



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Letícia Matheus Rosa

Associação da N-acetilcisteína com antifúngicos contra *Candida albicans*

Araraquara
2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Letícia Matheus Rosa

Associação da N-acetilcisteína com antifúngicos contra *Candida albicans*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima.

Araraquara
2023

R788a	Rosa, Letícia Matheus Associação da N-acetilcisteína com antifúngicos contra <i>Candida albicans</i> / Letícia Matheus Rosa. — Araraquara, 2023 46 p. : il., tabs. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientador: Ewerton Garcia de Oliveira Mima 1. <i>Candida albicans</i>. 2. Antifúngico. 3. Acetilcisteína. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

Letícia Matheus Rosa

Associação da N-acetilcisteína com antifúngicos contra *Candida albicans*

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Assinatura Orientador (a):

Assinatura Aluno (a):

Araraquara, 28 de fevereiro de 2023.

Dedico essa tese de conclusão de curso a todas as mulheres que vieram antes de mim, as quais lutaram pelo direito de outras mulheres de estudarem e de realizarem tudo aquilo que fosse o desejo de seus corações. Em especial a minha mãe **Ivani Matheus Rosa** (em memória, e presente no meu coração) minha maior influência, a pessoa que mais me incentivou e me apoiou nos estudos, e em todos os aspectos da minha vida. A quem devo tudo que fui, tudo que sou e tudo que ainda serei.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Robson Luiz Rosa** e **Ivani Matheus Rosa** (em memória) os quais eu amo de todo meu coração. Agradeço por todo apoio e dedicação em todas as etapas de minha vida, por não terem medido esforços para que eu conseguisse realizar meu sonho e ter chegado até aqui. À eles devo tudo, pois sei que foi graças a educação e o amor que tive e tenho que venho me tornando a mulher que quero ser.

Aos meus irmão, **Vinicius Augusto Matheus Rosa** e **Alexandre Matheus Rosa**, que são as minhas pessoas favoritas no mundo e minhas maiores inspirações. Agradeço por não terem soltado a minha mão, por toda ajuda, por cada palavra e por cada conselho. Essa caminhada foi muito mais leve sabendo que eu poderia contar com vocês.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, a quem tenho muita admiração. Agradeço por todo suporte, pela paciência e principalmente pela oportunidade de crescimento profissional. Obrigada por ter compartilhado um pouco da sua sabedoria e conhecimento, os quais levarei sempre comigo, sou imensamente grata.

A minha coorientadora **Mestre Thais Soares Bezerra Santos Nunes**, a quem devo muito da minha pesquisa. Agradeço por todo apoio, pelo companheirismo, pelos conhecimentos adquiridos e por ter ser meu exemplo no laboratório.

Aos meus amigos de turma, em especial a minha dupla **Marina Gaino Jarreta**, que fez com que a minha caminhada na faculdade fosse extremamente mais leve e colorida. Sou grata pela sua amizade, pelo nosso encontro e todo crescimento, pessoal e profissional que tivemos juntas.

Ao meu namorado, **Bruno Braga Cifarelli**, meu parceiro de vida. Por todo apoio e companheirismo muito antes da faculdade. Obrigada pelos conselhos, por estar sempre disponível, e por ser meu porto seguro.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara**, na pessoa do Diretor, Prof. Dr. Edson Alves de Campos e da Vice-Diretora Prof^a. Dr^a. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia, por todo apoio e suporte e ensinamentos fornecidos durante a graduação nesta instituição.

Aos **funcionários** da faculdade por toda ajuda, empenho e estarem sempre à disposição.

Ao **PIBIC** – Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Processo 47434) pelo apoio para realização desta pesquisa.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2018/02513-9) pelo apoio financeiro essencial para realização desta pesquisa

Rosa LM. Associação da N-acetilcisteína com antifúngicos contra *Candida albicans* [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

Candida albicans (Ca) é o principal fungo patógeno humano, responsável por infecções locais associadas a biofilme e sistêmicas, como a candidemia com altas taxas de mortalidade. Tradicionalmente, a candidíase é tratada com antifúngicos (AF) tópicos ou sistêmicos. A N-acetilcisteína (NAC) é um agente mucolítico utilizado na medicina com ampla margem de segurança e pesquisas in vitro tem demonstrado atividade antimicrobiana contra diferentes micro-organismos. A ação antifúngica da NAC sozinho ou em associação com agentes antifúngicos convencionais contra Ca também foram relatados. No entanto, os efeitos antifúngicos do NAC contra cepas resistentes, até onde sabemos, ainda são desconhecidas. Nesse contexto, investigar novas aplicações de medicamentos existentes (redirecionamento de fármacos) tem a vantagem de reduzir o tempo e o custo gastos no desenvolvimento de novos medicamentos. Esta característica torna bastante promissora a investigação da associação da NAC com AF convencionais na busca de um efeito mais robusto contra Ca. O objetivo desse estudo foi avaliar um possível efeito sinérgico entre a NAC e AF (Nistatina-NIST, Fluconazol-FLU e Caspofungina-CASP) sobre culturas planctônicas de Ca susceptível (CaS, SC5314) e Ca resistente ao FLU (CaR, ATCC 96901). A metodologia que utilizada foi o teste do tabuleiro, que consiste na combinação dos fármacos avaliados em concentrações iguais e inferiores à concentração inibitória mínima (CIM) de cada agente, com intuito de se verificar interação entre os fármacos (sinergismo, ausência de interação ou antagonismo) pela análise de Bliss. Os resultados demonstraram sinergismo entre NAC e CASP em menores concentrações para ambas as cepas. A combinação de NAC e FLU demonstrou sinergismo para CaS e sinergismo e antagonismo para CaR a depender das concentrações utilizadas. Já a combinação de NAC e NIST resultou em antagonismo para ambas as cepas. Conclui-se que a NAC demonstrou sinergismo com CASP para as cepas de Ca avaliadas, podendo contribuir no combate às infecção resistentes e biofilmes fúngicos.

Palavras – chave: *Candida albicans*. Acetilcisteína. Antifúngicos.

Rosa LM. Combining N-acetylcysteine with antifungals against *Candida albicans* [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

Candida albicans (Ca) is the main human pathogenic fungus, responsible for local infections associated with biofilm and systemic infections such as candidemia with high mortality rates. Traditionally, candidiasis is treated with topical or systemic antifungals (AF). N-acetylcysteine (NAC) is a mucolytic agent used in medicine with a wide safety margin and in vitro research have demonstrated its antimicrobial activity against different microorganisms. The antifungal action of NAC alone or in association with conventional antifungal agents against Ca has also been reported. However, the antifungal effects of NAC against resistant strains, as far as we know, are still unknown. In this context, investigating new applications of existing drugs (drug repurposing) has the advantage of reducing the time and cost spent on the development of new drugs. This characteristic makes the investigation of the association of NAC with conventional drugs very promising in the search for a more robust effect against Ca. The aim of this study was to evaluate a possible synergistic effect between NAC and AF (Nystatin-NIST, Fluconazole-FLU, and Caspofungin-CASP) on planktonic cultures of FLU-susceptible Ca (CaS, SC5314) and FLU-resistant Ca (CaR, ATCC 96901). The methodology used was the checkerboard assay, which consists of combining the drugs evaluated in concentrations equal to and lower than the minimum inhibitory concentration (MIC) of each agent, with the aim of verifying interaction between the drugs (synergism, absence of interaction or antagonism) by the Bliss analysis. The results demonstrated synergism between NAC and CASP at low concentrations for both strains. Combining NAC and FLU resulted in synergism for CaS and synergism and antagonism for CaR depending on the concentrations used. Conversely, NAC and NIST resulted in antagonism for both strains. As conclusion, NAC demonstrated synergism with CASP for the Ca strains evaluated, which may contribute in the battle against resistant infections and fungal biofilms.

Keywords: *Candida albicans*, Acetylcysteine. Antifungal agents.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	12
3 REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1 Uso de antifúngicos e resistência microbiana	13
3.2 Novo método terapêutico	13
3.3 N-acetilcisteína (NAC) e antifúngicos.....	14
4 MATERIAL E MÉTODO.....	17
4.1 Micro-organismos em condições de cultivo.....	17
4.2 Preparo dos fármacos.....	17
4.3 Avaliação do sinergismo	18
4.4 Análise estatística	21
5 RESULTADO	23
5.1 Interação da NAC com os antifúngicos.....	23
5.2 Avaliação dos resultados pelo método de Bliss	37
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXO A.....	46

1 INTRODUÇÃO

A candidose bucal é a infecção fúngica mais comum que acomete os humanos, cujo principal fator etiológico são os fungos do gênero *Candida*, sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente. Os fatores de risco para essa infecção incluem o uso de próteses dentárias, antibioticoterapia, medicamentos imunossupressivos e também condições sistêmicas como diabetes, deficiências nutricionais infecção por HIV e câncer¹. Por ser um micro-organismo oportunista, as infecções por *Candida* spp. desenvolvem-se principalmente em condições de imunossupressão¹⁻³. Acima de 90% dos casos de fungemia são atribuídos às espécies de *Candida*, e o número de mortes como resultado dessa infecção sistêmica varia de 40% a quase 80% em pacientes imunossuprimidos^{2,3}.

Dentre os tipos de candidíase oral, a estomatite protética é uma lesão crônica inflamatória da mucosa do palato de etiologia multifatorial, causada por má adaptação da prótese, higienização precária, uso da prótese durante o sono e, principalmente, biofilme microbiano com abundante presença de *Candida* spp.⁴. Essa patologia é muito recorrente e afeta até 70% dos usuários de prótese dentária, com maior prevalência em mulheres^{4,5}. O diagnóstico de estomatite protética é realizado clinicamente com base na inflamação da mucosa palatina^{4,6}.

O tratamento convencional das infecções por *Candida* spp. envolve a utilização de medicamentos tópicos ou sistêmicos. Os medicamentos mais utilizados são os polienos (nistatina, anfotericina B), os azóis, que podem ser divididos em imidazólicos (clotrimazol, miconazol e cetoconazol) e triazólicos (fluconazol e itraconazol), e as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina)^{7,8}. Os agentes tópicos, apesar de serem muitas vezes efetivos para candidíase oral, têm sua concentração reduzida a valores subterapêuticos devido aos efeitos diluentes da saliva e à ação de limpeza da musculatura bucal. Isso faz com que sejam necessárias múltiplas doses do medicamento, o que pode diminuir a cooperação do paciente para com o tratamento. Já os medicamentos sistêmicos podem promover efeitos colaterais hepatotóxicos e/ou nefrotóxicos⁹, o que requer muita cautela em sua prescrição. No entanto, o uso indiscriminado dos agentes antifúngicos tem levado ao desenvolvimento de cepas resistente. A resistência antimicrobiana vem se tornando uma ameaça a saúde pública¹⁰, devido ao uso indiscriminado de agentes antifúngico⁸.

A N-acetilcisteína (NAC) é um agente mucolítico utilizado na medicina com ampla margem de segurança e, pesquisas in vitro sugerem uma atividade antibiofilme promissora¹¹. Esta característica torna bastante promissora a investigação da associação da NAC com medicamentos convencionais na busca de um efeito mais robusto contra *Candida albicans*.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do trabalho foi avaliar in vitro a interação entre a NAC e antifúngicos convencionais em culturas planctônicas de *Candida albicans* susceptível (CaS) e resistente ao fluconazol (CaR). Os objetivos específicos foram:

- avaliar interação entre NAC e Fluconazol- FLU
- avaliar interação entre NAC e Caspofungina – CASP
- avaliar interação entre NAC Nistatina – NIST

3 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura deste trabalho foi elaborada pelos principais temas acerca do assunto pesquisado.

