

Bárbara de Lima

**ANFOTERICINA B PRÉ-AQUECIDA:  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FRENTE A ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *Candida* spp. DO HU-UFSC**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Título de Mestre em Farmácia na Área de Concentração de Análises Clínicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabíola Branco  
Filippin Monteiro

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Karin Silva  
Caumo

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lima, Bárbara de  
ANFOTERICINA B PRÉ-AQUECIDA: AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida*  
spp. DO HU-UFSC / Bárbara de Lima ; orientadora,  
Fabiola Branco Filippin Monteiro, coorientadora,  
Karin Silva Caumo, 2017.  
83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,  
2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Anfotericina B pré-aquecida. 3.  
Infecções fúngicas sistêmicas. 4. Super-agregados.  
5. Nefrototoxicidade. I. Monteiro, Fabiola Branco  
Filippin . II. Caumo, Karin Silva . III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

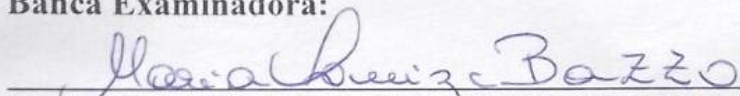
**“ANFOTERECINA B PRÉ-AQUECIDA:  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FRENTE A  
ISOLADOS CLÍNICOS DE Candida spp. DO HU-  
UFSC”**

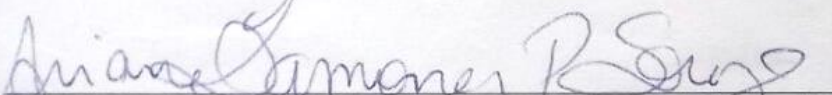
**POR**


**Bárbara de Lima**

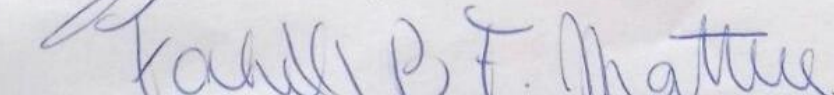
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

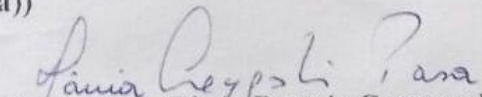
**Banca Examinadora:**

  
Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Bazzo (UFSC – Membro Titular)

  
Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza (UFSC – Membro Titular)

  
Prof(a). Dr(a). Glauber Wagner (UFSC - Membro Titular)

  
Prof(a). Dr(a). Fabíola Branco Filippin Monteiro (UFSC – Orientador(a))

  
Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC

Florianópolis, 29 de março de 2017.



Dedico este trabalho aos meus pais,  
pelo amor e apoio incondicional.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, meus pais Maria Ignez e Sérgio, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos e em todas as minhas decisões e pelo tanto deles que carrego comigo e sou, a minha irmã Marieli pelo exemplo de dedicação e inspiração que me motivou à escolha do mestrado

;

À minha orientadora profa. Fabíola Branco Filippin Monteiro pelo grande acolhimento na minha chegada ao PG, pelo aprendizado científico, e pelo seu apoio e paciência;

À minha co-orientadora profa. Karin Silva Caumo, pelo auxílio durante esta caminhada, pelos ensinamentos e carinho durante este período;

À profa. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, por a partir do meu contato me acolher de braços abertos e me apresentar à profa. Fabíola, o que possibilitou esta oportunidade;

Aos colegas do laboratório GEIMM: Tamara, Letícia, Najla, Fernanda, Adny, Louise, Iara, Marjorie, Jelver, Gabi, Júlia, Alex, Léo, Jeff, Laura, Nanda, Tati, Daiane, Débora, Ícaro, Bianca, pelo acolhimento, amizade, auxílio nas dúvidas e experimentos e por fazerem destes meus dois anos de mestrado um período especial.

À minha parceira de anfotericina B, Malu, pelo companheirismo durante os experimentos e pela grande amizade que levo para além do mestrado;

À Michele Rode, hoje doutoranda e minha colega no GEIMM, mas minha colega e tutora já no lab anterior, quando cheguei à Florianópolis na tentativa de ingressar no mestrado, por me guiar no momento de uma nova escolha;

Ao meu cunhado Daniel, pela amizade e suporte quando cheguei em Floripa;

Às minhas companheiras de apartamento neste último ano, Deise e Ana Paula;

Às minhas amigas de Carazinho: Andressa, Carol, Gabi e Sheila pela amizade e apoio durante este período;

Aos demais familiares e amigos de Carazinho pelas palavras de incentivo nos momentos de encontro;

À Sara Letícia Kretzer, do setor de Micologia do HU pela troca de conhecimento e auxílio;

Ao setor de Microbiologia do HU pelo auxílio e atenção;

Aos servidores da universidade e em especial, Sra. Ivonete pelo auxílio técnico no laboratório e carinho;

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho;

A Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC, que possibilitou este trabalho;

Ao CNPq Projeto nº 462243/ 2014-1, pelo suporte financeiro. Inserir os agradecimentos aos colaboradores à execução do trabalho.



## RESUMO

A Anfotericina B (AB) é o principal fármaco de escolha para o tratamento de infecções fúngicas. A alta incidência e gravidade destas infecções estão relacionadas principalmente a pacientes hospitalizados, que apresentam algum estado de imunossupressão, seja pelo uso de agentes quimioterápicos ou pacientes imunocomprometidos com HIV/AIDS. A formulação de AB em desoxicolato de sódio (AB-DOC), comercialmente disponível como Fungizone®, é a terapia comumente utilizada e considerada padrão-ouro, entretanto, sua administração em pacientes já debilitados provoca efeitos adversos graves, destacando-se a nefrotoxicidade. O aquecimento de AB foi avaliado quanto à formação de agregados e quanto à toxicidade em células de epitélio renal humano *in vitro* e eficácia em isolados clínicos de *Candida* spp. provenientes de amostras coletadas de pacientes atendidos no HU-UFSC. Para tal, a citotoxicidade das formulações de AB-DOC, AB-DOC aquecida e Ambisome® foi avaliada por citometria de fluxo, pela verificação da integridade da membrana celular em células de epitélio renal humano (HEK-293) marcadas com iodeto de propídeo. A identificação e caracterização dos isolados clínicos foram feitas através do subcultivo em ágar-sabouraud dextrose por 24 horas e posteriormente submetidas ao microcultivo em lâmina para identificação da espécie. A suscetibilidade antifúngica foi determinada através dos testes de microdiluição em caldo. Nos ensaios de citotoxicidade, a AB-DOC aquecida mostrou-se menos tóxica frente às células de epitélio renal. Observou-se ainda que a atividade antifúngica da AB-DOC aquecida foi tão eficaz quanto a AB-DOC convencional. Além disso, em isolados de *Candida albicans*, *Candida parapsolis* e *Candida tropicalis*, a AB-DOC aquecida foi mais ativa que a AB-DOC. Portanto, o pré-aquecimento de AB-DOC para uso intravenoso surge como futura alternativa não onerosa, conferindo perfil de seletividade a uma formulação já disponível no mercado, com baixo custo e considerado padrão ouro até os dias de hoje.

**Palavras-chave:** Anfotericina B, pré-aquecimento, super-agregados, infecções fúngicas sistêmicas, nefrotoxicidade.



## ABSTRACT

Amphotericin B (AB) is the drug of choice for the treatment of fungal infections. The high incidence and severity of these infections are mainly related to hospitalized patients, who present immunosuppression, either by the use of chemotherapeutic agents or immunocompromised patients with HIV/AIDS. The formulation of AB in sodium deoxycholate (AB-DOC), commercially available as Fungizone®, is the commonly used therapy and is considered gold standard, however, its administration in already debilitated patients causes serious adverse effects, especially nephrotoxicity. Heated AB was evaluated regarding its aggregate state and for *in vitro* toxicity in human renal epithelial cells as well as its efficacy in clinical isolates of *Candida* spp. collected from samples patients at HU-UFSC. For that, the cytotoxicity of the AB-DOC, heated AB-DOC and Ambisome® formulations was assessed by flow cytometry, evaluating cell membrane integrity in human renal epithelium (HEK-293) cells labeled with propidium iodide. The identification and characterization of the clinical isolates were done through the subculture in agar-sabouraud dextrose for 24 hours and later submitted to the microculture in coverslip for identification of the species. Antifungal susceptibility was determined by broth microdilution tests. In cytotoxicity assays, heated AB-DOC was shown to be less toxic to renal epithelial cells. It was further observed that the antifungal activity of heated AB-DOC was as effective as conventional AB-DOC. In addition, in the isolates of *Candida albicans*, *Candida parapsolis*, and *Candida tropicalis*, h-AB-DOC was more active than AB-DOC. Therefore, heated AB-DOC for intravenous use appears as a future non-costly alternative, giving a selectivity profile to a formulation that is already available in the market, with low-cost and considered the gold standard nowadays.

**Keywords:** Amphotericin B, preheating, super-aggregates, systemic fungal infections, nephrotoxicity.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química da Anfotericina B. ....	25
<b>Figura 2.</b> Modelo 3D da Anfotericina B. ....	26
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de ação da AB sobre a célula fúngica. ....	27
<b>Figura 4.</b> Diferentes formulações de AB e sua estrutura. ....	31
<b>Figura 5.</b> Visão superior de modelo de formação de canal AB-esterol em uma membrana plasmática ....	33
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática dos principais estágios de interação da AB com uma membrana plasmática. ....	34
<b>Figura 7.</b> Modelo de absorção e citotoxicidade de AB, nas formas monoméricas e agregadas. ....	35
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática das alíquotas de AB-DOC pré-aquecidas e mantidas sob diferentes condições de temperatura. ....	39
<b>Figura 9.</b> Placas de microcultivo com lamínula. ....	41
<b>Figura 10.</b> Esquema simplificado para identificação de alguns gêneros de leveduras. ....	42
<b>Figura 11.</b> Aspecto macroscópico da formulação AB-DOC em microtubos graduados de 1,5 mL antes do aquecimento (A) AB-DOC e após o aquecimento (B) AB-DOC pré-aquecida a 70° por 20 minutos ....	45
<b>Figura 12.</b> Diâmetro médio das estruturas presentes nas formulações de AB-DOC (A) e h-AB-DOC (B). ....	46
<b>Figura 13.</b> Microscopia eletrônica de transmissão das formulações de AB-DOC (A e B) e h-AB-DOC (C e D). ....	47
<b>Figura 14.</b> Diâmetro médio das estruturas presentes nas formulações de AB-DOC e h-AB-DOC. ....	48

**Figura 15.** Variação do tamanho das estruturas das formulações de AB-DOC armazenadas a 4° (A), 25° (B) e 37°C (C) e AB-DOC pré-aquecida a 4° (D), 25° (E) e 37°C (F).....49

**Figura 16.** Isolados clínicos em ágar sabouraud-dextrose 24 horas após a semeadura.....49

**Figura 17.** Microscopia de luz após microcultivos dos isolados clínicos. ....51

**Figura 18.** Microscopia de luz após microcultivos dos isolados clínicos. (A) *Candida parapsolis*, (B) *Candida glabrata*, (C) *Candida glabrata*, (D) *Candida tropicalis*. As setas indicam as diferentes estruturas visualizadas inerentes a cada espécie. Aumento de 400X.....52

**Figura 19.** Ambisome® em células de epitélio renal (HEK293). (A) Viabilidade celular em função das concentrações crescentes de AB. (B, C e D) Regressão não linear para a determinação do CC<sub>50</sub> por interpolação. Valores expressos em média e desvio padrão. Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. \* p<0,05 e \*\* p<0,01 (AB-DOC versus h-AB-DOC). φφφ p<0,001 (AB-DOC versus Ambisome®). ....52

**Figura 20.** Morfologia das células de epitélio renal após 24 horas de exposição à AB-DOC (B, E e H), h-AB-DOC (C, F e I) e Ambisome® (D, G e J) nas concentrações de 1600, 2000 e 4000 ng/mL). As setas em (C) mostram agregados da h-AB-DOC e em (D) células não viáveis. 400x.....56

**Figura 21.** Histogramas representativos da análise de viabilidade das células de epitélio renal por citometria de fluxo. As células de epitélio renal foram tratadas com concentrações de 2,0 µg/ mL, 3,0 µg/ mL e 5,0 µg/ mL das formulações de AB-DOC, h-AB-DOC e Ambisome®. As células na região H3 do histograma representam células não viáveis marcadas com iodeto de propídio (PI).....56

**Figura 22.** Análise de viabilidade celular de epitélio renal por citometria de fluxo após exposição às formulações de AB-DOC, h-AB-DOC e Ambisome®. Valores expressos em média e desvio padrão. Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. \* p<0,05 e \*\* p<0,01.....58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> – Valores de tamanho médio das estruturas das formulações de AB-DOC e h-AB-DOC após 24 de armazenamento a 4°, 25° e 37° C. Valores expressos em média e desvio padrão. ....	<b>49</b>
<b>Tabela 2.</b> –Valores de concentração inibitória mínima (CIM) determinadas por microdiluição em caldo de acordo com NCCLS M17A2. Os valores foram expressos em µg/mL e realizados em triplicata.....	<b>53</b>





## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- AB – Anfotericina B
- ATCC – American Type Culture Collection
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CC50 – Concentração e inibe 50% do crescimento celular
- DLS – Dispersão Dinâmica de Luz
- DMEM – Meio de Cultura Dulbecco Modificado
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DOC – Desoxicolato de Sódio
- HEK-293 – Linhagem celular renal humana embrionária
- HEPES – (N-(2-hidroxietyl)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HUVEC – Linhagem de células endoteliais de veia umbilical Humana
- IFS – Infecções fúngicas sistêmicas
- MET –Microscopia Eletrônica de Transmissão
- NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standard
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfatos
- ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
- RPMI 1640 – Meio de cultura completo Roswell Park Memorial  
Institute Medium
- SFB – Soro Fetal Bovino



