessman, C. 2000. The antidandruff efficacy of a shampoo containing piroctone olamine and salicylic acid in comparison to that of a zinc pyrithione shampoo. **International Journal of Cosmetic Science** 22(4): 285-9.
- Löffler, J., Einsele, H., Hebart, H., Schumacher, U., Hrastnik, C., Daum, G. 2000. Phospholipid and sterol analysis of plasma membranes of azole-resistant *Candida albicans* strains. **FEMS Microbiology Letters** 185(1): 59-63.
- MacCallum, D.M., Coste A., Ischer F., Jacobsen M.D., Odds F.C., Sanglard, D. 2010. Genetic Dissection of Azole Resistance Mechanisms in *Candida albicans* and Their Validation in a Mouse Model of Disseminated Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 54: 1476 - 1483.
- Machado, M.C.F.P., Melo-Junior, M.R. 2009. Avaliação do efeito antitumoral da *Kalanchoe brasiliensis* sobre o sarcoma 180 em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia** 01: 01-06.
- Magagnin, C.M., Stopiglia, C.D.O., Vieira, F.J., Heidrich, D., Machado, M., Vetoratto, G., Lamb, F.L., Scroferneker, M.L. 2011. Antifungal susceptibility of dermatophytes isolated from patients with chronic renal failure. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 86(4): 694-701.
- Mănescu, O., Lupuleasa, D., Miron, D.S., Budura, E.A., Rădulescu, F.S. 2011. *In vitro* drug release from topical antifungal pharmaceutical formulations. **Farmacia** 59(1): 15-23.
- Matsuki, M., Kanatsu, H., Watanabe, T., Ogasawara, A., Mikami, T., Matsumoto, T. 2006. Effects of antifungal drugs on proliferation signals in *Candida albicans*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** 29(5): 919-22.
- Mattos Oliveira, F., Severo, C.B., Guazzelli, L.S., Severo, L.C. 2007. *Cryptococcus gattii* fungemia: report of a case with lung and brain lesions mimicking radiological features of malignancy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 49(4): 263-265.
- McTiernan, A., Porter, P., Potter, J.D. 2008. Breast cancer prevention in countries with diverse resources. **Câncer** 113(8): 2325-30.
- Medeiros, C.S., Pontes-Filho, N.T., Camara, C.A., Lima-Filho, J.V., Oliveira, P.C., Lemos, S.A., Leal, A.F.G., Brandão, J.O.C., Neves, R.P. 2010. Antifungal activity of the naphthoquinone beta lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone immunosuppressed Swiss mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 43: 345-349.
- Medrano, D., Brilhante R., Cordeiro, R.A., Rocha, M., Rabenhorst, S., Sidrim J. C. 2006. Candidemia in a Brazilian hospital: The importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto Medicina Tropical São Paulo** 48(1): 17-20.
- Meinerz, A.R.M., Cleff, M.B., Nascente, P.S., Nobre, M.O., Schuch, L.F.D., Antunes, T.A., Xavier, M.O., Meireles, M.C.A., Mello, J.R.B. 2007. Effects of high doses of terbinafine and itraconazole in Wistar rats. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 43: 105-109.
- Melo, G.M., Kowalski, L.P. 2009. Risk factors analysis to pulmonary complications in postoperative laryngeal cancer patients: retrospective study from 1985 to 1996. **Revista brasileira de cirurgia de cabeça e pescoço** 38 (4).
- Messina, M., Nagata, C. Wu, A.H. 2006. Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. **Nutrition and Câncer** 55: 1-12.

- Mendes, C.R.S., Sapucaia, R.A., Ferreira, L.S.M. 2010. Surgical treatment of colorectal câncer: three-year historical series of a health service in Savador, Bahia, Brazil. **Revista brasileira de coloproctologia** 30(4): 440-443.
- Messina, M.J., Wood, C.E. 2008. Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast câncer risk: analysis and commentary. Review. **Nutrition and Câncer** 3: 7-17.
- Micelli, M.H., Díaz, J.A., Lee, S.A. 2011. Emerging opportunistic yeast infections. Review. **The Lancet Infectious Diseases** 11(2): 142-51.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** 65(1-2): 55-63.
- Niewerth, M., D. Kunze, M. Seibold, M. Schaller, H. C. Korting, and B. Hube. 2003. Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 47: 1805-1817.
- Nolen, G.A., Baines, D., Poynter, J.I., Weaver, J.E., Slough, C.L. 1989. The effects of dietary iron supplementation on the toxicity of piroctone olamine in the growing rat. **Drug and Chemical Toxicology** 12(2): 111-21.
- Nucci, M., Marr, K.A. 2005. Emerging Fungal Diseases. **Clinical Infectious Diseases** 41: 521-6.
- Oliveira, E.X.G., Melo, E.C., Pinheiro, R.S., Noronha, C.P., Carvalho, M.S. 2011. Access to câncer care: mapping hospital admissions and high-complexity outpatient care flows. The case of breast câncer. **Caderno de Saúde Pública** 27(2): 317-326.
- Oliveira, E.X.G., Melo, E.C.P., Pinheiro, R.S., Noronha, C.P., Carvalho, M.S. 2008. Effects of dietary supplementation with agaricales mushrooms and other medicinal fungus on therapy against the câncer. **Revista Brasileira de Câncerologia** 52(4): 363-371.
- Oliveira, F.M., Fernandes, S.S., Severo, C.B., Guazzelli, L.S., Severo, L.C. 2007a. *Histoplasma capsulatum* fungemia in patients with acquired immunodeficiency syndrome: detection by lysis-centrifugation blood-culturing technique. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 49(3): 135-8.
- Oliveira, F.M., Severo, C.B., Guazzelli, L.S., Severo, L.C. 2007b. *Cryptococcus gattii* fungemia: report of a case with lung and brain lesions mimicking radiological features of malignancy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 49(4): 263-5.
- Oliveira, P.C., Medeiros, C.S.Q., Macêdo, D.P.C., Andrade, S.L., Correia, M.T.A.L., Mesquita, S.D., Lima-Neto, R.G., Neves R.P. 2010. Ciclopirox olamine: an antifungal alternative against cryptococcosis. **Letters in Applied Microbiology** 51(5): 485-489.
- Oliveira, J.A.A., Said, R.A., Cartaxo, R.S., Santos, J.A.M., Gondim, R.L.P. 2012. Metástase laríngea por adenocarcinoma de próstata: uma entidade rara. **Brazilian jornal of otorhinolaryngology** 78(3): 135-135.
- Orhan, I., Özçelik, B., Kartal, M., Aslan, S., Bilge, S., Özgüven, M. 2007. Quantification of daidzein, genistein and fatty acids In soybeans and soy sprouts, and some bioactivity studies. **Acta Biologica Cracoviensia** 49(2): 61-68.
- Ortega, M., Marco, F., Soriano, A., Almela, M., Martínez, J.A., Pitart, C., Mensa, J. 2010. *Candida* spp. bloodstream infection: influence of antifungal treatment on outcome. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 65(3): 562-8.

- Ostrosky-Zeichner, L., Kullberg, B.J., Bow, E.J., Hadley S., León, C., Nucci, M., Patterson, T.F., Perfect, J.R. 2011. Early treatment of candidemia in adults: a review. **Medical Mycology** 49: (2): 113-120.
- O'Shaughnessy, E.M., Lyman, C.A., Walsh, T.J. 2009. Amphotericin B: Polyene Resistance Mechanisms. **Antimicrobial Drug Resistance Infectious Disease** 295-305.
- Pagano, L., Fianchi, L., Fanci, R., Candoni, A., Caira, M., Posteraro, B., Morselli, M., Valentini, C.G., Farina, G., Mitra, M.E., Offidani, M., Sanguinetti, M., Tosti, M.E., Nosari, A., Leone, G., Viale, P. 2010. Caspofungin for the treatment of candidaemia in patients with haematological malignancies. **Clinical Microbiology and Infection** 16(3): 298-301.
- Pappas, P.G., Rex, J.H., Lee, J., Hamill, R.J., Larsen, R.A., Powderly, W., Kauffman, C.A., Hyslop, N., Mangino, J.E., Chapman, S., Horowitz, H.W., Edwards, J.E., 2003. Dismukes, W.E. The NIAID Mycoses Study Group: a prospective observational study of candidemia, epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infectious Diseases** 37: 634-43.
- Park, Y.K., Aguiar, C.L., Alencar, S.M., Scamparini, A.R.P. 2001. Biotransformação de b-glicosil isoflavonas de soja em isoflavonas agliconas por b glicosidase fúngica. **Documentos da Embrapa** 169 (1): 33- 36.
- Paulina, E. P.D., Krista, A. P., Teija, T. H., Tarja, N., Paul, T., Sari, I. 2009. Dietary sources of lignans and isoflavones modulate responses to estradiol in estrogen reproductively intact mice. **Molecular Nutrition & Food Research** 53: 996 – 1006.
- Perabo, F.G., Von, Löw, E.C., Ellinger, J., von Rücker, A., Müller, S.C., Bastian, P.J. 2008. Soy isoflavone genistein in prevention and treatment of prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Disease** 11(1): 6-12.
- Pereira, D.N., Nader, S.S., Nader, P., Martins, P.G., Furlan, S.P., Hentges, C.R. 2009. Disseminated *Trichosporon* spp infection in preterm newborns: a case report. **Journal of Pediatrics** 85(5): 459-61.
- Pemán, J., Cantón, E., Quindós, G., Eraso, E., Alcoba, J., Guinea, J., Merino, P., Ruiz-Pérez-de-Pipaon, M.T., Pérez-del-Molino, L., Linares-Sicilia, M.J., Marco, F., García, J., Roselló, E.M., Gómez-G-de-la-Pedrosa, E., Borrell, N., Porras, A., Yagüe, G. 2012. Epidemiology, species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 67(5): 1181-7.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Gibbs, D.L., Newell, V.A., Nagy, E., Dobiasova, S., Rinaldi, M., Barton, R., Veselov A. 2008. *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology** 66: 515-521.
- Pfaller, M.A., Messera, S.A., Boyken, L. 2004. *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 48: 201-205.
- Pfaller, M.A., Messera, S.A., Boyken, L., Rice, C., Tendolkar, S., Hollis, R.J., Doern, G.V., Diekema, D.J. 2005. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **Journal Clinical and microbiology** 43: 2163-2167.

- Piérard-Franchimont, C., Goffin, V., Henry, F., Uhoda, I., Braham, C., Piérard, G.E. 2002. Nudging hair shedding by antidandruff shampoos. A comparison of 1% ketoconazole, 1% piroctone olamine and 1% zinc pyrithione formulations. **International Journal of Cosmetic Science** 24(5): 249-56.
- Piérard-Franchimont, C., Uhoda, E., Loussouarn, G., Saint-Léger, D., Piérard, G.E. 2003. Effect of residence time on the efficacy of antidandruff shampoos. **International Journal of Cosmetic Science** 25(6): 267-71.
- Pinhat, E.C., Borba, M.G.S., Ferreira, M.L., Ferreira, M.A., Fernandes, R.K., Nicolaou, S.K., Okamoto, C.T., Neto, C.F.O. 2012. Colonização fúngica em recém-natos de muito baixo peso: um estudo de coorte. **Journal of Pediatrics** 88(3): 211-216.
- Portas, J., Socci, C.P., Scian, E.P., Queija, D.S., Ferreira, A.S., Dedivitis, R.A., Barros, A.P.B. 2011. Swallowing after non-surgical treatment (radiation therapy / radiochemotherapy protocol) of laryngeal câncer. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology** 77(1): 96-101.
- Poston, G.J., Adam, R., Alberts, S. 2005. Oncosurge: a strategy for improving resectability with curative intent in metastatic colorectal câncer. **Journal of Clinical Oncology** 23: 7125-34.
- Povoa, P., Gonçalves-Pereira, J. 2011. Treatment of candidemia in adult patients without neutropenia - an inconvenient truth. **Critical Care** 15: 114.
- Qi, L., Xu, Z. 2006. *In vivo* antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 16(16): 4243-4245.
- Quintero, C.H.G. 2010. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. **Infectio** 14: 172-S180.
- Raynal, N.J., Momparler, L., Charbonneau, M., Momparler, R.L. 2008. Antileukemic Activity of Genistein, a Major Isoflavone Present in Soy Products. **Journal of Natural Products** 71(1): 3-7.
- Ramírez, M.J.F., Ferriol, E.E., Doménech, F.G., Llatas, M.C., Suárez-Varela, M.M., Martinez, R.L. 2003. Psychosocial adjustment in patients surgically treated for laryngeal câncer. **Otolaryngology– Head And Neck Surgery** 129(1): 92-97.
- Rex, J.H., Pfaller, M.A., Walsh, T.J. 2001. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clinical Microbiology Reviews** 14: 643-658.
- Ribeiro, L.C., Hahn, R.C., Favalessa, O.C., Tadano, T., Fontes, C.J. 2009. Systemic mycosis: factors associated with death among patients infected with the human immunodeficiency virus, Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil, 2005-2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42: 698-705.
- Ricciotti, H.A., Khaodhiar, L., Blackburn, G.L. 2005. Daidzein-rich isoflavone-aglycones for menopausal symptomsInternational. **Journal of Gynecology & Obstetrics** 89(1): 65-6.
- Rivas, P., Serrano, R.Q. 2003. Utilidad clínica de las Pruebas de susceptibilidade antimicótica. **Revista colombiana de câncerologia** 34-42.
- Roque, V. M. N.; Forones, N. M. 2006. Evaluation of the toxicity and quality of life in patients with colorectal câncer treated with chemotherapy. *Arquivos de Gastroenterologia* 43: 2-5.
- Rossi, M., Bosetti, C., Negri, E., Laggiou, P., La Vecchia, C. 2010. Flavonoids, proanthocyanidins, and câncer risk: a network of case-control studies from Italy. **Nutrition and Câncer** 62(7): 871-7.