3.1 Uso de antifúngicos e resistência microbiana

Tradicionalmente a candidíase é tratada por medicamentos tópicos ou sistêmicos¹². Porém, até hoje não existe uma terapia antifúngica ideal, pois os agentes empregados não são totalmente eficazes ou apresentam efeitos indesejáveis aos pacientes (toxicidade, sabor ruim, etc.)¹³. Atualmente, tem havido um aumento significativo na prevalência de resistência a agentes antibacterianos e antifúngicos¹⁴. Em resposta à resistência dos patógenos frente aos fármacos utilizados na prática clínica, as cepas susceptíveis evoluem para cepas resistentes, dificultando a eficácia dos tratamentos⁸.

Clinicamente, a resistência aos antifúngicos provoca a falha de determinada terapia antifúngica, resultando na persistência ou até progressão da infecção¹⁴. Em nível celular, a resistência aos antifúngicos ocasiona a evolução de uma cepa susceptível para uma cepa mais resistente¹⁶. Em termos laboratoriais, a resistência antifúngica é mensurada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a concentração mínima do fármaco necessária para inibir o crescimento do microorganismo¹⁷.

Atualmente, a resistência microbiana é uma ameaça mundial e uma das maiores preocupações da área da saúde¹⁸. Nesse sentido devido às limitações apresentadas atualmente pelos tratamentos disponíveis para infecções microbianas, outros métodos antimicrobianos estão sendo pesquisados¹⁹.

3.2 Novo método terapêutico

O aumento na ocorrência de infecções fúngicas, sua epidemiologia em mudança, o surgimento de resistência e a toxicidade exibida por algumas das terapias antifúngicas atualmente usadas resultaram na necessidade de um arsenal expandido de drogas antifúngicas²⁰. Investigações de novas indicações de

medicamentos que originalmente são designados para outra proposta são conhecidas como “redirecionamento de fármacos” (“drug repurposing”), cujas vantagens incluem menor tempo e menor custo de investigação, como aqueles despendidos para a avaliação clínica de segurança do medicamento²¹. O redirecionamento de fármacos é atraente e pragmático, dados os custos substanciais e os requisitos de tempo – em média, uma década ou mais – para o desenvolvimento de medicamentos²².

3.3 N-acetilcisteína (NAC) e antifúngicos

A N-acetilcisteína (NAC), um derivado do aminoácido L-cisteína²³, é um agente mucolítico com ampla margem de segurança e bastante difundido na prática médica e que tem apresentado propriedades antimicrobianas. Sua fração ativa, sítio tiol (-sh), desempenha um papel na eliminação de radicais livres e destruição das ligações de dissulfeto intermolecular ou intramolecular em proteínas, o que reduz a viscosidade das secreções²³. A NAC é um potente antioxidante, atuando contra radicais livres oxidantes nas células do tecido pulmonar²³, sendo administrado na medicina por vias inalatória, oral e intravenosa. Já existem evidências de que a NAC, isolada ou em associação com antibiótico, pode diminuir o risco da intensificação de bronquite crônica, doença pulmonar obstrutiva e rinossinusite²⁴. Os bons resultados da NAC na medicina pulmonar têm despertado certo interesse em estudar seu efeito em outras doenças mediadas por biofilme. A NAC também diminui a formação de biofilmes por uma variedade de bactérias^{25,26} e reduz a produção de uma matriz polissacarídica extracelular, enquanto promove a ruptura de biofilmes maduros^{23,13}.

Na área odontológica, a NAC tem se mostrado eficiente na redução da formação dos biofilmes em uma variedade de patógenos endodônticos clinicamente importantes^{27,28}. Pesquisas recentes exploraram a capacidade da NAC em aumentar os efeitos dos antibióticos convencionais²⁹.

Poucos estudos relatam a ação da NAC em *C. albicans*. Numa dessas investigações, biofilmes de isolados clínicos de *C. albicans* foram cultivados por 24 horas e expostos à NAC³⁰. O valor de concentração inibitória mínima (CIM) que reduziu 50% do metabolismo dos biofilmes foi 32 mg/mL após 48h. Análise de microscopia confocal demonstrou redução significativa da biomassa e da espessura do biofilme monoespécie e polimicrobiano de *C. albicans* e *Staphylococcus*

epidermidis expostos à NAC 8 mg/mL por 24h. NAC 16 mg/mL promoveu redução de colônias de *C. albicans* somente no biofilme monoespécie até 72h de exposição, porém não no biofilme polimicrobiano. Além disso, também foi observado sinergismo de NAC e anfotericina B contra as cepas de *C. albicans*, porém não houve sinergismo entre a NAC e fluconazol contra uma das cepas fúngicas avaliadas³⁰. Porém, tanto a determinação de CIM como a do sinergismo da NAC com antifúngicos foram realizadas por meio de metabolismo celular (ensaio de XTT), o qual pode apresentar resultados distintos e superestimados quando comparados com a viabilidade microbiana por crescimento de colônias. A avaliação da viabilidade microbiana por unidades formadoras de colônias (UFC) é considerada fundamental na avaliação antimicrobiana/antibiofilme, uma vez que, segundo a Sociedade Americana de Microbiologia, somente é considerado antimicrobiano o agente que promove redução de 3 log₁₀ nos valores de UFC³¹.

Em outra investigação, curvas do tempo de inativação demonstraram efeito bactericida da NAC, a qual foi somente fungistática para *C. albicans* e *Candida krusei* na concentração de 80 mg/mL. Os valores de CIM e concentração fungicida mínima (CFM) foram, respectivamente, de 40 e 160 mg/mL para *C. albicans* e 20 mg/mL para *C. Kruse*³². Porém, cepas padrões também não foram estudadas e o efeito da NAC em biofilmes das espécies fúngicas não foi avaliado. Outro estudo observou valores de CIM variaram de 0,4 a 0,8 µg/mL para cetoconazol e de 16 a 20 mg/mL para NAC contra 10 isolados clínicos de *C. albicans* de lesões orais e vaginais³³. A porcentagem de redução na formação de biofilme do cetoconazol foi de 25% a 87,4%, da NAC foi de 32,8% a 87,8% e a associação de ambos fármacos foi de 57,2% a 100%. Em biofilmes maduros ou pré-formados, o cetoconazol reduziu a formação de biofilme em 22% a 80,70%; a NAC, em 50% a 95,2%; e a associação de ambas de 54,07% a 100%¹⁴. Apesar desses resultados promissores, verifica-se uma grande variação entre os isolados clínicos, os quais não foram comparados com uma cepa padrão. Adicionalmente, a viabilidade do biofilme tratado com NAC não foi avaliada, uma vez que o cristal violeta é uma técnica de coloração de todo biofilme, incluindo células vivas, mortas e matriz.

Por quase 30 anos, a anfotericina B que é conhecida por causar nefrotoxicidade significativa, foi a única droga disponível para controlar infecções fúngicas graves¹⁴. Porém, o alto perfil de segurança dos triazóis, em particular do fluconazol, levou ao seu uso extensivo³⁴. O fluconazol tem se mostrado eficaz no

tratamento da candidíase mucosa mesmo em indivíduos com imunodeficiência avançada. Enquanto os polienos promovem permeabilização da membrana fúngica e são fungicidas, os azóis inibem a biossíntese do ergosterol fúngico (equivalente ao colesterol mamífero) e são fungistáticos. No entanto, a resistência ao fluconazol e a outros antifúngicos azólicos tornou-se um problema clínico importante no tratamento da candidíase²⁰.

Um outro fármaco muito utilizado é a nistatina. A nistatina é um antifúngico polieno usado no tratamento das infecções causadas por *Candida* da mucosa, pele e trato intestinal³⁵. A nistatina tópica é a droga de escolha para o tratamento das infecções por *Candida* spp. da cavidade oral³⁶.

Outra classe de antifúngicos são as equinocandinas, de uso sistêmico e injetáveis, que promovem a inibição do β -glucano da parede fúngica. O acetato de caspofungina (Cancidas, anteriormente relatado como MK-0991 e L-743.872) é uma potente equinocandina solúvel em água com atividade contra vários fungos clinicamente importantes³⁷. Estudos anteriores demonstraram que a caspofungina é altamente ativa contra espécies de *Candida*, incluindo alguns isolados resistentes a azóis^{38,39,4}.

4 MATERIAL E MÉTODO

Durante o desenvolvimento desta fase da pesquisa, seguimos as etapas a apresentadas a seguir.

4.1 Micro-organismos em condições de cultivo

Uma cepa CaS (SC5314) e outra CaR (ATCC 96901), mantidas congeladas em glicerol a -80 °C, foram avaliadas. Cada cepa foi descongelada e semeada em uma placa de Sabouraud Dextrose Agar com 0,1 g/L de cloranfenicol (SDA, Acumedia Manufacturers Inc., Baltimore, MD) e incubada por 48 horas a 37 °C. Em seguida foi feito o pré-inóculo, com 5 mL de Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, MI, EUA) e 5 colônias em um Falcon de 50 mL, esse procedimento foi executado para ambas as cepas, incubadas por overnight (em média 16-18 h) a 37 °C. Após a incubação, a solução foi diluída na razão 1:10 e 1:20 em YNB fresco, e foi incubada a 37 °C, fazendo leituras de densidade óptica (DO) no espectrofotômetro a 540 nm até atingir a metade da fase de crescimento exponencial (mid-log) do micro-organismo de acordo com sua curva de crescimento (CaS: DO: $0,405 \pm 0,11$ e CaR: DO: $0,46 \pm 0,029$). Essa concentração da suspensão foi equivalente, em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), a: $8,36 \times 10^6 \pm 4,85 \times 10^6$ UFC/mL para CaS e $4,61 \times 10^6 \pm 9,11 \times 10^5$ UFC/mL para CaR. Em seguida, a suspensão fúngica foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min a 25 °C, o sobrenadante foi descartado e resuspendido em meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP) tamponado com ácido morfolinepropanesulfônico (MOPS, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP) e suplementado com D-glicose 2% (Synth, São Paulo, SP), pH 7,064. Cada suspensão fúngica foi diluída 4 vezes (1:10 por 3 vezes e 1:1 por 1 vez) para se chegar numa concentração de $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL para os experimentos⁴⁰.

4.2 Preparo dos fármacos

A NAC (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP) foi preparada em meio RPMI em uma concentração de 25 mg/mL, para as cepas utilizadas (CaS e CaR). O FLU foi preparado com RPMI e 2,5% de dimetilsulfóxido (DMSO, concentração final) e

concentração inicial para CaS foi de 1 µg/mL e para CaR foi de 125 µg/mL. A CASP foi preparada com RPMI e concentração para CaS e CaR foi de 0,5 µg/mL. A NIST foi suspendida com RPMI e 2,5% de DMSO e sua concentração para CaS e CaR foi de 8 µg/mL.