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>23</b>
	2.1 Infecções Fúngicas .....	23
	2.2 Infecções fúngicas sistêmicas .....	23
	2.3 Aspectos físico-químicos da Anfotericina B.....	24
	2.4 Toxicidade da Anfotericina B .....	28
	2.5 Anfotericina B pré-aquecida.....	32
	2.6 Formação de agregados e superagregados .....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
	3.1 Objetivo geral.....	37
	3.1.1 Objetivos específicos .....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
	4.1 Preparação da Anfotericina B pré-aquecida .....	39
	4.2 Caracterização e estabilidade dos agregados e superagregados... ..	39
	4.3 Obtenção dos isolados clínicos .....	40
	4.4 Armazenamento e subcultivo dos isolados clínicos.....	40
	4.5 Identificação e caracterização dos isolados clínicos.....	41
	4.6 Suscetibilidade antifúngica .....	42
	4.7 Citotoxicidade em células de epitélio renal.....	43
	4.8 Determinação da concentração citotóxica (CC <sub>50</sub> ) .....	43
	4.9 Viabilidade celular por citometria de fluxo (integridade de membrana) .....	43
	4.10 Análise estatística .....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
	5.1 Caracterização das formulações de AB-DOC e AB-DOC pré-aquecida .....	45
	5.2 Isolados clínicos.....	50
	5.3 Susceptibilidade antifúngica .....	52
	5.4 Citotoxicidade das formulações de AB .....	54
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>655</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>67</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas sistêmicas (IFS) ocorrem em alta incidência em pacientes imunocomprometidos e imunodeprimidos, como pacientes HIV/Aids, queimados e, e pacientes em tratamento quimioterápico apresentando neutropenia. Os isolados clínicos mais frequentes destes casos são leveduras como *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. e fungos filamentosos, como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicilium* spp. A prevalência destas infecções aumenta progressivamente, o que leva a uma revisão dos agentes antifúngicos utilizados atualmente quanto à eficácia e impactos na saúde (ENOCH et al., 2006; CARRILLO-MUNÓZ, 2006).

A Anfotericina B (AB) é um antibiótico natural poliênico de coloração amarela/laranja, produzido a partir de uma cepa da bactéria filamentosa gram positiva *Streptomyces nodosus*, que habita o solo e foi obtida primeiramente na região do rio Orinoco, na Venezuela, e hoje produzida através de cultura em larga escala industrial. A utilização de AB contra infecções fúngicas sistêmicas iniciou em meados da década de 1950, sendo considerada um antifúngico padrão ouro a partir de 1960 (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003; JOHNSON e EINSTEIN, 2007; LEMKE; KIDERLEN e KAYSER, 2005; VANDEPUTTE, WACHTEL e STILLER, 1956).

O aumento de IFIs, particularmente em pacientes imunocomprometidos, induz ao aumento de taxas de morbidade e de mortalidade entre estes grupos e a AB é o medicamento de escolha na terapia empírica dessas infecções. A AB convencional é associada ao desoxicolato de sódio, com o propósito de tornar sua forma liofilizada solúvel em água e estabilizar a suspensão em forma de micelas. Em contraponto, o desoxicolato de sódio gera em 50-90% dos casos intolerância devido às reações como desequilíbrio hidroeletrólítico e nefrotoxicidade. Neste sentido, as formulações lipídicas e lipossomais apresentam maior efetividade, considerando que sua tolerância permite doses mais altas de administração, melhorando a eficácia terapêutica (JANKNEGHT et al., 1992; WADE, R. et al., 2013).

Espécies de *Candida*, prevalentes nas infecções muco-cutâneas e invasivas, podem atingir praticamente qualquer órgão, instigando a necessidade de novas estratégias terapêuticas. Enquanto que *Candida albicans* é predominante nas infecções orofaríngeas/ cutâneas e sensível à AB, as espécies não-albicans, como *Candida glabrata* e *Candida krusei*, estão mais presentes nas infecções sistêmicas e requerem doses máximas de AB no tratamento (PAPPAS et al., 2004).

O presente trabalho objetivou reforçar a proposta do aquecimento de AB-DOC de acordo com os protocolos propostos pela literatura, como alternativa para reduzir sua citotoxicidade às células renais, já demonstrado em estudos anteriores. Eventualmente, o processo de aquecimento poderá ser uma prática utilizada na administração do fármaco ao paciente, sem representar alteração no custo do tratamento.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Infecções Fúngicas

Os fungos são microrganismos eucarióticos e quimio-heterotróficos, obtendo energia através da absorção de nutrientes e necessitando do provimento de componentes orgânicos como fontes de energia e carbono. Estão presentes em diversas partes da natureza e setores da vida humana como em diferentes setores da indústria, o que engloba desenvolvimento de produtos químicos e farmacêuticos, além do setor alimentício, na produção de laticínios e bebidas que usufruem das propriedades fermentativas das leveduras (PIZARRO et al., 2007; MONNET et al., 2015; OLIVEIRA DOS SANTOS et al., 2016).

Os fungos possuem importante função para o organismo humano como seres participantes do microbioma, que varia entre os diferentes locais do corpo, desempenhando diferentes papéis na doença e como cofator no sistema imunológico (OEVER; NETEA, 2014).

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos e com morfologia esférica ou oval. Sua reprodução ocorre por brotamento através da formação de estruturas denominadas hifas ou ainda as pseudo-hifas de onde germinam esporos de reprodução sexuada ou assexuada (conídios ou conidiósporos) (HEITMAN et al., 2014). As leveduras da espécie *albicans* realizam sua fixação nas células epiteliais humanas a partir da forma leveduriforme, mas para atingir tecidos mais profundos necessita assumir a forma de pseudo-hifa (SUDBERY, 2011; YANG et al., 2014).

As micoses oportunistas são geralmente ocasionadas por fungos saprófitos que aproveitam o estado de debilidade do sistema imune de indivíduos acometidos por doenças graves, crônicas ou ainda sob medicação intensiva. Enquanto quantidade de compostos naturais e sintéticos com propriedades antibacterianas é ampla, a mesma variedade é reduzida no que diz respeito aos agentes antifúngicos, havendo uma limitação para tratamento de micoses humanas (FALCO e SOLER, 1998; DELGADO et al., 2004).

### 2.2 Infecções fúngicas sistêmicas

As micoses são infecções ocasionadas por fungos que se apresentam como doença crônica que atinge seres humanos e animais. A

classificação das micoses ocorre de acordo com o tecido afetado no hospedeiro e o mecanismo de infecção e podem ser classificadas como superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas e oportunistas (WALSH e DIXON, 1996).

A Anfotericina B (AB) é um antibiótico natural poliênico de coloração amarela/ laranja, produzido a partir de uma cepa da bactéria filamentosa gram-positiva *Streptomyces nodosus*. Esta bactéria habita o solo e foi obtida primeiramente na região do rio Orinoco, na Venezuela, sendo hoje produzida através de cultura em larga escala industrial. A utilização de AB contra infecções fúngicas sistêmicas iniciou-se em meados da década de 1950, sendo considerada um antifúngico padrão ouro a partir de 1960 (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003; JOHNSON e EINSTEIN, 2007; LEMKE; KIDERLEN e KAYSER, 2005; VANDEPUTTE, WACHTEL e STILLER, 1956).

O aumento de IFIs, particularmente em pacientes imunocomprometidos, induz ao aumento de taxas de morbidade e de mortalidade entre estes grupos. O medicamento de escolha na terapia empírica destas infecções, a AB convencional de referência é associada ao desoxicolato de sódio, com o propósito de tornar sua forma liofilizada solúvel em água e estabilizar a suspensão em forma de micelas. Porém, o desoxicolato de sódio gera em 50-90% dos casos intolerância devido às reações como desequilíbrio hidroeletrólítico e nefrotoxicidade. Neste sentido, as formulações lipídicas e lipossomais de AB apresentam maior efetividade, considerando que sua tolerância permite doses mais altas de administração, melhorando a eficácia terapêutica (JANKNEGT et al., 1992; WADE, R. et al., 2013).

Dentre as espécies prevalentes em infecções muco-cutâneas e invasivas, *Candida* spp. podem atingir praticamente qualquer órgão, instigando a necessidade de novas estratégias terapêuticas. Enquanto que a *C. albicans* é predominante nas infecções orofaríngeas/ cutâneas e sensível à AB, as espécies não-*albicans*, como a *Candida krusei*, estão mais presentes nas infecções sistêmicas e requerem doses máximas de AB no tratamento (PAPPAS et al., 2004).

### 2.3 Aspectos físico-químicos da Anfotericina B

A estrutura química da AB é composta por 37 átomos de carbono, formando um anel macrocíclico fechado por lactonização. Contém cadeias de duplas ligações conjugadas não-substituídas (heptaetano) e na porção oposta, uma cadeia poli-hidroxilada com sete grupos hidroxila

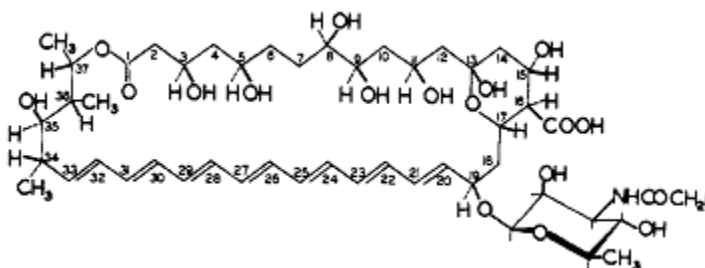


livres, caracterizada como anfipática. Em uma das extremidades da molécula há um resíduo micosamina (lactona) com um aminogruppo livre, formando uma cadeia lateral (Figuras 1 e 2) (GANIS et al., 1971).

A molécula de AB tem aproximadamente 24 Å de comprimento, ou seja, o equivalente a meia camada de fosfolípídeo. O domínio polieno hidrofóbico faz a ligação e inserção na bicamada lipídica fúngica. Quando há a presença de ergosterol na membrana, os monômeros de AB formam poros multiméricos, com as cadeias polieno lipofílicas dispostas para fora do multidímero quando em contato com a membrana do fungo. As cadeias hidrofílicas de poli-hidroxila formam um poro na parede interna. Tais poros aumentam significativamente a permeabilidade da membrana fúngica, fazendo com que cátions realizem a depleção do potássio intracelular e ocorra a morte celular (KLEINBERG, 2006; LANIADO-LABORÍN e CABRALES-VARGAS, 2009).

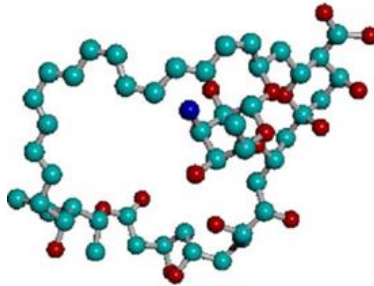
Em baixas concentrações (0,16 – 0,2 mM), a AB demonstrou perda de 98% do conteúdo intracelular de íons de potássio em cultura de *C. albicans*, além de indicar danos oxidativos e importante papel no mecanismo de ação lítica do antifúngico com a membrana celular de eritrócitos, *C. albicans* e leucócitos polimorfonucleares (FILIPPIN e SOUZA, 2006).

**Figura 1** . Estrutura química da Anfotericina B.



Fonte: GANIS et al., 1971.

**Figura 2** Modelo 3D da Anfotericina B.



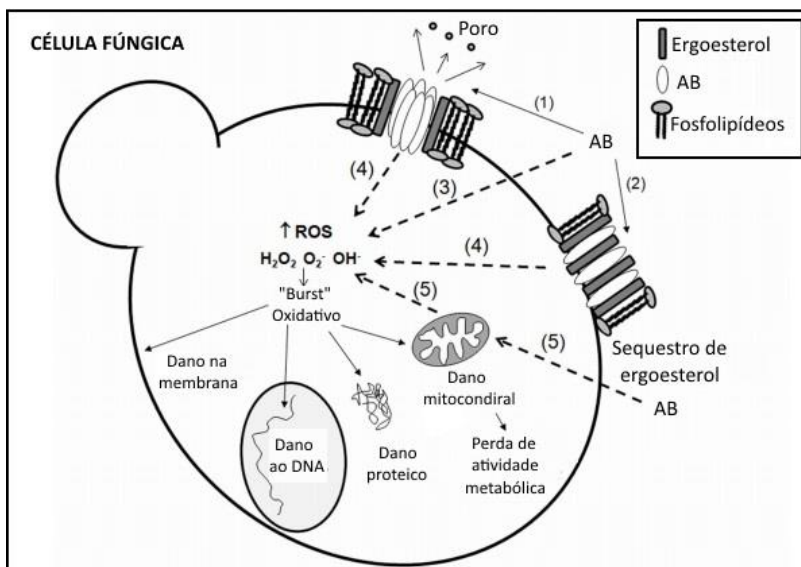
Legenda: Carbonos em verde, oxigênios em vermelho e nitrogênio em azul  
Fonte: LEMKE; KIDERLEN e KAYSER, 2015.