- Ruddon, R. W. 2007. **Câncer Biology**. Oxford, Oxford University Press.
- Ruiz, L.S.R., Montelli, A.C., Sugizaki, M.F., Silva, E.G., Batista, G.C.M., Moreira, D., Paula, C.R. 2012. Outbreak of fungemia caused by *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: Molecular investigation through microsatellite. **Revista Iberoamericana de Micología**, 10: 1130-1406.
- Saad, E.D., Hoff, P.M., Cernelós, R.P., Katz, A., Novis, Y.A.S., Peitrocola, M., Hamerschlag, M., Tabacof, J., Gansl, R.C., Simon, S.D. 2002. Common toxicity criteria of the National Câncer Institute. **Revista Brasileira de câncerologia** 48(1): 63-96.
- Salas, M.P. Celiz, G. Geronazzo, H., Daz, M., Resnik, S. L. 2011. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry** 124(4): 1411-1415.
- Salomão, R., Diament, D., Rigatto, O., Gomes, B., Silva, E., Carvalho, N.B., Machado, F.R. 2011. Diretrizes para tratamento da sepse grave/choque séptico: abordagem do agente infeccioso - controle do foco infeccioso e tratamento antimicrobiano. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva** 23(2): 145-157.
- Santos Junior, J.C.M. 2008. Câncer ano-reto-cólico: aspectos atuais IV - câncer de cólon - fatores clínicos, epidemiológicos e preventivos. **Revista brasileira de colo-proctologia** 28(3): 378-85.
- Sapolnik, R. 2003. Suporte de terapia intensiva no paciente oncológico. **Jornal de Pediatria** 79: 2-3.
- Sartor, S. G., Eluf-Neto, J., Travier, N., Wünsch Filho, V., Arcuri, A. S. A., Kowalski, L. P., Boffeta, P. 2007. Riscos ocupacionais para o câncer de laringe: um estudo caso-controle. **Caderno de Saúde Pública** 23(6): 1473-1481.
- Schalka, S., Nunes, S., Gomes Neto, A. 2012. Comparative clinical evaluation of efficacy and safety of a formulation containing ciclopirox 8% in the form of a therapeutic nail lacquer in two different posologies for the treatment of onychomycosis of the toes. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 87(1): 19-25.
- Schmidt, A., Rühl-Hörster, B. 1996. *In vitro* susceptibility of *Malassezia furfur*. **Arzneimittelforschung** 46(4): 442-4.
- Schmidt-Rose, T., Braren, S., Fölster, H., Hillemann, T., Oltrogge, B., Philipp, P., Weets, G., Fey, S. 2011. Efficacy of a piroctone olamine/climbazol shampoo in comparison with a zinc pyrithione shampoo in subjects with moderate to severe dandruff. **International Journal of Cosmetic Science** 33(3): 276-82.
- Sellami, A., Sellami, H., Néji, S., Makni, F., Abbes, S., Cheikhrouhou, F., Chelly, H., Bouaziz, M., Hammami, B., Ben Jemaa, M., Khaled, S., Ayadi, A. 2011. Antifungal Susceptibility of Bloodstream *Candida* Isolates in Sfax Hospital: Tunisia. **Mycopathologia** 171(6): 417-422.
- Shao, P.L., Hunag, L.M., Hsueh, P.R. 2006. Invasive fungal infection, laboratory diagnosis and antifungal treatment. **Journal of microbiology immunology and infect** 39: 178-188.
- Sherf, A.F. 1943. A method for maintaining *Phytoplasma sebedonica* in culture for long periods without transfer. **Phytopathology** 33: 330-332.
- Sigle, H.C., Schäfer-Korting, M., Korting, H.C., Hube, B., Niewerth, M. 2006. *In vitro* investigations on the mode of action of the hydroxypyridone antimycotics rilopirox and piroctone on *Candida albicans*. **Mycoses** 49(3): 159-68.

- Silva, P.R., Rabelo, R.A., Terra, A.P., Teixeira, D.N. 2008. Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41: 158-62.
- Silva, J.A.G. 2012. *Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil*. I.N.C. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro.
- Singh-Gupta, V., Zhang, H., Yunker, C.K., Ahmad, Z., Zwier, D., Sarkar, F.H., Hillman, G.G. 2010. Daidzein effect on hormone refractory prostate cancer in vitro and *in vivo* compared to genistein and soy extract: potentiation of radiotherapy. **Pharmaceutical Research** 27(6): 1115-27.
- Soares, M.M.S.R., Cury, A.E. 2001. *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with *tinea pedis*. **Brazilian Journal of Microbiology** 32(2): 130-134.
- Sobel JD. 2004. Combination therapy for invasive mycoses: evaluation of past clinical trial designs. **Clinical Infectious Diseases** 39: 224-227.
- Spellberg, B., Ibrahim, A.S., Edwards Jr., J.E., Filler, S.G. 2005. Mice with Disseminated Candidiasis Die of Progressive Sepsis. **Journal of Infectious Diseases** 192 (2): 336-343.
- Spence, R.A.J., Jonhston P. G. 2001. *Oncology*. Oxford.
- Steiner, C., Arnould, S., Scalbert, A., Manach, C. 2008. Isoflavones and the prevention of breast and prostate cancer: new perspectives opened by nutrigenomics. **British Journal of Nutrition** 99: S78-108.
- Subissi, A., Monti, D., Togni, G., Mailland, F. 2010. Ciclopirox: recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. **Drugs** 70(16): 2133-52.
- Sugizaki, M.F., Rhoden, C.R., Bombonatti, D.M., Montelli, A.C., Martinson, M.E., DE Magalhães Lopes, C.A. 1998. Prevalence and *in vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp isolated from clinical specimens in São Paulo, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia** 15(1): 16-18.
- Thangaraj, A., Branson, P., Bensadoun, E. 2010. Candidemia In The Intensive Care Unit. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 181: 4558.
- Tanaka, K., Adam, R., Shimada, H. 2003. Role of neoadjuvant chemotherapy in the treatment of multiple colorectal metastases to the liver. **British Journal of Surgery** 90(8): 963-9.
- Tolman, J.R., Lephart, E.D., Setchell, K.D., Eggett, D.L., Christensen, M.J 2008. Timing of supplementation of selenium and isoflavones determines prostate cancer risk factor reduction in rats. **Nutrition & Metabolism** 10(5): 31.
- Turkington, P.M., Kennan, N., Greenstone, M.A. 2002. Misinterpretation of the chest x ray as a factor in the delayed diagnosis of lung cancer. **Postgraduate Medical Journal** 78(917): 158-60.
- Van Der Heijden, R., Jacobs, D.I., Snoeijer, W., Hallard, D., Verpoorte, R. 2004. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. **Current Medicine Chemistry** 11: 607-28.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., Coste, A. T. 2012. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology** 71:3687.

- Velasco, E., Thuler, L.C.S., Martins, C.A.S., Nucci, M., Dias, L.M.C., Gonçalves, V.M. S.C. 2000. Epidemiology of Bloodstream Infections at a Câncer Center. **Sao Paulo Medical Journal** 118: 131-138.
- Viudes, A., Pemán, J., Cantón, E., Ubeda, P., López-Ribot, J.L., Gobernado, M. 2002. Candidemia at a Tertiary-Care Hospital: Epidemiology, Treatment, Clinical Outcome and Risk Factors for Death. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** 21: 767-774.
- Watanabe, S., Uesugi, S., Kikuchi, Y. 2002. Isoflavones for prevention of câncer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 56: 302-312.
- Who, W.H.O. 2011. Model List of Essential Medicines (17th edition).
- Weir, S.J., Patton, L., Castle, K., Rajewski, L., Kasper, J., Schimmer, A.D 2011. The repositioning of the anti-fungal agent ciclopirox olamine as a novel therapeutic agent for the treatment of haematologic malignancy. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics** 36(2): 128-34.
- Weisenthal, L.M. 1983. A novel dye exclusion method for testing *in vitro* chemosensitivity of human tumors **Câncer Research** 43: 749-57.
- Xia, Y., Lee K. 2010. Targeting Multidrug Resistance with Small Molecules for Câncer Therapy. **Biomolecules & Therapeutics** 18(4): 375-385.
- Xu, B., Chang, S.K., Liu, Z., Yuan, S., Zou, Y., Tan, Y. 2010. Comparative studies on the chemical and cell-based antioxidant activities and antitumor cell proliferation properties of soy milk manufactured by conventional and commercial UHT methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58(6): 3558-66.
- Younes, R.N., Varella, A.D., Suffredini, I.B. 2007. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics** 62(6): 763-768.
- Yu, L., Ling, G., Deng, X., Jin, J., Jin, Q., Guo, N. 2011. *In vitro* Interaction between Fluconazole and Triclosan against Clinical Isolates of Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Determined by Different Methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 55-7.
- Zandoná, B., Carvalho, L.P., Schimiedt, J.K., Daniela C., Koshimizu, R.T., Mallmann, A.C.M. 2011. Prevalência de adenomas colorretais em pacientes com história familiar para câncer colorretal. **Revista Brasileira de Coloproctologia** 31(2): 147-154.
- Zandonai, A.P., Sonobe, H.M., Sawada, N.O. 2012. Os fatores de riscos alimentares para câncer colorretal relacionado ao consumo de carnes. **Revista da Escola de Enfermagem da USP** 46(1): 234-239.
- Zamboni, M. 2002. Epidemiologia do câncer do pulmão. **Brazilian Journal of Pneumology** 28(1): 41-7.
- Zaragora, R., Perman, J. 2006. Invasive fungal infections in critically ill patients: different therapeutic options and a uniform strategy. **Revista Iberoamericana de Micologia** 23: 59-63.
- Zhang A.Y., Camp, W.L., Elewski B.E. 2007. Advances in Topical and Systemic Antifungals. **Dermatologic Clinics** 25(2): 165-183.

- Zhang, C., Ho, S.C., Lin, F., Cheng, S., Fu, J., Chen, Y. 2010. Soy product and isoflavone intake and breast cancer risk defined by hormone receptor status. **Cancer Science** 101(2): 501-7.
- Zhou, H., Shen, T., Luo, Y., Liu, L., Chen, W., Xu, B., Han, X., Pang, J., Rivera, C.A., Huang, S. 2010. The antitumor activity of the fungicide ciclopirox. **International Journal of Cancer** 127(10): 2467-77.
- Zaoutis, T.E., Prasad, P.A., Localio, A.R., Coffin, S.E., Bell, L.M., Walsh, T.J., Gross, R. 2010. Risk Factors and Predictors for Candidemia in Pediatric Intensive Care Unit Patients: Implications for Prevention. **Clinical Infectious Diseases** 51(5): 38-45.

APÊNDICES – ARTIGOS EM FASE DE SUBMISSÃO

Apêndice A - Octopirox olamina: Uma alternativa para tratamento da candidemia

Octopirox olamine: An alternative for treatment of candidemia

Artigo submetido para a revista

Brazilian Journal of Microbiology

Octopirox olamina: Uma alternativa para tratamento da candidemia

Fabíola Maria Marques do Couto¹; Silene Carneiro do Nascimento²; Patrícia Cariolano de Oliveira³; Isabela Patrícia Lima Silva¹; Rejane Pereira Neves¹ *.

¹ Departamento de Micologia, Centro, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-910, Recife, Brasil.

² Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-910, Recife, Brasil.

³ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-910, Recife, Brasil.

*Correspondência para: Dra. Rejane Pereira Neves.