4.3 Avaliação do sinergismo

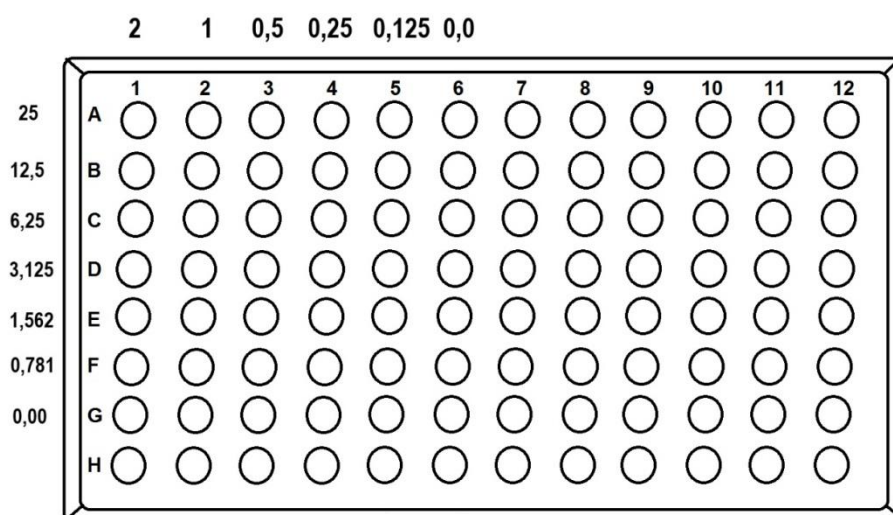
A interação entre os fármacos foi realizado através do método do Tabuleiro⁴¹ em placas de 96 poços de fundo em “U” (Kasv, São Paulo, SP). Sobre as linhas, foram pipetadas 50 µL de NAC em cada poço, sempre realizando uma diluição seriada a cada linha subsequente até atingir a concentração de 0 mg/mL, na qual foi pipetado apenas o meio de suspensão do fármaco (veículo), RPMI. Nas colunas foram pipetados 50 µL do antifúngico convencional avaliado (Fluconazol, Caspofungina ou Nistatina), a cada coluna subsequente também foi realizado uma diluição seriada até atingir a concentração de 0 mg/mL, na qual era pipetado apenas o meio de suspensão do fármaco (veículo). Dessa forma, ao final da montagem do tabuleiro, cada poço continha uma combinação única dos fármacos, graças ao cruzamento das linhas com as colunas com um volume final 100µL em cada poço (50µL da NAC + 50 µL do antifúngico convencional usado na ocasião). A última linha continha apenas as diluições seriadas dos antifúngicos mais o meio de cultura (veículo) da NAC, a última coluna continha apenas as diluições seriadas da NAC com o meio de cultura (veículo) do antifúngico e o último poço do tabuleiro continha apenas o meio de cultura (veículo) dos dois fármacos, o qual serviu como controle.

As concentrações dos fármacos utilizadas para o tabuleiro partiram da Concentração Inibitória Mínima de cada agente determinados previamente¹⁹ (Quadro 1). Assim, a concentração inicial da NAC em todos os experimentos do tabuleiro foi de 25 mg/mL. O FLU com concentração inicial no tabuleiro para CaS foi de 1 µg/mL (Figura 1), para CaR foi de 125 µg/mL (Figura 2). A CASP com concentração inicial no tabuleiro para CaS e CaR foi de 0,5 µg/mL (Figura 3). A NIST com concentração inicial no tabuleiro para CaS e CaR foi de 8 µg/mL (Figura 4). A partir dessas CIMs, com a diluição seriada no tabuleiro, foram avaliadas concentrações subCIM.

Quadro 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) de cada fármaco para as cepas avaliadas

Fármaco	CaS	CaR
NAC	25 mg/mL	25 mg/mL
FLU	1-0,5 µg/mL	125 µg/mL
CASP	0,125 µg/mL	0,125 µg/mL
NIST	2-0,5 µg/mL	2-0,5

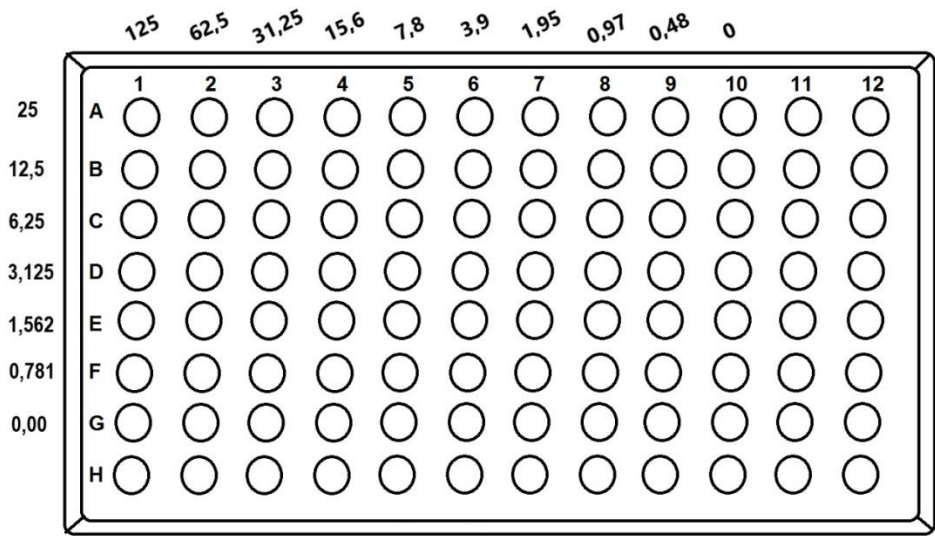
Fonte: Elaboração própria.

Figura 1- Ensaio do tabuleiro para CaS usando Fluconazol

As linhas são as concentrações de NAC e as colunas de FLU.

Fonte: Elaboração própria.

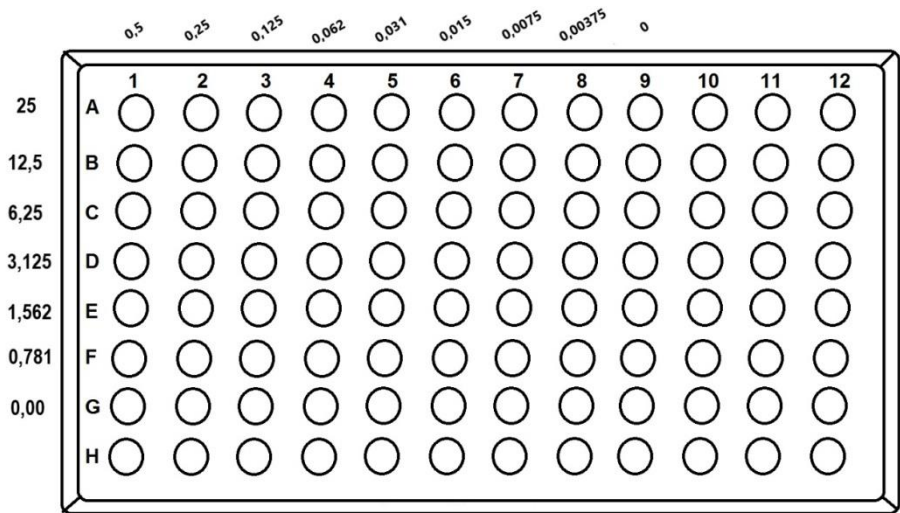
Figura 2- Ensaio do tabuleiro para CaR, usando Fluconazol



As linhas são as concentrações de NAC e as colunas de FLU.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 3- Ensaio do tabuleiro para CaS e CaR usando Caspofungina



As linhas são as concentrações de NAC e as colunas de CASP.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 4- Ensaio do tabuleiro para CaS e CaR usando Nistatina

	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03124	0,015625	0,007	0
25	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
12,5	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6,25	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
3,125	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1,562	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,781	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,00	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

As linhas são as concentrações de NAC e as colunas de NIST.

Fonte: Elaboração própria.

Após a montagem do tabuleiro, foi colocado 100 µL do inóculo fúngico de uma das cepas, totalizando 200 µL em cada poço. A placa foi incubada por 24 horas a 37 °C. Passado esse período, foi feita a leitura de absorbância da placa (540 nm, FLUOstar, Ômega, Alemanha) e a partir do valor de absorbância gerado em cada poço, foram escolhidos aqueles com absorbância inferior ao controle (concentração 0 da NAC com concentração 0 dos antifúngicos, havendo apenas o micro-organismo) para serem plaqueados em SDA. As placas foram incubadas a 24 horas em 37°C para posterior contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

4.4 Análise estatística

Para calcular se houve interação positiva entre os fármacos, foi feito o cálculo do índice da concentração inibitória fracional (FICI)^{42,43}. O valor do FICI é obtido a partir do somatório do FICI da NAC com o FICI do antifúngico ($FICI = FICI_{NAC} + FICI_{antifúngico}$). O FICI da NAC corresponde a Concentração inibitória mínima (CIM) da NAC associada ao antifúngico testado dividido pela CIM da NAC isoladamente ($FICI_A = CIM_A \text{ na presença de B} / CIM_A \text{ sozinho}$). Da mesma forma o FICI do antifúngico corresponde a CIM da NAC associada ao antifúngico dividido pela CIM do antifúngico isoladamente. Caso o valor de FICI seja inferior a 0,5 é configurado um sinergismo entre os fármacos. Se o valor de FICI for entre 0,5 e 4 há uma ausência

de interação, e caso o valor de FICI for superior a 4, há um antagonismo entre os fármacos⁴⁴. Cada experimento foi realizado em três ocasiões distintas.

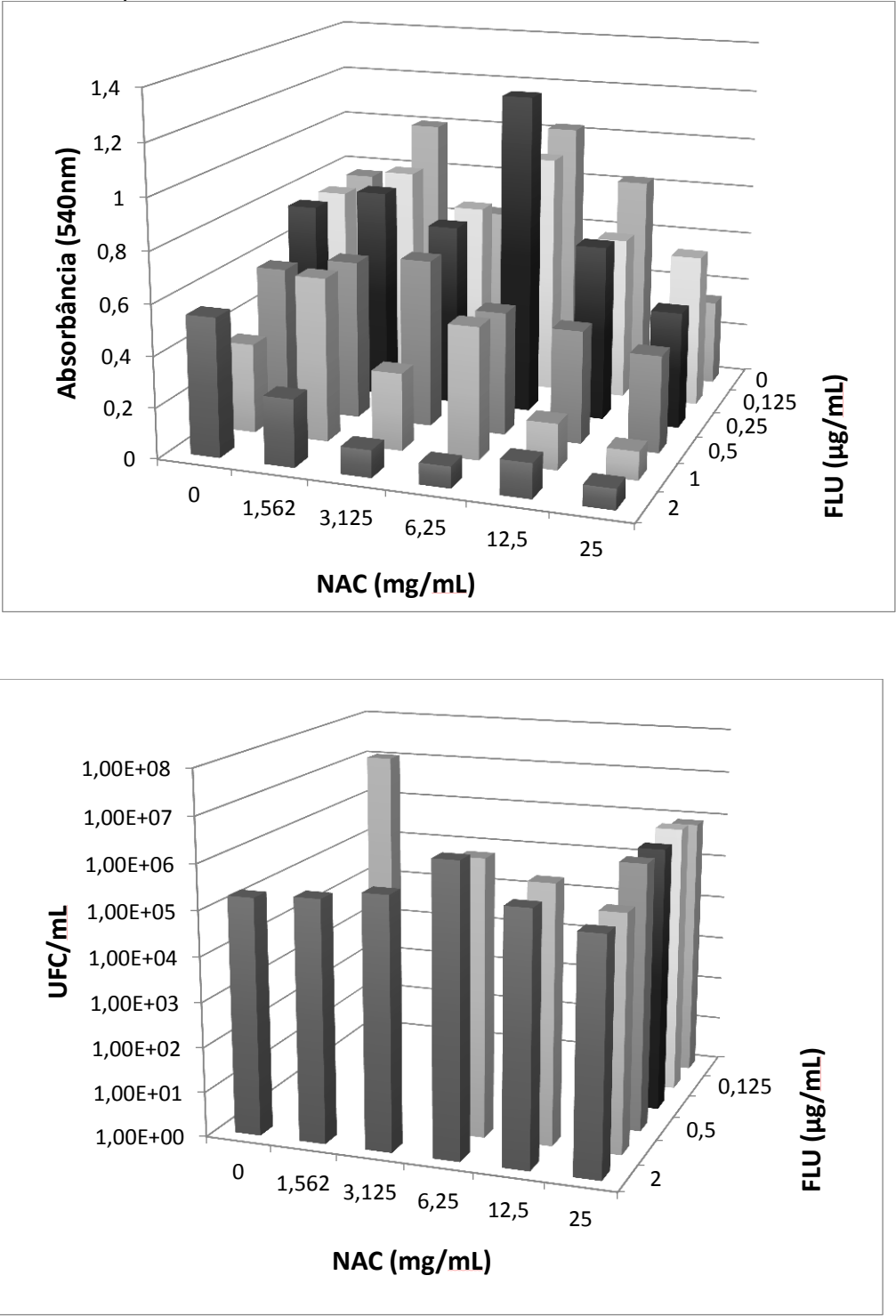
O método de FICI é considerado um método com limitações⁴⁵. Sendo assim, para complementação dos resultados foi realizado a análise de independência de Bliss^{43,45}. Tal método se baseia na ideia de cada fármaco age de forma independente, ou seja, é necessário avaliar eventos independentes. Para utilizar o método de Bliss, devemos utilizar a equação $EIND = EA + EB - EA \times EB$, para se obter os resultados do fármaco A na concentração "a", e o fármaco B na concentração "b". Sendo, a sigla EA quanto o o fármaco A é capaz de inibir o crescimento, sozinho, na concentração "a", e EB significa o mesmo, porém para fármaco B. Já a sigla EIND é a porcentagem esperada de inibição devido a uma associação não interativa do fármaco A em "a" com o fármaco B em "b". Sendo assim a diferença ($\Delta E = EOBS - EIND$) entre o observado e o esperado definiu-se como interação dos fármacos. Em que, pelo método de Bliss, o sinergismo ocorre quando o ΔE tem intervalo de confiança de 95% (IC) forem >0 . O antagonismo, por sua vez ocorre quando ΔE e seu IC 95% forem <0 . E independência de Bliss, quando 95% CI de ΔE se sobrepõe a 0^{43,44,46}. Lembrando, que o experimentos foram realizados em três ocasiões distintas e independentes, as análises de FICI e Bliss foram realizadas para cada combinação de fármaco. Nos gráficos de Bliss, os picos acima de 0 representam sinergismo, e abaixo de 0 antagonismo e 0 nenhuma interação estatisticamente significativa.