A ideia clássica mais aceita sobre o mecanismo fungicida da AB é a modificação da permeabilidade da membrana através da ligação ao ergosterol, esteróide presente na membrana de fungos sensíveis, causando a perda de constituintes citoplasmáticos e a morte celular. Esta alteração causa uma lesão oxidativa, que resulta em alterações metabólicas prejudiciais à sobrevivência celular. Em menor escala, a AB também se liga ao colesterol presente em membranas celulares humanas, gerando efeitos adversos. Além disso, também tem sido demonstrado o dano oxidativo celular causado por AB (Figura 3). Entretanto, todos os fatores envolvidos neste mecanismo não estão completamente elucidados (GHELLINK, et al., 2015; MESA-ARANGO; SCORZONI, ZARAGOZA, 2012).

Para o melhoramento e desenvolvimento de formulações lipídicas, a compreensão dos mecanismos da ação antifúngica de AB é fundamental. Diversos estudos biofísicos e estruturais são realizados através de permeabilidade lipossomal, bicamadas lipídicas planas, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de força atômica, espectroscopia de fluorescência, calorimetria exploratória diferencial, modelagem computacional, espectroscopia de ressonância, espectroscopia de UV visível, entre outras. A teoria predominantemente aceita sobre a ação de AB para permeabilizar e matar células fúngicas é resultante da formação de pequenos agregados de canais iônicos em bicamadas lipídicas. Isto direciona para melhoramentos no que se refere à permeabilização de membranas, como seletividade de canais iônicos

de células fúngicas versus células humanas; preferência aumentada por ergosterol fúngico versus colesterol humano, reduzindo a toxicidade às células humanas e contornando a resistência microbiana (ANDERSON et al., 2014; FILIPPIN; SOUZA, 2006).

**Figura 3.** Mecanismo de ação da AB sobre a célula fúngica.



Fonte: Adaptado de MESA-ARANGO, 2012.

Apesar dos grandes esforços empregados a fim de descrever por completo o mecanismo de ação de AB, parte deste permanece desconhecido, sem uma elucidação completa sobre todos os aspectos de sua ação antifúngica na membrana plasmática. Muitos estudos experimentais publicados são unânimes ao citar a formação de poros transmembranares, capazes de alterar a permeabilidade da membrana possibilitando a morte celular através da perda de íons de potássio e metabólitos da célula (BOLARD, 1996; SOKOL-ANDERSON et al., 1986; ZYGMUNT, 1966).

## 2.4 Toxicidade da Anfotericina B

As reações adversas relacionadas ao uso de AB são variadas e podem estar relacionadas ou não à nefrotoxicidade e ao processo de infusão, atingindo de 50 a 90% dos pacientes (ENOCK, LUDLAM, BROWN; 2006). Estas reações oscilam entre agudas e mais frequentes, tais como febre, calafrios, náuseas, vômitos e dor de cabeça e menos frequentes como alterações cardiovasculares – hipotensão, hipertensão e arritmia cardíaca (SCHÖFFSKL et al., 1998; NUCCI et al., 1999; WALSH et al., 1999; MORA-DUARTE et al., 2002).

Denominada comercialmente de Fungizone® (Bristol-Meyers, Squibb), a Anfotericina B com desoxicolato (AB-DOC) é constituída por 50 mg de AB, aproximadamente 41 mg de DOC e 20,2 mg de tampão fosfato, sendo a forma mais convencional de AB utilizada como terapia padrão para uma variedade de infecções fúngicas invasivas. A sua toxicidade é amplamente descrita na literatura, sendo que seus efeitos nefrotóxicos são mais elevados em comparação com as demais formulações de AB em complexo lipídico e AB lipossomal (CHAN e SORREL, 2007). Apesar de serem relatadas manifestações decorrentes de sua nefrotoxicidade, o baixo custo, o amplo espectro de ação aos agentes etiológicos das principais micoses endêmicas, o não desenvolvimento de resistência microbiana significativa e os mais de 50 anos no uso clínico, tornam a AB-DOC a primeira opção de tratamento empírico contra IFIs (FILIPPIN; SOUZA, 2006; GALLIS; DREW e PICKARD, 1990; LANIADO-LABORÍN, R. e CABRALES-VARGAS, M., 2009).

A formulação de AB é pouco solúvel em meio aquoso, sendo que esta solubilidade pode ser aumentada com a associação lauril sulfato de sódio ou desoxicolato de sódio (DOC), o que proporciona a formação de estruturas micelares. Entretanto, esta formulação convencional, AB-DOC, pode apresentar três formas de organização: monomérica, oligomérica e micelar (LAMY-FREUND; FERREIRA; SCHREIER, 1989).

Devido aos efeitos colaterais e à nefrotoxicidade, estratégias no modo de utilização durante a administração de Fungizon® são empregadas com intuito de reduzi-los. Com o pouco sucesso da infusão com salina e redução das doses como opção de melhoramento, no início da década de 1990, desenvolveram-se novas gerações de AB, havendo a substituição do desoxicolato de sódio por fosfolipídeos (Abelcet®), por colesterol (Amphocil®) ou pelos dois (Ambisome®). Estas últimas, por sua vez, demonstraram eficácia na ação antifúngica nos tecidos alvo e

melhor índice terapêutico em comparação ao Fungisone® (AL-QUADEIB et al., 2014; TORRADO, 2007).

As formulações lipídicas de AB – AB complexo lipídico, AB dispersão coloidal e AB lipossomal - demonstram maior segurança como medicamentos, já que estas apresentam incidência e gravidade de nefrotoxicidade inferior à gerada pela AB-DOC (KLEINBERG, 2006). Estudos clínicos, abertos ou controlados mostraram eficácia comparável entre a AB-DOC 0,6 a 1,5 mg/ kg de massa corporal/ dia – e formulações lipídicas administradas em doses três a seis vezes maiores (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs em 2009 a inclusão de Ambisome® na sua Lista de Medicamentos Essenciais para Aplicação em Crianças, com foco no tratamento de infecções fúngicas na pediatria. Os fatores que levaram a relevância desta formulação na saúde pública são de ordem epidemiológica, como a incidência de IFS, nefrotoxicidade de AB-DOC e população alvo (crianças com IFS causadas por espécies de *Arpegillus* spp., *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. e meningites criptocócicas) (OMS, 2009).

Em um estudo comparativo entre os tratamentos com AB-DOC e AB lipossomal, 687 pacientes apresentando febre e neutropenia foram tratados com terapia empírica para IFI. Um total de 343 pacientes submetidos ao tratamento com AB lipossomal e outros 344 com AB-DOC convencional, perfazendo um total de 7025 infusões que foram monitoradas; sendo 3622 infusões de AB lipossomal e 3403 infusões com AB-DOC, utilizando-se concomitantemente a pré-medicação para a prevenção dos efeitos tóxicos. Os pacientes tratados com AB lipossomal apresentaram menos efeitos adversos do que os tratados com AB convencional. O aumento de mais de 1 °C ocorreu em 7,4 % dos pacientes tratados com AB lipossomal, enquanto que nos pacientes tratados com AB-DOC essa porcentagem foi de 16 % (WALSH et al., 1999). Com isso, a necessidade do uso de acetaminofeno, difenidramina, meperidina, hidrocortisona, ou lorazepam para amenizar os efeitos foi reduzida (LANIADO-LABORÍN, R. e CABRALES-VARGAS, M., 2009).

Outro estudo com modelos murinos com candidíase sistêmica, na relação mg/ kg de massa corporal AB-DOC foi oito vezes mais potente do que Abelcet® e Ambisome®, em contrapartida, o tecido renal apresentou menor exposição às formulações lipídicas (ANDES et al., 2006)

Efeitos colaterais como febre e calafrios também foram associados à produção de citocinas pró-inflamatórias por células imunes

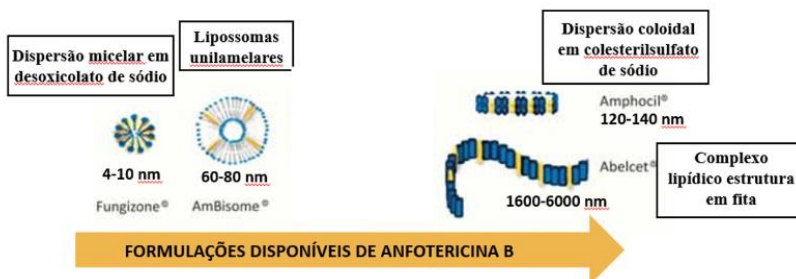
inatas, já que o composto de AB é de origem bacteriana. Essa característica poderia estimular células via receptores toll-like (TLRs), iniciando a cascata inflamatória, além de CD14. Entretanto, as formulações lipídicas de AB não estimulam significativamente estas citocinas, o que pode justificar sua reduzida toxicidade em relação à AB convencional (SALAMATU et al., 2003).

Para a atividade biológica de AB, ou seja, formação de canais iônicos transmembranares, é necessária a presença de esteróis na membrana celular. Considerando tal afirmação, Neumann e colaboradores (2010) analisaram a toxicidade seletiva de AB por membranas contendo ergosterol, para justificar o maior potencial de ação contra células fúngicas com ergosterol em comparação com células mamíferas com colesterol.

Um estudo realizado por Tzu-Sen Yang e colaboradores (2012), avaliou a possível alteração de permeabilidade de membranas celulares contendo ergosterol. Os experimentos foram realizados com células da linhagem de câncer de cólon HT29, que foram submetidas ao tratamento com AB em diferentes concentrações. A quantificação da permeabilidade da membrana e do tamanho dos poros formados pelos canais iônicos foi através de AlexaFluor® e do fator de crescimento epidérmico (QD-EGF), e evidenciou uma diferença dos tamanhos dos poros iônicos, que variaram proporcionalmente à concentração de AB presente no meio, o que demonstra que AB induz alterações da permeabilidade e concentração-tempo-dependentes em membranas com ergosterol.

Diversas formulações que levam em consideração o melhoramento dos fatores terapêuticos e redução da nefrotoxicidade de AB têm sido propostas por muitos grupos (Figura 4). Novos modelos que apresentam elevada seletividade ao lipídio específico do patógeno, coibindo o surgimento de cepas resistentes e virulentas, têm apresentado dificuldades para o seu desenvolvimento devido ao restrito acesso aos derivados sintéticos necessários (DAVIS, S. A. et al, 2015).

**Figura 4.** Diferentes formulações de AB e sua estrutura.



Fonte: Adaptado de: SERRANO et al., 2013.

Formulações de AB via oral apresentam melhoramento na biodisponibilidade, como a utilização de base de lipídios (IBRAHIM, F. *et al.*, 2012) e por encapsulamento de AB peguillado (PEG), poli-ácido láctico-co- glicólico (PLGA-PEG) e nanopartículas (NPs) (AL-QUADEIB *et al.*, 2015; ITALIA, 2011); outros estudos, como o proposto por Wang e colaboradores (2010) para a obtenção de um novo derivado de AB, nomeado de Anfotericina B (5) e propostas baseadas no encapsulamento por nanopartículas de AB incorporada a poli-ácido láctico-co-glicólico (PLGA) e ácido dimercaptossuccínico (SOUZA *et al.*, 2015); nanopartículas de PLGA e nanoemulsões (VAN DE VEN, H. *et al.*, 2012) passam por avaliações *in vivo*, mas ainda necessitam de aperfeiçoamento.

Dentre todos estes modelos, estudos demonstram a eficácia e benefícios de formulações lipídicas de AB já existentes (ADLER-MOORE e PROFFITT, 2008; BOTERO, PUENTES-HERRERA e CORTÉS, 2014; METHA, BLAKE e CRADDOCK, 2011; WALSH, 1999) e novas estratégias para otimização destas formulações (CALDEIRA *et al.*, 2015; KAGAN *et al.*, 2013; SACHS-BARRABLE *et al.*, 2008; SALERNO, C. *et al.*, 2013). Mas apesar do uso destas formulações mostrarem-se vantajosas para o paciente, o alto custo torna-se um obstáculo. A relação custo-efetividade das formulações lipídicas é proporcional, além de haver redução das taxas de mortalidade precoce, falência renal e hospitalização prolongada, levando à redução dos custos de saúde em âmbito hospitalar (KLEINBERG, 2006). Ainda assim, as

formulações lipídicas são fármacos de uso secundário, já que sua aquisição é onerosa aos sistemas de saúde, principalmente o sistema público do Brasil. Por isso, torna-se necessário e relevante pesquisar, aperfeiçoar e desenvolver formulações lipídicas de AB, como a idealizada pelo nosso grupo.

## **2.5 Anfotericina B pré-aquecida**

A relação entre o estado de agregação da AB e sua eficiência terapêutica já foram previamente reportados, sendo que este estado de agregação depende de diversos parâmetros que influenciam na seletividade da membrana pelo ergosterol de células fúngicas e pelo colesterol das células mamíferas (CHKRON; LEROY; BOLARD, 1997).

Em meio aquoso, a AB apresenta diferentes espécies de moléculas em equilíbrio, incluindo monômeros e agregados solúveis e insolúveis. Os níveis de concentração destas diferentes espécies são distintos, sendo predominante a forma de oligômeros, ou seja, a forma de auto-associação solúvel em água (VAN ETTEN et al., 2000).

Diferentes fatores estão associados à formação de superagregados, como a concentração de AB, o meio onde o fármaco está disperso, a ação exercida por surfactantes e outros excipientes como albumina sérica, o modo como a dispersão foi preparada e a temperatura de exposição, sendo que a formação de diferentes tipos de agregados depende da interação com o solvente (ROGERS, 2003).