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-420. Fone: 81 2126.8481, Fax: 81.2126.8480

E-mail: rejadel29@yahoo.com.br

Octopirox olamina: Uma alternativa para tratamento da candidemia

RESUMO

Octopirox olamina ou piroctona olamina é um agente antifúngico que tem demonstrado notável atividade contra fungos agentes de micoses superficiais, ainda não relatado contra agentes de micoses invasivas, a exemplo, candidemia. O acometimento da corrente sanguínea por espécies de *Candida* representa importante causa de morbidade e mortalidade principalmente em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* propriedades antifúngicas de octopirox olamina contra cepas de *Candida* isoladas de sangue.

Material e Métodos: Octopirox olamina foi avaliada quanto ao potencial antifúngico frente a cepas de leveduras agentes de candidemia. Anfotericina B e fluconazol foram usadas no ensaio como fármacos padrões e a concentração inibitória mínima foi determinada seguindo o método de microdiluição indicado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

Resultados: Um total de 43 isolados de *Candida* de diferentes espécies foi analisado. Os dados obtidos mostraram que a atividade antifúngica variou de 0,125 a 0,5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para octopirox olamina, 0,03 a 1,0 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para anfotericina B e 0,5 a 64 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para o fluconazol.

Conclusões: Nesta pesquisa a octopirox olamina mostrou melhor atividade antifúngica *in vitro*, comparada a fármacos convencionais, porém pesquisas experimentais devem ser realizadas para que se possa considerar este fármaco no tratamento de micoses sistêmicas.

Significado e impacto do estudo: Esta foi a primeira vez que octopirox olamina foi testada contra leveduras do gênero *Candida* isoladas de sangue, apresentando resultados promissores. Assim, a atividade antifúngica deste fármaco contra espécies de *Candida* sugere um potencial aplicável para a terapia de candidemia.

Palavras-chave: Atividade antifúngica; Octopirox olamina; *Candida*; Candidemia.

INTRODUÇÃO

Octopirox olamina (OCT) ou piroctona olamina (2-Hidroxi-4-metil-6-(2,4,4-trimetilpencil) 2 (1H)-piridona, sal monoetanolamínico), pertencente a família das hidroxipiridonas, é um agente anticaspa de baixa toxicidade, indicado para formulações de xampus,

condicionadores, tônicos, incluindo géis capilares e desodorantes. Suas propriedades conhecidas como antifúngicas e antioxidantes estão relacionadas a *Malassezia* spp., participante de mecanismos de formação da caspa (DUBINI et al, 2005).

A família de antimicóticos, hidroxipiridona, tem como representantes octopirox, ciclopirox e rilopirox, os quais têm demonstrado notável atividade contra fungos causadores de micoses superficiais (SIGLE et al, 2006).

Diferentemente da maioria dos antifúngicos disponíveis, as hidroxipiridonas não afeta a biossíntese dos esteróis e é metabolizado pela via do citocromo P450. A ação antifúngica desses fármacos envolve a quelação de cátions polivalentes, como o Fe^{3+} , com inibição de enzimas responsáveis pela degradação de peróxidos na célula fúngica (SCHALKA et al, 2012).

Infecções por *Candida* envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco, comprometendo vísceras como resultado de disseminação hematogênica (DIGNANI et al, 2003).

Neste contexto, o acometimento da corrente sanguínea por espécies de *Candida*, também chamado de candidemia, representa importante causa de morbidade e mortalidade principalmente em pacientes internados em unidades de cuidados intensivos. Candidemias causadas por *Candida* não-*albicans* tem representado 30-60% de todos os casos (O'SHAUGHNESSY et al, 2009).

A utilização de fármacos imunodepressores em pacientes submetidos a transplante, antibioticoterapia prolongada, nutrição parenteral, presença de cateter venoso central, entre outros fatores, contribuem para o aumento na frequência dessas infecções (FALAGAS et al, 2006).

O tratamento de sucesso para micoses invasivas envolve uma abordagem combinada com o diagnóstico precoce, administração de antifúngicos e a adequada reversão do quadro neutropênico quando presente. Um dos fármacos de escolha é a anfotericina B, porém muitas vezes, sua toxicidade limita o uso, interferindo no sucesso do tratamento. Portanto é imprescindível a busca de novas alternativas terapêuticas antifúngicas, que resulte num tratamento eficaz para uma menor permanência hospitalar e melhora significativa do paciente, evitando óbito (FERREIRA et al, 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* as propriedades antifúngicas de OCT contra isolados clínicos de *Candida*.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 43 isolados clínicos de *Candida* spp. utilizado neste estudo foi cedido pela Coleção de Culturas URM da Universidade Federal de Pernambuco. Todas as linhagens foram isoladas de amostras de sangue humano e estavam preservadas sob óleo mineral (SHERF, 1943).

O teste de susceptibilidade seguiu o método de microdiluição em caldo, de acordo com a padronização publicada no documento M27-A3 pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Para controle de qualidade foram incluídas nos testes, as linhagens de *C. krusei* ATCC 6528 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 como recomendadas pelos documentos (CLSI, 2008).

Fluconazol (FLZ) e anfotericina B (AMB) foram utilizados na pesquisa como antifúngicos padrões e o meio de cultura utilizado foi RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) com L-glutamina, 2,0g/ L de glicose, sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS). O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22- μ m (Millipore, Darmstadt, Germany).

Dez diferentes concentrações foram usadas, variando de 0,03 a 16 μ g mL⁻¹ para AMB e de 0,125 a 64 μ g/mL⁻¹ para FLZ. OCT (Sigma ®) foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) com solução estoque na concentração 1600 μ g/mL⁻¹. As concentrações testadas de OCT variaram de 0,0625 até 32 μ g/mL⁻¹.

As placas foram incubadas a 37°C, e a leitura visualizada em 24h e 48h de incubação. Dois poços controles, sendo um isento de antifúngico e outro isento de levedura, foram incluídos no ensaio. As leituras foram realizadas visualmente comparando com o crescimento nos poços controle.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível dos isolados testados, em relação ao poço controle (Pfaller et al, 2004). Os ensaios foram realizados em duplicata.

Para o FLZ, isolados com CIMs $\leq$ 8 μ g/mL, foram considerados susceptíveis, assim como, os isolados com CIMs entre 16-32 μ g/mL foram considerados susceptível de uma maneira dose-dependente (SDD) e CIMs $\geq$ 64 μ g/mL, considerados resistentes para o mesmo fármaco. CIM's $>$ 1,0 conferiram resistência para AMB. Diretrizes para a OCT não foram estabelecidas por documentos de referência.

RESULTADOS

Dos 43 isolados de *Candida* utilizados no teste, treze correspondiam a espécie *C. parapsilosis*, dez *C. albicans*, nove *C. tropicalis*, sete *C. guilliermondii*, dois *C. glabrata* e dois *C. kruzei*.

Os testes de susceptibilidade *in vitro* de *Candida* spp. isolada de sangue frente OCT, FLZ e AMB, estão resumidos na Tabela 1. Os dados são apresentados como intervalos de CIM's e médias. Todos os isolados testados foram sensíveis à OCT e AMB, os quais obtiveram comportamento fungicida, sendo observado um total de 100% de inibição no crescimento das leveduras. Entretanto, para o FLZ, antifúngico de atividade fungistática, a leitura foi observada nos poços com 50% de inibição. Para este fármaco algumas cepas foram resistentes. O CIM dos isolados utilizados como controle de qualidade estava dentro dos limites estabelecidos.

OCT e AMB exibiram excelentes atividades *in vitro* contra as espécies de *Candida*, uma vez que todos os isolados foram inibidos pelo caráter fungicida com $\leq 0,5\mu\text{g/mL}$ de OCT e $\leq 1\mu\text{g/mL}$ de AMB. Os isolados que apresentaram resistência ao FLZ corresponderam às espécies *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* com $64\mu\text{g/mL}$. Para este fármaco, os isolados apresentaram CIMs variando entre 0,5 e $64\mu\text{g/mL}$. Para AMB, a variação foi entre 0,03 e $1,0\mu\text{g/mL}$ e OCT apresentou faixa de CIM entre 0,125 e $0,5\mu\text{g/mL}$.

Tabela 1. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol (FLZ), anfotericina B (AMB), e octopirox olamina (OCT) frente espécies de *Candida* como agentes de fungemia.

Espécie	Número (%)	Fármacos	Intervalo CIM ($\mu\text{g/mL}^{-1}$) / média
<i>Candida albicans</i>	10 (23.26%)	AMB	0.03 – 0.5 (0.01)
		FLZ	0.5 – 16 (4.6)
		OCT	0.125 – 0.25 (0.19)
<i>C. parapsilosis</i>	13 (30.23%)	AMB	0.03 – 0.5 (0.10)
		FLZ	0.5 – 64 (6.5)
		OCT	0.125 – 0.5 (0.24)
<i>C. tropicalis</i>	09 (20.93%)	AMB	0.03 – 0.06 (0.03)
		FLZ	0.125 – 64 (7.77)

		OCT	0.125 – 0.5 (0.87)
<i>C. glabrata</i>	02 (4.65%)	AMB	0.03 – 0.03 (0.03)
		FLZ	0.5 – 0.5 (0.5)
		OCT	0.125 – 0.125 (0.12)
<i>C. guilliermondii</i>	07 (16.28%)	AMB	0.03 – 1.0 (0.24)
		FLZ	2.0 – 4.0 (2.85)
		OCT	0.125 – 0.25 (0.18)
<i>C. krusei</i>	02 (4.65%)	AMB	0.03 – 1.0 (0.51)
		FLZ	16 – 32 (24)
		OCT	0.125 – 0.25 (0.19)

Fonte: Fabiola Maria Marques do Couto, 2013.

DISCUSSÃO

A incidência de infecções fúngicas sistêmicas tem aumentado ao longo das duas últimas décadas em paralelo com os avanços nos procedimentos médicos e cirúrgicos (SELLAMI et al, 2011). Apesar dos avanços nas intervenções preventivas, diagnósticas e terapêuticas, infecções fúngicas invasivas causam significativa morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (KANAFANI; PERFECT, 2008).

No grupo de pacientes com diagnóstico de candidemia ou com seus fatores predisponentes, o tratamento deve ser iniciado após o diagnóstico laboratorial. Em outros casos, a detecção precoce de fatores de risco para o desenvolvimento da candidemia, tais como a administração de antibióticos de largo espectro, utilização de cateteres, ventilação mecânica, nutrição parenteral e colonização de fungos, leva ao tratamento empírico, a fim de reduzir a alta mortalidade associada a infecções fúngicas (SALOMÃO et al, 2011).

Neste estudo, não houve grandes variações de CIM para OCT dentre as espécies nos testes de susceptibilidade a antifúngicos *in vitro*. Os valores de CIM variaram entre 0,125 e 0,5µg/mL. Além de possuir poucos efeitos tóxicos e de resistência (KIM et al, 2011), a OCT mostrou excelente atividade antifúngica, com comportamento fungicida, sugerindo o seu valor farmacológico. Informações disponíveis na literatura indicaram mais fraca atividade da

OCT frente a outros fungos como *Malassezia* e dermatófitos (SCHMIDT; RÜHL-HÖRSTER, 1996; MAGAGNIN et al, 2011).

O FLZ tem sido utilizado com sucesso na profilaxia, considerado um fármaco de primeira linha no tratamento de infecções causadas por leveduras. No entanto, a frequência no uso deste azol conduziu ao aumento da resistência dos agentes etiológicos (Yu et al, 2011). Nesta pesquisa foi observada resistência de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* ao FLZ, sendo sensíveis a OCT.

Baseado em trabalho realizado por França et al, (2008), *C. glabrata* e *C. krusei* naturalmente apresentam sensibilidade reduzida ao FLZ. Contudo, tem-se observado taxas de resistência também para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (ALBUQUERQUE ET AL, 2009; QUINTERO, 2010; YU ET AL, 2011). No presente estudo, todos os isolados de *C. glabrata* foram sensíveis ao FLZ, entretanto, cepas de *C. krusei* demonstraram sensibilidade dose-dependente ao fármaco, assim como um isolado de *C. albicans*, corroborando com resultados encontrados por outros autores.

Estudos com testes de susceptibilidade antifúngica evoluíram rapidamente durante a última década e tornou-se uma relevante ferramenta clínica. Informações sobre sensibilidade de fungos a fármacos antifúngicos *in vitro*, auxiliam na escolha de medicamentos mais eficazes, especialmente para micoses sistêmicas, as quais estão se tornando cada vez mais frequentes com mau prognóstico (SELLAMI et al, 2011).

Os resultados desta pesquisa mostraram que os antifúngicos OCT e AMB demonstraram capacidade mais pronunciada quando comparada ao FLZ. Para AMB estes resultados eram esperados, uma vez que é considerado um fármaco fungicida com amplo espectro (JARVIS et al, 2007; O'SHAUGHNESSY et al, 2009). Além disso, este estudo também demonstra a importância da realização de ensaios de sensibilidade *in vitro*, uma vez que alguns isolados de uma mesma espécie apresentaram diferentes perfis de sensibilidade.