5 RESULTADO

5.1 Interação da NAC com os antifúngicos

Com os valores de CIM (Quadro 1), foi calculado o valor de FICI para as combinações subCIM da NAC com cada antifúngico. A associação da NAC com o FLU para CaS geraram valores de absorbância semelhantes ou até superiores em relação ao controle (Figura 1 e Tabela 1). Ao realizar o plaqueamento de alguns poços selecionados, observou-se valor de UFC/mL também elevado, não demonstrando uma ação positiva nesta associação. A combinação foi de 1 µg/mL do FLU com 12,5 mg/mL da NAC resultou em um FICI de 1,5, mostrando ausência de interação.

Figura 1 - Valores médios de DO (540 nm) e UFC/mL obtidos para associação da NAC com o FLU para CaS



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 1 - Valores de desvio-padrão de DO (540 nm) e UFC/mL obtidos para associação da NAC com o FLU para CaS

DO (540 nm)		Fluconazol (µg/mL)					
		2	1	0,5	0,25	0,125	0
	25	0,038	0,043	0,245	0,317	0,141	0,196
	12,5	0,073	0,122	0,282	0,608	0,538	0,505
NAC	6,25	0,392	0,579	0,051	0,425	0,580	0,448
(mg/mL)	3,125	0,430	0,300	0,214	0,260	0,517	0,380
	1,562	0,225	0,583	0,227	0,362	0,460	0,456
	0	0,681	0,224	0,304	0,168	0,439	0,323

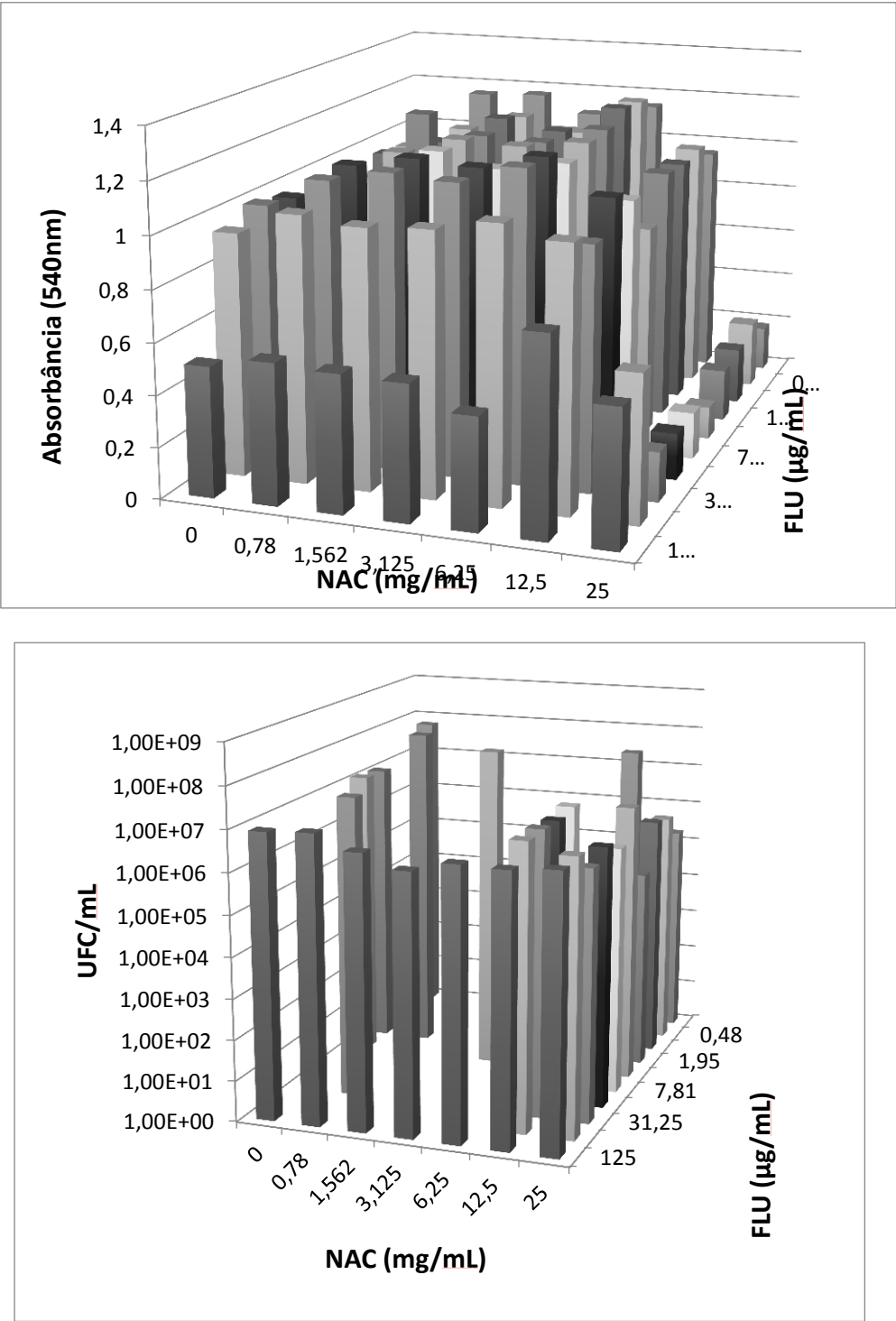
UFC/mL		Fluconazol (µg/mL)					
		2	1	0,5	0,25	0,125	0
	25	9,58E+04	4,92E+04	6,18E+05	6,18E+05	0,00E+00	6,91E+05
	12,5	2,38E+05	2,42E+05	-	-	-	-
NAC	6,25	3,47E+06	2,90E+05	-	-	-	-
(mg/mL)	3,125	2,64E+05	-	-	-	-	-
	1,562	4,10E+04	-	-	-	-	-
	0	1,34E+05	-	-	-	-	6,89E+06

-: amostras não plaqueadas ou plaqueada somente em uma das ocasiões.

Fonte: Elaboração própria.

A associação da NAC com o FLU para CaR resultaram em valores de absorbância e de UFC/mL semelhantes ao controle (Figura 2, Tabela 2). A combinação de 7,81 µg/mL do FLU com 12,5 mg/mL da NAC resultou em um FICI de 0,57, mostrando ausência de interação.

Figura 2 - Valores médios de DO (540 nm) e UFC/mL obtidos para associação da NAC com o FLU para CaR



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2 - Valores de desvio-padrão de DO (540 nm) e UFC/mL obtidos para associação da NAC com o FLU para CaR

DO (540 nm)		NAC (mg/mL)						
		25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,78	0
FLU (µg/mL)	125	0,775	0,692	0,390	0,481	0,521	0,489	0,479
	62,5	0,711	0,449	0,185	0,206	0,187	0,114	0,143
	31,25	0,117	0,239	0,231	0,422	0,474	0,455	0,385
	15,62	0,107	0,096	0,222	0,445	0,473	0,465	0,446
	7,81	0,081	0,093	0,134	0,427	0,443	0,413	0,433
	3,9	0,022	0,166	0,213	0,424	0,496	0,486	0,409
	1,95	0,085	0,095	0,255	0,467	0,435	0,502	0,434
	0,97	0,109	0,179	0,208	0,434	0,471	0,493	0,473
	0,48	0,157	0,128	0,170	0,444	0,525	0,437	0,482
	0	0,112	0,167	0,187	0,411	0,444	0,330	0,330