O aquecimento da AB é um procedimento alternativo em relação às formulações comercializadas de alto custo, como as formulações lipídicas de AB. A indução da super-agregação de AB por aquecimento altera sua interação com HDL, LDL, proteínas séricas e monócitos, o que é uma importante explicação para a redução da toxicidade, além de não comprometer a sua atividade antifúngica (ROGERS, 2003).

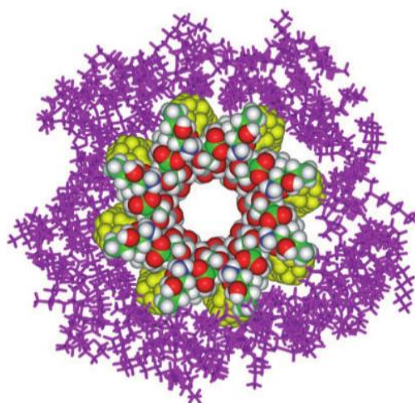
## **2.6 Formação de agregados e superagregados**

ZIA e colaboradores (2016), descreveram como uma alternativa às formulações lipídicas a AB super-agregada, considerando menor citotoxicidade e custo de produção, apresentando agregados diferentes



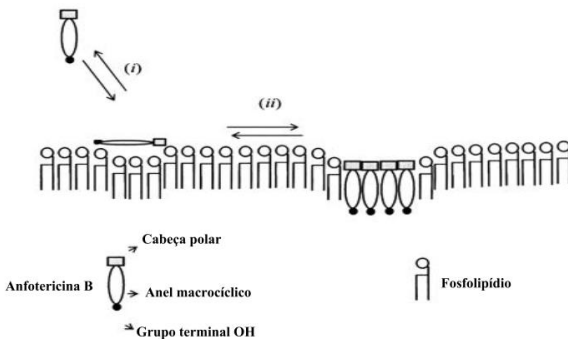
da formulação convencional de Fungizone®, além de melhorada estabilidade térmica. A formação de poli-agregados demonstrou toxicidade reduzida em experimentos realizados com células animais de mamíferos *in vitro*, mantendo sua efetividade de atividade anti-fúngica. Os estudos de biodisponibilidade de AB demonstraram que a auto-associação de AB possui maior acumulação em órgãos do retículo-endotelial, poupando assim o tecido renal, um dos órgãos mais afetados pela toxicidade de AB. Além disso, a formulação se mostrou eficaz para tratamento de infecções por *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. (Figura 5).

**Figura 5.** Visão superior de modelo de formação de canal AB-esterol em uma membrana plasmática



Fonte: BAGINSKI et al., 2006

**Figura 6.** Representação esquemática da interação de AB com uma membrana plasmática.



Fonte: Adaptado de Coutinho e Prieto, 2003

A AB é uma molécula anfifílica, possuindo em sua estrutura química uma porção polar hidrofílica e outra apolar e hidrofóbica. Tal característica torna a molécula propensa a formação de agregados. Quando em meio aquoso (polar), ela tende a formar agregados nos quais a região apolar da molécula mantém-se “protegida” da água e as regiões polares em contato com a mesma. Já em um ambiente anfifílico (meio apolar), a configuração do agregado deve se inverter, pois agora a AB tende a oferecer a região apolar para interagir com os lipídios e deve “proteger” a região polar de contato com o mesmo (OLIVEIRA, 2011).

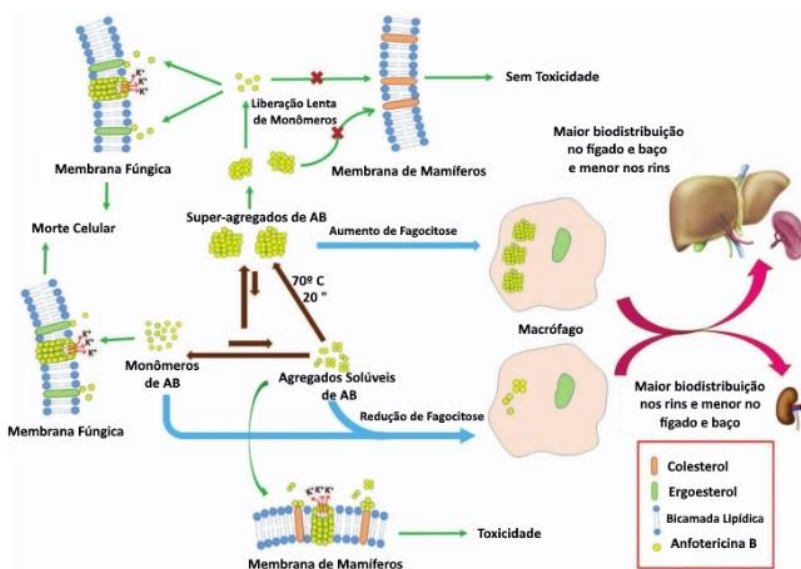
Uma justificativa para a eficácia dos agregados e menor toxicidade de AB pré-aquecida maior do que AB-DOC, sugere que esta última pode converter-se rapidamente em monômero ligado à proteína albumina do soro humano, enquanto que AB pré-aquecida apresenta monômeros mais estáveis (HARTSEL et al., 2001)

A AB é uma molécula anfifílica, possuindo em sua estrutura química uma porção polar hidrofílica e outra apolar e hidrofóbica. Tal característica torna a molécula propensa a formação de agregados. Quando em meio aquoso (polar), ela tende a formar agregados nos quais a região apolar da molécula mantém-se “protegida” da água e as regiões polares em contato com a mesma. Já em um ambiente anfifílico (meio apolar), a configuração do agregado deve se inverter, pois agora a AB tende a oferecer a região apolar para interagir com os lipídios e deve “proteger” a região polar de contato com o mesmo (OLIVEIRA, 2011).

Uma justificativa para a eficácia dos agregados e menor toxicidade de AB pré-aquecida maior do que AB-DOC, sugere que esta

última pode converter-se rapidamente em monômero ligado à proteína albumina do soro humano, enquanto que AB pré-aquecida apresenta monômeros mais estáveis (HARTSEL et al., 2001).

**Figura 7.** Modelo de absorção e citotoxicidade de AB, nas formas monoméricas e agregadas.



Fonte: Adaptado de ZIA et al., 2016.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade da anfotericina B pré-aquecida frente a isolados de casos de candidemia diagnosticados do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC).

##### **3.1.1 Objetivos específicos**

a) Caracterizar físico-quimicamente a formulação de AB pré-aquecida;

b) Determinar o perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados clínicos (AB pré-aquecida e as demais formulações de AB comercialmente disponíveis);

c) Avaliar o efeito citotóxico da AB pré-aquecida e das demais formulações de AB comercialmente disponíveis entre as linhagens celulares do epitélio renal humano.



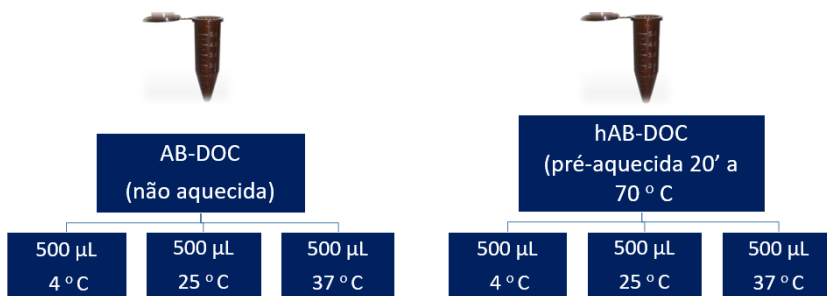
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Preparação da Anfotericina B pré-aquecida

A AB-DOC liofilizada foi reconstituída em 10 mL de água ultra-pura sob condições de esterilidade de acordo com as especificações do fabricante (Sigma-Aldrich,  $C_{47}H_{73}NO_{17}$  e peso molecular 924.08).

Alíquotas de 1,5 mL de AB-DOC foram submetidas ao aquecimento em banho-maria à 70° C por 20 minutos conforme protocolo descrito por ETTEN e colaboradores (2000). As alíquotas foram armazenadas em microtubos de resina grau médio livre de DNase, RNase, traços de metal e endotoxinas, resistentes à temperaturas até 115° C, protegidos de luz à 4°C, 25°C ou 37°C.

**Figura 8.** Representação esquemática das alíquotas de AB-DOC pré-aquecidas e mantidas sob diferentes condições de temperatura.



Fonte: a autora

### 4.2 Caracterização e estabilidade dos agregados e superagregados

As alíquotas de AB-DOC foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula e agregados pela técnica de medição do tamanho o equipamento Zeta Sizer Nano (Malvern®). O índice de polidispersão (PDI) também foi determinado pelo equipamento. O PDI é um parâmetro calculado a partir da função de autocorrelação da intensidade de dispersão de luz, demonstrando a distribuição do tamanho das partículas.

Dez microlitros das amostras foram utilizados para a determinação do diâmetro das partículas em nanômetros.

Os agregados também foram caracterizados morfológicamente por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de acordo com (SILVA et al., 2012). As amostras diluídas 1:5 em polímero poli-álcool vinílico 1% foram depositadas em suportes de níquel (grids) recobertos com carbono por 24 horas em temperatura ambiente para total secagem da amostra (XU et al., 2013; AMENDOLA, 2015). Os grids foram submetidos a leitura em microscópio de transmissão (JEM-1011 TEM, Peabody, MA, USA) operado em 100 kV como diferença de potencial máxima de aceleração do feixe.

Ainda, as amostras de AB-DOC foram avaliadas quanto a estabilidade dos agregados em diferentes temperaturas (4°C, 25°C e 37°C). A estabilidade foi determinada pelo tamanho dos agregados ao longo do tempo, bem como o índice de dispersão desses agregados nos períodos de 10, 15, 25, 40, 50, 65, 80 e 90 dias.

### **4.3 Obtenção dos isolados clínicos**

Os isolados clínicos foram obtidos a partir de amostras de hemoculturas coletadas no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC) na cidade de Florianópolis no período de março de 2013 a março de 2015. Os isolados foram identificados quanto ao fenótipo bioquímico e perfil de susceptibilidade de AB e fuclonazol (VITEK® 2 bioMérieux, Brasil) nos setores de Microbiologia e Micologia da Divisão de Análises Clínicas (DACL) do HU-UFSC. Os isolados foram semeados em tubos ágar sabouraud-dextrose e mantidas no Setor de Micologia do HU-UFSC.

### **4.4 Armazenamento e subcultivo dos isolados clínicos**

Os isolados clínicos foram subcultivados em tubos ágar sabouraud-dextrose, mantidos em estufa a 37°C por 24 horas para posterior criopreservação. Após este período, 4 a 5 colônias foram coletadas e depositadas em criotubos contendo minibeads de porcelana e glicerol 30% em condições estéreis. Os criotubos foram armazenados à -80°C até o momento dos subcultivos para os diferentes experimentos.

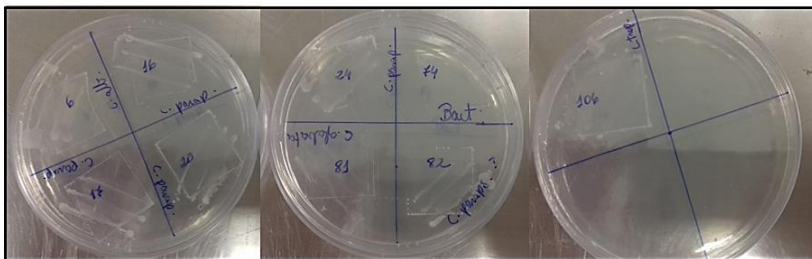


#### 4.5 Identificação e caracterização dos isolados clínicos

Para a identificação e caracterização, os isolados clínicos foram cultivados em ágar sabouraud-dextrose por 24 horas. As amostras foram submetidas ao microcultivo em lamínula e lâmina para a prova de filamentação e clamidósporo.

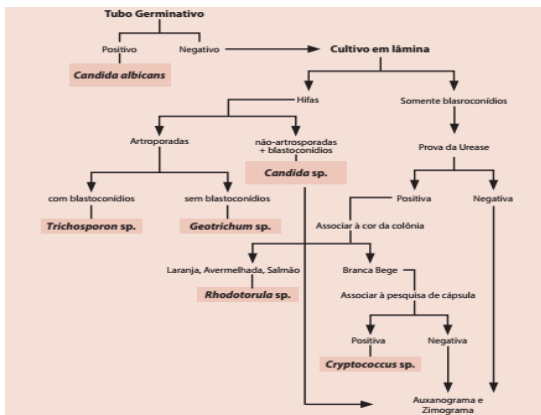
Para o microcultivo foram preparadas placas contendo ágar fubá Tween 80 a 1% e as cepas foram depositadas em forma de estriamento sob o ágar. A lamínula foi depositada sobre as amostras e placa foi mantida em estufa a 37°C por 24 horas (Figura 9) Após este período, as placas foram visualizadas por microscopia de luz e as cepas foram classificadas quanto à espécie de acordo com esquema estabelecido pela ANVISA (Figura 10).

**Figura 9.** Placas de microcultivo com lamínula.



Fonte: a autora.

**Figura 10.** Esquema simplificado para identificação de alguns gêneros de leveduras.



Fonte: Adaptado da Detecção e Identificação de Fungos de Importância Médica, ANVISA, 2010.