A realização e o monitoramento de testes antimicrobianos são importantes, uma vez que visa detectar resistência de micro-organismos para o direcionamento de intervenções e tratamento adequado. No entanto, há uma escassez de estudos sobre sensibilidade de fungos, sobretudo *Candida*, a fármacos da família hidroxipiridona. Esta foi a primeira vez que OCT foi testada contra cepas de *Candida* isoladas de sangue, usando o método de microdiluição em caldo.

A atividade antifúngica deste fármaco contra estas cepas sugere uma nova alternativa para a terapia de candidemia, porém pesquisas adicionais devem ser realizadas para que se

possa considerar este fármaco como tratamento promissor e terapia aplicável para micoses sistêmicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF) e a Pro Reitoria de Pesquisa (PROPESQ) da instituição.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

APOIO FINANCEIRO

Pro Reitoria de Pesquisa (Propesq / UFPE).

**Apêndice B - Avaliação *in vitro* das atividades antifúngica e antineoplásica das
isoflavonas da soja**

In vitro antifungal and anticancer activity of soy isoflavones

Artigo a ser submetido para a revista

Letters in Applied Microbiology

Fabíola Maria Marques do Couto¹; Silene Carneiro do Nascimento²; Oliane Maria Correia Magalhães¹; Rejane Pereira Neves¹ *.

¹ Departamento de Micologia, Centro, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-910, Recife, Brasil.

² Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-910, Recife, Brasil.

*Correspondência para: Dra. Rejane Pereira Neves.

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-420. Fone: 81 2126.8481, Fax: 81.2126.8480
E-mail: rejadel29@yahoo.com.br

Avaliação *in vitro* das atividades antifúngica e antineoplásica das isoflavonas da soja

RESUMO

Novos compostos antifúngicos e antitumorais têm sido propostos como alternativas para minimizar os efeitos indesejáveis causados por fármacos convencionais. As isoflavonas pertencem a classe dos isoflavonóides que tem sido amplamente estudada devido ao uso potencial na prevenção de várias doenças crônicas, atribuído ao poder antioxidante. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar *in vitro* propriedades antifúngica e antitumoral das isoflavonas agliconas frente a isolados clínicos de *Candida* spp. e linhagens de células neoplásicas. Um total de quarenta e três isolados de *Candida* foi submetido a testes de susceptibilidade a antifúngicos seguindo o método da microdiluição em caldo. Os testes de avaliação antineoplásica foram realizados através da citotoxicidade frente a três linhagens de células: carcinoma mucoepidermóide de pulmão (NCI-H292), carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2) e adenocarcinoma de cólon (HT-29), mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. Todos os isolados testados foram resistentes a daidzeína e genisteína, nas concentrações testadas, confirmando a ausência de atividade antifúngica das substâncias. A daidzeína não apresentou bons resultados de ação antineoplásica para os três tipos de células, entretanto a genisteína mostrou 75,54% de inibição celular para câncer de laringe. Assim, mais estudos devem ser realizados, sobretudo com experimentos *in vivo*, para investigações sobre o modo de ação desta substância, assim como a indução de efeitos tóxicos.

Palavras-chave: Atividade antifúngica; atividade antineoplásica; daidzeína; genisteína; *Candida*; NCI-H292; HEp-2; HT-29.

INTRODUÇÃO

A revolução biotecnológica tem fornecido ferramentas e informações extremamente úteis para a descoberta de fármacos. Os avanços expressivos da química e biologia, bem como a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo (GUIDO et al, 2010).

As plantas medicinais são fitoterápicos importantes para várias doenças. Estima-se que aproximadamente 20.000 espécies vegetais de várias famílias sejam úteis para esse fim. Assim, cerca de 80% da população mundial utiliza fármacos à base de plantas (KUETE et al, 2008).

A fitoterapia tem sido freqüentemente utilizada no tratamento de várias enfermidades, constituindo uma importante fonte de novos componentes biologicamente ativos (GUEDES et al, 2009). Aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais que permanecem como uma importante fonte para obtenção de medicamentos (CARVALHO et al, 2007).

Novos compostos antifúngicos e antitumorais têm sido propostos como alternativas para minimizar os efeitos indesejáveis causados pelos fármacos convencionais. Para este fim, pesquisas são desenvolvidas com substâncias popularmente conhecidas por potencial bioativo, como os flavonóides de frutas, vegetais e as isoflavonas da soja (PARK et al, 2001; BOGACZ et al, 2010).

As isoflavonas pertencem a classe dos isoflavonóides que tem sido amplamente estudada pelo potencial na prevenção de várias doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, osteoporose, câncer, dentre outras, devido ao poder antioxidante. A soja e produtos derivados são as únicas fontes de fornecimento de grandes quantidades de isoflavonas na dieta humana. Daidzeína, genisteína e gliciteína são isoflavonas do tipo agliconas contidas na soja e consideradas benéficas ao organismo (MESSINA et al, 2006).

Pesquisas sugerem que as isoflavonas da soja agem de quatro maneiras diferentes: como estrógenos e anti-estrógenos, inibidores de câncer, antioxidantes e estimuladores imunitários (WATANABE et al, 2002).

A ação tóxica de fármacos utilizados comercialmente, a ineficácia destes fármacos, além da excessiva de trabalhos relacionados, motivou a realização desta pesquisa que teve como objetivo avaliar *in vitro* propriedades antifúngica e antitumoral das isoflavonas agliconas da soja (daidzeína e genisteína) frente a isolados clínicos de *Candida* obtidos de sangue, além de três diferentes linhagens de células neoplásicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 43 isolados de *Candida* spp. provenientes de amostras de sangue, os quais estavam preservados sob óleo mineral (SHERF, 1943) na coleção de culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

O teste de sensibilidade antifúngica seguiu o método da microdiluição em caldo, de acordo com a padronização publicada no documento M27-A3 pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Para controle de qualidade foram incluídas nos testes, as linhagens de *C. krusei* ATCC6528 e *C. parapsilosis* ATCC22019 como recomendadas pelos documentos (CLSI, 2008).

Anfotericina B (AMB) e fluconazol (FLZ) foram utilizados na pesquisa como antifúngicos padrões e o meio de cultura utilizado foi RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) com L-glutamina, 2,0g/L de glicose, sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS). O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22- μ m (Millipore, Darmstadt, Germany).

Dez diferentes concentrações foram usadas, variando de 0,03 a 16 μ g mL⁻¹ para AMB e de 0,125 a 64 μ g/mL⁻¹ para FLZ. As substâncias puras incluídas no teste, daidzeína (DZ) e genisteína (GEN) (Sigma®), foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5%. As concentrações testadas das isoflavonas variaram entre 0,03 a 1024 μ g/mL⁻¹.

As placas foram incubadas a 37°C, e a leitura visualizada em 24h e 48h de incubação. Dois poços controles, sendo um, isento de antifúngico e um, isento de levedura foram incluídos no ensaio. As leituras foram realizadas visualmente comparando com o crescimento nos poços controle. A concentração inibitória mínima (CIM) foi a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento visível dos isolados testados, em relação ao poço controle (Pfaller et al, 2004). Os ensaios foram realizados em duplicata.

De acordo com o protocolo, isolados com CIMs $\leq$ 8 μ g/mL foram consideradas sensíveis para FLZ e os que apresentaram CIMs $\geq$ 64 μ g/mL, foram considerados resistentes para o mesmo fármaco. CIMs superiores a 2,0 são descritos como resistentes para AMB. Contudo, diretrizes para a DZ e GEN não são estabelecidas.

Os testes de avaliação antineoplásica foram realizados frente a três linhagens celulares: células NCI-H292 (derivadas de carcinoma mucoepidermóide de pulmão), células HEp-2 (derivadas de carcinoma epidermóide de laringe) e células HT-29 (adenocarcinoma de cólon) obtidas da seção de culturas celulares do Instituto Adolfo Lutz (SP), mantidas de acordo com o protocolo estabelecido pelo laboratório de cultura de células do Departamento

de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Estas linhagens foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 Mm.

Suspensões celulares na concentração de 10^5 células/mL foram preparadas em DMEM, sendo distribuída em placas de cultura com 96 poços e incubadas a 37° C em estufa, com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂, durante 24 h. Após esse tempo, as substâncias testadas, nas concentrações de 25 a 0,3 µg/mL, foram adicionadas e as placas reincubadas por 72 horas a 37°C (Saad et al, 2002).

Após 72 h foi adicionado em cada poço, 25 µL de MTT e as placas foram mantidas por mais duas horas em estufa (37°C). Ao final desse período o meio de cultura, juntamente com o de MTT foi aspirado e em seguida, 100 µL de DMSO (Dimetilsulfoxido) foram adicionados a cada poço para dissolução dos cristais Formazan (Alley, 1988).

A leitura óptica foi feita em leitor automático de placas do tipo Multiskan a 450nm, a densidade óptica (DO) média dos poços foi comparada com a média dos poços controles e a determinação da CI₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle) foi realizada a partir de uma regressão linear, relacionando-se o percentual de inibição em função do logaritmo das concentrações testadas e admitindo-se um intervalo de confiança de 99% (p<0,01). A avaliação da atividade antineoplásica foi feita de acordo com o Protocolo do National Câncer Institute (NCI) (GERAN et al, 1972).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da distribuição dos isolados de *Candida* utilizados no teste, dez correspondiam a *C. albicans*, dois *C. glabrata*, sete *C. guilliermondii*, dois *C. kruzei*, treze *C. parapsilosis* e nove *C. tropicalis*.

Os testes de susceptibilidade *in vitro* das 43 cepas de *Candida* isoladas de sangue à AMB e FLZ, estão resumidos na Tabela 1. Os dados são apresentados como intervalos de CIM. Nenhum dos isolados testados foi sensível a DZ e GEN, mesmo nas altas concentrações, confirmando a ausência de atividade antifúngica destas substâncias a isolados de *Candida*.

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados de *Candida* estocados na coleção de culturas Micoteca URM, frente anfotericina B (AMB) e fluconazol (FLZ).

Regist ro	Espécie	Susceptibilidade antifúngica (CIM)	
		AMB	FLZ
5692	<i>Candida albicans</i>	0,03 µg/mL	2,0 µg/mL
5684	<i>C. albicans</i>	0,03µg/m L	4,0 µg/mL
5683	<i>C. albicans</i>	0,03 µg/mL	4,0 µg/mL
5682	<i>C. albicans</i>	0,03 µg/mL	16 µg/mL
5689	<i>C. albicans</i>	0,03 µg/mL	8,0 µg/mL
5935	<i>C. albicans</i>	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL
5934	<i>C. albicans</i>	0,03 µg/mL	8,0 µg/mL
4609	<i>C. albicans</i>	0,25 µg/mL	2,0 µg/mL
4606	<i>C. albicans</i>	0,03 µg/mL	1,0 µg/mL
380	<i>C. albicans</i>	0,03 µg/mL	0,5 µg/mL
6094	<i>C. glabrata</i>	0,03µg/m L	0,5µg/mL
5933	<i>C. glabrata</i>	0,03µg/m L	0,5 µg/mL
5716	<i>C. guiliermondii</i>	0,03 µg/mL	2,0 µg/mL
5715	<i>C. guiliermondii</i>	0,5 µg/mL	4,0 µg/mL
5714	<i>C. guiliermondii</i>	1,0 µg/mL	4,0 µg/mL
5986	<i>C. guiliermondii</i>	0,03 µg/mL	4,0 µg/mL
5936	<i>C. guiliermondii</i>	0,06 µg/mL	2,0 µg/mL
5932	<i>C. guiliermondii</i>	0,03 µg/mL	2,0 µg/mL

5717	<i>C. guilhermondii</i>	0,06µg/mL	2,0 µg/mL
5712	<i>C. krusei</i>	1,0 µg/mL	32 µg/mL
5840	<i>C. krusei</i>	0,03 µg/mL	16 µg/mL
5695	<i>C. parapsilosis</i>	0,03µg/mL	4,0 µg/mL
5691	<i>C. parapsilosis</i>	0,06 µg/mL	2,0 µg/mL
5681	<i>C. parapsilosis</i>	0,03 µg/mL	0,5 µg/mL
5679	<i>C. parapsilosis</i>	0,03 µg/mL	64 µg/mL
6095	<i>C. parapsilosis</i>	0,03 µg/mL	2,0 µg/mL
5678	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 µg/mL	1,0 µg/mL
5731	<i>C. parapsilosis</i>	0,03 µg/mL	0,5 µg/mL
5877	<i>C. parapsilosis</i>	0,03 µg/mL	0,5 µg/mL
5875	<i>C. parapsilosis</i>	0,03 µg/mL	4,0 µg/mL
4608	<i>C. parapsilosis</i>	0,25µg/mL	4,0 µg/mL
4889	<i>C. parapsilosis</i>	0,25µg/mL	0,5 µg/mL
4607	<i>C. parapsilosis</i>	0,03 µg/mL	1,0 µg/mL
5680	<i>C. parapsilosis</i>	0,03 µg/mL	0,5 µg/mL
5693	<i>C. tropicalis</i>	0,03µg/mL	0,25 µg/mL
5690	<i>C. tropicalis</i>	0,06 µg/mL	0,25 µg/mL
5872	<i>C. tropicalis</i>	0,03 µg/mL	0,5 µg/mL
5871	<i>C. tropicalis</i>	0,03 µg/mL	0,4 µg/mL
5732	<i>C. tropicalis</i>	0,03µg/mL	0,12

		L	µg/mL
5677	<i>C. tropicalis</i>	0,03 µg/mL	0,5 µg/mL
5675	<i>C. tropicalis</i>	0,03µg/m L	0,25 µg/mL
6093	<i>C. tropicalis</i>	0,03 µg/mL	64 µg/mL
5676	<i>C. tropicalis</i>	0,03 µg/mL	0,12 µg/mL

*Não foi possível estabelecer o valor CIM para DZ e GEN. Estas moléculas não apresentaram atividade antifúngica aos isolados de *Candida* testados.