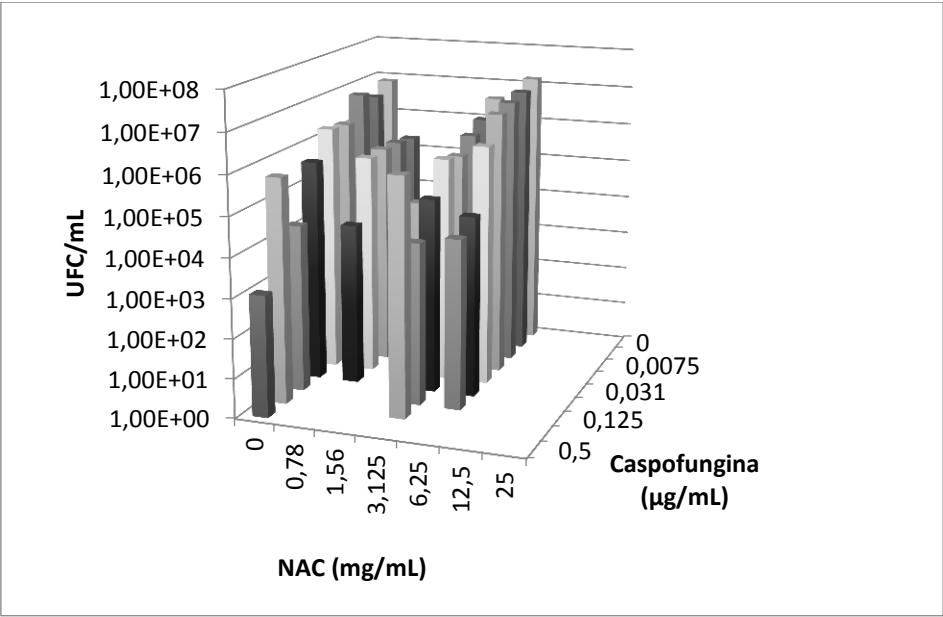
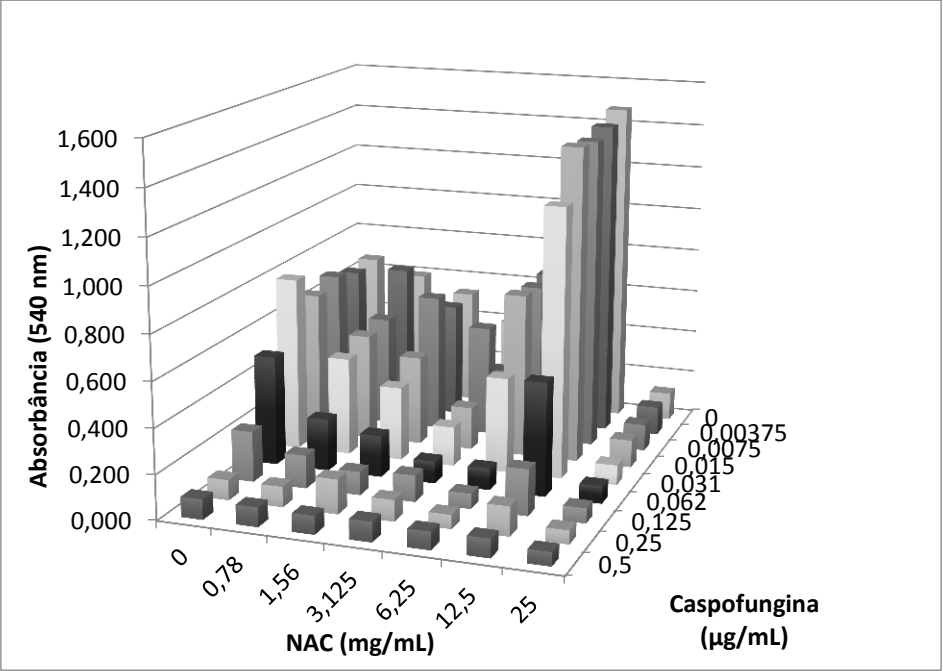
UFC/mL		NAC (mg/mL)						
		25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,78	0
FLU (µg/mL)	125	6,79E+06	1,67E+06	2,11E+06	5,08E+06	4,03E+06	3,62E+06	1,90E+06
	62,5	6,38E+06	2,56E+06	-	-	-	-	-
	31,25	7,48E+05	7,95E+06	-	-	-	-	-
	15,62	2,01E+06	1,16E+07	-	-	-	-	-
	7,81	5,28E+05	7,21E+06	-	-	-	-	-
	3,9	7,23E+06	-	-	-	-	-	-
	1,95	9,63E+04	-	-	-	-	-	-
	0,97	1,22E+06	-	-	-	-	-	-
	0,48	7,50E+05	-	-	-	-	-	-
	0	6,90E+04	-	-	-	-	-	7,82E+07

-: amostras não plaqueadas ou plaqueada somente em uma das ocasiões.

Fonte: Elaboração própria.

A associação da NAC com a CASP para CaS demonstrou valores de absorbância e UFC/mL inferiores e semelhantes ao controle (Figura 3, Tabela 3). A combinação de 0,031 µg/mL da CASP com 3,125 mg/mL da NAC resultou em um FICI de 0,373, mostrando um sinergismo entre os fármacos, com uma redução média de 1,15 log₁₀ da viabilidade de CaS em relação ao controle.

Figura 3 - Valores médios de absorbância (540 nm) e UFC/mL obtidos para associação da NAC com o CASP para CaS



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 - Valores de desvio-padrão de DO (540 nm) e UFC/mL obtidos para associação da NAC com a CASP para CaS

DO (540 nm)		NAC (mg/mL)						
		25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,78	0
CASP (µg/mL)	0,5	0,004	0,029	0,029	0,023	0,002	0,001	0,004
	0,25	0,003	0,070	0,004	0,046	0,121	0,009	0,006
	0,125	0,009	0,225	0,006	0,070	0,030	0,110	0,178
	0,062	0,014	0,683	0,025	0,030	0,163	0,133	0,181
	0,031	0,029	0,551	0,288	0,100	0,050	0,258	0,276
	0,015	0,024	0,315	0,136	0,069	0,367	0,118	0,158
	0,0075	0,028	0,250	0,147	0,334	0,361	0,316	0,264
	0,00375	0,048	0,348	0,256	0,134	0,112	0,170	0,301
	0	0,026	0,240	0,124	0,036	0,154	0,237	0,201

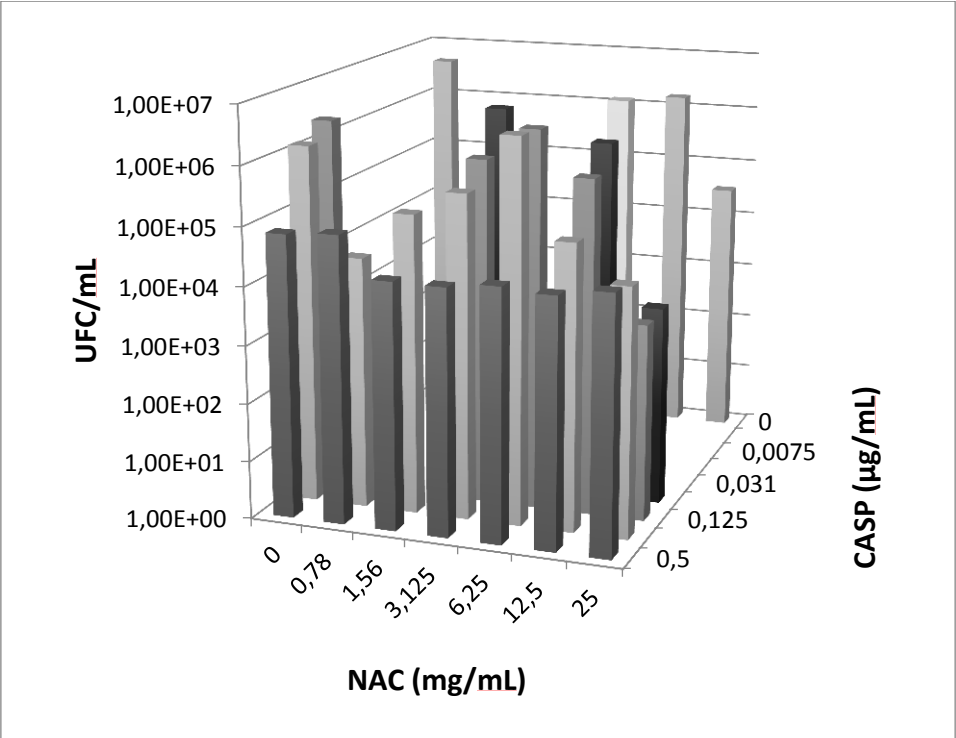
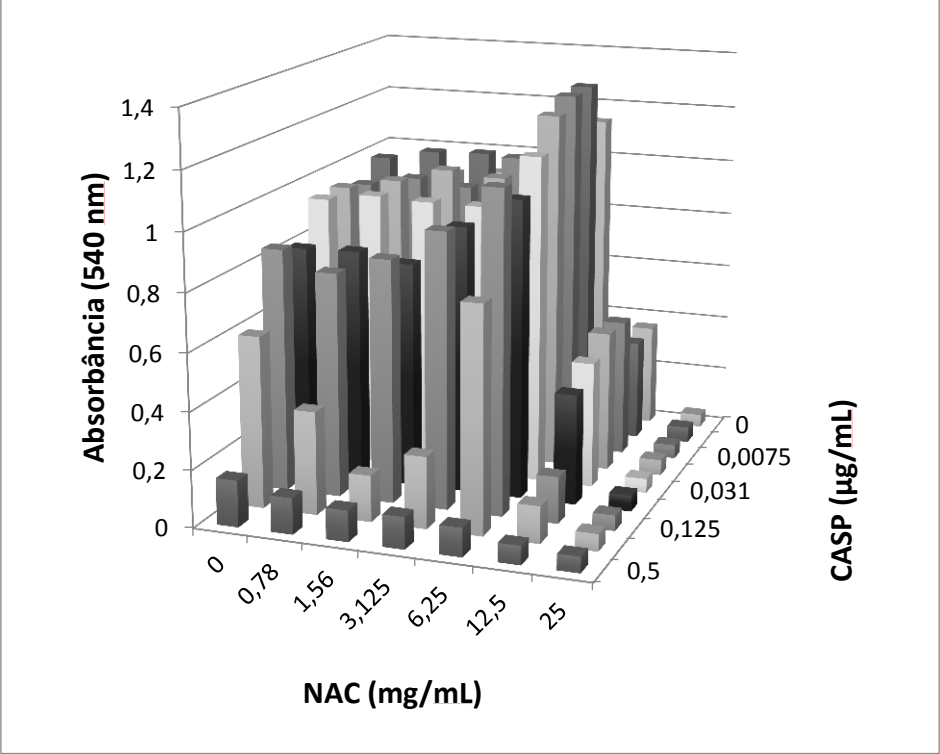
UFC/mL		NAC (mg/mL)						
		25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,78	0
FLU (µg/mL)	0,5	-	-	-	-	-	-	1,63E+03
	0,25	-	-	-	1,70E+06	-	-	8,46E+05
	0,125	-	-	2,92E+04	2,10E+04	-	-	1,67E+04
	0,062	-	-	3,07E+04	1,46E+05	-	-	3,99E+05
	0,031	-	-	2,21E+06	8,77E+05	-	2,53E+05	1,07E+06
	0,015	-	-	5,52E+06	2,35E+05	-	-	1,22E+06
	0,0075	-	-	5,64E+06	9,06E+05	-	2,59E+05	7,56E+06
	0,00375	-	-	6,74E+06	7,83E+05	-	-	2,54E+06
	0	-	-	9,11E+06	1,83E+06	-	-	7,10E+06

-: amostras não plaqueadas ou plaqueada somente em uma das ocasiões.

Fonte: Elaboração própria.

As concentrações da NAC associadas às concentrações da CASP para CaR resultaram em valores de absorbância e UFC/mL semelhantes e até superiores ao controle (Figura 4, Tabela 4). A combinação foi 0,25 µg/mL da CASP com 12,5 mg/mL da NAC mostrou um FICI de 1,5, indicando ausência de interação entre os fármacos.