## 4.6 Suscetibilidade antifúngica

Para os ensaios de atividade antifúngica, uma suspensão dos isolados clínicos e da cepa ATCC ICB 12 (*Candida albicans*) foi realizada em salina estéril e a densidade celular ajustada para 0,5 da escala McFarland. Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado ensaio de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo NCCLS M27A2 (Anvisa, 2008). Em placas de 96 poços, foram adicionados 200 µL de meio RPMI-1640 com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol sem inóculo (poços controle) e com o inóculo do respectivo isolado em triplicata (poços teste). As formulações de AB-DOC, h-AB-DOC e Ambisome® (formulação lipossomal de AB) foram adicionadas em concentrações crescentes (0,03 µg/mL a 0,12 µg/mL e 0,12 µg/mL a 16 µg/mL). Após 24 horas, a leitura de cada placa foi realizada por análise macroscópica da presença de crescimento nos diferentes poços contendo o agente antifúngico comparada com a quantidade de crescimento no poço controle. As amostras cultivadas em microdiluição em caldo foram classificadas comparando-se o crescimento do poço controle (isento de fármaco) com o poço dos inóculos tratados, como: opticamente claro; crescimento indefinido; redução proeminente de crescimento; ligeira redução do crescimento e nenhuma redução do crescimento.

Para a determinação das CIMs, os pontos finais da reação foram definidos como a menor concentração de AB que impede qualquer grau de crescimento discernível.

Os isolados foram classificados como sensíveis quando a CIM  $\leq$  1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para Anfotericina B e formulações.

#### **4.7 Citotoxicidade em células de epitélio renal**

Para determinar a citotoxicidade das formulações de AB, AB-DOC, h-AB-DOC e AmBisome®, foram utilizadas células de epitélio renal humana (HEK-293). As células foram mantidas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado a 10% de soro fetal bovino (SFB) contendo 25 mM de glicose, 100 U/mL de penicilina e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomicina. O meio foi trocado a cada 48 horas e as culturas foram repicadas e expandidas ao atingirem 80% de confluência. Todos os experimentos foram realizados entre as passagens 4 e 8 em triplicata.

Para realização do ensaio de citotoxicidade das formulações, foram utilizadas placas de 96 poços nas quais foram plaqueadas 10.000 células/poço em meio de cultura por 24h. O tratamento com os compostos foi realizado em concentrações crescentes (400 a 3000 ng/mL) e as células foram incubadas a 37°C por 24 h. Ao término da incubação foi adicionada solução de resazurina (AlamarBlue®/ Sigma-Aldrich) na concentração de 2 mM e as placas foram incubadas por 2 horas. Após esta etapa, foi avaliada a concentração do produto formado resofurina por medida de absorbância com leitura em 570nm em leitor de microplacas (ELX800, Biotek, Vermont, EUA). A densidade óptica do grupo controle foi considerada como 100% células viáveis.

#### **4.8 Determinação da concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>)**

Para determinar a concentração citotóxica das formulações de AB, os ensaios de viabilidade descritos no item 3.6 foram conduzidos. A CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica que promove a morte em 50% das células) foi calculada por meio de regressão não linear seguido de interpolação utilizando o software Graph Pad Prism (La Jolla, CA, EUA).

#### **4.9 Viabilidade celular por citometria de fluxo (integridade de membrana)**

As células de epitélio renal (1 x10<sup>5</sup> células/poço) foram inoculadas em placas de 24 poços. Após 24 horas de crescimento, as células foram expostas às formulações de AB-DOC, AB-DOC aquecida e Ambisome® nas concentrações de 2, 3 e 5 ng/mL por 24 horas. Após este período, as células foram retiradas da placa, lavadas com tampão salina fosfato (PBS) e ressuspendidas em 500  $\mu\text{L}$  de

tampão PBS e iodeto de propídeo (PI) (2 $\mu$ g/mL) foi adicionado no momento da leitura no citômetro. A excitação foi realizada em laser de argônio (480nm) e a leitura da fluorescência na faixa de 560-580 (FL2). Células viáveis foram consideradas aquelas não marcadas com PI.

#### **4.10 Análise estatística**

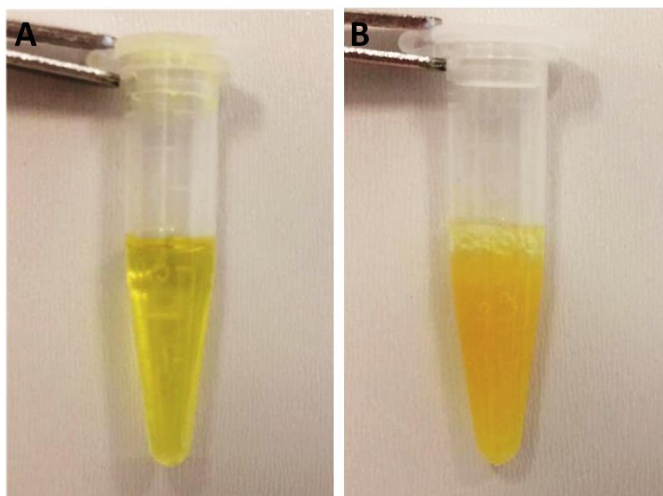
Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade foram expressos como porcentagem de viabilidade e em concentração  $\mu$ g/mL ( $CC_{50}$ ). A diferença entre os valores foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) com comparação de médias, seguido do teste de Turkey ou Bonferroni. As diferenças durante as análises foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade foi menor que 0,05 ( $P < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das formulações de AB-DOC e AB-DOC pré-aquecida

A formulação comercial de AB, AB-DOC foi submetida ao aquecimento a 70° C por 20 minutos. A Figura 11 mostra o aspecto visual da formulação após aquecimento. Observou-se turbidez acentuada da formulação de AB-DOC pré-aquecida.

**Figura 11.** Aspecto macroscópico da formulação AB-DOC em microtubos graduados de 1,5 mL antes do aquecimento (A) AB-DOC e após o aquecimento (B) AB-DOC pré-aquecida a 70° por 20 minutos

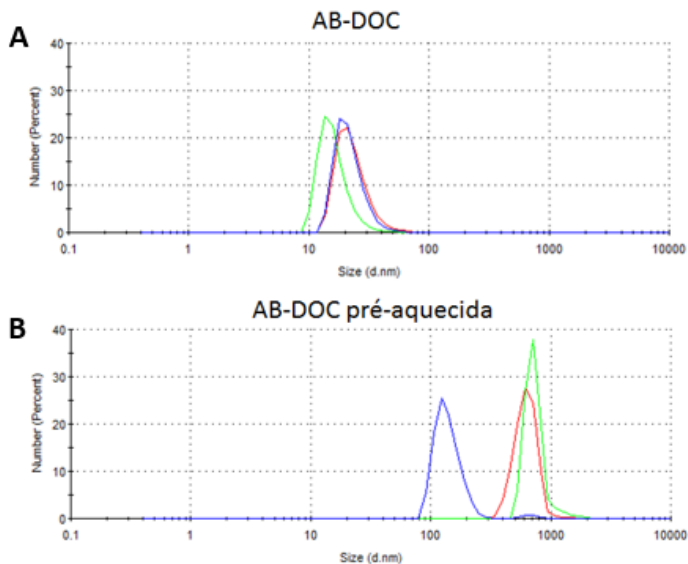


**Fonte:** a autora.

O tamanho dos agregados e superagregados foram determinados por ensaio de espalhamento de luz dinâmico a fim de determinar o diâmetro médio das estruturas. A Figura 12 mostra o tamanho das estruturas contidas nas formulações de AB-DOC e h-AB-DOC (Figura 13). Logo após o aquecimento, as amostras foram deixadas em repouso até atingirem temperatura ambiente para a determinação do tamanho das estruturas. Na formulação de AB-DOC, observou-se tamanho de  $23,08 \pm 7,7$  nm, enquanto que a formulação aquecida observou-se estruturas características de superagregados ( $629,4 \pm 150,7$  nm).

Ainda, foram medidos os índices de polidispersão (PDI) para as formulações de AB-DOC (0,294) e h-AB-DOC (0,443).

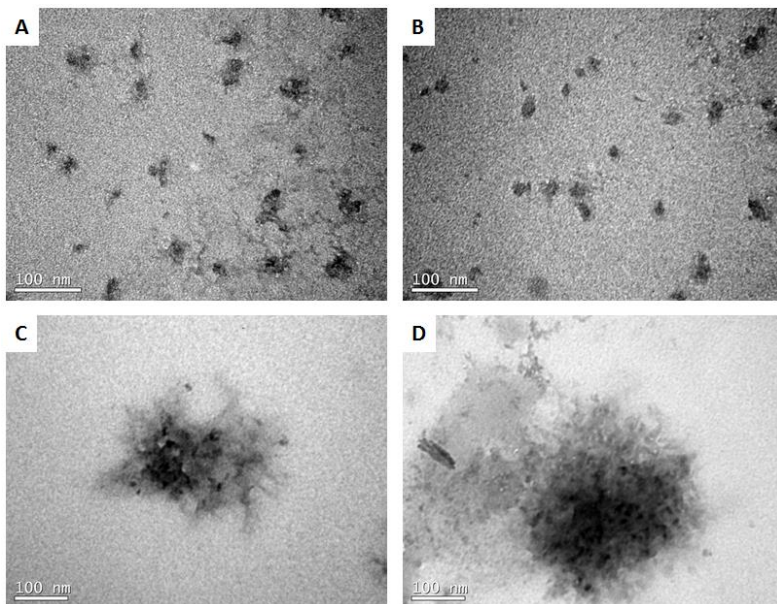
**Figura 12.** Diâmetro médio das estruturas presentes nas formulações de AB-DOC (A) e h-AB-DOC (B).



Curvas de frequência representativas de três leituras independentes (linhas azul, verde e vermelha). **Fonte:** a autora.

Para confirmar o tamanho das estruturas nas formulações, bem como a morfologia das mesmas, as amostras foram analisadas por MET. A Figura 13 ilustra as estruturas das formulações de AB-DOC e h-AB-DOC.

**Figura 13.** Microscopia eletrônica de transmissão das formulações de AB-DOC (A e B) e h-AB-DOC (C e D).



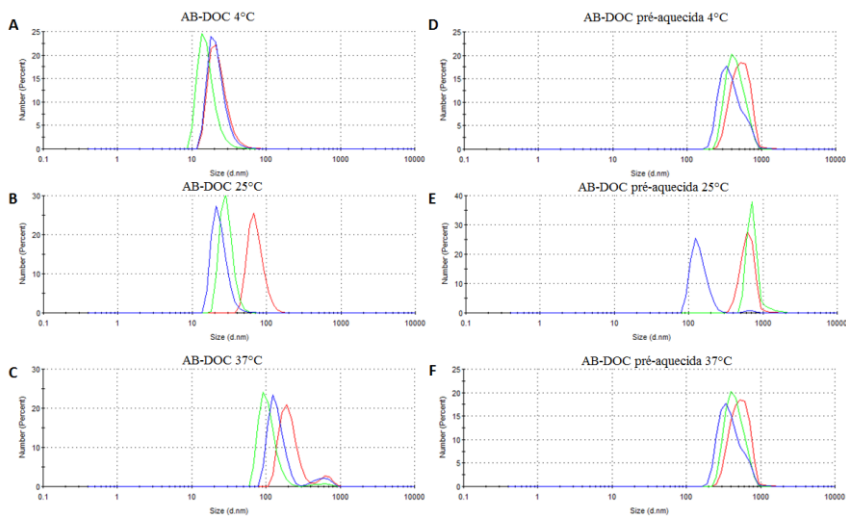
Fonte: a autora.

Alíquotas de AB-DOC e h-AB-DOC foram armazenadas em tubos plásticos a 4°, 25° e 37°C, protegidos de luz por 90 dias e avaliados quanto ao tamanho das estruturas periodicamente. A Figura 15 mostra a variação do tamanho das estruturas após 24 horas de armazenamento nas diferentes temperaturas, tanto para a AB-DOC quanto para a h-AB-DOC. Ainda, na Tabela 1, observa-se valores do diâmetro médio das estruturas e os valores de dispersão entre as estruturas (PDI).

Foi determinado o tamanho das estruturas nas diferentes condições de armazenamento por 90 dias. A Figura 15 ilustra as determinações realizadas. Observaram-se duas populações de agregados de tamanho distintos em todas as formulações e condições. Ainda, observou-se instabilidade no tamanho das estruturas ao longo do tempo,

variando entre 100 nm e 1500 nm. Já a formulação AB-DOC pré-aquecida manteve seus agregados estáveis em aproximadamente 500 nm. As formulações que menos variaram foram as armazenadas à 37°C.

**Figura 14.** Diâmetro médio das estruturas presentes nas formulações de AB-DOC e h-AB-DOC.



Após 24 horas de armazenamento a 4°C (A e D), 25°C (B e E) e 37°C (C e F). Curvas de frequência representativas de três leituras independentes (linhas azul, verde e vermelha). **Fonte:** a autora.



**Tabela 1:** Valores do diâmetro médio das estruturas e os valores de dispersão entre as estruturas (PDI).

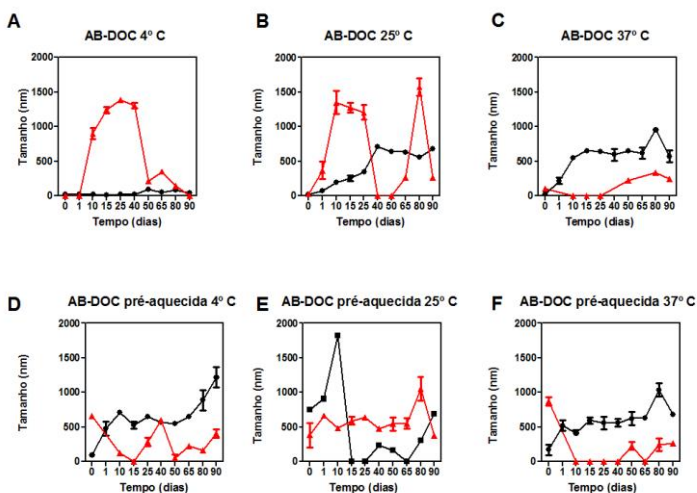
AB-DOC		
	Tamanho (nm)	PDI
4° C	20,45 ± 7,4	0,279
25°C	23,69 ± 7,04	0,999
37°C	202 ± 52,53	0,634

AB-DOC pré- aquecida		
	Tamanho (nm)	PDI
4° C	474,5 ± 151	0,319
25°C	629,4 ± 150,7	0,443
37°C	541 ± 187,6	0,505

**Fonte:** a autora.

**Figura 15** Variação do tamanho das estruturas das formulações de AB-DOC armazenadas a 4° (A), 25° (B) e 37°C (C) e AB-DOC pré-aquecida a 4° (D), 25° (E) e 37°C (F).