Fonte: Fabiola Maria Marques do Couto, 2013.

De acordo com Salas et al, (2011), em pesquisa sobre a atividade antifúngica de flavonóides naturais, modificados enzimaticamente, extraídos de plantas do gênero *citrus* contra os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*, os flavonóides podem exibir pequena atividade antifúngica, inibindo parcialmente o crescimento dos fungos. Segundo Steiner et al, (2008), os processos biológicos modulados por isoflavonas, especialmente, pela genisteína, têm sido extensivamente estudados, mas sem levar a uma compreensão clara dos mecanismos celulares e moleculares de ação.

Li et al, (2008) estudaram as atividades antifúngica e antibacteriana de derivados de desoxibenzoína da genisteína contra *Aspergillus niger*, *C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescense*, *Staphylococcus aureus* e constataram que a maioria dos compostos demonstraram atividade antibacteriana, porém nenhum composto apresentou ação antifúngica.

Anfotericina B, pertence à classe dos antimicóticos poliênicos que agem por complexação com o ergosterol na membrana celular. Este mecanismo leva a desestabilização e mudanças na permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, provoca a perda de proteínas, carboidratos e nucleotídeos, conferindo a propriedade fungicida aos fármacos (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). Entretanto, para o FLZ, antifúngico de atividade fungistática, a observação foi feita nos poços com 50% de inibição. Para este fármaco algumas cepas foram resistentes. O CIM dos isolados utilizados como controle de qualidade estava dentro dos limites estabelecidos.

Goldman et al, (2004) descreveram mecanismos de resistência ao fluconazol em *C. albicans*, onde há pontos de mutação e superexpressão do gene *erg11*. Alterações no gene *erg3* que codifica a enzima C-5 esterol dessaturase, indispensável na biossíntese do

ergosterol, bem como alterações na composição lipídica da membrana plasmática fúngica estão envolvidas no mecanismo de resistência aos azólicos (LÖFFLER et al, 2000).

A literatura afirma que os compostos são considerados ativos quando a percentagem de inibição citotóxica for igual ou superior a 70% e quando CI_{50} apresenta-se igual ou inferior a $30\mu\text{g/mL}$ (Saad et al, 2002). A citotoxicidade às células neoplásicas foi apresentada em função da percentagem de inibição e cálculo da CI_{50} , destacando a ação da GEN frente células HEp-2 que mostrou inibição significativa de 75,54% (Figura 01) com CI_{50} de $2,81\mu\text{g/mL}$. Em relação às outras linhagens celulares testadas, esta substância não apresentou resultados significativos. A DZ não apresentou bons resultados de inibição para os três tipos de células com ausência total de inibição para a linhagem HEp-2.

Kang et al, (2009) demonstraram que as isoflavonas foram capazes de diminuir a proliferação e apoptose *in vitro* e *in vivo* de células neoplásicas, demonstrando efeitos antitumorais e antiangiogênicos.

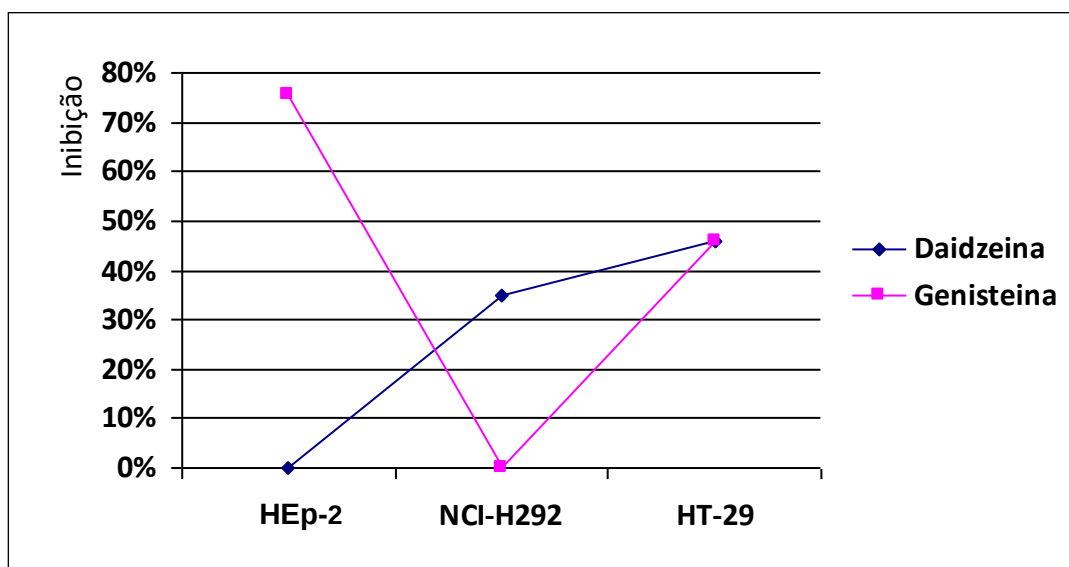


Figura 01. Percentagem de inibição de crescimento de células neoplásicas pela ação da daidzeína e genisteína contra as linhagens neoplásicas HEp-2, NCI-H292 e HT-29 na concentração de $50\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Fabiola Maria Marques do Couto, 2013.

Num estudo *in vitro* sobre o efeito de isoflavonas da soja e saponinas em carcinoma de cólon, HT-29, Jim et al, (2008) verificaram a ocorrência de apoptose das células neoplásicas expostas às substâncias. Em nossa pesquisa as isoflavonas não apresentaram ação sobre a referida linhagem celular.

Raynal et al, (2008) em pesquisa sobre a atividade antileucêmica da genisteína *in vitro* e *in vivo*, evidenciaram a atividade antineoplásica mielóide e linfóide contra células leucêmicas.

Além disso, observaram que uma dieta enriquecida de genisteína produziu um moderado, mas significativo efeito anti-leucêmico em camundongos. Nossos resultados inferem que a genisteína não possui efeito antineoplásico *in vitro* para linhagens de cânceres de pulmão e cólon.

Os resultados encontrados nesta pesquisa mostram ainda a ausência da capacidade antifúngica contra espécies de *Candida* e pequena atividade antineoplásica das isoflavonas da soja, destacando apenas a ação da genisteína contra HEP-2, caracterizando como composto ativo para câncer de laringe, porém pesquisas adicionais *in vivo* necessitam ser realizadas para confirmação do potencial antineoplásico desta substância.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF) e a Pro Reitoria de Pesquisa (PROPESQ) da instituição.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

APOIO FINANCEIRO

Pro Reitoria de Pesquisa (Propesq / UFPE).

Apêndice C - Hidroxipiridonas: fármacos promissores para tratamento do câncer - um estudo *in vitro*

Hydroxypyridones: promising drugs for câncer treatment - an *in vitro* study

Artigo a ser submetido para a revista

Cancer Research

Fabíola Maria Marques do Couto¹; Silene Carneiro do Nascimento²; Gardênia Militão³; Oliane Maria Correia Magalhães¹; Silvio Francisco Pereira Júnior¹; Rejane Pereira Neves¹ *.

¹ Departamento de Micologia, Centro, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-910, Recife, Brasil.

² Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-910, Recife, Brasil.

³ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-910, Recife, Brasil.

*Correspondência para: Dra. Rejane Pereira Neves.

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-420. Fone: 81 2126.8481, Fax: 81.2126.8480

E-mail: rejadel29@yahoo.com.br

Hidroxi-*piridonas*: fármacos promissores para tratamento do câncer - um estudo *in vitro*

RESUMO

Hidroxi-*piridona* é uma classe de antimicóticos que incluem agentes antifúngicos de baixa toxicidade para células normais e seus principais componentes são formados por ciclopirox olamina e octopirox olamina, disponibilizados comercialmente e restritos para tratamento tópico de micoses superficiais. Os tratamentos instituídos para a cura do câncer incluem a administração de fármacos quimioterápicos, os quais muitas vezes apresentam severa toxicidade. Neste estudo, foram testados ciclopirox olamina e octopirox olamina como possíveis fármacos anticancerígenos, frente a células neoplásicas de pulmão (NCI-H292), laringe (HEp-2) e cólon (HT-29). Para o teste foi utilizado o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e as concentrações usadas variaram entre 25 a 0,3 µg/ mL das substâncias, sendo determinada a CI₅₀ a partir de regressão linear. Os fármacos testados mostraram atividades citotóxicas significativas frente às três linhagens celulares utilizadas neste estudo. Octopirox olamina foi destaque com relação a percentagem de inibição de crescimento das células neoplásicas, sobretudo contra HT-29 que mostrou inibição de 95,97% e CI₅₀ de 2,80µg/mL. Os resultados encontrados nesta pesquisa são promissores para uso da octopirox olamina no tratamento de cânceres de pulmão, laringe e principalmente de cólon, levando-se em conta a baixa toxicidade e alta capacidade de inibição na proliferação das células neoplásicas *in vitro*. Este é o primeiro estudo de correlação entre hidroxi-*piridonas* e as referidas linhagens celulares neoplásicas.

Palavras-chave: Atividade citotóxica; hidroxi-*piridonas*; ciclopirox olamina; octopirox olamina; NCI-H292; HEp-2; HT-29.

INTRODUÇÃO

A revolução biotecnológica tem fornecido informações extremamente úteis para a descoberta de fármacos. Os avanços expressivos da química e biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida da população mundial (GUIDO et al, 2010).

Os tratamentos instituídos ao câncer podem ser realizados através de cirurgias, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade. Fármacos quimioterápicos são aplicados, em sua maioria, via intravenosa, podendo também ser administrados por via oral, intramuscular, subcutânea e tópica. Ademais, além de conduzir a destruição das células modificadas, promovem também a destruição de células normais (GUIDO et al, 2010).

As hidroxipiridonas quimicamente formam uma classe de antimicóticos, de aplicação tópica, não relacionadas com qualquer outra classe de agentes antifúngicos, seus principais componentes incluem ciclopirox e octopirox olamina disponibilizadas comercialmente. Os representantes desta classe são ativos contra um amplo espectro de fungos de importância médica, incluindo dermatófitos e leveduras. A baixa toxicidade para células normais em testes experimentais fez tornar-se possível no uso tópico para tratamento de micoses superficiais (SOARES; CURY, 2001).

Ciclopirox olamina é um agente antimicótico cujo perfil antimicrobiano inclui leveduras, dermatófitos e outros fungos filamentosos clinicamente relevantes (Subissi et al, 2010). Embora inicialmente desenvolvido como um agente antifúngico tópico, estudos têm demonstrado que esse fármaco induz a morte de células malignas *in vitro* e *in vivo*, porém necessita ser mais bem avaliado para compreensão dos mecanismos que culminam com a morte de células neoplásicas (BALABANOV et al, 2007; KIM et al, 2011).

Octopirox olamina ou piroctona olamina é um agente anticaspa de baixa toxicidade, indicado para formulações de xampus, condicionadores, tônicos, géis capilares e desodorantes. As propriedades fungicidas são conhecidas contra *Malassezia*, *C. parapsilosis*, *Scopulariopsis brevicaulis* e *T. rubrum* (DUBINI et al, 2005).

Estipula-se que deve existir cerca de 350 novos agentes quimioterápicos estudados e aplicados experimentalmente em todo o mundo, o que comprova a real necessidade da descoberta de novas classes químicas bioativas (WHO, 2011). Assim, denota-se a importância de pesquisa e desenvolvimento de fármacos mais potentes, não apenas para o controle das infecções, mas para prevenção e tratamento de complicações clínicas decorrentes de tratamentos quimioterápicos.