Figura 4 - Valores médios de absorbância (540 nm) e UFC/mL obtidos para associação da NAC com o CASP para CaR



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Valores de desvio-padrão de DO (540 nm) e UFC/mL obtidos para associação da NAC com a CASP para CaR

DO (540 nm)		NAC (mg/mL)						
		25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,78	0
CASP (µg/mL)	0,5	0,002	0,002	0,037	0,003	0,006	0,026	0,015
	0,25	0,004	0,054	0,294	0,013	0,030	0,278	0,011
	0,125	0,003	0,074	0,016	0,046	0,023	0,128	0,110
	0,062	0,006	0,124	0,018	0,010	0,060	0,169	0,129
	0,031	0,004	0,308	0,020	0,067	0,051	0,009	0,139
	0,015	0,004	0,224	0,114	0,054	0,014	0,042	0,003
	0,0075	0,005	0,197	0,002	0,013	0,044	0,069	0,016
	0,00375	0,004	0,190	0,031	0,109	0,088	0,016	0,049
	0	0,001	0,318	0,259	0,223	0,161	0,172	0,103

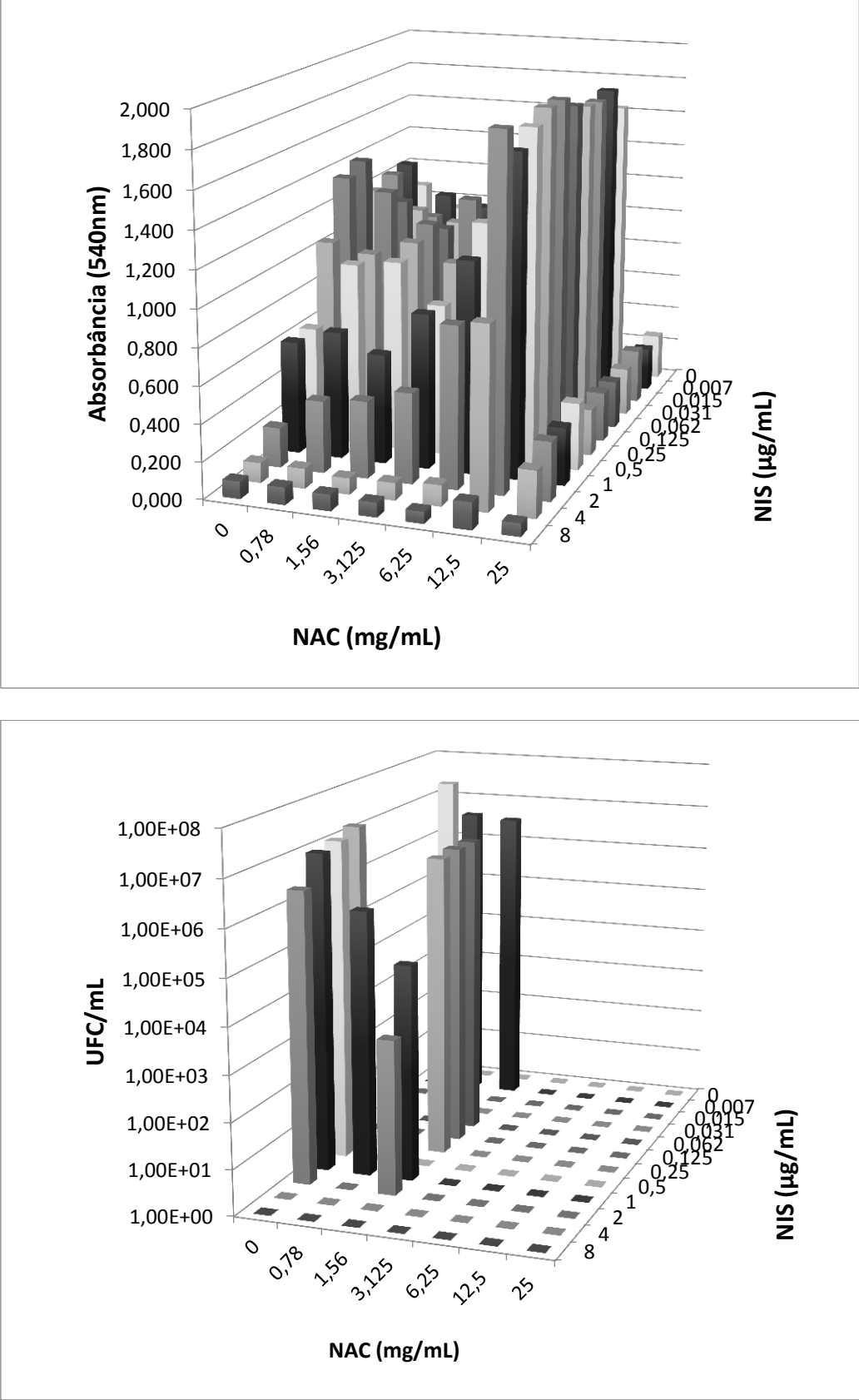
UFC/mL		NAC (mg/mL)						
		25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,78	0
CASP (µg/mL)	0,5	3,18E+04	1,57E+04	2,32E+04	2,46E+04	1,61E+04	8,92E+04	6,38E+04
	0,25	1,47E+04	5,83E+04	4,92E+06	2,66E+05	5,78E+04	-	9,61E+05
	0,125	-	4,75E+05	-	-	-	-	-
	0,062	-	-	-	-	-	-	-
	0,031	-	-	-	-	-	-	-
	0,015	-	-	-	-	-	-	-
	0,0075	-	-	-	-	-	-	-
	0,00375	-	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	1,00E+06

-: amostras não plaqueadas ou plaqueada somente em uma das ocasiões.

Fonte: Elaboração própria.

As amostras tratadas somente com NAC e NIST mostraram valores de DO iguais e maiores que o controle. No plaqueamento, devido a DO alta em vários poços, foram selecionadas poucas associações para avaliação da viabilidade fúngica (Figuras 5 e 6, Tabelas 5 e 6), os quais também apresentaram valores de UFC/mL similares em relação ao controle.

Figura 5 - Valores médios de absorbância (540 nm) e UFC/mL obtidos para associação da NAC com a NIST para CaS



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 5 - Valores de desvio-padrão de DO (540 nm) e UFC/mL obtidos para associação da NAC com a NIST para CaS

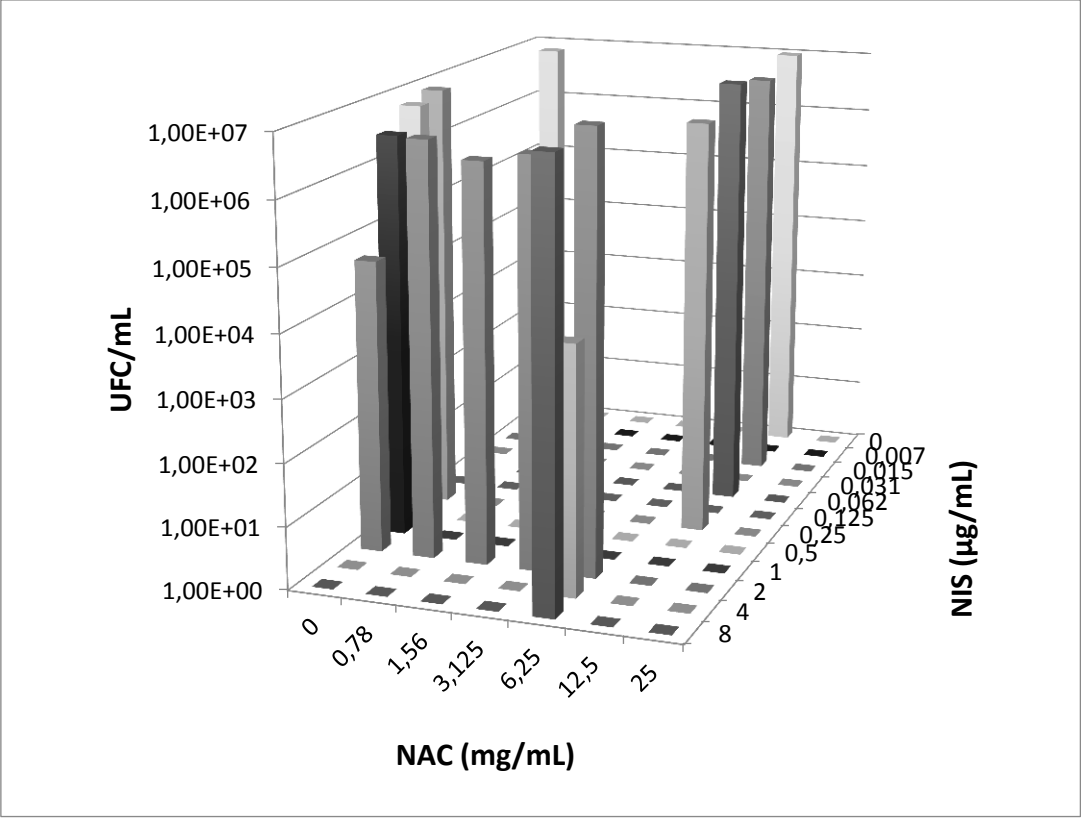
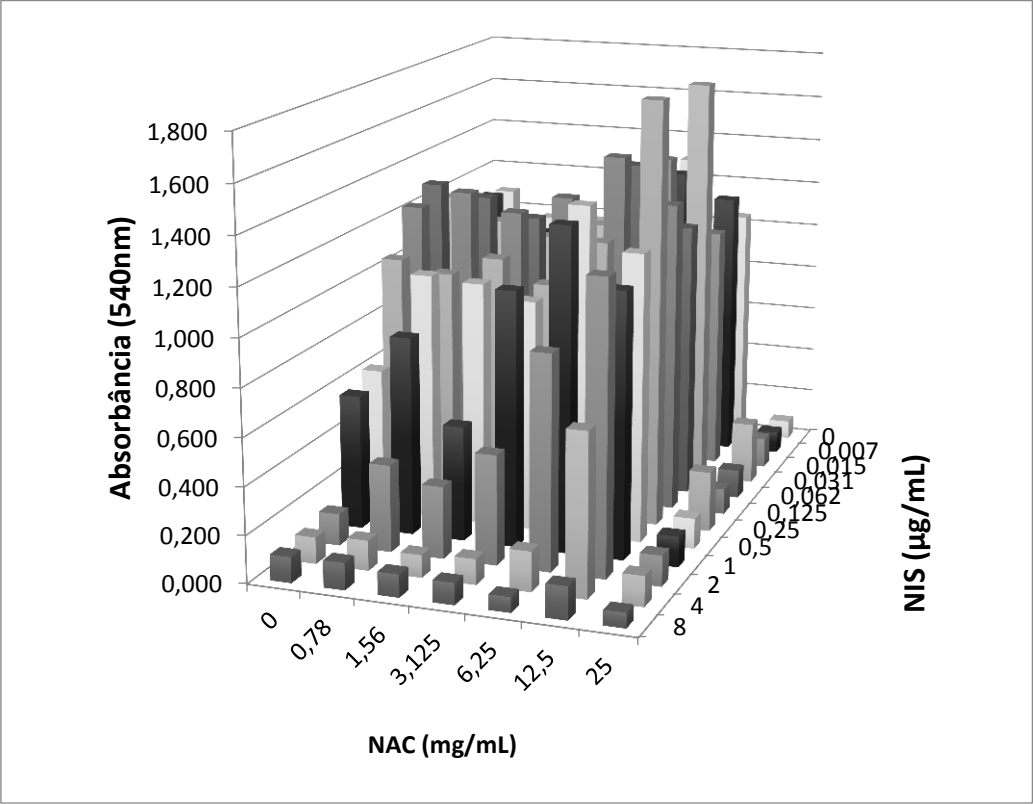
DO (540 nm)		NAC (mg/mL)						
		25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,78	0
NIST (µg/mL)	8	0,015	0,136	0,003	0,001	0,006	0,010	0,008
	4	0,079	0,222	0,049	0,006	0,001	0,016	0,023
	2	0,165	0,052	0,024	0,330	0,449	0,424	0,175
	1	0,156	0,138	0,359	0,153	0,304	0,197	0,704
	0,5	0,231	0,036	0,313	0,082	0,038	0,141	0,733
	0,25	0,132	0,061	0,478	0,274	0,619	0,163	0,200
	0,125	0,159	0,103	0,441	0,418	0,511	0,424	0,136
	0,062	0,111	0,028	0,424	0,396	0,427	0,447	0,132
	0,031	0,153	0,123	0,432	0,274	0,244	0,238	0,126
	0,015	0,134	0,110	0,301	0,253	0,275	0,136	0,005
	0,007	0,145	0,242	0,003	0,060	0,231	0,211	0,131
	0	0,197	0,161	0,200	0,093	0,098	0,060	0,032