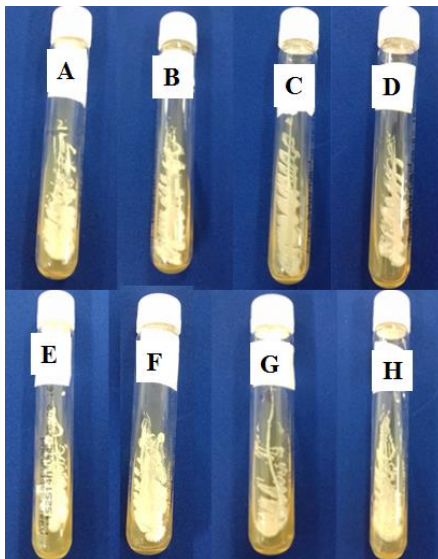
Subpopulação majoritária de estruturas (linha preta) e minoritária (linha vermelha). Os valores foram expressos em média e desvio padrão **Fonte:** a autora.

## 5.2 Isolados clínicos

No período de janeiro de 2011 a maio de 2016, o setor de Micologia do HU-UFSC recebeu 354 amostras com solicitação de hemocultura. Dentre estas, 4,8% das hemoculturas apresentaram crescimento fúngico, sendo 15 isolados de *Candida* spp. e 2 isolados de *Trichosporon asahii*. Dentre as espécies de *Candida*, isolados foram identificadas como *C. parapsolis* (47%), seguido de *C. albicans* (20%), *C. lusitaniae* (13,5%), de *C. glabrata* (13,5%) e de *C. tropicalis* (6%).

Destes, oito isolados clínicos foram incluídos no estudo, do período de 2013 a 2015. As amostras foram cultivadas em ágar sabouraud-dextrose por 24 horas para todos os experimentos realizados. A Figura 16 ilustra as cepas cultivadas após semeadura do isolado clínico.

**Figura 16.** Isolados clínicos em ágar sabouraud-dextrose 24 horas após a semeadura.

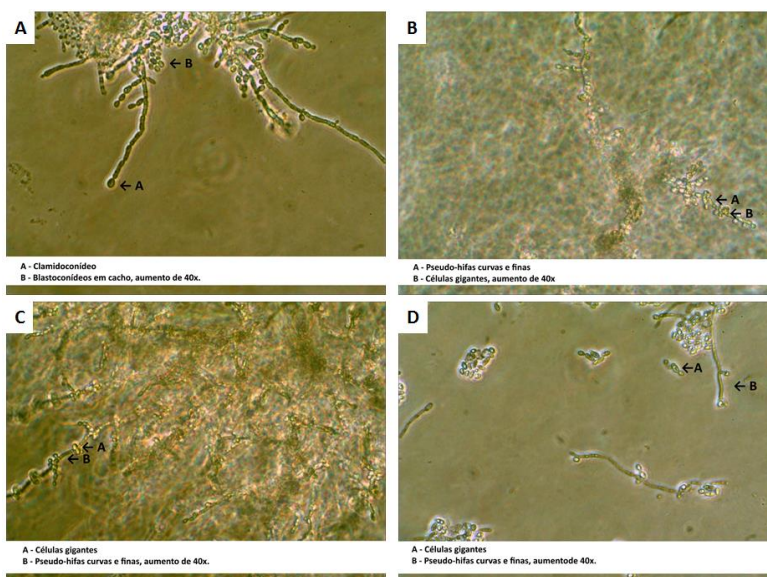


Os isolados foram identificados fenotipicamente pelo Setor de Micologia do HU-UFSC. (A) *Candida albicans*, (B) *Candida parapsolis* I, (C) *Candida parapsolis* II, (D) *Candida parapsolis* III, (E) *Candida parapsolis* IV, (F) *Candida glabrata* I, (G) *Candida glabrata* II, (H) *Candida tropicalis*.

Fonte: a autora.

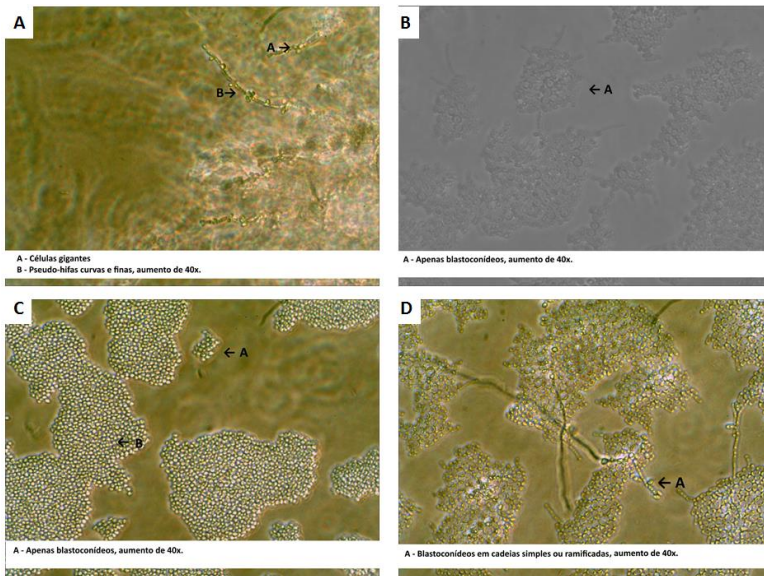
Após 24 horas de crescimento, as cepas foram submetidas ao microcultivo para confirmação das espécies. O microcultivo foi realizado e diversas estruturas de reprodução e resistência foram visualizadas, permitindo a identificação das cepas quanto a espécie (Figuras 17 e 18).

**Figura 17.** Microscopia de luz após microcultivos dos isolados clínicos.



As setas indicam as diferentes estruturas visualizadas inerentes a cada espécie, sendo (A) *Candida albicans*, (B) *Candida parapsolis* I, (C) *Candida parapsolis* II, (D) *Candida parapsolis* III. Aumento de 400X. **Fonte:** a autora

**Figura 18** Microscopia de luz após microcultivos dos isolados clínicos.



(A) *Candida parapsolis* IV, (B) *Candida glabrata* I, (C) *Candida glabrata* II, (D) *Candida tropicalis*. As setas indicam as diferentes estruturas visualizadas inerentes a cada espécie. Aumento de 400X. **Fonte:** a autora

### 5.3 Susceptibilidade antifúngica

Os isolados clínicos foram submetidos ao ensaio de susceptibilidade antifúngica por microdiluição em caldo. Foram avaliadas as formulações de AB-DOC, AB-DOC pré-aquecida e a formulação lipossomal de AB comercialmente disponível Ambisome®. Quanto a avaliação de sensibilidade aos antifúngicos, todos os isolados clínicos apresentaram susceptibilidade à AB, com CIM variando entre 0,1 e 0,2 µg/ mL para a formulação AB-DOC, valores inferiores a 0,05 µg/ mL e até 0,15 µg/ mL para a formulação AB-DOC pré-aquecida e entre 0,1 e 0,15 µg/mL para a formulação Ambisome®.

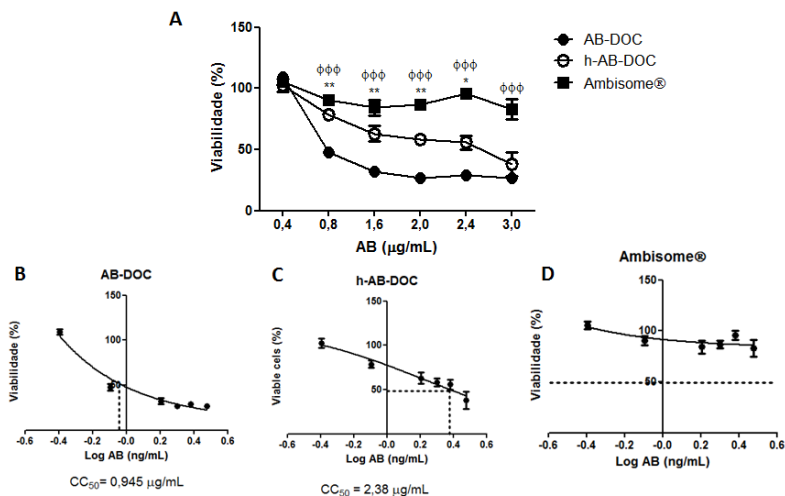
**Tabela 2.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM) determinadas por microdiluição em caldo de acordo com a NCCLS M17A2.

	CIM (µg/mL)		
	AB-DOC	h-AB-DOC	Ambisome®
<b>Isolado Clínico</b>			
Isolado Controle			
ICB 12A	0,10	0,10	0,15
<i>C. albicans</i>	0,10	< 0,05	0,10
<i>C. parapsolis</i> I	0,20	0,10	0,15
<i>C. parapsolis</i> II	0,10	0,10	0,1
<i>C. parapsolis</i> III	0,15	0,10	0,15
<i>C. parapsolis</i> IV	0,15	<0,05	0,15
<i>C. glabrata</i> I	0,10	0,10	0,15
<i>C. glabrata</i> II	0,10	0, 15	0,15
<i>C. tropicalis</i>	0, 15	0,10	0,15

#### **5.4 Citotoxicidade das formulações de AB**

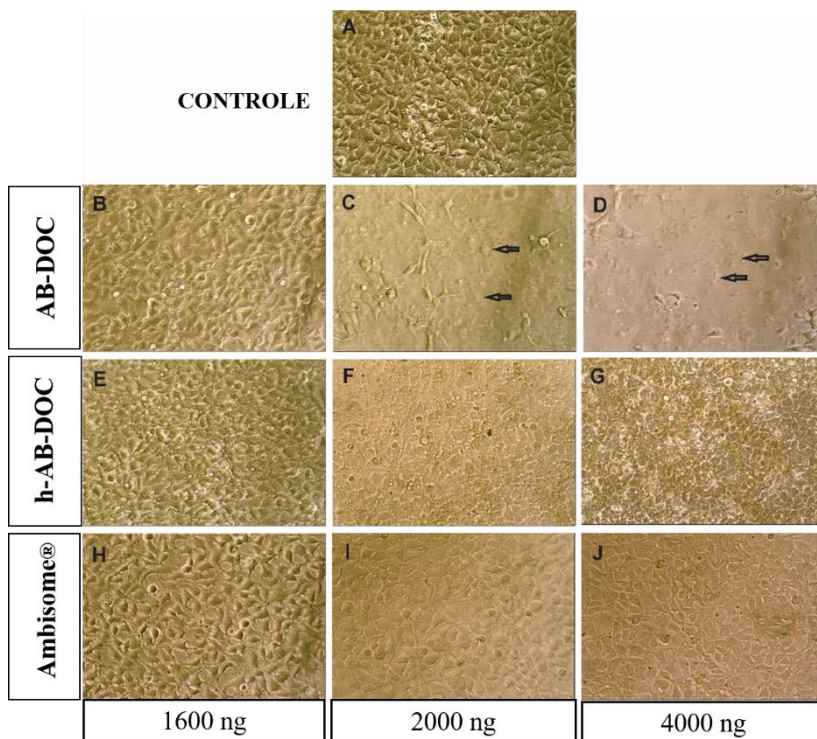
A toxicidade das formulações de AB-DOC, h-AB-DOC e Ambisome® foram determinadas em células de epitélio renal após 24 horas de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio da resazurina. Concentrações crescentes das formulações foram testadas e a  $CC_{50}$  (concentração citotóxica de 50% das células) foi determinada. A  $CC_{50}$  das formulações de AB-DOC, h-AB-DOC foi de 0,945  $\mu\text{g/mL}$  e 2,387  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Não foi possível a determinação da  $CC_{50}$  de Ambisome® devido a sua baixa toxicidade, entretanto considerou-se a  $CC_{50}$  maior que 3,000  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 19).

**Figura 19.** Ambisome® em células de epitélio renal (HEK293). (A) Viabilidade celular em função das concentrações crescentes de AB. (B, C e D) Regressão não linear para a determinação do  $CC_{50}$  por interpolação. Valores expressos em média e desvio padrão. Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  (AB-DOC versus h-AB-DOC).  $\phi\phi\phi$   $p < 0,001$  (AB-DOC versus Ambisome®).



As células de epitélio renal foram também visualizadas quanto a sua morfologia por microscopia de luz, após a exposição com as formulações de AB-DOC, h-AB-DOC e Ambisome®. A Figura 20 mostra a morfologia das células nas diversas concentrações das formulações de AB.

**Figura 20.** Morfologia das células de epitélio renal após 24 horas de exposição à AB-DOC (B, E e H), h-AB-DOC (C, F e I) e Ambisome® (D, G e J) nas concentrações de 1600, 2000 e 4000 ng/mL).