A relação entre as hidroxipiridonas e células neoplásicas de pulmão, laringe e cólon nunca foi avaliada anteriormente, sendo este estudo considerado pioneiro. Nesse trabalho foram avaliadas ações citotóxicas de ciclopirox e octopirox olamina frente a três linhagens de células neoplásicas humanas, células NCI-H292 (derivadas de carcinoma mucoepidermóide

de pulmão), células HEp-2 (derivadas de carcinoma epidermóide de laringe) e células HT-29 (adenocarcinoma de cólon).

MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de citotoxicidade foram realizados frente a três linhagens celulares neoplásicas obtidas da seção de culturas celulares do Instituto Adolfo Lutz (SP), mantidas de acordo com o protocolo estabelecido pelo laboratório de culturas de células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Estas linhagens foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, solução de antibiótico a 1% (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200Mm.

Neste ensaio, as células tumorais, foram avaliadas quanto à viabilidade celular, por meio do teste de exclusão com o corante vital Azul Tripán (Sigma) 0,4% p/v, em PBS, o qual penetra facilmente nas células danificadas corando-as em azul, enquanto as células íntegras permanecem incolores, permitindo assim, determinar a porcentagem de células vivas e células mortas (Weisenthal et al, 1983).

A contagem das células foi realizada em microscópio invertido (LEITZ), com a utilização de um hemocitômetro, preenchido com uma alíquota da suspensão de células homogeneizada.

Para avaliação da citotoxicidade das moléculas puras de ciclopirox olamina (Sigma®) e octopirox olamina (Sigma®), uma suspensão celular de 10^5 células/mL foi preparada em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Suspensões de 25 a 0,3 µg/ mL foram distribuídas em placas com 96 poços e incubadas a 37°C em estufa, com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂, durante 24 h. Posteriormente, foram adicionados os fármacos testados, na concentração de 50 µg/ mL, e as placas reincubadas por 72 horas a 37° C em estufa (Saad et al, 2002).

Após 72 h de contato, foi adicionado em cada poço, 25 µL de MTT ou 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio e as placas foram mantidas por mais duas horas em estufa (37°C). Ao final desse período o meio de cultura, juntamente com o MTT foi aspirado e em seguida, 100 µL de DMSO (Dimetilsulfoxido) foram adicionados a cada poço para dissolução dos cristais Formazan (ALLEY, 1988).

A leitura óptica foi feita em leitor automático de placas do tipo Multiskan a 450nm. A densidade óptica (DO) média dos poços foi comparada com a média dos poços controles. A

determinação da CI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle) foi conduzida a partir de uma regressão linear, relacionando-se o percentual de inibição em função do logaritmo das concentrações testadas e admitindo-se um intervalo de confiança de 99% ($p < 0,01$), para a reta obtida.

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada de acordo com o Protocolo do *National Cancer Institute* (NCI) (GERAN et al, 1972).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fármacos testados, ciclopirox olamina e octopirox olamina mostraram atividades citotóxicas significativas frente às três linhagens celulares utilizadas neste estudo.

O método MTT aplicado na pesquisa é um método colorimétrico que se baseia na capacidade que as células vivas possuem de reduzir o sal tetrazólio, de cor amarela, a formazan insolúvel, de cor púrpura, que precipita graças à ação da enzima mitocondrial succinil desidrogenase, ativa apenas em células vivas (MOSMANN, 1983).

A citotoxicidade às células neoplásicas foi apresentada em função da percentagem de inibição e cálculo da CI_{50} , destacando a ação da octopirox olamina frente células HT-29 que mostrou inibição de 95,97% (Figura 01) com CI_{50} de $2,80\mu\text{g/mL}$ (Figura 02).

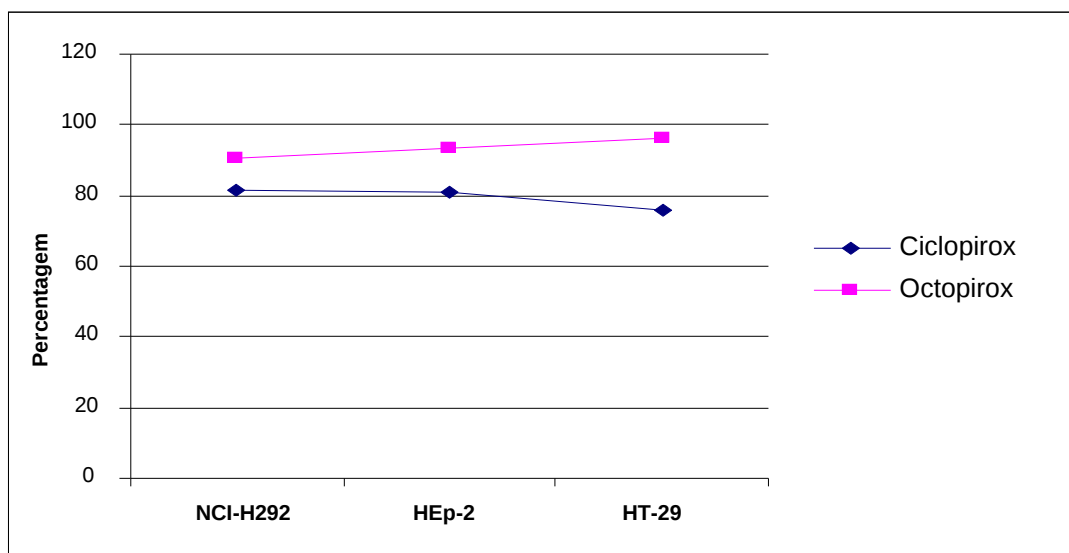


Figura 01. Percentagem de inibição de crescimento das linhagens neoplásicas NCI-H292, HEp-2 e HT-29 pela ação da ciclopirox e octopirox olamina ($50\mu\text{g/mL}$).
Fonte: Fabiola Maria Marques do Couto, 2013

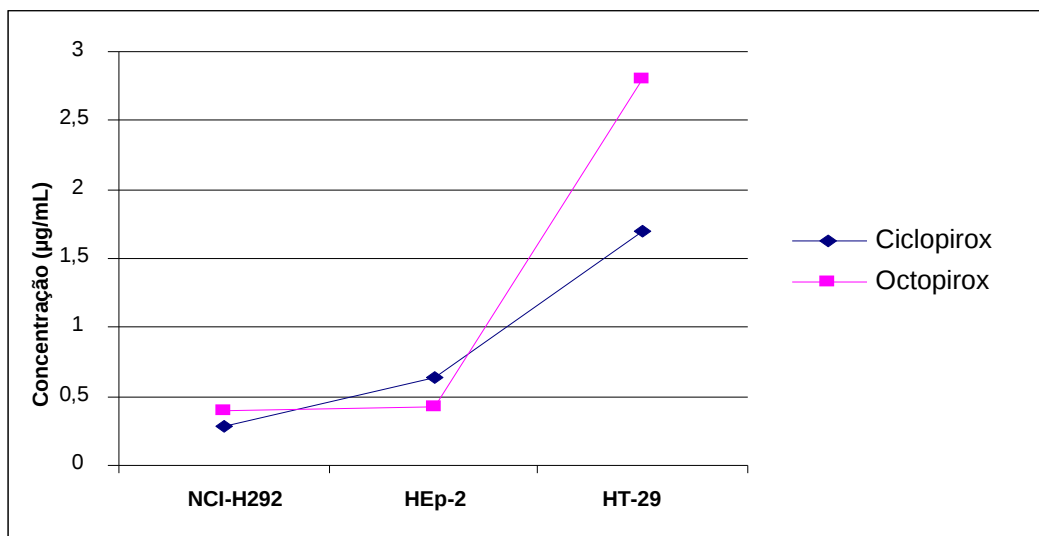


Figura 02. Taxas de CI_{50} das linhagens neoplásicas NCI-H292, HEp-2 e HT-29 pela ação da ciclopirox olamina e octopirox olamina.

Fonte: Fabiola Maria Marques do Couto, 2013

Segundo protocolo do *National Cancer Institute* (SAAD et al, 2002), valores de $CI_{50} \leq$ a $30\mu\text{g/mL}$ devem ser considerados significativos para extratos brutos de origem vegetal, bem como valores de $CI_{50} \leq$ a $4\mu\text{g/mL}$, devem ser considerados significativos para substâncias puras. Nesta pesquisa, as hidroxipiridonas testadas foram de origem pura, resultando em valores significativos de CI_{50} .

O ciclopirox olamina, tem sido introduzido para o tratamento clínico há mais de duas décadas, sendo freqüentemente usado para tratar micoses superficiais ou candidíase vaginal (NIEWERTH et al, 2003).

Embora inicialmente desenvolvido como um agente antifúngico tópico, estudos têm demonstrado que esse fármaco induz a morte de células malignas *in vitro* e *in vivo*, como mostra um estudo realizado por Balabanov et al, (2007). Os autores inferem que ciclopirox olamina inibe o crescimento de células malignas em pacientes com leucemia mielóide crônica, em baixas concentrações molares. No presente estudo esta substância demonstrou bioatividade *in vitro* contra as três linhagens neoplásicas testadas, apresentando inibições maiores que 75%.

A relação entre octopirox olamina e células neoplásicas foi observada por Kim et al, (2011). Os autores verificaram que houve uma maior atividade apoptótica em mieloma humanos e murinos, em várias linhas de células de linfoma, bem como, em células humanas primárias, estando de acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Os resultados encontrados neste estudo são promissores para possível tratamento dos cânceres de pulmão, laringe e principalmente de cólon, levando-se em consideração a baixa toxicidade dos fármacos a células normais (NIEWERTH et al, 2003; DUBINI et al, 2005).

A falta de estudos que relatem atividade citotóxica para as linhagens neoplásicas NCI-H292, HEp-2 e HT-29 faz desse estudo um trabalho pioneiro, que merece ser aprofundado em pesquisas futuras, sobretudo com experimentos *in vivo* que visa tornar-se possível a aplicação sistêmica no homem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF) e a Pro Reitoria de Pesquisa (PROPESQ) da instituição.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

APOIO FINANCEIRO

Pro Reitoria de Pesquisa (Propesq / UFPE).

Apêndice D - Efeito antitumoral e antifúngico de octopirox olamina em camundongos portadores de tumor S180 e candidemia

Antitumor effect and antifungal octopirox olamine in S180 tumor-bearing mice and candidemia

Artigo a ser submetido para a revista

In Vivo

Fabíola Maria Marques do Couto¹; Silene Carneiro do Nascimento²; Silvio Francisco Pereira Júnior¹; André Luiz de Souza Barros², Rejane Pereira Neves¹ *.

¹ Departamento de Micologia, Centro, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-910, Recife, Brasil.

² Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego s / n, 50670-910, Recife, Brasil.

*Correspondência para: Dra. Rejane Pereira Neves.

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-420. Fone: 81 2126.8481, Fax: 81.2126.8480
E-mail: rejadel29@yahoo.com.br

Efeito antitumoral e antifúngico de octopirox olamina em camundongos portadores de tumor S180 e candidemia

RESUMO

O presente estudo testou as atividades antifúngica e antitumoral da octopirox olamina, um fármaco antifúngico de baixa toxicidade, em camundongos com câncer e com candidemia. Sarcoma 180 foi usado para o processo tumoral e *Candida albicans* como agente etiológico da candidemia. Os grupos experimentais foram constituídos de seis animais, distribuídos como, grupo controle, grupo de animais portadores de tumor e grupo de animais com tumor e candidemia. Os tumores apresentaram volume médio de aproximadamente 2,02 mg no 14º dia. A infecção fúngica foi realizada no sétimo dia do processo tumoral e o tratamento iniciado com 72 horas após a infecção fúngica. Octopirox olamina na concentração 0,5 mg/Kg apresentou efeito inibitório do crescimento tumoral (18,38%) frente ao sarcoma 180 e exibiu efeito antifúngico nos camundongos infectados com 100% de eliminação fúngica no sangue após sete dias de tratamento. Este é um trabalho pioneiro com resultado inovador para o tratamento de tumor maligno associado a candidemia. Pesquisas futuras devem ser conduzidas quanto a diferentes concentrações e toxicidade do fármaco em questão, visando tornar-se possível a aplicação ao homem.

Palavras-chave: Atividade antitumoral; atividade antifúngica; *in vivo*; sarcoma 180; octopirox olamina.

INTRODUÇÃO

A revolução biotecnológica tem fornecido informações extremamente úteis para a descoberta de fármacos. Os avanços expressivos da química e biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo (GUIDO et al, 2010).

Atualmente, estão em expansão linhas de pesquisas que buscam novos compostos antineoplásicos e antifúngicos aos quais selecionam compostos mais efetivos para o tratamento e controle de infecções tumorais e fúngicas (DUBINI et al, 2005; WHO, 2011).