UFC/mL		NAC (mg/mL)						
		25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,78	0
NIST (µg/mL)	8	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	3,32E+06
	1	-	-	-	-	-	-	1,29E+07
	0,5	-	-	-	-	-	-	1,60E+07
	0,25	-	-	-	-	-	-	4,38E+06
	0,125	-	-	-	-	-	-	-
	0,062	-	-	-	-	-	-	-
	0,031	-	-	-	-	-	-	-
	0,015	-	-	-	-	-	-	-
	0,007	-	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	1,74E+07

-: amostras não plaqueadas ou plaqueada somente em uma das ocasiões.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 - Valores médios de absorbância (540 nm) e UFC/mL obtidos para associação da NAC com o NIST para CaR



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6- Valores de desvio-padrão de DO (540 nm) e UFC/mL obtidos para associação da NAC com a NIST para CaR

DO (540 nm)		NAC (mg/mL)						
		25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,78	0
NIST (µg/mL)	8	0,006	0,124	0,001	0,017	0,016	0,018	0,029
	4	0,100	0,200	0,126	0,013	0,011	0,011	0,028
	2	0,106	0,886	0,012	0,289	0,286	0,390	0,057
	1	0,104	0,732	0,060	0,181	0,148	0,406	0,641
	0,5	0,105	0,808	0,167	0,135	0,044	0,075	0,727
	0,25	0,079	0,914	0,209	0,091	0,359	0,010	0,057
	0,125	0,073	0,881	0,337	0,379	0,366	0,406	0,319
	0,062	0,088	0,850	0,298	0,194	0,268	0,373	0,303
	0,031	0,069	0,720	0,240	0,204	0,165	0,199	0,209
	0,015	0,107	0,857	0,151	0,103	0,180	0,245	0,173
	0,007	0,063	0,605	0,054	0,010	0,104	0,035	0,073
	0	0,047	0,663	0,039	0,035	0,085	0,023	0,049

UFC/mL		NAC (mg/mL)						
		25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,78	0
NIST (µg/mL)	8	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	2,46E+06	-	6,69E+04
	1	-	-	-	-	-	-	4,30E+06
	0,5	-	-	-	-	-	-	1,23E+06
	0,25	-	4,60E+06	-	-	-	-	-
	0,125	-	-	-	-	-	-	-
	0,062	-	-	-	-	-	-	-
	0,031	-	-	-	-	-	-	-
	0,015	-	-	-	-	-	-	-
	0,007	-	-	-	-	-	-	-
	0	-	6,73E+06	-	-	-	-	1,41E+05

-: amostras não plaqueadas ou plaqueada somente em uma das ocasiões.

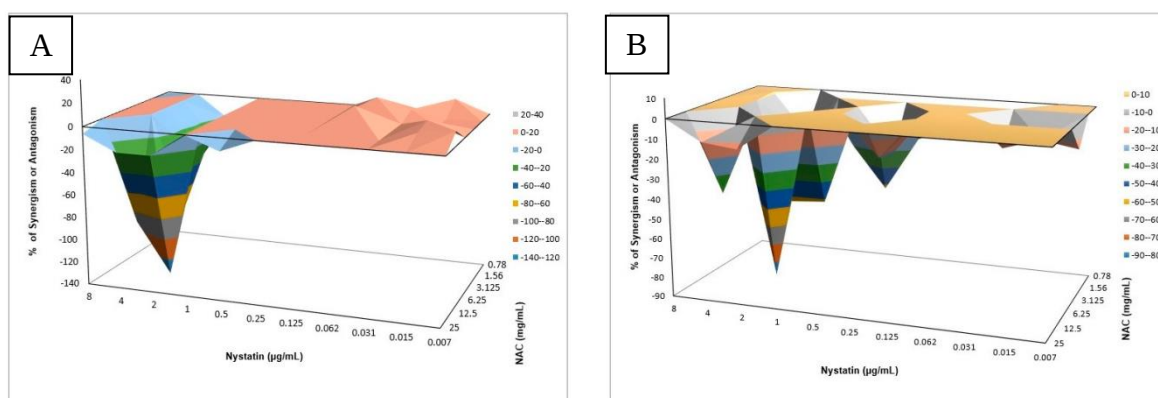
Fonte: Elaboração própria.

5.2 Avaliação dos resultados pelo método de Bliss

Como demonstrado no Quadro 1, as CIMs de nistatina, fluconazol e caspofungina para CaS foram 2, 0,5 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e para CaR foram 2, 125 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Pelo método de FICI obtivemos sinergismo de NAC apenas com caspofungina para CaS, com valores FICI de 0,245 e 0,373 nas combinações de 3,125 mg/mL NAC com 0,015 $\mu\text{g/mL}$ caspofungina e 3,125 mg/mL NAC com 0,031 $\mu\text{g/mL}$ caspofungina, respectivamente, sendo as reduções de viabilidade de 1,15 a 1,28 $\log_{10}$.

Porém, a análise de independência de Bliss demonstrou antagonismo de NAC com NIST para CaS (Figura 7A, IC de -0,6803 – -0,0003 a -1,6437 – -1,0301 para NAC em todas as concentrações com 2 $\mu\text{g/mL}$ de NIST) e CaR (Figura 7B, CI de -0,2059 – -0,0398 a -1,2331 – -0,5081 para NAC a 25 e 6,25 mg/mL, respectivamente, com 2 $\mu\text{g/mL}$ de NIST).

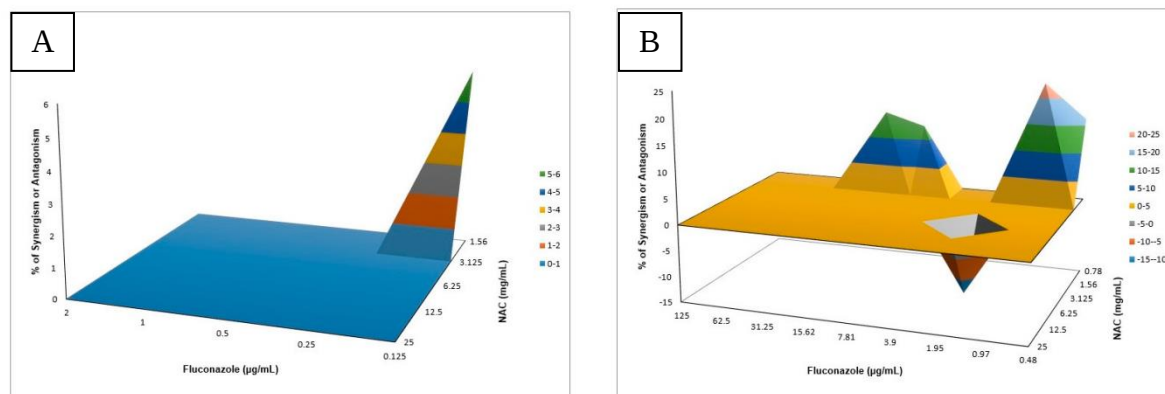
Figura 7 - Gráfico de independência de Bliss avaliando NAC com NIST para CaS (A) e CaR (B), respectivamente



Fonte: Nunes et al., 2020¹⁹.

Para a cepa de CaS, foi observado sinergismo para NAC e FLU, nas seguintes concentrações: 1,56 mg/mL FLU e 0,125 $\mu\text{g/mL}$ NAC (Figura 8A, IC 0,0084– 0,1115). Para CaR, com o mesmo fármaco foi observado sinergismo com NAC a 0,78 mg/mL com FLU em 15,62, 7,81, 0,97 e 0,48 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8B, IC de 0,0684–0,1808 a 0,0720–0,3834), porém também encontramos antagonismo para NAC em 6,25 mg/mL com FLU a 1,95 $\mu\text{g/mL}$ (IC -0,2277 – -0,0340).

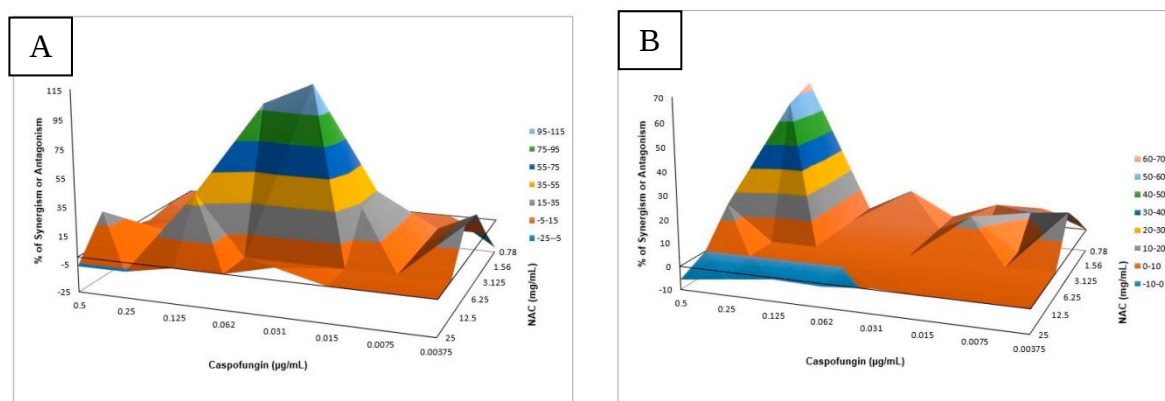
Figura 8 - Gráfico de independência de Bliss avaliando NAC com FLU para CaS (A) e CaR (B), respectivamente



Fonte: Nunes et al., 2020¹⁹.

Já para a caspofungina, um sinergismo com valores altos de ΔE médio foi observado para CaS quando NAC em 6,25 e 3,125 mg/mL foi combinada com CASP de 0,062 a 0,015 µg/mL (Figura 9A, IC de 0,0141–0,1560 a 0,0892–2,2102). Foi observado um sinergismo também na cepa de CaR, com NAC em 3,125 e 1,56 mg/mL associado a 0,25 µg/mL de CASP (Figura 9B, IC de 0,0035–0,1328 a 0,6138–0,6496).

Figura 9 - Gráfico de independência de Bliss avaliando NAC com CASP para CaS (A) e CaR (B), respectivamente



Fonte: Nunes et al., 2020¹⁹.

Os resultados mencionados anteriormente foram apresentados no congresso XXXI Congresso de iniciação científica da UNESP, como parte do protocolo a ser seguido na pesquisa desenvolvida, e a apresentação deste trabalho recebeu menção honrosa. O certificado está contido no Anexo A.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho e em um estudo prévio¹⁹ do nosso grupo de pesquisa, concluímos que a NAC mostrou a mesma MIC (25 mg/mL) para CaS e CaR. O estudo citado anteriormente avaliou culturas planctônicas e biofilmes, e a CIM da NAC foi consideravelmente alta²¹. Diante disto, optou-se por investigar um possível efeito sinérgico da NAC que possibilitasse a sua utilização em concentrações menores, razão pelo qual o presente trabalho foi desenvolvido.

Um aspecto original da presente investigação se deve ao fato da escassez na literatura da ação da NAC em cepas de referência de *C. albicans*, principalmente no que diz respeito a associá-la com antifúngicos convencionais na busca de um efeito sinérgico analisado pelo método de independência de Bliss. A análise de independência de Bliss considera o efeito de diferentes fármacos com mecanismos de ação independente e, por isso, é o método de escolha para análise de fármacos com mecanismos de ação distintos (como por exemplo, antifúngico e agente mucolítico utilizados neste estudo). Apesar de um estudo prévio ter avaliado a ação da NAC com anfotericina B e fluconazol em biofilmes de *C. albicans*⁴⁸ culturas planctônicas não foram avaliadas e o sinergismo foi mensurado pelo efeito mediano com equações próprias. Nesse estudo, NAC e fluconazol na proporção 1000:1 não apresentaram sinergismo³⁰. Um outro estudo demonstrou que a NAC com cetoconazol potencializou a inibição de aderência e de biofilmes maduros quando comparados com os fármacos sozinhos³³. No entanto, essas investigações citadas não utilizaram o método de Bliss para avaliação de sinergismo.