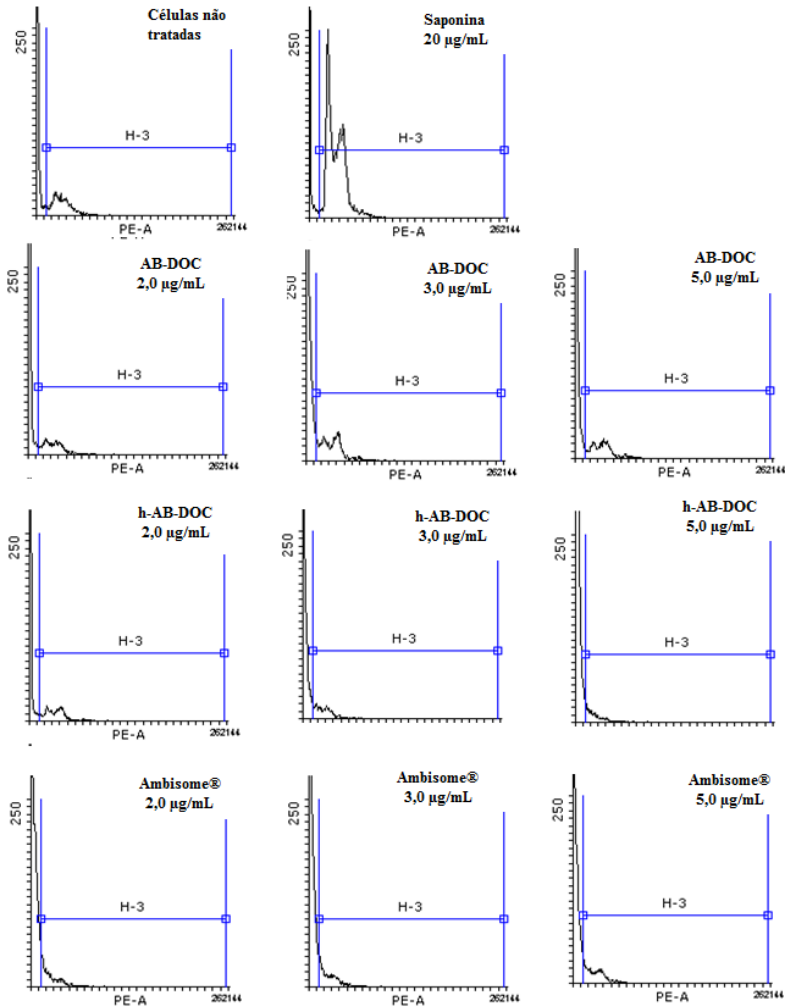
As setas em (C) mostram agregados da h-AB-DOC e em (D) células não viáveis. 400x. **Fonte:** a autora.

Para avaliar a integridade de membrana celular, as células de epitélio renal foram expostas às seguintes concentrações de AB-DOC, h-AB-DOC e Ambisome®: 2,0, 3,0 e 5,0  $\mu\text{g/mL}$ . Após, foram submetidas ao ensaio de integridade de membrana celular, utilizando o intercalante de ácidos nucleicos, o PI. Neste experimento pode-se observar a perda de integridade de membrana das células pela entrada de

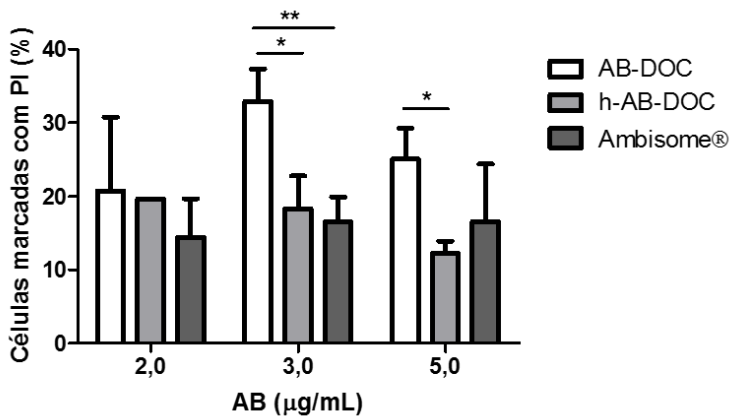


PI nestas células, marcando-as de maneira fluorescente, sugerindo morte celular. Na Figura 21 é possível observar os histogramas relativos a cada exposição às células, com as diferentes formulações de AB e três diferentes concentrações. Na Figura 22 está representada a porcentagem de células de epitélio renal marcadas com PI após o tratamento com as diversas formulações de AB. Observou-se maior porcentagem de células marcadas com PI nos tratamentos com AB-DOC na concentração de 3,0 µg/mL em relação a h-AB-DOC ( $p < 0,05$ ) e Ambisome® ( $p < 0,01$ ). Ainda, a h-AB-DOC na concentração de 5,0 µg/mL promoveu menor perda de integridade de membrana se comparada às demais formulações (AB-DOC,  $p < 0,05$  e Ambisome®, ns).

**Figura 21.** Histogramas representativos da análise de viabilidade das células de epitélio renal por citometria de fluxo. As células de epitélio renal foram tratadas com concentrações de 2,0  $\mu\text{g/mL}$ , 3,0  $\mu\text{g/mL}$  e 5,0  $\mu\text{g/mL}$  das formulações de AB-DOC, h-AB-DOC e Ambisome®. As células na região H3 do histograma representam células não viáveis marcadas com iodeto de propídio (PI).



**Figura 22.** Análise de viabilidade celular de epitélio renal por citometria de fluxo após exposição às formulações de AB-DOC, h-AB-DOC e Ambisome®.



Valores expressos em média e desvio padrão. Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ . **Fonte:** a autora.



## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, objetivou-se a avaliação da formulação de AB-DOC pré-aquecida quanto a atividade antifúngica em isolados clínicos de *Candida* spp. de pacientes internados no HU-UFSC. Ainda, determinou-se a toxicidade da formulação frente a uma linhagem celular de epitélio renal, por diversas metodologias. A escolha do epitélio renal se deu devido à alta incidência de nefrotoxicidade observada em pacientes usuários de AB endovenosa (BATES et al., 2001; FUREBRING; OBERG; SJÖLIN, 2000; LANIADO-LABORN; CABRALES-VARGAS, 2009; VARLAM et al., 2001).

Com a ocorrência de reações adversas graves causadas pela AB-DOC (Fungison®), dentre elas a nefrotoxicidade em pacientes que fazem uso deste medicamento, é evidente a necessidade do melhoramento tecnológico de sua formulação. Diante disto, a proposta de um procedimento simples e praticamente sem custo, como o aquecimento do fármaco sob condições pré-estabelecidas surge como alternativa de tratamento acessível.

A relação entre o estado de agregação de AB e seus parâmetros de seletividade pela membrana fúngica (BARTLETT *et al.*, 2004; CHKRON; LEROY; BOLARD, 1997; VAN ETTEN *et al.*, 2000) corroboraram para estabelecer um protocolo estabelecido primeiramente por Gaboriau e colaboradores (1997), consistindo no aquecimento de AB a 70 °C por 20 minutos em banho-maria, gerando a formação de agregados maiores na dispersão coloidal de AB, por meio do fenômeno de floculação (formação de superagregados inferiores à 1µm). Macroscopicamente, as mudanças após o processo de aquecimento são percebidas pela intensificação da cor amarela (inerente à formulação), alteração do estado transparente para uma amostra com intensa turbidez e ganho de viscosidade. Ainda, micrografias obtidas por MET demonstraram a formação de superagregados, a presença de estruturas anamórficas com regiões mais densas (proeminências escuras) e regiões mais claras (menos agregada).

Quanto à detecção, a caracterização do tamanho dos agregados e superagregados e a estabilidade da AB-DOC e AB pré-aquecida armazenadas em diferentes condições temperaturas (4°, 25° e 37° C) por 90 dias foram realizadas no equipamento Zeta Sizer Nano (Malvern®).

Neste estudo, a atividade antifúngica das diferentes formulações de Anfotericina B (AB-DOC, h-AB-DOC e AB lipossomal) foram avaliadas através do CIM, valores estes que foram obtidos através da

triagem pelo Laboratório de Microbiologia do HU pelo equipamento Vitek ou E-Test pelo Laboratório de Micologia e pela técnica de microdiluição em caldo. Os valores de CIM dos isolados clínicos para AB pré-aquecida foram iguais ou inferiores a AB-DOC, com exceção do isolado de *C. glabrata* II, o que sugere maior sensibilidade destes microrganismos à AB pré-aquecida em relação à formulação de AB-DOC. Tal atividade é possivelmente relacionada à melhora da seletividade de AB após o aquecimento (CHKRON *et al.*, 2003; ESPADA *et al.*, 2008; HARTSEL *et al.*, 2001; LAMBING; WOLF; HARTSEL, 1993), quando, de acordo com hipótese, os superagregados não induzem a formação de canais iônicos na membrana, como ocorre com AB-DOC. Os superagregados seriam responsáveis pela liberação de monômeros da formulação enquanto permeia a membrana de forma seletiva (apenas ergosterol fúngico, sem haver ligação ao colesterol das células renais), funcionando como um “reservatório” de monômeros, provendo à AB pré-aquecida propriedades farmacológicas semelhantes às formulações lipossomais, como mostram experimentos em células epiteliais renais LLCPK1, quando avaliados os níveis de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) (CHÉRON *et al.*, 2003). Tais mecanismos não estão bem elucidados, mas podem incluir também o efeito lítico por ação peroxidativa no nível da membrana (Figura 4), sendo a peroxidação possivelmente ocasionada pelas cadeias acil não-saturadas da membrana celular fúngica e por espécies reativas de oxigênio produzidas pelo antibiótico, aniquilando o agente infeccioso por estresse oxidativo (ETTEN *et al.* 2000; GABORIAU, 1996; LAMY-FREUND, 1993). Além disso, a multiplicidade de canais transmembranares e modos de ação de AB-DOC na célula fúngica (LEGRAND, 1992) amplia a possibilidade de que ocorram outros tipos de mecanismos seletivos para AB pré-aquecida.

A formação dos superagregados na AB pré-aquecida, confere à formulação maior estabilidade termodinâmica, assim como mostram os gráficos do monitoramento de estabilidade em diferentes temperaturas de armazenamento. Tal característica influenciaria negativamente a associação da forma superagregada de AB com lipoproteínas, como LDL e HDL e albumina sérica, quando se refere ao plasma humano (CHÉRON *et al.*, 2003).

Quanto aos resultados de CIM obtidos, os isolados clínicos não apresentam resistência à AB. Relatos de resistência *in vitro* de *Candida* spp. são pouco frequentes, principalmente quando os isolados clínicos foram submetidos a sucessivos repiques no laboratório, que podem levar a perda ou silenciamento de genes relacionados a resistência. Kretzer

(2015) descreveu a ocorrência de IFS e determinou o perfil epidemiológico das mesmas no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), identificando prevalência das leveduras *Candida albicans*, representando 39,6 % dos isolamentos, entretanto inferior quanto à soma das demais espécies não-albicans, (60,4 %), sendo 18,9 % *C. parapsilosis*, 13,2 % *C. tropicalis*, 11,3 % *C. glabrata*, 5,7 % *C. krusei* e 11,3 % outras espécies.

No Brasil, o estudo de Da Costa e colaboradores (2014) avaliou quanto ao perfil de resistência, 108 isolados de *Candida* spp. provenientes de hemocultura. Diversos antifúngicos foram testados, incluindo a AB, por meio da técnica *in vitro* de microdiluição em caldo. A porcentagem de suscetibilidade frente a anfotericina B foi equivalente a 99 %. Semelhante ao que constatou-se no presente trabalho, no estudo realizado por Bustamante et al. (2014) foram testados os antifúngicos anfotericina B, fluconazol e voriconazol por meio da técnica *in vitro* de microdiluição em caldo. A porcentagem de suscetibilidade frente a anfotericina B foi de 97,4 a 98,7 %.

Ainda assim, os experimentos de microdiluição em caldo foram essenciais para demonstrar a eficácia similar de h-AB-DOC à AB-DOC, da mesma forma como demonstraram estudos anteriores de sensibilidade fúngica (BARTLETT *et al.*, 2004; DA SILVA-FILHO *et al.*, 2012; SIVAK; BARTLETT; WASAN, 2004; STOODLEY; WASAN; BIZZOTTO, 2007; VAN ETTEN *et al.*, 2000). Isto corrobora ainda mais para as vantagens do uso de AB-DOC pré-aquecida, como a eficiência contra infecções fúngicas; redução não só da toxicidade renal, mas também de outros órgãos. Esse evento seria consequência da maior concentração do fármaco de forma significativa no fígado, além de pulmão, baço e coração após administração intravenosa, conforme concentrações de AB pré-aquecida no soro e tecidos isolados determinados por cromatografia líquida de alta eficiência e diminuição dos valores séricos de creatinina, por não haveria dano à filtração glomerular dos rins (KWONG *et al.*, 2001). Tais resultados também corroboram os valores de CC<sub>50</sub> de AB pré-aquecida nas células de epitélio renal foram inferiores aos valores de CC<sub>50</sub> de AB-DOC. Desta forma, demonstra que AB pré-aquecida apresenta eficácia com menores concentrações do fármaco e com citotoxicidade reduzida, como já demonstrado por outros estudos (BARTLETT *et al.*, 2004; DA SILVA-FILHO *et al.*, 2012; VAN ETTEN *et al.*, 2000).