O acometimento da corrente sanguínea por espécies de *Candida*, também chamado de candidemia, representa importante causa de morbidade e mortalidade principalmente em pacientes com câncer, o qual é a terceira causa de óbitos no mundo, matando seis milhões de pessoas por ano. Atualmente, cerca de 12 milhões de novos casos são diagnosticados anualmente (O'SHAUGHNESSY et al, 2009, XIA; LEE, 2010).

Octopirox olamina ou piroctona olamina (2-Hidroxi-4-metil-6-(2,4,4-trimetil pentil) 2 (1H)-piridona, sal monoetanolamínico), pertencente a família das hidroxipiridonas, é um agente anticaspa de baixa toxicidade, indicado para formulações de xampus, condicionadores, tônicos, incluindo géis capilares e desodorantes (DUBINI et al, 2005).

O aumento da incidência de casos de câncer e doenças secundárias, associado à crescente taxa de mortalidade atribuída tem direcionado pesquisadores de várias áreas a realizar diversos estudos na busca de novos compostos terapêuticos em modelos animais. O Sarcoma 180 ou tumor de Crocker faz parte de uma linhagem ATCC indiferenciada que foi constatada em ratos albinos desde 1914. Sendo geneticamente semelhante a tumores humanos é amplamente utilizado em pesquisas com modelos animais (QI; XU, 2006).

O emprego intensivo dos protocolos pós-cirúrgicos, incluindo a associação de quimioterápicos com diferentes mecanismos de ação vem melhorando os resultados do tratamento de alguns tipos de cânceres. Porém, muitos tumores ainda apresentam respostas modestas aos protocolos clínicos, limitando a indicação e a eficácia do tratamento adjuvante tanto para os tumores primários quanto para as metástases tornando-se imperativo a necessidade de encontrar, desenvolver, e introduzir no arsenal médico, modalidades terapêuticas mais eficientes aos pacientes com neoplasias (FORTES; NOVAES, 2006; WHO, 2011).

A crescente taxa de morbimortalidade de pacientes portadores de neoplasias que são acometidos por infecções fúngicas sistêmicas, a ação tóxica de fármacos quimioterápicos e antifúngicos comercialmente utilizados e a escassez de trabalhos que relatem a ação da octopirox olamina frente a células neoplásicas, sobretudo em portadores de fungemia, nos motivou a realizar esta pesquisa que teve como objetivo avaliar a ação antitumoral e antifúngica da octopirox olamina frente a camundongos albinos Suíços portadores de sarcoma 180 e candidemia.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos albinos Suíços adultos, da espécie *mus musculus* de ambos os sexos, com aproximadamente 30g, foram obtidos no biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram tratados de acordo com procedimentos experimentais estabelecidos, após a aprovação pelo comitê de ética em procedimento animal da instituição com registro de nº 23076.050932/2011-86.

O fármaco utilizado na pesquisa foi o sal octopirox olamina (Sigma®) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5% adicionado de 3% de Tween 80 (v/v em solução salina). A linhagem de *C. albicans* utilizada para indução da candidemia, foi oriunda de amostra de sangue de paciente internado no setor de doenças infecciosas e parasitárias de hospital universitário e atualmente está estocada na coleção de culturas Micoteca URM, UFPE, Brasil, com registro URM380. Os grupos experimentais foram constituídos de seis animais, distribuídos como, grupo controle, grupo de animais portadores de tumor e grupo de animais com tumor e candidemia.

As células tumorais do Sarcoma 180 foram provenientes do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e mantidas em camundongos através de passagens intraperitoneais semanais. O líquido ascítico com as células tumorais germinadas por sete dias foi aspirado e centrifugado (70g, 5 min, 4°C), do sedimento realizou-se a contagem celular e teste de viabilidade celular com o auxílio do corante azul de Tripán.

A concentração de células viáveis foi ajustada com solução de NaCl 150 mM estéril para $5,0 \times 10^7$ células/mL⁻¹. O volume de 0,1mL foi inoculado via subcutânea na região axilar direita de cada camundongo, para o crescimento do tumor na forma sólida.

A forma sólida do tumor foi desenvolvida durante sete dias, sendo verificada através da formação de massa tumoral palpável que comprometia a mobilidade dos membros superiores do animal. Após sete dias de infecção tumoral, 0,2mL da suspensão de 10^6 células/mL de levedura foi administrada intraperitonealmente, sendo realizada no grupo controle, a introdução de salina estéril.

O tratamento foi iniciado com o uso de 0,2mL de octopirox olamina intraperitoneal durante sete dias consecutivos. Ao final do experimento foi realizada a eutanásia através da sedação com a associação de cloridrato de xilazina e cloridrato de ketamina nas dosagens de 10 mg/Kg e 115 mg/Kg, respectivamente, por via intraperitoneal e posterior punção cardíaca para retirada do sangue e tumores, os quais foram pesados e mergulhados em solução de

formaldeído a 10% por 24 horas. As amostras de tecido tumoral foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico e diafanizadas em xilol. Em seguida, as peças foram impregnadas e incluídas em parafina para obtenção de microcortes transversais perpendiculares e posterior coloração com hematoxilina e eosina.

Os dados referentes ao peso médio corporal e dos tumores foram submetidos à análise estatística, através do software PRISMA 3.0, pelo teste t pareado. Os resultados obtidos foram expressos como média, aceitando-se como estatisticamente importantes os valores comparados ao nível de significância de 5%.

O cálculo de inibição tumoral foi realizado através da comparação das médias de peso dos tumores dos grupos controle e experimental.

Para análise antifúngica, alíquotas de sangue foram adicionadas a placas contendo meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA)(Difco) acrescido de cloranfenicol (50 mg / mL) e incubadas a 37°C por 24-72h. A observação microscópica foi conduzida a partir da montagem entre lâmina e lamínula, para visualização das estruturas fúngicas.

Colônias de leveduras foram purificadas e identificadas através das características morfofisiológicas, para confirmação da espécie (BARNNET et al, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, um modelo de neoplasia por sarcoma 180 foi desenvolvido para investigar a capacidade da octopirox olamina em controlar a doença de base. Esta linhagem neoplásica é freqüentemente utilizada em pesquisas *in vivo* relacionadas a substâncias antitumorais (BEZERRA et al, 2006).

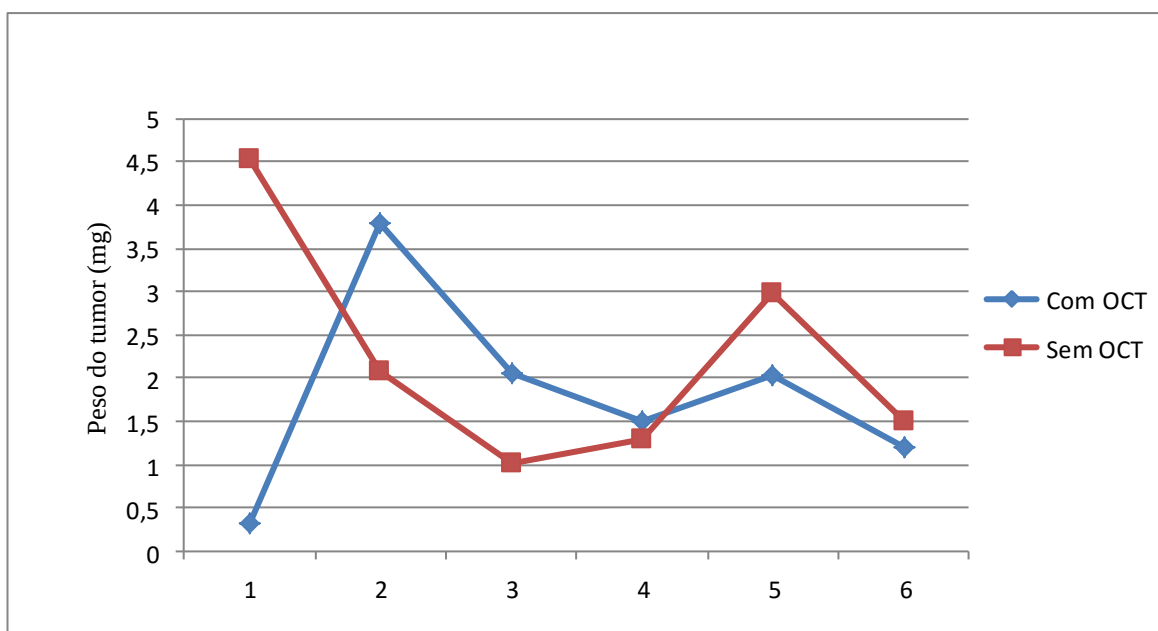
Foi verificado que *C. albicans* causou infecção disseminada no grupo dos camundongos infectados e não tratados. Tal confirmação foi constatada com a presença de leveduras nas amostras de sangue observadas ao exame direto e através do crescimento de unidades formadoras de colônias, após plaqueamento no meio SDA. As colônias de leveduras foram confirmadas como *C. albicans*. No referido grupo de animais foram observados alguns sintomas clínicos como perda de peso, respiração ofegante, cegueira e lentidão e perda dos movimentos, sobretudo dos membros superiores. Alves et al, (2004) e Machado; Melo-Junior (2009), também apontam estes tipos de sinais clínicos em pesquisa relacionada com a administração de substâncias anticâncerígenas.

Além disso, foi observada também uma maior velocidade de crescimento do tumor no grupo de animais infectados com *C. albicans*, confirmando o estado de maior debilidade nos camundongos com tumor, acometidos pela candidemia.

Os tumores atingiram um volume médio de aproximadamente 2,02 mg no 14º dia. Não houve mortalidade nos grupos neste período. Todos os tumores eram sólidos com ausência de áreas necróticas ou hemorrágicas. Não foram encontradas metástases nos grupos analisados.

O tratamento de octopirox olamina com 0,5 mg/Kg permitiu a eliminação total da leveduras no sangue. Tal resultado foi confirmado através de análises micológicas do sangue dos animais do grupo tratado em comparação com o grupo não tratado.

Neste estudo foram realizadas comparações, com relação ao peso tumoral dos animais tratados e não tratados, dentro do grupo de animais com tumor e candidemia. Foi verificada uma menor média de peso tumoral do grupo exposto ao fármaco (Figura 1). Tal diferença foi observada também para o grupo de animais com apenas o tumor.



OCT- octopirox olamina

Figura 1. Comparação entre os pesos dos tumores dos grupos com tratamento e sem tratamento com octopirox olamina.

Parâmetros ponderais, como o peso dos tumores e variações de massa corpórea é de extrema importância para monitorar os efeitos de tratamento de moléculas anti-neoplásicas (BEZERRA et al, 2006).

Octopirox olamina na concentração 0,5 mg/Kg apresentou efeito inibitório do crescimento tumoral frente ao sarcoma 180, atingindo o percentual de 18,38%. Esse percentual final de inibição foi calculado pela média dos tumores mensurados, no momento

da eutanásia. Acreditamos que esta percentagem será crescente de acordo com um aumento de concentração do fármaco, uma vez que a concentração aplicada corresponde à mínima.

A relação entre octopirox olamina e células neoplásicas foi observada apenas por Kim et al, (2011), em estudo sobre o aumento da eficácia *in vivo* de lenalidomida com a adição de octopirox olamina em mieloma murino, constatando atividade apoptótica e redução de crescimento tumoral, o que corrobora com os resultados desta pesquisa.

Nesta pesquisa também foram observados, através de cortes histológicos, aspectos micromorfológicos dos tumores e foi verificado que animais tratados com octopirox olamina, apresentaram tumores mais compactos, com células mais agrupadas e menor invasão linfocitária quando comparado aos tumores de animais não tratados (Figura 2). Assim, pode-se presumir que o uso da octopirox olamina pode reduzir possibilidades de ocorrência de metástases, sendo importantes fenômenos para disseminação neoplásica.

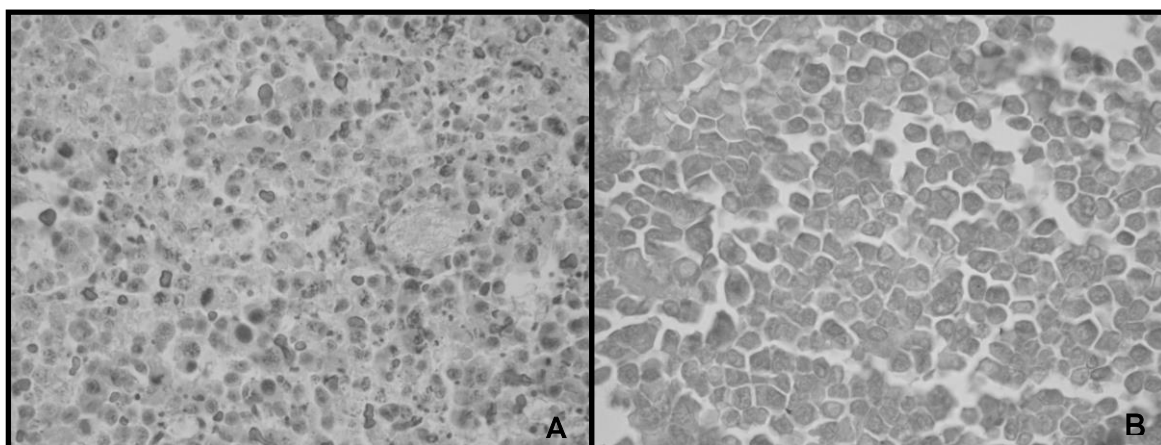


Figura 2. Aspectos histológicos do Sarcoma 180. (A) tumor retirado de animal exposto a octopirox olamina, apresentando células fortemente justapostas (B) tumor retirado de animal sem exposição ao fármaco, apresentando células dispersas.