O método de independência de Bliss supera as limitações do método FICI, tais como: 1. necessidade de se determinar um valor de ponto de corte de CIM, principalmente quando se combina fármacos fungicidas e fungistático; 2. escolha de valores de corte para FICI; 3. sensibilidade de erros intra-experimentais, principalmente em diluições 1:1; 4. imprecisão de um FICI real quando valores de CIM fora do padrão são obtidos; 5. ausência de um sumário efetivo das interações e 6. dificuldade em interpretar o resultado estatisticamente⁴³.

No atual estudo, foi possível encontrar um efeito sinérgico da associação da NAC com a CASP para CaS (tanto pelo método de FICI como de independência de Bliss). Sabendo que a CASP atua sobre o $\beta(1,3)$ -D-glucano, um polissacarídeo essencial da parede fúngica de *C. albicans*²⁰, uma hipótese para esse efeito pode

ser encontrada na pesquisa de origem¹⁹, na qual a NAC reduziu significativamente os polissacarídeos solúveis da matriz (WSP)¹⁹. Ou seja, os dois fármacos, por compartilharem uma ação sobre um componente semelhante, os polissacarídeos, possivelmente intensificou seus efeitos. Outro estudo também demonstrou a ação da NAC em polissacarídeos de biofilmes bacterianos³⁸. O sinergismo entre NAC e CASP apresentou valores altos de ΔE (porcentagem de inibição de crescimento), com até 115% para CaS e 70% para CaR (Figura 9).

O FLU e a NIST em contrapartida, apresentam mecanismos de ação diferentes da NAC. FLU impede o crescimento de fungos por inibir que estes sintetizem compostos de ergosterol necessários à sua sobrevivência¹⁴. NIST impede a ligação aos esteroides existentes na membrana celular dos fungos susceptíveis, com resultante alteração na permeabilidade da membrana celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático¹⁶. Sendo assim, verifica-se que os mecanismos de ação dos fármacos são distintos e parecem não se associarem quando combinados. Apesar deste estudo ter verificado sinergismo entre a NAC e o fluconazol para algumas concentrações avaliadas, este resultado deve ser interpretado com cautela, uma vez que os valores de ΔE obtidos foram baixos (Figura 8): 6% para CaS e 12% a 23% para CaR, os quais podem não ser suficientes para o tratamento de uma infecção por *C. albicans*.

O uso da NAC tem um aspecto extremamente positivo, pois se trata de um redirecionamento de medicamento (*"drug repurposing"*)²¹, isto é, o uso de um fármaco já conhecido e seguro na área de saúde é testado para uma nova indicação. Esse redirecionamento inclui vantagens, como: menor tempo e menor custo de investigação comparado com as avaliações clínicas de segurança de novos medicamento ainda não disponíveis comercialmente²¹. Porém, como limitações deste estudo, pode-se mencionar: avaliação somente de culturas planctônicas e modelo in vitro, além de ausência de isolados clínicos de *C. albicans* e outras espécies fúngicas.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesta investigação, pode-se concluir que a NAC apresentou sinergismo com CASP tanto para CaS como para CaR com altos valores de ΔE . A combinação de NAC com fluconazol resultou em sinergismo para CaS e CaR, mas também antagonismo para CaR, porém os valores de ΔE baixos no sinergismo. Já a NAC com nistatina resultou em antagonismo para ambas as cepas. Esses resultados sugerem que a combinação de NAC com CASP tem maior potencial para o tratamento de infecções resistentes e causadas por biofilmes de *C. albicans*. Porém, estudos com biofilmes, modelos in vivo e ensaios clínicos precisam ser ainda desenvolvidos.

REFERÊNCIAS*

1. Samaranayake LP. Nutritional factors and oral candidosis. *J Oral Pathol.* 1986; 15(2): 61-52.
2. Costa SF, Marinho I, Araújo EAP, Manrique AEI, Medeiros EAS, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. *J Hosp Infect.* 2000;45(1): 69-72.
3. Dimopoulos G, Karabinis A, Samonis G, Falagas ME. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007; 26(6): 377-84.
4. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011; 20(4): 251-60.
5. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A et al. The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PLoS One.* 2015; 10(9): e0137717.
6. Davoudi A, Ebadian B, Nosouhian S. Role of laser or photodynamic therapy in treatment of denture stomatitis: a systematic review. *J Prosthet Dent.* 2018; 120(4): 498-505.
7. Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol 2000.* 2009; 49(1): 39-59.
8. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011; 75(2): 213-67.
9. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: Selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(9): 719-27.
10. Rudnicka E, Napierała P, Podfigurna A, Męczekalski B, Smolarczyk R, Grymowicz M. The World Health Organization (WHO) approach to healthy ageing. *Maturitas.* 2020; 139: 6-11.
11. Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(8): 4814-22.
12. Vergani CE, Sanitá P V., Mima EGO, Pavarina AC, Machado AL. Oral candidiasis: Conventional and alternative treatment options. In: Contreras F, Fuentes P., editors. *Candidiasis: epidemiology, symptoms and treatment options.* Hauppauge: Nova Science Publishers; 2013.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>.

13. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Jan;39(1):1-8.
14. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(4): 501-17.
15. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(2): 382-402.
16. Prasad R, Gaur N, Gaur M, Komath S. Efflux pumps in drug resistance of *Candida*. *Infect Disord - Drug Targets*. 2008; 6(2): 69-83.
17. Rex JH, Alexander BD, Andes D, Arthington-Skaggs B, Brown SD, Chaturvedi V et al. M27-A3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
18. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization; 2014 [acesso em 10 jan 2023].Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>
19. Nunes TSBS, Rosa LM, Vega-Chacón Y, Mima EG de O. Fungistatic action of N-acetylcysteine on *Candida albicans* biofilms and its interaction with antifungal agents. *Microorganisms*. 2020; 8(7): 980.
20. Bachmann SP, Patterson TF, López-Ribot JL. In vitro activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(6): 2228-30.
21. Corsello SM, Bittker JA, Liu Z, Gould J, McCarren P, Hirschman JE et al. The Drug repurposing hub: a next-generation drug library and information resource. *Nat Med*. 2017; 23(4): 405-8.
22. Nosengo N. Can you teach old drugs new tricks? *Nature*. 2016; 534(7607): 314-6.
23. Sevier CS, Kaiser CA. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(11): 836-47.
24. Blasi F, Page C, Rossolini GM, Pallecchi L, Matera MG, Rogliani P, Cazzola M. The effect of N-acetylcysteine on biofilms: implications for the treatment of respiratory tract infections. *Respir Med*. 2016; 117: 190-7.
25. Marchese A, Bozzolasco M, Gualco L, Debbia EA, Schito GC, Schito AM. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2003; 22(2): 95-100.
26. Schwandt LQ, Van Weissenbruch R, Stokroos I, Van Der Mei HC, Busscher HJ, Albers FWJ. Prevention of biofilm formation by dairy products and N-acetylcysteine on voice prostheses in an artificial throat. *Acta Otolaryngol*. 2004; 124(6): 726-31.
27. Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2012; 38(1): 81-5.
28. Moon JH, Choi YS, Lee HW, Heo JS, Chang SW, Lee JY. Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens. *J Microbiol*. 2016; 54(4): 322-9.

29. del Prado G, Ruiz V, Naves P, Rodríguez-Cerrato V, Soriano F, del Carmen Ponte M. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strains and effects of human serum albumin, ibuprofen, N-acetyl-L-cysteine, amoxicillin, erythromycin, and levofloxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 67(4): 311-8.
30. Venkatesh M, Rong L, Raad I, Versalovic J. Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. *J Med Microbiol*. 2009; 58(7): 936-44.
31. Cieplik F, Tabenski L, Buchalla W, Maisch T. Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens. *Front Microbiol*. 2014; 12(5): 405.
32. Aslam S, Darouiche RO. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections. *Int J Artif Organs*. 2011; 34(9): 752-8.
33. El-Baky RMA, El Ela DMMA, Gad GFM. N-acetylcysteine inhibits and eradicates *Candida albicans* biofilms. *Am J Infect Dis Microbiol*. 2014; 2 (5), 122-30.
34. Dowd FJ, Johnson BS, Mariotti AJ. Pharmacology and therapeutics for dentistry. 7th ed. Maryland Heights: Mosby; 2016.
35. De Farias Nc, Buffon Mm, Cini R. Avaliação in vitro da ação antifúngica do digluconato de clorhexidina e nistatina no controle do crescimento de *Candida albicans*. *Visão Acad*. 2003 [acesso em 10 jan 2023]. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/535>>.
36. Bartizal K, Gill CJ, Abruzzo GK, Flattery AM, Kong L, Scott PM et al. In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(11): 2326-32.
37. Barchiesi F, Schimizzi AM, Fothergill AW, Scalise G, Rinaldi MG. In vitro activity of the New Echinocandin Antifungal, MK-0991, against common and uncommon clinical isolates of *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999;18(4): 302-4.
38. Marco F, Pfaller MA, Messer SA, Jones RN. Activity of MK-0991 (L-743,872), a new echinocandin, compared with those of LY303366 and four other antifungal agents tested against blood stream isolates of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 32(1): 33-7.
39. Del Poeta M, Schell WA, Perfect JR. In vitro antifungal activity of pneumocandin L-743,872 against a variety of clinically important molds. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(8): 1835-6.
40. CLSI Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard: Doc M27-A3 Suppl S3. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
41. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52(1): 1.
42. Bachmann SP, Ramage G, VandeWalle K, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL. Antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(11): 3657-9.

43. Meletiadiis J, Verweij PE, Te Dorsthorst DTA, Meis JFGM, Mouton JW. Assessing in vitro combinations of antifungal drugs against yeasts and filamentous fungi: comparison of different drug interaction models. *Med Mycol.* 2005; 43(2): 133-53.
44. Roell KR, Reif DM, Motsinger-Reif AA. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. *Frontiers in Pharmacology.* 2017; 20(8): 158.
45. Zhao T, Liu Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2010;10(1): 140.
46. Petraitis V, Petraitiene R, Hope WW, Meletiadiis J, Mickiene D, Hughes JE et al. Combination therapy in treatment of experimental pulmonary aspergillosis: In vitro and in vivo correlations of the concentration- and dose-dependent interactions between anidulafungin and voriconazole by Bliss independence drug interaction analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 2382–91.

ANEXO A – CERTIFICADO DA MENÇÃO HONROSA



XXXI Congresso de Iniciação
Científica da Unesp

MENÇÃO HONROSA

Certificamos que o trabalho intitulado "*Associação da N-acetilcisteína com antifúngicos contra Candida albicans*" apresentado pela Acadêmica **LETICIA MATHEUS ROSA** e orientada pelo Professor Doutor EWERTON GARCIA DE OLIVEIRA MIMA, recebeu **Menção Honrosa** na **1ª fase** do **XXXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp - Área de Biológicas**, realizada no período de **23 a 25 de setembro de 2019**, na Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araraquara - SP.

Araraquara, 25 de setembro de 2019

Prof. Dr. EDUARDO COLOMBARI
Presidente da Comissão Permanente de Pesquisa