Quanto aos ensaios citotoxicidade – viabilidade celular, alamar blue, morfologia por microscopia e citometria de fluxo por marcação com iodeto de prótido - avaliando as três formulações: AB-DOC, AB

pré-aquecida e Ambisome® reforçam a baixa citotoxicidade da formulação lipossomal *in vivo* (BEKERSKY et al., 2000) pois apresentou baixos valores de MIC e altos valores para CC<sub>50</sub>, sendo que ocorre o oposto com a formulação de AB-DOC, que apesar do baixo valor de CIM, apresentou baixo CC<sub>50</sub>, o que corresponde aos seu alto nível de citotoxicidade já demonstrado pela literatura (FISHER e BRYSON, 1979; GABOURIAU *et al.*, 1997; HARTSEL e BORLARD, 1996). Neste trabalho observamos que o aquecimento de AB-DOC proporcionou à formulação baixos valores de CIM, semelhantes ou inferiores aos valores CIM para AB-DOC, entretanto, os valores foram maiores para CC<sub>50</sub>, sugerindo eficácia similar de h-AB-DOC à AB-DOC, porém com menor citotoxicidade para as células de epitélio renal.

Portanto, o pré-aquecimento de AB-DOC a 70° C por 20 minutos antes de seu uso intravenoso surge como futura alternativa não onerosa, capaz de modificar os processos farmacocinéticos inerentes a AB, em especial, no que diz respeito à distribuição nos tecidos, conferindo perfil seletividade a uma formulação já disponível no mercado, com baixo preço e considerado padrão ouro até os dias de hoje.



## 7 CONCLUSÃO

- O estado de agregação de AB-DOC por processo térmico foi alterado, levando a formação de estruturas maiores de agregados, os chamados superagregados;

- A h-AB-DOC apresentou estabilidade pelo período de 90 dias em armazenamento nas temperaturas de 4°, 25° e 37° C;

- Em células de epitélio renal, a h-AB-DOC mostrou-se tão eficaz quanto AB-DOC® e com menor citotoxicidade e maior seletividade;

- Nos experimentos de microdiluição em caldo para determinação do CIM, h-AB mostrou-se tão eficaz quanto AB-DOC frente aos isolados clínicos de *Candida parapsolis*, *Candida albicans*, *Candida lusitanae*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*.



## REFERÊNCIAS

- ADLER-MOORE, J. P.; PROFFITT, R. T. Amphotericin B lipid preparations: What are the differences? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 4, p.25-36, 2008.
- AJIRO, K. et al. Reciprocal Epigenetic Modification of Histone H2B occurs in Chromatin during Apoptosis *in vitro* and *in vivo*. **Cell Death Differentiation**, v. 17(6), p. 984–93, 2010.
- AL-QUADEIB, B. T. et al. Stealth Amphotericin B nanoparticles for oral drug delivery: *In vitro* optimization. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, p. 290–302, 2015.
- ANDERSON, T. M. et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature Chemical Biology**, v. 14, p. 1-10, 2014.
- ANDES, D.; et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Comparison of Amphotericin B (AMB) and Two Lipid-Associated AMB Preparations, Liposomal AMB and AMB Lipid Complex, in Murine Candidiasis Models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 674–84, 2006.
- BARTLETT, K. et al. Effect of Heat-Treated Amphotericin B on Renal and Fungal Cytotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 333–336, 2004.
- BATES, D. W. et al. Correlates of acute renal failure in patients receiving parenteral amphotericin B. **Kidney International**, v. 60, n. 4, p. 1452–1459, 2001.
- BEKERSKY, I., et al. Safety, toxicokinetics and tissue distribution of long-term intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome): a 91-day study in rats. **Pharmaceutical research**, v. 17(12), p. 1494-502, 2000.
- BOTERO, M. C.; PUENTES-HERRERA, M.; CORTÉS, J. A. Formas lipídicas de anfotericina. **Revista Chilena Infectología**, v. 31, n. 5, p. 518-527, 2014.

BUSTAMANTE, B, MARTINS, M.A., BONFIETTI, L.X., SZESZS, M.W., JACOBS, J., GARCIA, C., et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* isolates from bloodstream infections in Lima, Peru. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 855-60, 2014.

CHEN, S. C. A.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **The medical journal of Australia**, v. 187, n. 7, p. 404-09, 2007.

CHKRON, M.; LEROY, L.; BOLARD, J. Physico-chemical properties of the heat-induced of amphotericin B Frangois Gaboriau. **Science**, v. 4622, n. 96, 1997.

CHÉRON, M. et al. Heat-induced reformulation of amphotericin B-deoxycholate favours drug uptake by the macrophage-like cell line J774. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 904–910, 2003

COSTA, V.G., QUESADA, R.M., ABE, A.T., FURLANETO, M.C., Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. **Mycopathologia** v. 178 (3-4), p.243-50, 2014.

DAVIS, S. A. et al. Nontoxic antimicrobials that evade drug resistance. **Nature Chemical Biology**, Advance online publication, v. 11, p. 481–487, 2015.

DELGADO, A. J.; BOLANOS, E.; COBO, E. G. Oral manifestations of HIV infection in infants: A review article. **Medicina e Patología Oral e Cirurgia Bucal**, v. 9, n. 5, p. 415-20; 410-5, 2004.

ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 809-818, 2006.

ESPADA, R. et al. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 361, n. 1-2, p. 64–69, 2008.

ETTEN, E. W. M. et al. Mild Heating of Amphotericin B-Desoxycholate: Effects on Ultrastructure, *In Vitro* Activity and Toxicity,

and Therapeutic Efficacy in Severe Candidiasis in Leukopenic Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 1598–1603, 2000.

FALCO, S.N.; SOLER, J.B. Prevention and treatment of opportunistic infections. **Allergologia et Immunopathologia (Madri)**, v. 26, n. 3, p. 144-50, 1998.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de Anfotericina B. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 167-197, 2006.

FUREBRING, M.; OBERG, G.; SJÖLIN, J. Side-effects of amphotericin B lipid complex (Abelcet) in the Scandinavian population. **Bone marrow transplantation**, v. 25, n. 3, p. 341–3, 2000.

FISHER, P.B., BRYSON, V., SCHAFFNER, C.P. Polyene macrolide antibiotic cytotoxicity and mebrane permeability alterations. **Journal of cellular physiology**., v. 100 (2), p. 335-42, 1979.

GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Reviews of Infectious.Disease.**, v. 12, p. 308–29, 1990.

GANIS, P.; AUITABILE, G.; MECHLINKI, W.;SCHAFFNER, C.P. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodo-acetyl derivative. **Journal of the American. Chemical Society.**, v. 93, p. 4560-4564, 1971.

GHELLINCK, A. *et al.* Lipid polyunsaturation determines the extent of membrane structural changes induced by Amphotericin B in *Pichiapastoris* yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, n. 10, p. 2317–2325, 2015.

HARTSEL, S., BOLARD, J. Amphotericin B: new life for an old drug. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 17 (12) p. 445-9. 1996.

HEITMAN, J. *et al.* Sexual reproduction of human fungal pathogens. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 8, 2014.

ITALIA, J.L. *et al.* Peroral Amphotericin B Polymer Nanoparticles Lead to Comparable or Superior *In Vivo* Antifungal Activity to That of

Intravenous Ambisome® or Fungizone. **Plos One**, v. 6, n. 10, p. e25744, 2011.

JANKNEGTT, R.; DE MARIE, S. et al. Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. **Clinical pharmacokinetics**, v. 23, p. 279-91, 1992.

JOHNSON, R. H.; EINSTEIN, H. E. Amphotericin B and Coccidioidomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1111, p. 434–441, 2007.

KAGAN, L. et al. Dual Physiologically Based Pharmacokinetic Model of Liposomal and Nonliposomal Amphotericin B Disposition. **Pharmaceutical research**, v. 31, n.1, p. 35-45, 2014.

KLEINBERG, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27S, p. S12–S16, 2006.

KRETZER, S.L. et al. Infecções relacionadas à assistência à saúde em Hospital Universitário de Santa Catarina: Perfil Epidemiológico de Candidemia no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2013.

KWONG et al. Heat Treatment of Amphotericin B Modifies Its Serum Pharmacokinetics, Tissue Distribution, and Renal Toxicity following Administration of a Single Intravenous Dose. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 2060–63, 2001.

LAMY-FREUND, M. T.; FERREIRA, V. F. N.; SCHREIER, S. Polydispersity of aggregates formed by the polyene antibiotic amphotericin B and deoxycholate. A spin label study. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 981, n. 2, p. 207–212, 1989.

LAMY-FREUND, M.T.; FERREIRA, V.F.N.; FALJONIALARIO A.; SCHREIER, S. Effect of aggregation on the kinetics of autoxidation of the polyene antibiotic amphotericin-B. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 82(2), p. 162–66, 1993.

LANIADO-LABORIN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología.**, v. 26, n. 4, p. 223–227, 2009.

LEGRAND, P., ROMERO, E.A., COHEN, B.E., BOLARD, J. Effects of Aggregation and Solvent on the Toxicity of Amphotericin B to Human Erythrocytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 2518-2522, 1992.

LEMKE, A., KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, p. 151–162, 2005.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–10, 2012.

METHA, J.; BLAKE, J.; CRADDOCK, C. Comparative Efficacy of Amphotericin B Lipid Complex and Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Invasive Fungal Infections in HSCT Recipients and other Immunocompromised Patient Populations with Hematologic Malignancies: A Critical Review. **The Open Transplantation Journal**, v. 5, p. 23-29, 2011.

MONNET, C. et al. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 362, n. 1, p. 1-9, 2015.

NEUMANN, A. et al. How Do Sterols Determine the Antifungal Activity of Amphotericin B? Free Energy of Binding between the Drug and Its Membrane Targets. **Journal of the American Chemical Society**, v.132, n. 51, 2010.

OEVER, J.; NETEA, M. G. The bacteriome – mycobiome interaction and antifungal host defense. **European journal of immunology**, p. 3182–3191, 2014.

OLIVEIRA, T. Caracterização estrutural de agregados formados pelo antifúngico anfotericina B e lipídios catiônicos: uma possível formulação farmacológica. p. 147, 2011.

OLIVEIRA DOS SANTOS, C. et al. Emerging pan-resistance in *Trichosporon* species: a case report. **BioMed Central Infectious Diseases**, v. 16, p. 148, 2016.

OLIVEIRA, J. Tópicos em Micologia Médica . Rio de Janeiro; 2014  
OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. Amphotericin B: time for anew 'gold standard'. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 415–25, 2003.

PAPPAS, P.G. et al. Guidelines for Treatment of Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38 (2), p. 161-189, 2004.

PIZARRO, F.; VARGAS, F. A.; AGOSIN, E. A systems biology perspective of wine fermentations. **Yeast**, v. 24, n. 11, p. 977-91, Nov 2007.

ROGERS, P. D. Heat-induced superaggregation of amphotericin B attenuates its ability to induce cytokine and chemokine production in the human monocytic cell line THP-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 405–408, 2003.

SALAMATU, K. S. et al. The Antifungal Drug Amphotericin B Promotes Inflammatory Cytokine Release by a Toll-like Receptor and CD14-dependent Mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37561–37568, 2003.

SALERNO, C. et al. Lipid-based microtubes for topical delivery of Amphotericin B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.107, p. 160–166, 2013.

SILVA, A. H. et al. *In vitro* biocompatibility of solid lipid nanoparticles. **Science of the Total Environment**, v. 432, p. 382–388, 2012.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **The Journal of infectious diseases**, v. 154, n. 1, p. 76–83, 1986.

SOKOL-ANDERSON, et al. Role of Cell Defense against Oxidative Damage in the Resistance of *Candida albicans* to the Killing Effect of Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 702-705, 1988.

SOUZA, A. C. O. et al. Activity and in vivo tracking of Amphotericin B loaded PLGA nanoparticles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 267-276, 2015.



SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiol**, v. 9, n. 10, p. 737-48, 2011.

TORRADO, J. J.; ESPADA, R. *et al.* Amphotericin B Formulations and Drug Targeting. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 2405–2425, 2008.

VANDEPUTTE, J.; WACHTEL, J.L. e STILLER, E.T. Amphotericin A and B antifungal antibiotics produced by a *Streptomyces*. II The isolation and properties of the crystalline amphotericins. **Antimicrobial agents annual**, v. 1955-1956, p. 587-591, 1956.

VANDEPUT, J.; NETE. The bacteriome – mycobiome interaction and antifungal host defense. **European journal of immunology**, p. 3182–3191, 2014.

VAN DE VEM, H. *et al.* PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent *in vitro* and *in vivo* alternatives to Fungizone and AmBisome. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 795–803, 2012.

WADE, R. L. *et al.* Nephrotoxicity and other adverse events among patients receiving liposomal amphotericin B or amphotericin B lipid complex. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, p. 361–367, 2013.

WALSH, T. J. *et al.* Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. **The New England journal of medicine**, v. 340, p. 764-71, 1999.

WALSH, T.J; DIXON, D. M. Spectrum of Mycoses. In: Baron S, editor. **Medical Microbiology**. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; v. 75, 1996.

WANG, I.-H. *et al.*, A newly identified derivative of amphotericin B: isolation, structure determination and primary evaluation of the activity and toxicity. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, p. 553–557, 2010.

WHO, Application for listing of liposomal Amphotericin B for the treatment of invasive fungal infections on the WHO model list of

essential medicines for children. **17th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines**, 2009.

ZYGMUNT, W. A. Intracellular Loss of Potassium in *Candida albicans* After Exposure to Polyene Antifungal Antibiotics. **Applied microbiology**, v. 14, n. 6, p. 953–6, 1966.