Quanto à escolha da octopirox olamina, ressalta-se a conhecida baixa toxicidade às células normais atribuídas ao fármaco, assim como a excassês de trabalhos relacionados (ALLGOOD et al, 1991; DUBINI et al, 2005). Os resultados desta pesquisa podem ser promissores para tratamento de neoplasias associadas à presença de infecções fúngicas sistêmicas.

Não existem relatos sobre a atividade antitumoral de octopirox olamina isoladamente administrada contra modelo de sarcoma 180, sobretudo com candidemia, perfazendo deste, um trabalho pioneiro, que merece ser aprofundado para verificação quanto a diferentes concentrações, toxicidade e associações do fármaco em questão visando tornar-se possível a aplicação ao homem. Tais estudos já estão sendo desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF) e a Pro Reitoria de Pesquisa (PROPESQ) da instituição.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

APOIO FINANCEIRO

Pro Reitoria de Pesquisa (Propesq / UFPE).

ANEXOS – ARTIGOS PUBLICADOS E OUTROS DOCS

Anexo A - Fungemia em hospital universitário: uma abordagem epidemiológica

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(6):745-748, nov-dez, 2011



Article/Artigo

Fungemia in a university hospital: an epidemiological approach

Fungemia em hospital universitário: uma abordagem epidemiológica

Fabiola Maria Marques do Couto¹, Daniele Patrícia Cerqueira Macedo¹ and Rejane Pereira Neves¹

ABSTRACT

Introduction: Fungemia corresponds to the isolation of fungi in the bloodstream and occurs mostly in immunosuppressed patients. The early diagnosis and treatment of these infections are relevant given the serious threat to the affected patients and possible spread to other organs, often becoming fatal. The growing number of fungemia associated with poor prognosis resulted in this research aiming to diagnose and assess the epidemiological aspects of hematogenous infections by fungi. **Methods:** The study included 58 blood samples collected within a 1-year period, from patients at the Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, by venipuncture in vacuum tubes. Blood samples were processed for direct examination and culture and identification, conducted by observing the macroscopic and microscopic characteristics, as well as physiological characteristics when necessary. **Results:** Eight (13.8%) episodes of fungemia were identified, accounting for the total sample, and these pathogens were *Candida*, *Histoplasma*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, and a dematiaceous fungus. *C. albicans* was the prevalent species, accounting for 37.5% of the cases. Most affected patients were adult males. There was no predominance for any activity, and the risk of acquired immunodeficiency syndrome was the underlying pathology most often cited. **Conclusions:** The isolation of fungi considered as emergent species, such as *C. membranifaciens* and dematiaceous species, highlights the importance of epidemiological monitoring of cases of fungemia in immunocompromised patients, as the therapy of choice depends on the knowledge of the aetiological agent.

Keywords: Epidemiology. Fungemia. University hospital.

RESUMO

Introdução: Fungemia corresponde ao isolamento de fungos na corrente sanguínea e ocorre, sobretudo, em pacientes imunossuprimidos. O diagnóstico e tratamento precoce destas infecções são relevantes diante da grave ameaça aos pacientes acometidos e possível disseminação via hematogênica para outros órgãos, tornando-se muitas vezes fatal. O crescente número de casos de fungemia associados ao mau prognóstico resultou na realização desta pesquisa que teve por objetivo diagnosticar e avaliar aspectos epidemiológicos das infecções hematogênicas por fungos. **Métodos:** O estudo incluiu 58 amostras de sangue coletadas, durante um ano, de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, através da punção venosa em tubos a vácuo. As amostras de sangue foram processadas para exame direto e cultura e a identificação, conduzida através da observação das características macroscópicas, microscópicas e quando necessárias fisiológicas. **Resultados:** Oito (13,8%) episódios de fungemia foram identificados, correspondendo ao total das amostras e os agentes etiológicos envolvidos foram *Candida*, *Histoplasma*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* e um fungo dematiáceo. *C. albicans* foi a espécie prevalente com 37,5% dos casos. A maior parte dos pacientes acometidos pertencia ao sexo masculino, na idade adulta. Não houve predominância para nenhuma atividade de risco e a síndrome da imunodeficiência adquirida foi a patologia de base mais citada. **Conclusões:** O isolamento de fungos considerados emergentes como *C. membranifaciens* e espécies dematiáceas ressaltam a importância do acompanhamento epidemiológico dos casos de fungemia em imunocomprometidos, uma vez que a escolha terapêutica depende do conhecimento do agente etiológico.

Palavras-chaves: Epidemiologia. Fungemia. Hospital universitário.

INTRODUCTION

In recent years, there was a marked increase in the number of serious infections caused by pathogenic fungi and those traditionally considered non-pathogenic. Infections caused by these organisms usually occur in patients with impaired immune defense, suffering from cancer, with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), or who received immunosuppressive therapy, had disruptions of the normal barriers, or experienced changes in normal microbiota¹.

Advances in medicine have led to prolonged survival of immunocompromised patients and as well as the development of opportunistic fungal infections. Among these infections, fungemia corresponds to the presence of fungi in the bloodstream, whose incidence has risen in recent decades. The presence of viable microorganisms in the bloodstream suggests active infection in tissues, and the patient's recovery may depend on early identification and isolation of the aetiological agent^{2,3}.

Fungemia or hematogenous fungal infections represent a serious health problem, involving hospitalized patients with predisposing conditions leading to a high mortality rate^{4,5}.

The clinical presentation is nonspecific, and fever is the most common one^{6,7}, which makes the diagnosis of fungemia a challenge, as blood cultures are positive in less than 50% of cases^{6,7}. Thus, the diagnosis is usually late in the course of the infection or even during necropsy⁸.

Yeasts have been increasingly present as aetiological agents of fungemia, including *Candida albicans* and other species such as *Candida non-albicans*⁹. Nevertheless, other fungi, such as *Histoplasma capsulatum*, may also be involved. Differential patterns of species distribution have not been fully elucidated and may be closely related to the potential virulence of these microorganisms⁸.

The early diagnosis and treatment of these fungemias are relevant given the serious threat to immunocompromised patients and possible spread, hematogenously, to deeper organs, often becoming

L.L. Lacerda: Departamento de Microbiologia Médica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

Address to: Dra. Rejane Pereira Neves, Dept. de Microbiologia/CCB/UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil.

Phone/Fax: 55 81 2126-8480

e-mail: rejane@ufpe.br; rejane@ufpe.br; rejane@ufpe.br

Received in 10/04/2011

Accepted in 01/06/2011

Anexo B - Atividade Antifúngica da piroctone olamina em candidíase intra-abdominal experimental

de Couto et al. SpringerPlus (2016) 5:468
DOI 10.1186/s40064-016-2130-8

SpringerPlus

RESEARCH

Open Access



Antifungal activity of the piroctone olamine in experimental intra-abdominal candidiasis

Fabiola Maria Marques do Couto¹, Silene Carneiro do Nascimento², Silvio Francisco Pereira Júnior¹, Vanessa Karina Alves da Silva¹, André Ferraz Goliana Leal^{1*} and Rejane Pereira Neves¹

Abstract

This work aimed to evaluate the antifungal activity of piroctone olamine in the treatment of intra-abdominal candidiasis in an experimental model using Swiss mice. The mice ($n = 6$) were infected by intraperitoneal injection of 0.2 ml of *C. albicans* (10^7 cells/ml in saline). The animals were observed daily for clinical signs and mortality for 14 days. The treatment with piroctone olamine (0.5 mg/kg) was performed 72 h after infection by intraperitoneal administration. For comparison, a group of animals ($n = 6$) was treated with amphotericin B (0.5 mg/kg). The mycological diagnosis was made by collecting the liver, spleen and kidneys. Data regarding the fungal growth and mortality were analyzed statistically by Student's *t* test and analysis of variance (ANOVA), with level of significance set at $P < 0.05$. The difference in fungal growth scoring between the control group and the treatment groups (piroctone olamine and amphotericin B) was statistically significant ($P < 0.05$). The difference in fungal growth scoring between the treatment groups (piroctone olamine and amphotericin B) was not statistically significant ($P < 0.05$).

Keywords: Activity antifungal, Piroctone olamine, Intra-abdominal candidiasis

Background

Piroctone olamine (1-hydroxy-4-methyl-6-(2,4,4-trimethyl-2-(1H)pyridinone-2-amino)ethanol salt) is an ethanolamine salt of the hydrotamic acid derivative piroctone. This antifungal compound was first synthesized in 1979 by Schwarzkopf-Herbol (Germany) (Kim et al. 2011). It is a component of many cosmetic products such as anti-dandruff shampoo and hair rinses for scaly and irritated skin. One reason for scaling and irritation of the scalp is the colonization with *Malassezia* spp. and other yeasts. These microorganisms split parts of the sebum of the capillitium lipolytically into free fatty acids. These free fatty acids and microbial pro-cedures lead to irritation of the skin and via an increase of mitosis to scaling (Sigle et al. 2006). Thus the piroctone olamine (PO) present in the shampoo and hair rinses have the ability to reduce microbial colonization. Its mechanism

of action is complex and not completely understood. It is known that this agent has the ability to penetrate the cell membrane and form complexes with iron (Fe^{2+} e Fe^{3+}), inhibiting energy metabolism in mitochondria of pathogenic fungi (Kim et al. 2011; Dubini et al. 2008).

Fungi can infect virtually any organ or structure in the abdomen. Intra-abdominal fungal infections can be divided in two groups according to their clinical presentation: localized, following surgery, trauma, or placement of foreign device; and disseminated, in critical ill or immunocompromised patients. It is important to recognize these infections early since serious complications, such as intestinal obstruction, bleeding, perforation, peritonitis, sepsis and death, can occur (Reboredo and Sarria 2013). Among fungal agents that can cause intra-abdominal infection, *Candida* species are the most common. The antifungal drugs most commonly used to treat this type of invasive mycosis are amphotericin B, fluconazole and echinocandins (Bassetti et al. 2013).

The low number of available antifungal agents and the increased reports of yeasts resistant to conventional

* Correspondence: andreferrazleal@yahoo.com.br

¹ Department of Mycology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE CEP 50640-500, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

Anexo C – Folha de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Humana CCS/UFPE

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Comitê de Ética em Pesquisa**

Av. da Engenharia, s/n – 1º andar – Sala 4 – Cidade Universitária
50.740-600 Recife – PE, Tel/fax: 81. 2126.8588 – cepccs@ufpe.br

Ofício nº. 006/2013 - CEP/CCS/UFPE

Recife, 15 de janeiro de 2013.

À
Pesquisadora Fabíola Maria Marques do Couto
Pós-graduação em Biologia de Fungos

Registro do SISNEP FR – 370406
CAAE – 0336.0.172.000-10
Registro CEP/CCS/UFPE Nº **336/2010**
Título: Avaliação da ação antifúngica e antitumoral de isoflavonas da soja no câncer de mama e próstata.
Pesquisador Responsável: Fabíola Maria Marques do Couto

Senhor (a) Pesquisador (a):

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) recebeu em 15/01/2013 o relatório final do protocolo em epígrafe e considera que o mesmo foi devidamente aprovado por este Comitê nesta data.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE

Anexo D – Folha de aprocação do Comitê de Ética em Experimentação Animal UFPE

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 08 de março de 2012

Ofício 409/2012

Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE
Para: **Profa. Rejane Pereira Neves**
Departamento de Micologia - UFPE
Processo nº 23076.050932/2011-86

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado: ***“Avaliação da ação antifúngica e antitumoral de isoflavonas da soja e hidroxipiridonas no câncer de mama e próstata.”***

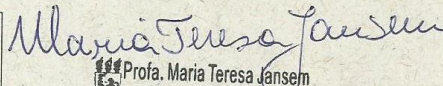
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEAA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Observação: Origem dos animais: Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE; Animais: camundongos; Linhagem: Camundongos Albinos Swiss (*Mus musculus*); Sexo: Machos e Fêmeas; Idade: 60 dias; Peso: 25g; N° de Animais previsto no projeto: 48 animais.


 Profa. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEAA