



**UFOP**

Universidade Federal  
de Ouro Preto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE FARMÁCIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA SEGURANÇA CARDIOVASCULAR DO ANTIFÚNGICO  
CASPOFUNGINA**

**Danielle Cristiane Correa de Paula Machado**

**Ouro Preto - MG**

**2019**

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA SEGURANÇA CARDIOVASCULAR DO ANTIFÚNGICO  
CASPOFUNGINA**

**Danielle Cristiane Correa de Paula Machado**

Tese de doutorado a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma) da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dra. Andrea Grabe Guimarães

Co-orientadora: Dra. Elaine Amaral Leite

**Ouro Preto - MG**

**2019**

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P324a Paula, Danielle Cristiane Correa de .  
Avaliação in vivo da segurança cardiovascular do antifúngico  
Caspofungina. [manuscrito] / Danielle Cristiane Correa de Paula. - 2019.  
113 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães.  
Coorientadora: Profa. Dra. Elaine Amaral Leite.  
Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de  
Farmácia. Programa de Ciências Farmacêuticas.  
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Cândida. 3. Antimicóticos. 4. Sistema cardiovascular. I.  
Guimarães, Andrea Grabe. II. Leite, Elaine Amaral. III. Universidade  
Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.282


Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6/1589



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
**Escola de Farmácia**

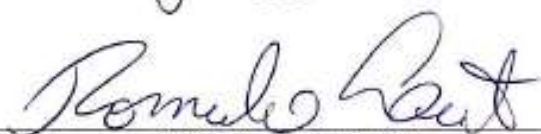
Sessão de defesa da 22ª tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas a Danielle Cristiane Corrêa de Paula com a defesa da tese intitulada: "Avaliação in vivo da segurança cardiovascular do antifúngico caspofungina", avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 11 de dezembro de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Heloisa D'Avila Bizarro  
UFJF

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Stefano Bruno de Assis Cau  
UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Gabriela Guerra Leal de Souza  
UFOP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Romulo Leite  
UFOP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Andrea Grabe Guimarães  
UFOP

## **Equipe**

Profª. Dra. Andrea Grabe Guimarães, Laboratório de Farmacologia Experimental, Escola de Farmácia, UFOP, Ouro Preto-MG.

Profª. Dra. Elaine Amaral Leite, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Escola de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte Minas Gerais-MG.

Colaboradores: Profª Drª Maria Elisabete da Silva Barros, Departamento de Farmácia Escola de Farmácia, UFOP, Ouro Preto-MG.

Prof. Dr. Homero Nogueira Guimarães, Departamento de Engenharia Elétrica, Escola de Engenharia, UFMG, Belo Horizonte Minas Gerais-MG.

Técnicos: Sr. Wilson, Renata Branquinho, Carolina Moraes, Rejane.

À Deus, à minha filha amada Liz, ao meu esposo  
Maurício e meus familiares, pelo amor e incentivo  
incondicionais.

## **Agradecimentos**

À Deus, pela saúde física, psíquica e emocional.

À Andrea, que ao longo de todos esses anos de orientação, confiou em meu trabalho e me acolheu em minhas limitações. Serei eternamente grata pelos ensinamentos e dedicação!

À minha co-orientadora, Elaine, pessoa competente, comprometida e acima de tudo, paciente. Sempre esteve disponível em me auxiliar.

Aos membros da banca, pelas valiosas contribuições.

À minha filha, Liz, que foi muito desejada e chegou no momento certo em minha vida, pois foi a inspiração para a conclusão desse trabalho.

Ao meu esposo, Maurício, que compreendeu minha ausência com carinho e paciência. Seu apoio e incentivo foram fundamentais para esta conquista!

Aos meus amados pais, Vera e Wilson que sonharam junto comigo essa conquista, me acolhendo sempre com orações, palavras de incentivo e confiança. Às minhas irmãs Ana e Paola, que sempre foram fonte de admiração e exemplo, por me compreender de forma tão sensível na luta da pós-graduação. Aos meus sobrinhos queridos, Maitê e Pedro, por serem inspiração, principalmente nos momentos de angústia ao longo desses anos.

Aos professores e colegas do laboratório de farmacologia pela ótima convivência, ajuda nas dificuldades e aprendizados, especialmente Carol Moraes e Thales por toda ajuda e preciosa contribuição.

Às minhas grandes amigas, Alê, por ter sido uma irmã desde o início de minha jornada acadêmica; Carol e Quênia, que mesmo longe, compartilharam comigo cada tropeço e cada vitória desse trabalho, sempre com uma palavra de conforto.

À Rejane, que foi muito mais que a técnica do laboratório de Microbiologia, tornou-se uma amiga que me acolheu nos momentos de tristeza e compartilhou das risadas nos momentos de alegria. Levarei por toda a vida!

À professora Elizabeth, por ceder o laboratório de Microbiologia, permitindo a viabilidade do desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Luiz Fernando, por compartilharem seus conhecimentos sobre microbiologia.

À professora Viviane Gouveia pela concessão da cepa de *C. albicans* utilizada no presente trabalho.

Ao professor Homero por todo auxílio prestado com o sistema de aquisição de dados.

À UFOP pelas oportunidades, pelo conhecimento e por ter me proporcionado bons momentos.



## SUMÁRIO

1- Introdução.....	16
2- Revisão da literatura.....	19
2.1. <i>Candida ssp</i> .....	19
2.2. Tratamento farmacológico da candidíase .....	22
2.3. Avaliação cardiovascular de fármacos potencialmente cardiotoxicos.....	29
2.3.1. Eletrocardiograma e Variabilidade da Frequência Cardíaca .....	30
3- Justificativa.....	33
4- Objetivo Geral .....	34
5- Avaliação da eficácia da caspofungina .....	35
5.1. Introdução .....	35
5.2. Objetivos específicos .....	35
5.3. Métodos .....	35
5.3.1. Obtenção e manutenção das cepas de <i>C. albicans</i> .....	35
5.3.2. Padronização da infecção por <i>C. albicans</i> em camundongos.....	36
5.3.3. Avaliação da eficácia da caspofungina .....	38
5.3.4. Análise estatística .....	39
5.3.5. Avaliação da susceptibilidade in vitro da cepa de <i>C. albicans</i> SC5314.....	39
5.4. Resultados.....	42
5.4.1. Padronização da infecção por <i>C. albicans</i> em camundongos.....	42
5.4.2. Avaliação da eficácia da caspofungina .....	44
5.4.3. Avaliação da susceptibilidade in vitro da cepa de <i>C. albicans</i> SC5314.....	46
5.5. Discussão .....	47
6- Efeitos do tratamento com caspofungina sobre os parâmetros do eletrocardiograma .....	51
6.1. Introdução .....	51
6.2. Objetivo específico .....	51
6.3. Métodos .....	51
6.3.1. Protocolos experimentais .....	51
6.3.2. Obtenção do sinal ECG .....	54
6.3.3. Obtenção do ECG por telemetria e análise da variabilidade da frequência cardíaca .....	55
6.3.4. Análise estatística .....	57
6.4. Resultados.....	57
6.4.2. ECG de animais infectados com <i>C. albicans</i> e conscientes tratados com dose única de caspofungina (protocolo B) .....	57

6.4.2. ECG de animais não infectados e conscientes tratados com doses múltiplas de caspofungina (protocolo B).....	60
6.4.3. Animais conscientes e não infectados tratados com ciclofosfamida.....	70
6.5. Discussão .....	71
7- Discussão geral.....	77
8- Conclusão .....	80
9- Referências Bibliográficas .....	81
10- Anexos.....	110
10.1. ECG de animais não infectados e anestesiados .....	110
10.2. ECG de animais não infectados e conscientes tratados com doses múltiplas de caspofungina (protocolo B) .....	112
10.3. Certificado de aprovação CEUA .....	115

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CFU	Colony forming unit
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and laboratory standards institute</i>
DMA	Dimetilacetamida
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
EUCAST	<i>European committee on antibiotic susceptibility testing</i>
FC	Frequência cardíaca
FDA	<i>Food and drug administration</i>
HRV	Heart rate variability
ICH	<i>International conference on harmonisation</i>
IM	Infarto do miocárdio
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenosa
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MC	Microdiluição em caldo
PA	Pressão arterial
PEG	Propilenoglicol
RENAME	Relação nacional de medicamentos essenciais
SD	Sabouraud dextrosado
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNA	Sistema nervoso autonômico
SNC	Sistema nervoso central
<i>TdP</i>	<i>Torsade de points</i>
UFC	Unidades formadoras de colônia
UTI	Unidade de terapia intensiva
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1: Protocolos experimentais da padronização da imunossupressão associada a infecção por <i>C. albicans</i> em camundongos Swiss fêmeas .....	35
Tabela 5.2: Resultados dos protocolos da padronização da imunossupressão e infecção de camundongos Swiss fêmeas .....	41
Tabela 5.3: Eficácia da caspofungina em camundongos Swiss fêmeas infectadas com <i>C. albicans</i> . Valores de UFC/g (média ± e.p.m.) de animais sobreviventes (n/total) utilizados para contagem de colônias fúngicas. ....	44
Tabela 6.1: Intervalos PR e QRS (média ± e.p.m) do ECG de camundongos não infectados e conscientes.....	60
Tabela 6.2: Intervalos QT e QTc (média ± e.p.m) do ECG de camundongos não infectados e conscientes.....	61
Tabela 6.3: Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo mensurados pelo ECG por telemetria (média ± e.p.m.) .....	62
Tabela 6.4: Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo mensurados pelo ECG por telemetria (média ± e.p.m) .....	63
Tabela 6.5: Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo mensurados pelo ECG por telemetria (média ± e.p.m). ....	64
Tabela 6.6: Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo mensurados pelo ECG por telemetria (média ± e.p.m) .....	65
Tabela 6.7: Valores absolutos (média ± e.p.m.) dos parâmetros da análise da VFC dos sinais de ECG por telemetria .....	66
Tabela 6.8: Parâmetros do eletrocardiograma (ECG) (média ± e.p.m.) dos valores absolutos mensurados antes (basal) e 24 horas após a 1ª dose e a 4ª dose do tratamento com veículo ou ciclofosfamida 100 mg/kg IP durante 4 dias .....	68

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: <i>C. albicans</i> . Microscopia da colônia com presença de hifas e leveduras identificadas pelas setas (400x)..	17
Figura 2.2: Esquema representativo da invasão tecidual por <i>C. albicans</i> .	19
Figura 2.3: Mecanismo de ação dos antifúngicos.	21
Figura 2.4: Estrutura química da caspofungina.	24
Figura 5.1: Esquema do protocolo de tratamento com caspofungina 5 ou 10 mg/kg ou veículo em camundongos Swiss fêmeas.	36
Figura 5.2: Percentual da sobrevivência (A) e peso corporal (B) de camundongos infectados com <i>C. albicans</i> após o tratamento IP com veículo, caspofungina 5 ou 10 mg/kg.	453
Figura 5.3: Microplaca de 96 poços da avaliação <i>in vitro</i> da eficácia da caspofungina.	475
Figura 6.1: Protocolos experimentais de tratamento com a caspofungina e obtenção do sinal de ECG (DII) para a avaliação da cardiotoxicidade <i>in vivo</i> .	51
Figura 6.2: Protocolo experimental para avaliação da atividade cardíaca da ciclofosfamida.	52
Figura 6.3: Sinal de ECG DII de camundongo consciente indicando os intervalos	553
Figura 6.4: Sensor de telemetria. (DSI)	553
Figura 6.5: Parâmetros do ECG (média $\pm$ e.p.m. dos valores absolutos) antes (basal) e após tratamento em dose única com caspofungina ou veículo.	57
Figura 6.6: Registro do ECG por telemetria de animais tratados com veículo (A) caspofungina (B).	58
Figura 6.7. Variação dos valores absolutos dos parâmetros da VFC obtidos por amostragem de registros do ECG por telemetria em 24 horas.	67

## RESUMO

A caspofungina é um fármaco antifúngico relativamente seguro utilizado para tratar candidíase invasiva. Entretanto, a cardiotoxicidade desse fármaco foi relatada em humanos e modelos experimentais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia experimental *in vivo* da caspofungina sobre a *Candida albicans* e avaliar sua segurança terapêutica sobre o sistema cardiovascular em camundongos Swiss fêmeas não infectados e infectados por *Candida albicans* através da análise do eletrocardiograma (ECG). Os animais foram infectados utilizando a imunossupressão prévia com ciclofosfamida (100 mg/kg) e administração IV do inóculo de *Candida albicans* (SC5314) (1 a  $5 \times 10^5$  UFC/ml). O tratamento com veículo ou caspofungina (5 ou 10 mg/kg) por 5 dias IP foi iniciado 24 horas após a infecção confirmada pela presença de unidades formadoras de colônia (UFC) de *C. albicans* em amostras de coração, rim, baço ou fígado. A sobrevivência foi significativamente aumentada com o tratamento com caspofungina 5 ou 10 mg/kg IP e todos os camundongos infectados tratados apenas com o veículo vieram a óbito. A dose de 10 mg/kg de caspofungina inibiu o crescimento de UFC. A susceptibilidade *in vitro* de *C. albicans* foi realizada utilizando a técnica de microdiluição em caldo com concentrações cerscentes de caspofungina, sendo a concentração inibitória mínima de caspofungina para *C. albicans* de 0,3 µg/ml, indicando que o fungo é sensível ao fármaco. O sinal do ECG na derivação II (DII) foi obtido em camundongos conscientes em contenção: para mensurar os intervalos do ECG. O ECG por telemetria foi obtido nos animais não infectados tratados com caspofungina 10 mg/kg durante 5 dias IP para avaliar os parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) nos tempos: basal, e após tratamento. A caspofungina induziu aumento significativo dos intervalos PR (18,5%) e QRS (26,6%) em comparação ao basal. Os intervalos QT (20,2 e 23,9%) e QTc (16,3 e 27,2%) aumentaram após tratamento com veículo e com caspofungina indicando que a infecção por *C. albicans* induziu essas alterações. No entanto, a caspofungina não induziu ao aumento adicional dos intervalos QT e QTc nem impediu o aumento induzido pela *C. albicans*. Não ocorreram alterações significativas nos parâmetros de VFC de animais não infectados após o tratamento com caspofungina. Concluímos que a caspofungina pode ser considerada um fármaco seguro, em relação aos seus efeitos cardíacos avaliados *in vivo* no presente estudo, mantendo sua eficácia antifúngica contra *C. albicans*.

**Palavras-chave:** *Candida*; caspofungina; eficácia; cardiotoxicidade.

## ABSTRACT

Caspofungin is a relatively safe antifungal drug used to treat invasive candidiasis. However, the cardiotoxicity of this drug has been reported in humans and experimental models. The aim of this study was to evaluate the *in vivo* experimental efficacy of caspofungin on *Candida albicans* and to evaluate its therapeutic safety on the cardiovascular system in uninfected and *Candida albicans* infected female Swiss mice by electrocardiogram (ECG) analysis. The animals were previously immunosuppressed with cyclophosphamide (100 mg/kg) and IV administration of the *Candida albicans* (SC5314) inoculum (1 a  $5 \times 10^5$  CFU/ml). Treatment with or caspofungin (5 or 10 mg/kg) for 5 days IP started 24 hours after infection. Infection was confirmed by the presence of *C. albicans* colony forming unit (CFU) in heart, kidney, spleen or liver. Survival was significantly increased with treatment with caspofungin 5 or 10 mg/kg IP and all infected mice treated with vehicle died. None of the surviving infected mice had CFU after treatment with 10 mg/kg. *In vitro* susceptibility of *C. albicans* was performed using the broth microdilution technique with caspofungin concentrations, with the minimum inhibitory caspofungin concentration for *C. albicans* was 0,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , indicating that the fungus is sensitive to the drug. The ECG signal in lead II (DII) was obtained from conscious mice in restraint: to measure the ECG intervals. Telemetry ECG was obtained from uninfected animals treated with caspofungin 10 mg/kg for 5 days IP to evaluate heart rate variability (HRV) parameters at baseline and after treatment. Caspofungin administration induced a significant increase in PR (18.5%) and QRS (26.6%) compared to baseline. For QT (20.2 and 23.9%) and QTc (16.3 and 27.2%) intervals increased after treatment with vehicle and caspofungin, indicating that infection by *C. albicans* induced these changes. However, caspofungin did not induce a significant additional increase in QT and QTc intervals nor did it prevent the increase induced by *C. albicans* infection. There were no significant changes in HRV parameters in uninfected animals after caspofungin treatment. We concluded that caspofungin can be considered a safe drug in relation to its cardiac effects evaluated *in vivo* in the present study, maintaining its antifungal efficacy against *C. albicans*.

**Keywords:** *Candida*; caspofungin, efficacy; cardiotoxicity.

## 1- Introdução

Nas últimas décadas, as infecções fúngicas aumentaram significativamente em diferentes ecossistemas (Fisher *et al.*, 2012). Entre os fungos de interesse médico, as leveduras do gênero *Candida* são de extrema importância, devido à alta frequência de colonização e infecção em seres humanos no Brasil (Costa *et al.*, 2000; Antunes *et al.*, 2004; Colombo *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2007) e no mundo (Wisplinghoff *et al.*, 2004; Sofair *et al.*, 2006; Leroy *et al.*, 2009; McCarty e Pappas, 2016).

É importante considerar que a infecção por espécies de *Candida spp* apresenta alta incidência (Colombo *et al.*, 2007), são os mais comuns como causa de infecções fúngicas invasivas e são responsáveis por relevante proporção de infecções nosocomiais (Meyer *et al.*, 2013). Essa situação ocorre principalmente em pacientes neutropênicos (Wisplinghoff *et al.*, 2004), imunocomprometidos, em longos períodos de internação (Pappas *et al.*, 2018) doenças crônicas como diabetes, e transplantes (Colombo *et al.*, 2007; Sipsas *et al.*, 2009; Spiliopoulou *et al.*, 2012).

A candidíase sistêmica é a forma mais grave da infecção por *C. albicans* e pode estar relacionada à complicações devido a procedimentos pós-operatórios ou de forma isolada, como endocardite (Badiie *et al.*, 2014), endoftalmite (Godoy *et al.*, 2004; Blázquez, 2006) que ocorrem dependendo das condições do hospedeiro. A presença do fungo no sistema nervoso central (SNC) em pacientes com septicemia por *Candida* que evoluem a óbito apresentam lesões fúngicas no SNC em até 20 % dos casos (Jong *et al.*, 2001; Jong *et al.*, 2003). A peritonite secundária à infecção por *Candida* é comumente observada em centros cirúrgicos e unidade de terapia intensiva (UTI) sendo o índice de mortalidade de aproximadamente 25 %, sobretudo em pacientes com longos tratamentos e ventilação artificial (Till *et al.*, 2008). A candidíase hepatoesplênica é uma forma da infecção associada à neutropenia prolongada e está relacionada ao uso de cateteres e administração de antibióticos de amplo espectro (Larregina *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2007).

A terapia de escolha para tratamento da candidíase sistêmica inclui a anfotericina B, triazóis, e mais recentemente, as equinocandinas (Thursky *et al.*, 2008). A resistência da *Candida spp* aos antifúngicos de primeira escolha, como fluconazol (Marr *et al.*, 1997; Nucci e Colombo, 2002; Martinez, 2006; Xiang *et al.*, 2013), toxicidade da anfotericina (Moysakakis *et al.*, 2005; Berdichevski *et al.*, 2006) e itraconazol (Lestner *et al.*, 2009) são alguns fatores sugestivos da necessidade de novos fármacos no tratamento de infecções fúngicas.



As equinocandinas são antifúngicos com atividade estabelecida contra espécies dos gêneros *Candida* e *Aspergillus*, incluindo amostras resistentes ao fluconazol e anfotericina B. São substâncias semi-sintéticas derivadas da fermentação do fungo *Glarea lozoyensis* (ver revisão de Balkovec *et al.*, 2014), apresentando em sua estrutura uma cadeia lateral lipofílica que interage com o fosfolípido da bicamada da membrana da célula fúngica, inibindo a síntese da membrana (Deresinski e Stevens, 2003). O acetato de caspofungina (Cancidas®) foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratar candidíase oral e esofágica, candidíase invasiva e aspergilose, e também na terapia empírica de infecções graves (ver revisão de Balkovec *et al.*, 2014).

A segurança e eficácia da caspofungina foram demonstradas em estudos *in vitro* contra espécies de *Candida* (Bartizal *et al.*, 1997; Pfaller *et al.*, 2008), estudos pré-clínicos em camundongos (Abruzzo *et al.*, 1997) e em estudo clínico de fase II/III (Sable *et al.*, 2002). No entanto, alguns efeitos adversos foram relatados em estudo de fase II como febre, hipocalemia, flebite (ver revisão de Balkovec *et al.*, 2014), hepatotoxicidade (Kyriakidis *et al.*, 2017) e mais recente, a cardiotoxicidade. A administração de caspofungina provocou redução na contratilidade do ventrículo esquerdo, em coração de ratos, provavelmente por alterações na função oxidativa mitocondrial (Stover *et al.*, 2014) e em cardiomiócitos isolados de ratos, reduziu significativamente a contratilidade (Arens *et al.*, 2014). Em estudos *in vivo*, a infusão de caspofungina por via venosa central em ratos anestesiados induziu redução do débito cardíaco (Stover e Cleary, 2015), da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, da pressão arterial (PA), do volume sistólico, volume diastólico final do ventrículo esquerdo e frequência cardíaca (FC) (Koch *et al.*, 2015a). De acordo com revisão de Patil e Majumdar (2017), as equinocandinas apresentam melhor custo-benefício e são bastante favoráveis no manejo de infecções sistêmicas invasivas por fungos quando comparadas à anfotericina B ou triazóis.

A avaliação detalhada da potencial cardiotoxicidade e da análise da segurança cardiovascular de fármacos é uma necessidade, sendo a avaliação dos efeitos cardíacos *in vivo* uma forte recomendação para o desenvolvimento de medicamentos e o acompanhamento de seu uso pós-comercialização (Enoch *et al.*, 2017). O eletrocardiograma (ECG) é uma ferramenta robusta e não-invasiva usada para a obtenção de parâmetros biomarcadores da cardiotoxicidade pela medição de seus intervalos (Cavero e Crumb, 2005) ou pela detecção de alterações da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (Champeroux *et al.*, 2015). Dessa forma, primeiramente avaliamos a dose *in vivo* mais eficaz de caspofungina para tratar camundongos com infecção sistêmica por *C. albicans*. Em seguida, utilizamos a dose mais

eficaz para avaliar os efeitos da caspofungina sobre os intervalos do ECG e nos índices da VFC no domínio do tempo e para descrever melhor sua segurança cardíaca.

## 2- Revisão da literatura

### 2.1. *Candida ssp*

O gênero *Candida* compreende cerca de 200 espécies e é o principal gênero entre as leveduras patogênicas (Lacaz *et al.*, 1991), pelo menos 15 espécies são responsáveis por causar infecções no homem (ver revisão Pfaller e Diekema, 2007). A espécie *C. albicans* é pleomórfico e se apresenta de duas formas: leveduriformes (blastocônídios) no estado saprofítico, associado à colonização assintomática, e filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), observadas em processos patogênicos (Soll, 2014). Além disso, sob condições de crescimento subótimas, pode ocorrer a formação de clamidósporos (esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular) (figura 2.1). Dessa forma, o fungo tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos (Lacaz *et al.*, 1991).

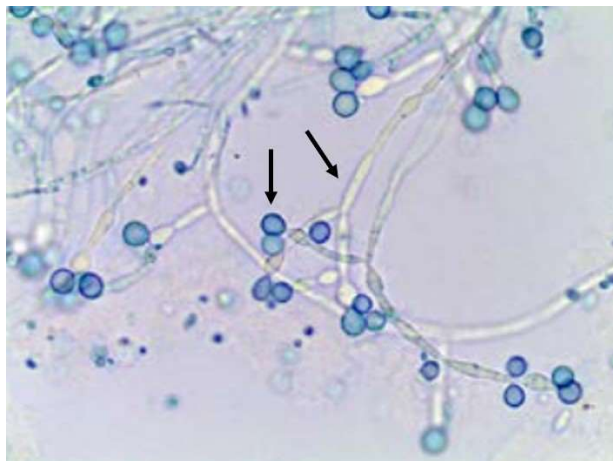


Figura 2.1: *C. albicans*. Microscopia da colônia com presença de hifas e leveduras identificadas pelas setas (400x). Fonte: Oliveira, 2014.

A candidíase é uma infecção fúngica ocasionada pela presença de leveduras do gênero *Candida*, destacando-se a *C. albicans*, como agente principal (Kivaria e Noordhuizen, 2007; Pfaller e Diekema, 2012). Outras espécies não-albicans como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* e *C. guilliermondii* também estão emergindo como importantes patógenos destas infecções fúngicas oportunistas (Chaves *et al.*, 2003; Qi, Hu e Zhou, 2005; Pfaller e Diekema, 2012). Algumas *Candida spp.*, como *C. haemulonii* e *C. auris*, têm causado preocupação, embora menos frequentemente isolados, mostraram alta patogenicidade e resistência a múltiplos fármacos (Ben-Ami *et al.*, 2017).

A *C. albicans* é caracterizada microbiologicamente por colônia úmida, cremosa e odor específico, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada em meio de cultura ágar Sabouraud. Com relação ao aspecto morfológico, as células leveduriformes são de formato esférico, ovoide ou alongado e apresentam-se como Gram-positivas. As condições ótimas para seu crescimento são temperaturas entre 20° C a 38° C e pH entre 2,5 a 7,5 (Murray *et al.*, 2017, 8. ed.). A *C. albicans* é uma levedura que reside inofensivamente como comensal em humanos saudáveis (ver revisão Kullberg e Arendrup, 2015). No homem é encontrada na mucosa bucal, trato gastrointestinal e urogenital, e pele em 30 a 80 % dos indivíduos. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30 % são colonizadas também na vagina (Perlroth *et al.*, 2007). Em circunstâncias normais não causa doenças, mantido sob controle pelo nosso sistema imunológico e pela microbiota bacteriana protetora no intestino e outras superfícies mucosas (Sudbery, 2011); (Brown *et al.*, 2012; Erwig e Gow, 2016).

Em circunstâncias excepcionais, pode ocorrer ruptura do equilíbrio biológico, e fatores relacionados à *Candida*, intrínsecos (regulação gênica dos fungos, morfologia celular, adaptação, carga fúngica) e extrínsecos (microbiota competitiva, dieta, estado imunológico do hospedeiro) afetam a colonização em outros locais do corpo (ver revisão Dantas *et al.*, 2016). A permanência do fungo como comensal deve-se a fatores como, pele intacta, protegida por células queratinizadas; superfície mucosa; presença de mucinas e de IgA (Senet, 1997). Na ausência de uma resposta imunológica adequada (ver revisão Dantas *et al.*, 2016), a incapacidade de controlar a colonização de *C. albicans* em mucosas superficiais pode ocasionar as candidíases (Wang *et al.*, 2014). Por esse motivo são consideradas infecções oportunistas, e clinicamente, a candidíase pode ser cutânea, mucosa, cutaneomucosa ou invasiva. A figura 2.2 representa como ocorre a invasão dos tecidos por estes microrganismos, ocasionando a candidíase invasiva ou sistêmica. A levedura se adere ao epitélio, ocorre a penetração epitelial e invasão por hifas, seguida da disseminação vascular, que envolve penetração de hifas nos vasos sanguíneos, dispersão de células de levedura para a corrente sanguínea e a colonização e penetração endotelial durante a disseminação da doença (Saville *et al.*, 2003; Wächtler *et al.*, 2011).

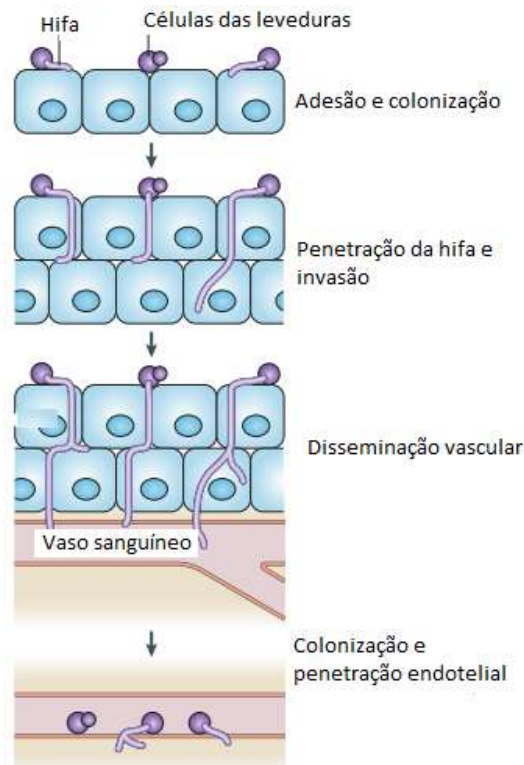


Figura 2.2: Esquema representativo da invasão tecidual por *C. albicans*. Fonte: (Gow et al., 2012).

É importante entender os mecanismos de defesa envolvidos na infecção por *Candida* para planejar estratégias de prevenção, controle e tratamento dessas infecções. A imunidade inata e adaptativa estão envolvidas na proteção contra a infecção por *C. albicans*, sendo a imunidade inata, por meio de macrófagos e neutrófilos, os principais mecanismos de defesa contra candidíase invasiva disseminada (Costa *et al.*, 2008; Garth e Steele, 2017). Para a resposta antipatogênica dos neutrófilos polimorfonucleares são essenciais a ação fagocítica, geração de espécies reativas de oxigênio (Prüfer *et al.*, 2014) e mecanismos não oxidativos como lisozima, enzima antimicrobiana encontrada nos grânulos e lisossomos de granulócitos, capazes de matar os fungos ou restringir seu crescimento (Lopera *et al.*, 2008). Os efeitos da lisozima nos fungos não são claros, mas podem envolver hidrólise enzimática da parede celular fúngica e/ou lesão na membrana celular (Marquis *et al.*, 1982).

A candidíase invasiva normalmente está associada à imunossupressão após transplante, complicações infecciosas em pacientes graves de UTI (Vincent *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014) portadores de doenças degenerativas, utilização de agentes antifúngicos na profilaxia ou imunossupressão mais grave (Giolo e Svidzinski, 2010), pacientes com câncer, infecção pelo vírus causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (Pappas *et al.*, 2003). Além

disso, a *Candida* pode ser diretamente introduzida no sangue por acessos intravenosos, cateteres, diálise peritoneal, cirurgia cardíaca ou abuso de drogas intravenosas (Pagano *et al.*, 2006; Marriott *et al.*, 2009; Zilberberg e Shorr, 2009).

No Brasil, estudo conduzido nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil observou incidência de candidíase de 2,49 casos por 1.000 admissões hospitalares, taxa muito superior às registradas em instituições dos EUA e Europa (Colombo *et al.*, 2006). Isso deixa claro que a infecção por *Candida spp.* é problema de saúde pública. Devido à alta mortalidade (Pfaller e Diekema, 2007; Hassan *et al.*, 2009), associada ao aumento do tempo de internação hospitalar e aos altos custos hospitalares (Olaechea *et al.*, 2004; Falagas *et al.*, 2010), a candidíase invasiva é uma preocupação importante especialmente em pacientes acometidos por comorbidades subjacentes (Lepak e Andes, 2011).

## 2.2. Tratamento farmacológico da candidíase

Em consequência da similaridade bioquímica e fisiológica existente entre as células fúngicas e humanas, o arsenal terapêutico disponível para tratamento da candidíase torna-se bastante limitado. Existe a necessidade de novos fungicidas, com amplo espectro de ação, menos efeitos colaterais e que possam ser administrados tanto por via oral quanto parenteral. As classes de antifúngicos diferem quanto ao perfil farmacocinético, mecanismo de ação, espectro e toxicidade. Atualmente, há 4 classes de antifúngicos, polienos (anfotericina B e formulações), triazóis (fluconazol e voriconazol), flucitosina e equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina), aprovados pelo FDA para tratamento da candidíase invasiva (Pappas *et al.*, 2016). No Brasil, os antifúngicos usados na terapêutica da candidíase invasiva que constam na relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME) estão o fluconazol e a anfotericina B e formulações.

Os antifúngicos atuam em diversos alvos, sendo principalmente inibição da síntese da membrana plasmática e da síntese proteica. A flucitosina é uma pirimidina sintética fluorada que se incorpora ao longo do RNA e inibe a síntese proteica, além de interferir na síntese do DNA do fungo; a anfotericina B liga-se ao ergosterol, esteroide presente na membrana de fungos, alterando a permeabilidade desta e causando a perda de constituintes citoplasmáticos; os azólicos atuam bloqueando a demetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol, o que altera a permeabilidade da membrana e a viabilidade fúngica; as equinocandinas atuam por inibição da  $\beta$ -1,3-glucano sintase, enzima responsável pela produção da parede celular fúngica. A

glucana é um dos principais componentes da parede celular fúngica. As equinocandinas destroem a integridade da parede celular, o que leva a um desequilíbrio osmótico e, conseqüentemente, lise celular (figura 2.3).

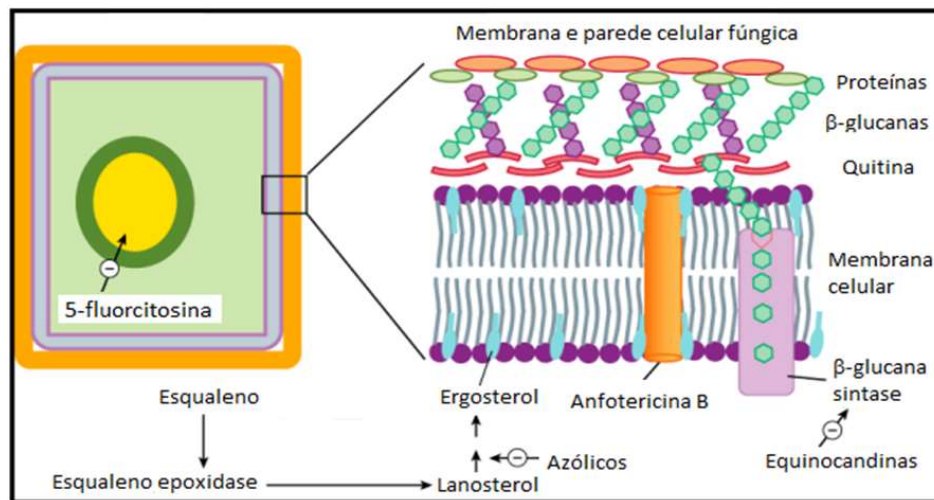


Figura 2.3: Mecanismo de ação dos antifúngicos. Fonte: Adaptado de Odds *et al.*, 2003

A anfotericina B, um polieno utilizado na forma de desoxicolato ou em formulações lipídicas (anfotericina B lipossomal, complexo lipídico anfotericina B) é potente contra a maioria das espécies de *Candida*, tem sido considerada o “padrão ouro” para o tratamento de infecções fúngicas, mas sua toxicidade limita seu uso (Berdichevski *et al.*, 2006). Efeitos cardiotóxicos foram relatados com uso da anfotericina B (Moysakis *et al.*, 2005), incluindo efeito cronotrópico negativo e condutância anormal (Butler *et al.*, 1964; Cleary *et al.*, 1993) e arritmias em pacientes com doença cardíaca prévia (Bowler *et al.*, 1992) e miocardiopatia congestiva (Danaher *et al.*, 2004).

O fluconazol e voriconazol são ativos contra a maioria das espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A resistência ao fluconazol por parte de algumas espécies, *C. albicans* (Xiang *et al.*, 2013), *C. krusei* (Lamping *et al.*, 2009), *C. glabrata* (Vermitsky e Edlind, 2004), têm surgido crescentemente e por isso, as diretrizes (Colombo *et al.*, 2013; Pappas *et al.*, 2016) recomendam as equinocandinas como agentes de primeira linha para infecções invasivas de moderada a grave. Por outro lado, o fluconazol tem a maior penetração no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Thaler *et al.*, 1995) e vítreo (Tod *et al.*, 1997), sendo frequentemente usado no tratamento de infecções do SNC e intra-oculares por *Candida*. O voriconazol tem um espectro de ação mais amplo do que o fluconazol, e é ativo contra espécies de *Candida* que incluem *C. glabrata* e *C. krusei*, porém, a maior interação

medicamentosa e baixa tolerância em comparação a outros antifúngicos sistêmicos, torna o voriconazol uma opção menos atrativa (Pappas *et al.*, 2016).

A flucitosina tem espectro de ação restrito e é usada clinicamente somente contra *Candida spp.*, tratamento da candidíase grave (Utz, 1972). A flucitosina é normalmente administrada em combinação com outro agente antifúngico devido à resistência durante a monoterapia (Barchiesi *et al.*, 2000). O uso mais comum da flucitosina em infecção por *Candida* é combinado à anfotericina B para pacientes com infecções mais refratárias, como endocardite por *Candida* ou endoftalmite. Ocasionalmente, pode ser usada para o tratamento da candidíase do trato urinário por *C. glabrata* resistente ao fluconazol (Fisher *et al.*, 2011).

As equinocandinas, anidulafungina, caspofungina e micafungina foram aprovados pelo FDA para tratamento da candidíase invasiva (Pappas *et al.*, 2003; Cornely *et al.*, 2012). A caspofungina (Cancidas®) foi aprovada para uso em 2001, micafungina (Mycamine®) em 2005 e anidulafungina (Eraxis®) em 2006. No Brasil, os registros na ANVISA são dos anos da década de 2010 e hospitais incluíram na lista de antifúngicos de uso sistêmico (Protocolos Clínicos - FHEMIG, 2013).

Equinocandinas são uma classe de antifúngicos lipopeptídeos cíclicos semi-sintéticos, produzidos a partir de modificações químicas de produtos extraídos de fungos: caspofungina é produzida a partir da pneumocandina B<sub>0</sub>, um produto isolado da fermentação de fungos *Glarea lozoyentis* (Bouffard *et al.*, 1994); micafungina é produzida a partir do hexapeptídeo FR901379, antibiótico produzido pelo microrganismo *Coleophoma empedra* (Tomishima *et al.*, 1999); e, anidulafungina é produzida a partir de equinocandina B, antibiótico produzido por *Aspergillus nidulans* (Hodges *et al.*, 1994). Os fármacos da classe das equinocandinas possuem semelhança estrutural e compartilham o mesmo mecanismo de ação.

O mecanismo de ação das equinocandinas sobre os fungos ocorre por inibição da  $\beta$ -1,3-glucano sintase, enzima responsável pela produção da parede celular fúngica (Deresinski e Stevens, 2003). As equinocandinas destroem a integridade da parede celular, o que leva a um desequilíbrio osmótico e, conseqüentemente, lise celular (ver revisão Denning, 2003; Andes, 2006; Pappas *et al.*, 2016). A parede celular dos fungos contém hidratos de carbono e proteínas que não estão presentes em células eucariotas, sendo, portanto, alvo ideal para os agentes antifúngicos, garantindo a eficácia e melhorando a segurança terapêutica (Netea *et al.*, 2008). Cerca de 80 % da parede celular dos fungos é formada por polissacarídeos, com destaque para



os polímeros ramificados de glicose com ligações do tipo  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 ( $\beta$ -glucanas) (ver revisão Chaffin, 2008). Esses medicamentos possuem ação fungicida para espécies de *Candida* e fungistáticas para espécies de *Aspergillus* (Lalitha *et al.*, 2007; Sucher *et al.*, 2009), sendo a *C. albicans* bastante sensível (Bachmann *et al.*, 2002) e existem poucos relatos sobre resistência às equinocandinas (Ben-Ami *et al.*, 2011). As equinocandinas tem uso no tratamento de candidíase e aspergilose invasivas em pacientes neutropênicos ou não e esse uso tem sido especialmente importante em infecções resistentes aos azólicos (Walsh *et al.*, 2008; Pappas *et al.*, 2016).

As equinocandinas estão disponíveis em preparações parenterais, são degradadas lentamente no fígado, meia-vida de 8 a 13 horas e seu metabolismo, não oxidativos, independente do sistema enzimático citocromo P-450 (ver revisão Denning, 2003). Não há formação de metabólitos ativos, e os metabólitos formados são excretados pelas fezes e urina, sendo mínima (1-2%) a excreção renal do fármaco ativo (Deresinski e Stevens, 2003; (Maschmeyer e Glasmacher, 2005). As equinocandinas atingem concentrações terapêuticas em todos os locais da infecção, exceto no cérebro, líquido cefalorraquidiano, próstata e olhos (Felton *et al.*, 2014) devido aos altos pesos moleculares.

A caspofungina (figura 2.3) foi a primeira equinocandina de uso clínico aprovado pelo FDA (2001), inicialmente para aspergilose invasiva, posteriormente, para candidíase esofágica e invasiva e, finalmente, como terapia empírica em infecções fúngicas (Ascioglu e Chan, 2014). Isso provocou a redução na utilização de agentes antifúngicos mais antigos e o aumento do uso da caspofungina (Ascioglu e Chan, 2014). A caspofungina foi disponibilizada nos Estados Unidos e Europa (FDA, 2001), como Cancidas® e Caspofungina MSD® (Merck, New Jersey, USA), respectivamente (Deresinski e Stevens, 2003).

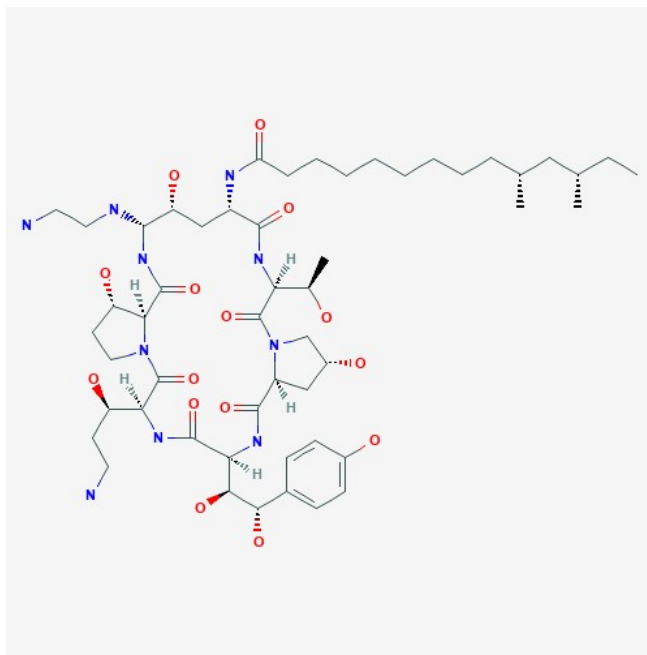


Figura 2.4: Estrutura química da caspofungina. Fonte: LactMed, Caspofungin, 2006.

A caspofungina, assim como todos os fármacos da classe das equinocandinas é administrada por via parenteral, pois possui baixa disponibilidade oral. Possui farmacocinética linear através de administrações intravenosas e é metabolizada principalmente pelo fígado através de reações de hidrólise e acetilação de forma espontânea. Por não sofrer metabolismo oxidativo pelo complexo citocromo P450, tem baixa interferência com outros medicamentos metabolizados no fígado. Sua eliminação ocorre de forma gradativa ao longo do tempo, sendo eliminada principalmente pela bile (Colombo *et al.*, 2013).

Além de sua alta eficácia, baixa toxicidade, menor susceptibilidade à resistência em comparação com os outros antifúngicos (Ben-Ami *et al.*, 2011), a caspofungina apresenta menor número de interações medicamentosas quando comparadas aos azólicos e à anfotericina B (Deresinski e Stevens, 2003; McCormack e Perry, 2005; Chandrasekar e Sobel, 2006; Eschenauer *et al.*, 2007).

A caspofungina possui, em geral, um perfil de tolerabilidade comparável ao fluconazol (Villanueva *et al.*, 2002; de Wet *et al.*, 2004; Krause *et al.*, 2004) e melhor que o da anfotericina B (Walsh *et al.*, 2004; McCormack e Perry, 2005; Kuse *et al.*, 2007). Porém, foram relatados, frequentemente, alteração das transaminases hepáticas (Keating e Figgitt, 2003; Vazquez, 2005) e reações relacionadas à hipersensibilidade à infusão (rubor facial, inchaço, erupção cutânea, prurido e febre) (Patil e Majumdar, 2017).

Na avaliação *in vitro* da caspofungina contra isolados de *Candida* e a concentração inibitória mínima (CIM) foi de 0,007-2,00 µg/ml (Pfaller *et al.*, 2006), valores em concordância com estudo clínico (Kartsonis *et al.*, 2005). A caspofungina demonstrou excelente atividade antifúngica contra a maioria dos isolados clínicos de *Candida*, como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. pelliculosa*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (Pfaller *et al.*, 2008; Eksi *et al.*, 2013).

*In vivo*, a caspofungina exibe atividade fungicida contra *C. albicans*, *C. glabrata* (Andes *et al.*, 2010), *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* (Spreghini *et al.*, 2012) e *C. parapsilosis* (Andes *et al.*, 2010; Spreghini *et al.*, 2012) e *Aspergillus* (Maertens *et al.*, 2004; Benjamin *et al.*, 2006; Groll *et al.*, 2006).

Villanueva *et al.*, (2001) avaliaram a eficácia, segurança e tolerância da caspofungina em comparação com a anfotericina B em casos clínicos de esofagite por *Candida* e foi observado que doses de caspofungina de 50 mg/dia e 70 mg /dia mostraram taxas de sucesso clínico de 74 e 89 %, respectivamente. Já a anfotericina B (0,5 mg/kg/dia), mostrou 63 % de sucesso clínico. Além disso, a anfotericina B foi interrompida em 24 % dos pacientes devido a efeitos adversos, enquanto que no grupo da caspofungina foi de 4 e 7 %, (50 e 70 mg /dia), respectivamente. Mora-Duarte *et al.*, (2002) compararam a caspofungina com a anfotericina B no tratamento da candidíase invasiva em humanos, concluindo que ambas são igualmente eficazes, porém a caspofungina mostrou-se menos tóxica. Já Villanueva *et al.*, (2002) compararam a eficácia da caspofungina (50 mg) e fluconazol (200 mg) em pacientes infectados pelo vírus da síndrome da imunodeficiência humana (SIDA), a taxa de sucesso terapêutico para caspofungina e fluconazol foi de 81 e 85 %, respectivamente, sem interações medicamentosas e efeitos adversos relatados. Outros estudos clínicos demonstraram sucesso terapêutico da caspofungina semelhante à anfotericina B convencional (Mora-Duarte *et al.*, 2002; Arathoon *et al.*, 2002) anfotericina B lipossomal (Wang *et al.*, 2015), e micafungina (Kohno *et al.*, 2013).

A caspofungina avaliada em ensaios clínicos prospectivos demonstrou ser eficaz e bem tolerada no tratamento tanto de candidíase mucosa (Villanueva *et al.*, 2001; Villanueva *et al.*, 2002; Arathoon *et al.*, 2002) quanto invasiva (Mora-Duarte *et al.*, 2002; Cornely *et al.*, 2007; Betts *et al.*, 2009), com baixa extensão de eventos adversos (Comisar *et al.*, 2014) e segura mesmo em doses elevadas (150 mg/dia) (Betts *et al.*, 2009). A caspofungina é uma ótima alternativa terapêutica nos casos de candidíase invasiva em recém-nascidos de baixo peso em situação de risco de vida (Lopes *et al.*, 2010) e mostrou segurança, tolerabilidade e eficácia na

profilaxia de candidíase invasiva em pacientes pediátricos (Maximova *et al.*, 2017; Tsekoura *et al.*, 2019).

Os efeitos adversos mais comumente observados com o uso da caspofungina abrangem: febre (Mora-Duarte *et al.*, 2002), elevação do nível sérico de fosfatase alcalina e elevação do nível sérico de creatinina (Villanueva *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2004), edema periférico (Villanueva *et al.*, 2001) e hipocalemia (Mora-Duarte *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2004; Testoni *et al.*, 2012). Todos esses efeitos foram observados em uma intensidade menor e em menos pacientes quando comparado aos demais antifúngicos. Também foram observadas após administração de caspofungina reações relacionadas à hipersensibilidade à infusão (rubor facial, inchaço, erupção cutânea, prurido e febre) (Patil e Majumdar, 2017). Essas reações parecem ser mediadas por liberação de histamina secundária à caspofungina (Cleary *et al.*, 1993). Recentemente, foi observado que a caspofungina *in vitro* altera as funções efetoras de neutrófilos polimorfonucleares. O tratamento com caspofungina prejudica a degranulação dos neutrófilos e a produção de espécies reativas de oxigênio, e aumenta a fagocitose (Ries *et al.*, 2019). Anteriormente, *in vivo*, já havia sido observado um efeito imunomodulador da caspofungina, induzindo uma resposta inflamatória (Moretti *et al.*, 2012).

A cardiotoxicidade é um efeito adverso pouco comum, mas tem sido relatado em alguns estudos, principalmente em pacientes de UTI. Após a administração da caspofungina foi observado hipotensão grave (Fink *et al.*, 2013), redução do débito cardíaco e da frequência cardíaca (Lichtenstern *et al.*, 2013) arritmia cardíaca e morte súbita (FDA, 2013). Esses efeitos cardiotoxícos motivaram mais estudos acerca da segurança terapêutica da caspofungina. A cardiopatia foi relatada quando a caspofungina foi avaliada *ex vivo* em coração de rato, reduzindo a contratilidade do ventrículo esquerdo, relacionada provavelmente por alterações na função oxidativa mitocondrial (Stover *et al.*, 2014). Efeito semelhante foi observado em cardiomiócitos isolados (Arens *et al.*, 2014) com redução da contratilidade. Koch *et al.* (2015), observaram, após administração central de caspofungina, diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, da PA, do volume sistólico, do volume diastólico final do ventrículo esquerdo e da frequência cardíaca. Além disso, o débito cardíaco foi reduzido *in vivo* em ratos anestesiados após infusão de caspofungina 6 mg/kg por via venosa central (Stover e Cleary, 2015). Assim, a descrição da segurança terapêutica sobre o sistema cardiovascular da caspofungina é ainda restrita, e a sua investigação é uma necessidade para contribuir para sua seleção segura e seu uso racional.

### 2.3. Avaliação cardiovascular de fármacos potencialmente cardiotoxicos

A avaliação cardiovascular de fármacos ou de novas formulações farmacêuticas é uma recomendação consolidada nos anos de 1990 e oficializada com maior detalhamento na *International Conference on Harmonisation (ICH) S7A (2000)*, sendo também uma diretriz da *The Safety Pharmacology Society (Authier et al., 2015)*. Estão incluídas nestes guias os experimentos não clínicos *in vitro* e *in vivo*, abordando aspectos da eletrofisiologia cardíaca, avaliação da contratilidade do coração e vasos, parâmetros hemodinâmicos, bioquímicos e imunológicos, assim como características de respostas em doses usuais e doses tóxicas dos fármacos.

O sistema cardiovascular é um dos principais sistemas alvo de toxicidade induzida por fármacos GUENGERICH, sendo um fator limitante dos candidatos a fármacos entrar no mercado. De acordo (FDA, 2005) para que novos fármacos sejam lançados no mercado é preciso que sejam realizados estudos clínicos e não clínicos que avaliem o potencial destas novas substâncias em atrasar a repolarização ventricular.

Considerando o ECG como ferramenta para a avaliação *in vivo*, não invasiva, da função elétrica cardíaca, a avaliação experimental dos intervalos do ECG é preconizada desde 1997 pelo Agência Europeia para Avaliação de Produtos Médicos (EMA) e depois disso vários guias, incluindo do FDA (EUA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, BRASIL) recomendam que estudos experimentais *in vivo* sejam realizados para a determinação do potencial cardiotoxico de novos fármacos.

A análise dos intervalos QT e QTc do ECG são considerados essenciais, pois o prolongamento do intervalo QT do ECG é fator preditor para arritmias cardíacas e para *Torsade de Points (TdP)*, uma taquicardia ventricular polimórfica atípica, que por sua vez pode levar à morte cardíaca súbita, principalmente se associado a flutuações da VFC (Baltesberger *et al.*, 2008; Swaminathan *et al.*, 2011; Cavero *et al.*, 2000; Aggarwal *et al.*, 2011; Moskovitz *et al.*, 2013). O prolongamento do intervalo QT também pode ser utilizado como uma forma de avaliar a repolarização cardíaca (Klimas *et al.*, 2008; Kmecova e Klimas, 2010) e diante disso, a cardioproteção pode ser demonstrada pela redução do prolongamento do intervalo QT ou pela capacidade em evitar o seu prolongamento em condições de hiperatividade cardíaca (Baillard *et al.*, 2000).

A VFC constitui um método para avaliação do prognóstico de doenças cardiovasculares (Watanabe *et al.*, 2013), sendo a sua relação estabelecida na fisiopatologia de doenças cardiovasculares (Kjellgren e Gomes, 1993; Pecyna, 2006; Larosa *et al.*, 2008). A VFC reduzida pode ser um forte preditor de mortalidade cardíaca e/ou arritmias, principalmente na configuração pós-infarto de miocárdio (IM) (Moss *et al.*, 2002).

A toxicidade de fármacos com ação cardiovascular representa muitas vezes uma sobreexpressão do seu efeito farmacológico sobre o coração. No entanto, outros fármacos podem produzir cardiotoxicidade que não está relacionada com o seu uso terapêutico. A cardiotoxicidade relacionada aos medicamentos antifúngicos tem sido amplamente relatada na literatura experimentalmente ou em estudos de fase clínica. As toxicidades relatadas abrangem os componentes das classes terapêuticas mais utilizadas: anfotericina B (Butler *et al.*, 1964; Moyssakis *et al.*, 2005), cetoconazol (Morganroth *et al.*, 1997; (Robert *et al.*, 2007; Boyce *et al.*, 2012), Isavuconazol (Keirns *et al.*, 2017; Mellinshoff *et al.*, 2018), caspofungina (Stover *et al.*, 2014; Arens *et al.*, 2014; Stover e Cleary, 2015; Koch *et al.*, 2016).

### **2.3.1. Eletrocardiograma e Variabilidade da Frequência Cardíaca**

O ECG é um registro obtido através da atividade elétrica do coração, a qual tem origem no nodo sinoatrial (SA) no átrio direito, célula marcapasso, que irá se estender aos átrios, nodo atrioventricular (AV), por conseguinte nos feixes de *His*, nas fibras de *Purkinje* e nos ventrículos, dando origem as ondas do ECG (Farraj *et al.*, 2011). Estas ondas ocorrem de maneira cíclica, onde cada ciclo ou período completo corresponde a um batimento cardíaco.

Existem numerosas formas de utilização do eletrocardiograma de 12 derivações na prática clínica, pois o método é capaz de refletir alterações primárias ou secundárias aos processos do miocárdio, como nos casos de hipertensão arterial, cardiomiopatias, doenças metabólicas e alterações eletrolíticas (Guimarães, 2003). A interpretação do eletrocardiograma depende da análise de um profissional experiente.

O registro do ECG apresenta ondas geradas pela propagação da despolarização nos átrios (onda P) e nos ventrículos (complexo QRS), e pela repolarização ventricular (onda T). A magnitude destas ondas depende do vetor da derivação, portanto da direção e amplitude do vetor elétrico médio (resultante) do coração e da derivação. A duração dos segmentos e intervalos entre as ondas é utilizada para caracterização do ECG em clínica médica. Por exemplo, o intervalo QT (entre o início da onda Q e o término da onda T) corresponde ao tempo

total de atividade elétrica ventricular, do início da despolarização até o término da repolarização ventricular. O segmento ST (que vai do término da onda S ao início da onda T) é o tempo entre o término da propagação da despolarização e o início da onda de repolarização ventricular. Por fim, o segmento TP (do término da onda T ao início da onda P) representa o período de repouso elétrico cardíaco (Guyton and Hall, 2006).

Clinicamente, o sinal de ECG deve ser obtido em pacientes conscientes em repouso ou submetidos a protocolos de hiperativação simpática como no exercício físico. Existem diferentes aplicações para o ECG, como medida preventiva, para autorizar a realização de alguns tipos de atividades que demandam uma alta exigência do coração, para diagnosticar possíveis doenças.

A VFC descreve as influências simpáticas e parassimpáticas em seres humanos e tornou-se uma ferramenta útil em estudos clínicos realizados para adaptar o atendimento ao paciente ("Task Force", 1996) constitui um método não invasivo, pois é obtido do sinal de ECG, utilizado como marcador da atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) (Van Ravenswaaij-Arts *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1994). O SNA é capaz de modular a regulação desses intervalos que refletem a capacidade do coração de se adaptar à estímulos. Por isso, a análise da VFC é importante para a avaliação da atividade do SNA, uma vez que a atividade simpática aumenta a FC, desencadeando intervalos mais curtos de batimento cardíaco e, conseqüente, redução da VFC. Por sua vez a atividade parassimpática reduz a FC, culminando em intervalos maiores de batimentos e o aumento da VFC. As alterações nos padrões da VFC são indicadores de comprometimento da função cardíaca (Ferreira *et al.*, 2010).

A análise da VFC mede alterações nos intervalos R-R entre ciclos cardíacos normais sucessivos ao longo do tempo. Todos os índices no domínio do tempo são baseados em estatísticas descritivas (Thireau *et al.*, 2008) O RR médio e o desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo (SDNN) são variáveis obtidas de registros de longa duração que representam influências autonômicas simpática e parassimpática (Vanderlei *et al.*, 2009). A raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre os intervalos adjacentes em um intervalo de tempo (RMSSD) representa influência autonômica parassimpática, visto que são obtidos através de análises dos intervalos RR adjacentes, já o índice triangular e o TINN avaliam a variabilidade global (Bittencourt *et al.*, 2005).

As diferenças na VFC entre indivíduos treinados e não treinados demonstram que há um significativo aumento nos tempos entre os intervalos R-R, representados pelo SDNN (desvio padrão entre intervalos RR normais sucessivos), NN50 (número de intervalos NN que apresentam diferença de duração superior a 50 ms), pNN50 (proporção da diferença entre intervalos RR normais adjacentes até 50 ms – NN50/n) e RMSNN (raiz média quadrática da diferença entre intervalos NN normais sucessivos) e aumento na variância dos valores de RR médio ("Task Force", 1996).

A VFC pode ser analisada através do sinal de ECG obtido por telemetria (Kramer e Kinter, 2003) de forma fidedigna, pois não sofre a influência da presença do experimentador. A telemetria pode ser utilizada em diferentes modelos e para diferentes objetivos, como por exemplo os mecanismos de doenças cardiovasculares e o uso de avaliação cardiovascular de fármacos.

Assim, considerando a importância da avaliação da segurança cardiovascular do uso de medicamentos pós-comercialização, os efeitos cardiotóxicos descritos anteriormente pela caspofungina, e a escassez de estudos que avaliem os parâmetros de ECG em tratamentos com essa equinocandina, o presente estudo avaliou a atividade cardíaca de animais infectados e não infectados tratados com caspofungina.



### **3- Justificativa**

O surgimento de micoses sistêmicas mais graves (Enoch *et al.*, 2017), a toxicidade dos antifúngicos (Moyssakis *et al.*, 2005; Berdichevski *et al.*, 2006) e o aparecimento de resistência aos antifúngicos (Martinez, 2006; Xiang *et al.*, 2013) leva a busca por fármacos mais eficazes e melhor tolerados, sendo uma estratégia a busca por novos sítios de ação. A caspofungina é uma equinocandina utilizada como alternativa no tratamento de infecções sistêmicas graves por *C. albicans*. As equinocandinas são bem toleradas, no entanto efeitos cardiotoxicos, como hipotensão grave (Fink *et al.*, 2013) e arritmias (FDA, 2013), foram relatados. Considerando ainda, que a própria infecção por este fungo pode induzir a endocardite (Victorio *et al.*, 2017) e provocar redução da VFC, como observado por Fairchild *et al.*, (2009). A infecção IP de ratos por *C. albicans* (SC5314) causou bradicardia e redução da VFC, indicando uma cardiotoxicidade causada pela infecção (Fairchild *et al.*, 2009). Assim, é importante aprofundar na investigação da cardiotoxicidade de fármacos utilizados no tratamento antifúngico, afim de contribuir para o conhecimento da sua segurança terapêutica, e garantir o sucesso do tratamento. No presente projeto será utilizado a análise da VFC a partir do sinaldo ECG obtido na derivação periférica II, em animais conscientes para caracterizar os efeitos da caspofungina em doses eficazes contra a infecção sistêmica por *C. albicans*, em modelo murino.

#### ***4- Objetivo Geral***

Avaliar a eficácia da caspofungina sobre a infecção por *Candida albicans in vivo* e a segurança terapêutica sobre o sistema cardiovascular em camundongos Swiss fêmeas utilizando a análise do eletrocardiograma obtido em animais infectados e não infectados conscientes em contenção manual para a análise dos intervalos e em animais não infectados obtido por telemetria para a análise dos parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca.

## **5- Avaliação da eficácia da caspofungina**

### **5.1. Introdução**

Para avaliação da eficácia da caspofungina no presente estudo, foi desenvolvido e padronizado um modelo de candidíase sistêmica por *C. albicans* em camundongos Swiss fêmeas. Modelos animais de candidíase sistêmica são utilizados para avaliação da eficácia antifúngica (Graybill *et al.*, 1998; Berényi *et al.*, 2014; Domán *et al.*, 2015) em diferentes espécies de modelos animais (Spreghini *et al.*, 2012; Maiolo *et al.*, 2016), utilizando espécies de *Candida* não-*albicans* (González *et al.*, 2001; Spreghini *et al.*, 2012) e com protocolos de tratamento diferentes (Dimopoulou *et al.*, 2014).

A utilização dos testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* tornou-se indispensável devido às resistências detectadas em diferentes fungos (Yang *et al.*, 2005; Magill *et al.*, 2006). O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), publicou o documento M27-A3, para provas de susceptibilidade a antifúngicos em leveduras como método de referência (CLSI, 2008). Esse documento contém técnicas de macro e microdiluição em caldo (MC) para determinar a CIM. No presente estudo, o teste de susceptibilidade *in vitro* para a cepa de *C. albicans* SC5314 foi realizado utilizando a técnica de MC.

### **5.2. Objetivos específicos**

- Padronizar um modelo de infecção sistêmica por *C. albicans* em camundongos Swiss fêmeas.
- Avaliar eficácia do tratamento intraperitoneal com caspofungina nas doses de 5 e 10 mg/kg durante 5 dias.
- Avaliar a susceptibilidade *in vitro* da cepa de *C. albicans* SC5314.

### **5.3. Métodos**

#### **5.3.1. Obtenção e manutenção das cepas de *C. albicans***

Foram utilizadas cepas de *C. albicans* de isolados clínicos, *American Type Culture Collection* (ATCC) 18864 (Persi *et al.*, 1985) e SC5314 (Gillum *et al.*, 1984) adquiridas da coleção do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG).

O ágar Sabouraud Dextrosado (SD) (Kasvi), contendo cloranfenicol 5 % foi utilizado para cultivo e manutenção da cepa de *C. albicans*. O ágar foi solubilizado em água MiliQ purificada pelo sistema Symplicity/System 185 (Milipore® USA). O meio foi preparado conforme orientações do fabricante, esterilizado em autoclave vertical (Prismatec) e mantido a 4° C. As cepas de *C. albicans* foram mantidas por repique a cada 30 dias. O meio de cultura foi incubado a 28° C por 48 horas e em seguida as culturas foram mantidas à temperatura de 2 a 8° C, em geladeira (Eletrolux/Mod 469L), até sua utilização para um novo repique.

### **5.3.2. Padronização da infecção por *C. albicans* em camundongos**

Para a obtenção da infecção *in vivo* por *C. albicans* em camundongos foi necessário tratamento com um fármaco imunossupressor, iniciado previamente à administração do inóculo do fungo, com objetivo de reduzir a resposta imunológica do animal para permitir estabelecimento da infecção como descrito na literatura (Spreghini *et al.*, 2012).

A ciclofosfamida (Genuxal®, Baxter Oncology, Alemanha) é uma mostarda nitrogenada que atua em células com alta atividade mitótica e foi utilizada como agente imunossupressor dos animais. Esta foi solubilizada em água MiliQ purificada pelo sistema Symplicity/System 185 (Milipore® USA) na concentração de 25 mg/ml. A imunossupressão foi produzida pela administração por via intraperitoneal (IP) da ciclofosfamida e avaliada pela contagem global de leucócitos de amostras de sangue dos animais, antes e durante o tratamento. O sangue dos animais foi retirado pela veia caudal na presença do anticoagulante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), diluído em reagente de Turk e analisado em Câmara de Neubauer, por contagem direta em microscópio óptico (Olympus).

Para infecção dos animais, o isolado clínico de *C. albicans* foi primeiramente repicado a partir da cultura mãe 48 horas antes do procedimento de infecção dos animais e cultivado em ágar SD inclinado.

O inóculo para a infecção foi preparado a partir de suspensão das colônias em 5 ml de salina estéril a 0,9 % p/v, padronizada mediante comparação da turbidez com padrão 0,5 da escala de MacFarland em espectrofotômetro Cary 50 Bio (Varian-Austrália) a 530 nm. O resultado da absorbância entre 0,08 a 0,1 equivale de 1 a 5 x 10<sup>6</sup> células/ml (CLSI, 2008). A suspensão de trabalho foi preparada pela diluição 1:10, resultando em concentração de 1 a 5 x 10<sup>5</sup> células/ml. Uma alíquota de 100 µl da suspensão fúngica foi administrada nos animais na veia caudal.

Para a padronização e definição do protocolo de infecção a ser utilizado na avaliação da eficácia da caspofungina foram utilizados sete protocolos com variação da posologia, dose e número de administrações da ciclofosfamida, variação da cepa de *C. albicans* utilizada, da carga fúngica e do dia da administração intravenosa (IV) do inóculo. O protocolo 7 (P7) (tabela 5.1) induziu imunossupressão associada à infecção e morte dos animais até o 6º dia após a infecção, por isso, considerando o tratamento com caspofungina durante 5 dias, esse foi o protocolo utilizado para avaliação da eficácia.

Tabela 5.1: Protocolos experimentais da padronização da imunossupressão associada a infecção por *C. albicans* em camundongos Swiss fêmeas.

Protocolo	ciclofosfamida (IP)	Dia da administração do inóculo*	Cepa e UFC#/ml
P1	50 mg/kg, 2 dias 25 mg/kg, 2 dias	D5	ATCC18864 1 a 5 x 10 <sup>6</sup>
P2	50 mg/kg, 4 dias	D5	ATCC18864 1 a 5 x 10 <sup>6</sup>
P3	50 mg/kg, 2 dias 25 mg/kg, 2 dias	D3	ATCC18864 1 a 5 x 10 <sup>6</sup>
P4	100 mg/kg, 4 dias	D3	ATCC18864 1 a 5 x 10 <sup>6</sup>
P5	100 mg/kg, 4 dias	D3	SC5314 1 a 5 x 10 <sup>6</sup>
P6	100 mg/kg, 4 dias	D3	SC5314 1 a 5 x 10 <sup>4</sup>
P7	100 mg/kg, 4 dias	D3	SC5314 1 a 5 x 10 <sup>5</sup>

\*Após início da imunossupressão. # Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

Assim, para a obtenção da infecção, os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 100 mg/kg/dia por quatro dias consecutivos. No terceiro dia após o início da imunossupressão com ciclofosfamida, os animais receberam por via IV 100 µl da suspensão de *C. albicans* (SC5314) contendo 1 a 5 x 10<sup>5</sup> células/ml (figura 5.1).

A presença da infecção por *C. albicans* nos animais foi avaliada pela contagem de UFC nos tecidos dos principais órgãos acometidos pelo fungo: coração, rins, fígado e baço (Chaves *et al.*, 2004). Para isso, após a infecção os animais foram eutanasiados nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas (n=2 por tempo). Em seguida, o coração, os rins, o fígado e o baço foram retirados, pesados assepticamente e homogeneizados por maceração em 1 ml de solução salina

0,9 % estéril. Foram realizadas diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) e alíquotas de 100  $\mu$ l do homogeneizado foram plaqueadas em ágar SD contendo cloranfenicol a 5 % p/v, incubadas a 37 °C durante 48 horas para quantificação da carga fúngica. Os procedimentos foram realizados em capela de exaustão de fluxo laminar (Veco/Mod FL-12805). As colônias foram quantificadas e o número de UFC/g de tecido foi determinado nos órgãos de cada animal. Os valores de UFC/g representam a média  $\pm$  e.p.m. dos animais que apresentaram crescimento fúngico (os animais com crescimento zero não foram usados).

### 5.3.3. Avaliação da eficácia da caspofungina

O acetato de caspofungina (Sigma Aldrich) foi solubilizado em dimetilacetamida:propilenoglicol 400 (DMA:PEG 400) (Syntec) na proporção 40:60 e no momento da administração foi diluído em salina 0,9 %.

O tratamento antifúngico foi iniciado 24 horas após a infecção por *C. albicans* (figura 5.2), com a administração IP de caspofungina nas doses de 5 (n=10) ou 10 mg/kg (n=11) ou veículo (n=13), uma vez ao dia durante 5 dias consecutivos.

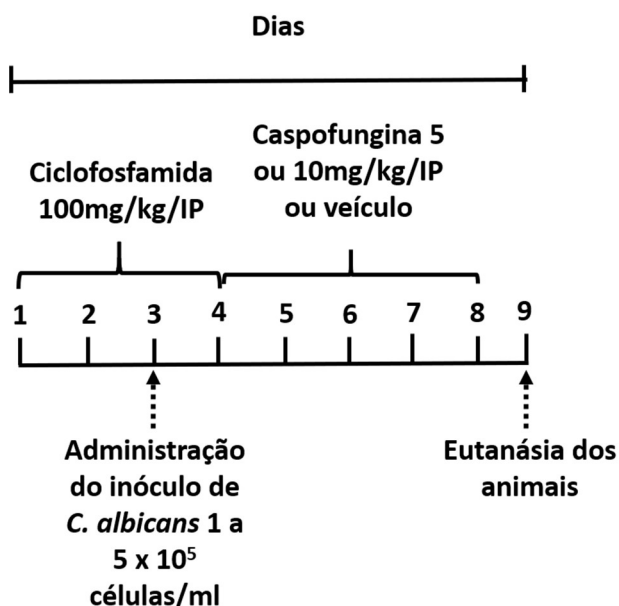


Figura 5.1: Esquema do protocolo de tratamento com caspofungina 5 ou 10 mg/kg ou veículo em camundongos Swiss fêmeas.

Para avaliação da eficácia, os animais foram pesados e monitorados diariamente para avaliar o tempo de sobrevivência. Os animais foram eutanasiados 24 horas após o final do tratamento e tiveram os órgãos removidos e pesados assepticamente e utilizados para a

avaliação *in vitro* da carga fúngica, como descrito no item 5.3.2, no coração, rins, fígado e baço. Os animais moribundos, ou seja, àqueles que estavam muito caquéticos foram eutanasiados para evitar o sofrimento e a morte foi registrada no dia seguinte, sendo assim possível coletar os órgãos do grupo controle.

#### **5.3.4. Análise estatística**

Para análise da carga fúngica foi utilizado o Teste t não-pareado e teste de Mantel-Cox para sobrevivência. Foi utilizado o software GraphPadPrism 6.0 (EUA). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) e foram considerados significativos quando P foi menor ou igual a 0,05 ( $P < 0,05$ ).

#### **5.3.5. Avaliação da susceptibilidade *in vitro* da cepa de *C. albicans* SC5314**

##### ***Preparação do inóculo de *C. albicans****

Para preparação do inóculo foi obtida subcultura da amostra de *C. albicans*, em tubo estéril com ágar SD, incubado a 35° C por 24 horas. A seguir, as colônias foram suspensas em 5 ml de solução salina 0,9 % estéril homogeneizada sob agitação durante 15 segundos. A densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro a fim de se obter transmitância equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland ( $1$  a  $5 \times 10^6$  células/ml), em comprimento de onda de 530 nm. A suspensão de trabalho foi preparada pela diluição 1:50 seguida de uma diluição 1:20 da suspensão padrão com o meio líquido RPMI 1640, resultando em concentração de  $1$  a  $5 \times 10^3$  UFC/ml. O meio de cultura RPMI 1640, tamponado com ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico (MOPS) 0,165 M pH 7,0. O meio foi esterilizado por filtração a vácuo com membrana estéril de celulose branca lisa 0,22  $\mu$ m de poro e mantido a 6° C até o momento do uso.

##### ***Preparação das microplacas***

O teste de MC foi realizado em placas estéreis e descartáveis de 96 poços em triplicata. O esquema de distribuição por cada poço está representado no quadro 5.1. A caspofungina foi diluída em DMA e a partir da solução estoque do fármaco foram preparadas diluições finais para a caspofungina de 0,005; 0,01; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 5,0 e 10,0  $\mu$ g/ml em meio RPMI-1640. Alíquotas de 100  $\mu$ l foram dispensadas sequencialmente, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas e posteriormente foi preenchido com 100  $\mu$ l do inóculo padronizado. Foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente, o fármaco e o inóculo, ambos

apenas na presença do meio RPMI-1640. Para controle de esterilidade foi utilizado 200 µl do meio de cultura e para controle de diluição foi utilizado 100 µl de DMA 0,5 % na presença de 100 µl do inóculo.



Quadro 5.1: Esquema da montagem da microplaca para a avaliação da susceptibilidade *in vitro* da caspofungina.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b> Inóculo (2-11)	Meio	Meio	0,005 µg/ ml	0,01 µg/ ml	0,1 µg/ ml	0,3 µg/ ml	1,0 µg/ ml	3,0 µg/ ml	5,0 µg/ ml	10,0 µg/ ml	Inóculo +DMA 0,5%	
<b>B</b> Inóculo (2-11)	Meio	Meio	0,005 µg/ ml + inóculo	0,01 µg/ ml+ inóculo	0,1 µg/ ml+ inóculo	0,3 µg/ ml+ inóculo	1,0 µg/ ml+ inóculo	3,0 µg/ ml+ Inóculo	5,0 µg/ ml+ inóculo	10,0 µg/ ml+ inóculo	Inóculo +DMA 0,5%	
<b>C</b> Inóculo (2-11)	Meio	Meio + Inóculo	0,005 µg/ ml + inóculo	0,01 µg/ ml+ inóculo	0,1 µg/ ml+ inóculo	0,3 µg/ ml+ inóculo	1,0 µg/ ml+ inóculo	3,0 µg/ ml+ Inóculo	5,0 µg/ ml+ inóculo	10,0 µg/ ml+ inóculo	Inóculo +DMA 0,5%	
<b>D</b>												
<b>E</b>			0,005 µg/ ml+ meio	0,01 µg/ ml+ meio	0,1 µg/ ml+ meio	0,3 µg/ ml+ meio	1,0 µg/ ml+ meio	3,0 µg/ ml+ meio	5,0 µg/ ml+ meio	10,0 µg/ ml+ meio		
<b>F</b>			0,005 µg/ ml+ meio	0,01 µg/ ml+ meio	0,1 µg/ ml+ meio	0,3 µg/ ml+ meio	1,0 µg/ ml+ meio	3,0 µg/ ml+ meio	5,0 µg/ ml+ meio	10,0 µg/ ml+ meio		
<b>G</b>			0,005 µg/ ml+ meio	0,01 µg/ ml+ meio	0,1 µg/ ml+ meio	0,3 µg/ ml+ meio	1,0 µg/ ml+ meio	3,0 µg/ ml+ meio	5,0 µg/ ml+ meio	10,0 µg/ ml+ meio		

Meio: controle negativo; Meio + Inóculo: controle positivo

### ***Incubação e leitura dos resultados***

As placas foram incubadas a 35° C e a CIM determinada após 48 horas. Foram comparados visualmente com as condições controle pela presença de turvação indicando o crescimento da levedura nos poços. A CIM foi determinada pela menor concentração da caspofungina capaz de inibir o crescimento total do fungo em relação ao crescimento total do fungo sem a presença do fármaco.

O teste de susceptibilidade foi interpretado de acordo com o critério do CLSI (M27-S4) que define o ponto de corte da susceptibilidade da caspofungina contra a *C. albicans* como: susceptível (S)  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/ml}$  do fármaco para inibir o crescimento do fungo, susceptibilidade dose dependente (S-DD) para 0,5  $\mu\text{g/ml}$  e resistente (R) para  $\leq 1,0$   $\mu\text{g/ml}$  (CLSI, 2012).

## **5.4. Resultados**

### ***5.4.1. Padronização da infecção por C. albicans em camundongos***

Diferentes protocolos foram utilizados para a padronização do modelo de infecção, uma vez que o objetivo era definir um protocolo que permitisse a imunossupressão considerada ideal para o tratamento com a caspofungina. O protocolo 7 (P7) (tabela 5.1) produziu imunossupressão associada à infecção e morte dos animais até o 6° dia após a infecção e foi então definido como o protocolo de infecção a ser utilizado para a avaliação da eficácia da caspofungina.

A infecção foi confirmada pela presença do fungo nos tecidos do coração, rins, fígado e baço dos animais após crescimento da *C. albicans* em ágar SD em pelo menos um dos órgãos avaliados. Os resultados estão apresentados na tabela 5.2.

Tabela 5.2: Resultados dos protocolos da padronização da imunossupressão e infecção de camundongos Swiss fêmeas.

<b>Nº do Protocolo</b>	<b>Infecção</b>	<b>Nº de Animais Sobreviventes</b>	<b>Tempo de vida após a infecção (dias)</b>
P1	-	6/6	> 30
P2	-	6/6	> 30
P3	+	6/6	> 30
P4	+	6/6	> 30
P5	+	0/6	1 a 3
P6	+	6/6	> 30
P7	+	0/6	2 a 5

n= 6 em todos os grupos experimentais.

Os grupos de animais tratados com os protocolos P1 e P2 tiveram sobrevida de 100 % e não estavam infectados até 30 dias após a infecção. No protocolo P3, os animais estavam infectados, porém a sobrevida foi de 100 % até 30 dias após a infecção.

Nos protocolos P4 e P5, os animais tiveram o tratamento com ciclofosfamida na dose de 100 mg/kg durante 4 dias consecutivos, porém foram utilizadas cepas diferentes de *C. albicans*: ATCC18864 e a SC5314, respectivamente. No presente estudo, a cepa SC5314 se mostrou mais virulenta e por isso foi escolhida para os experimentos.

O grupo de animais infectados com 1 a  $5 \times 10^6$  leveduras (P5) atingiu 100 % de mortalidade no terceiro dia após a infecção, enquanto aqueles que receberam 1 a  $5 \times 10^4$  leveduras (P6) apresentaram 100 % sobrevida até 30 dias após a infecção. Os animais infectados com 1 a  $5 \times 10^5$  leveduras (P7) atingiram 100 % de mortalidade até o sexto dia após a infecção (tabela 5.1 e tabela 5.2). Dessa forma, a carga fúngica de 1 a  $5 \times 10^5$  leveduras da cepa SC5314 administrada nos animais imunossuprimidos foi considerada adequada para o tratamento de cinco dias com a caspofungina.

#### **5.4.2. Avaliação da eficácia da caspofungina**

Os resultados da avaliação da eficácia da caspofungina em camundongos Swiss fêmeas infectadas com *C. albicans* estão apresentados na figura 5.3 e na tabela 5.3.

A sobrevida foi significativamente aumentada quando os camundongos infectados foram tratados com caspofungina 5 ou 10 mg/kg via IP. Todos os camundongos infectados tratados apenas com o veículo morreram. O tratamento com caspofungina nas doses de 5 e 10 mg/kg evitou a morte de 70 e 73 % dos animais, respectivamente (figura 5.3 A). Na figura 5.3 B estão apresentados os pesos dos animais infectados durante o tratamento com veículo, caspofungina 5 ou 10 mg/kg. A administração do veículo não foi capaz de impedir a perda de peso dos animais após à infecção, já os animais que receberam o tratamento com caspofungina reestabeleceram o peso corporal avaliado até 24 horas após o final do tratamento, demonstrando uma recuperação dos animais.

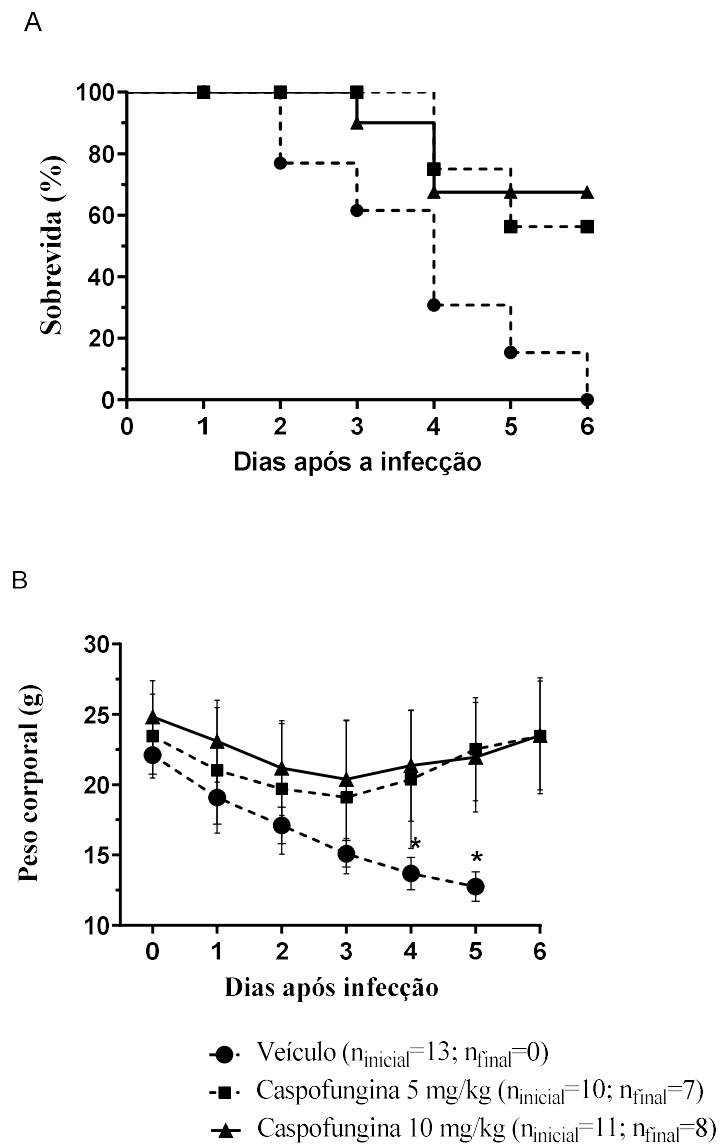


Figura 5.2: Percentual de sobrevivência (A) e peso corporal (B) de camundongos infectados com *C. albicans* após o tratamento IP com veículo, caspofungina 5 ou 10 mg/kg. \*  $P < 0,05$  significativo comparado aos grupos tratados com caspofungina.

Embora cerca de 30% dos animais tratados com caspofungina tenham morrido, a dose mais alta utilizada, 10 mg/kg, pode ser considerada uma boa eficácia, uma vez que nenhum dos camundongos infectados que sobreviveram apresentaram UFC positiva após o tratamento, indicando uma remissão completa da infecção. Para a dose de 5 mg/kg, a remissão completa da infecção foi observada em menos de 50 % dos camundongos sobreviventes e a detecção de UFC pode indicar um potencial restabelecimento da infecção, embora o número de UFC fosse significativamente menor do que o do veículo (tabela 5.3). A avaliação da eficácia pela contagem de UFC/g de tecido foi realizada 24 horas após o final do tratamento de cada grupo.

Tabela 5.3: Eficácia da caspofungina em camundongos Swiss fêmeas infectadas com *C. albicans*. Valores de UFC/g (média ± e.p.m.) de animais sobreviventes (n/total) utilizados para contagem de colônias fúngicas. \* P < 0,05 comparado ao veículo. Teste t não-pareado para UFC positivo e teste de Mantel-Cox para sobrevida.

Parâmetros	Tratamento		
	Veículo	Caspofungina (mg/kg)	
		5	10
<b>Sobrevida (n/total; %)</b>	0/13 (0%)	7/10 (70%)*	8/11 (73%)*
<b>UFC/g</b>			
<b>Coração</b>	1329 ± 502,9 (4/9)	0*	0*
<b>Rins</b>	528 ± 157,3 (9/9)	39 ± 28,5*(2/3)	0*
<b>Fígado</b>	111 ± 53,4 (8/9)	38 ± 6,4*(2/3)	0*
<b>Baço</b>	256 ± 153,3 (5/9)	60 ± 54,9*(3/3)	0*

\* P < 0,05 significativo comparado ao grupo tratado com veículo.

#### **5.4.3. Avaliação da susceptibilidade in vitro da cepa de *C. albicans* SC5314**

A avaliação da susceptibilidade *in vitro* da *C. albicans* frente à caspofungina foi realizada pelo método visual, como sugerido na M27-A3 do CLSI. A figura 5.4 representa a microplaca de 96 poços. O controle negativo (apenas o meio de cultura) e o controle positivo (meio de cultura + inóculo) foram adequados para avaliação da qualidade do método, pois foi observado ausência e presença do crescimento do fungo, respectivamente.

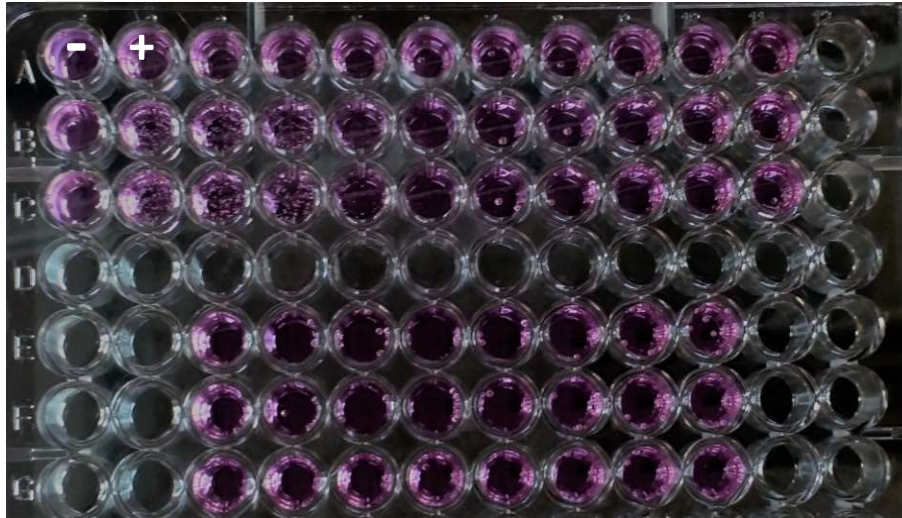


Figura 5.3: Microplaca de 96 poços da avaliação *in vitro* da eficácia da caspofungina. Cada poço contém as diluições finais para a caspofungina de 0,005; 0,01; 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{g/ml}$  em meio RPMI-1640 de acordo com o quadro 5.1

A inibição total da turbidez causada pela presença do fungo ocorreu no poço com concentração de caspofungina a partir de 0,3  $\mu\text{g/ml}$ , indicando que esse valor corresponde à CIM de caspofungina para a cepa selvagem de *C. albicans* SC5314 utilizada no presente trabalho.

## 5.5. Discussão

*C. albicans* é amplamente utilizada em modelos de infecção *in vivo*, porque é uma das principais espécies responsáveis pelo grande número de infecções oportunistas, é frequentemente citada como a principal causa de infecção nosocomial, sendo apontada como uma das leveduras mais patogênicas para o ser humano (Pappas, 2006). A disponibilidade de novos antifúngicos tem proporcionado mais opções terapêuticas, aumentando o uso desses compostos não apenas para tratamento, mas também como profilaxia, tratamento empírico ou preventivo. A caspofungina, fármaco de escolha, é considerada adequada para alcançar um efeito terapêutico desejado como opção para tratar candidíase sistêmica e aspergilose (Walsh *et al.*, 2008), onde as espécies de *Candida* respondem a este antifúngico, inclusive as resistentes ao fluconazol (Xiang *et al.*, 2013). O aumento do uso de antifúngicos tem induzido resistências, espécies susceptíveis foram substituídas por resistentes ou espécies desenvolveram secundariamente a resistência, alterando a epidemiologia das infecções fúngicas (Lass-Flörl, 2009). As equinocandinas são utilizadas e os isolados de *C. albicans* resistentes a esses

antifúngicos são bastante raros, sendo o primeiro caso relatado em 2005 (Park *et al.*, 2005), permanecendo relativamente baixo, com menos de 3 % com relação à maioria das espécies de *Candida spp* (Castanheira *et al.*, 2010).

A infecção sistêmica *in vivo* de *C. albicans* foi obtida utilizando o inóculo do fungo e um tratamento prévio e concomitante com ciclofosfamida para induzir imunossupressão (Spreghini *et al.*, 2012; Domán *et al.*, 2015; Berényi *et al.*, 2014). Em roedores, a ciclofosfamida é capaz de inibir a produção de anticorpos, e atuar em células com alta atividade mitótica, inibindo as respostas imunes humoral e celular (Foldvari *et al.*, 2000; Naglik *et al.*, 2008), reproduzindo a candidíase humana (Pappas *et al.*, 2009). A ciclofosfamida induz a neutropenia nos animais, e como os neutrófilos polimorfonucleares representam a primeira linha de defesa contra infecções fúngicas, a neutropenia é o principal fator de risco (Garth e Steele, 2017).

Várias cepas de *C. albicans* são utilizadas em modelos de infecção sistêmica. A cepa SC5314 é uma linhagem selvagem e virulenta utilizada em modelos *in vivo* e *in vitro* (Pitarch *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2017; Pumeesat *et al.*, 2017), assim como a cepa ATCC 18864 (Ibrahim *et al.*, 2012; Carmo, do *et al.*, 2016; Rosa *et al.*, 2016). No entanto, no modelo padronizado em nosso estudo, a cepa SC5314 utilizada em suspensão de 1 a  $5 \times 10^5$  UFC/ml mostrou-se mais virulenta para infectar os animais. Este modelo permite estudos sobre a atividade de antifúngicos pois mimetiza a infecção em humanos. Além disso, provou ser apropriado para examinar a eficácia desses agentes farmacológicos a curto prazo, uma vez que os animais tratados apenas com o veículo morrem até o quinto dia após administração do inóculo. O modelo também foi adequado para mostrar eficácia da caspofungina já que o tratamento foi capaz de aumentar a sobrevivência e o peso dos camundongos e reduzir a carga fúngica nos órgãos avaliados (Arendrup *et al.*, 2002; Spellberg *et al.*, 2005; Trammell e Toth, 2011; Dimopoulou *et al.*, 2014; Domán *et al.*, 2015). O rim é um dos principais órgãos afetados em modelos de infecção por candidíase sistêmica devido a habilidade da levedura produzir pseudo-hifas no lúmen tubular renal e penetrar no parênquima renal (Chaves *et al.*, 2004). Hajdu *et al.*, (1997), avaliaram a farmacocinética da caspofungina em animais e observaram que as concentrações do fármaco nos rins, fígado e baço foram mais altas que as concentrações plasmáticas.

O delineamento experimental *in vivo* para o tratamento dos camundongos com caspofungina foi baseado em estudos com animais que demonstraram a eficácia do fármaco no tratamento de candidíase (Graybill *et al.*, 1998; Berényi *et al.*, 2014; Dimopoulou *et al.*, 2014).



O tratamento dos animais foi realizado por via IP nas doses de 5 ou 10 mg/kg de caspofungina durante 5 dias. Embora a caspofungina seja indicada clinicamente por administração IV, optou-se pela via IP por questões práticas, porém fundamentadas em estudos que utilizaram a mesma via de administração (Abruzzo *et al.*, 1997; Graybill *et al.*, 1998; González *et al.*, 2001; Berényi *et al.*, 2014; Domán *et al.*, 2015; Maiolo *et al.*, 2016). Além disso, os relatos de problemas de baixa biodisponibilidade da caspofungina são relacionados apenas com administração do fármaco por via oral (Letscher-Bru e Herbrecht, 2003; Maschmeyer e Glasmacher, 2005; McCormack e Perry, 2005). A administração da caspofungina por via IP não contribuiu para a baixa eficácia do antifúngico no modelo de candidíase sistêmica proposto, uma vez que nas doses avaliadas (5 ou 10 mg/kg) mostraram resultados eficazes dose-dependente.

Estudos com camundongos infectados por *C. albicans*, *C. metapsilosis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. inconspicua* não houve melhora significativa da eficácia quando a dose do fármaco foi aumentada, apesar do tratamento com caspofungina ser eficaz em reduzir a carga fúngica em todos os tratamentos (Berényi *et al.*, 2014; Dimopoulou *et al.*, 2014; Kovács *et al.*, 2014). Spreghini *et al.*, (2012) trataram camundongos com caspofungina de 0,25 a 10 mg/kg/dia durante 6 dias e observaram efeito antifúngico contra *Candida não-albicans* em todas as doses, sendo as doses mais efetivas 5 e 10 mg/kg, conforme utilizadas e confirmadas no trabalho atual.

A resposta terapêutica ao tratamento com 5mg/kg de caspofungina não foi eficaz, o que pode ser o resultado do tratamento antifúngico (Colombo *et al.*, 2013; Pappas *et al.*, 2009; Pfaller *et al.*, 2012), iniciado somente 24 horas após à infecção. Os protocolos de dosagem e o tempo de tratamento utilizados foram restritos, uma vez que uma das limitações encontradas nos ensaios *in vivo* foi o elevado custo do fármaco de escolha. Como a eficácia da caspofungina foi melhor na dose de 10 mg/kg, foi a dosagem de escolha para prosseguir com a avaliação da cardiotoxicidade *in vivo*, tanto em camundongos infectados por *C. albicans* quanto em camundongos não infectados.

Os métodos de teste de susceptibilidade antifúngica são importantes para detectar resistência antifúngica e para determinar o melhor tratamento. Duas organizações, *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST, 2008) e o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), padronizaram métodos para realizar testes de susceptibilidade antifúngica. Essas organizações definiram pontos de corte de alguns antifúngicos para espécies de *Candida*, a fim de identificarem as cepas resistentes.

O CLSI padronizou o método de MC para as equinocandinas contra a *Candida spp.* (CLSI, 2008). Foram definidos os limites de controle de qualidade e os pontos de corte (Pfaller *et al.*, 2011) para esses fármacos. Entretanto em 2012, o CLSI revisou esses dados (M27-S4, CLSI 2012), para fluconazol, itraconazol, voriconazol e equinocandinas, para todas as espécies de *Candida* (Pfaller e Diekema, 2012). Para caspofungina os pontos de corte foram definidos como:  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/ml}$  susceptível (S), 0,25-0,5  $\mu\text{g/ml}$  susceptível dose-dependente (SDD), 0,5-1  $\mu\text{g/ml}$  intermediário (I), e  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$  resistente (R). A interpretação dos pontos de corte clínico para o teste de susceptibilidade *in vitro* podem ser usados para indicar o provável tratamento antimicrobiano, qual o fármaco utilizado e o regime de dose (Turnidge e Paterson, 2007).

A análise de susceptibilidade aos antifúngicos de MC (CLSI, 2008) é a mais utilizada por ser rápida, de fácil execução e de menor custo comparada à macrodiluição. A susceptibilidade aos antifúngicos é determinada através da CIM, em que o crescimento de um microrganismo, na presença de uma sequência de concentrações do antimicrobiano é medida durante um tempo definido de acordo com a metodologia preconizada. Em nosso estudo, a CIM da caspofungina contra a *C. albicans* SC5314 foi de 0,3 mg/kg, de acordo com valores encontrados em estudos anteriores (Pfaller *et al.*, 2006; Hedayati *et al.*, 2018) e de acordo com estudos de vigilância da atividade *in vitro* desse fármaco (Gil-Alonso *et al.*, 2016).

## ***6- Efeitos do tratamento com caspofungina sobre os parâmetros do eletrocardiograma***

### **6.1. Introdução**

A proposta desta etapa do trabalho foi avaliar a segurança terapêutica da caspofungina sobre o sistema cardiovascular *in vivo*. Foram avaliados os efeitos do tratamento com caspofungina sobre os intervalos PR, QRS, QT e QTc (QT corrigido pela FC) do ECG obtido em animais conscientes em contenção manual e sobre os parâmetros de avaliação da VFC obtidos a partir do sinal de ECG por telemetria em animais com livre movimentação.

Na avaliação da eficácia (item 5), o tratamento com caspofungina na dose de 10 mg/kg se mostrou mais eficaz no combate à infecção sistêmica causada pela *C. albicans*. Assim, essa dose foi a selecionada para avaliação da atividade cardíaca *in vivo* da caspofungina.

### **6.2. Objetivo específico**

Avaliar os efeitos do tratamento com caspofungina em dose única sobre os intervalos do eletrocardiograma em animais conscientes infectados e não infectados.

### **6.3. Métodos**

#### ***6.3.1. Protocolos experimentais***

A atividade da caspofungina sobre o ECG em camundongos foi avaliada utilizando-se os sinais obtidos na derivação periférica II (DII). O tratamento foi realizado com veículo ou caspofungina 10 mg/kg, IP, durante 5 dias de acordo com os grupos experimentais descritos abaixo. Cada protocolo consistiu então de dois grupos experimentais.

Para a avaliação da atividade cardíaca da caspofungina administrada em animais infectados com *C. albicans*, os animais foram mantidos conscientes e sob contenção manual durante o registro do ECG. A contenção manual dos animais foi realizada nas mãos do mesmo pesquisador e da mesma maneira em todos os experimentos. Os animais foram imobilizados nas mãos do pesquisador aproximadamente por 5 minutos antes do registro do ECG até estabilização dos sinais. Após a estabilização, o sinal do ECG foi registrado durante 5 minutos continuamente. Para minimizar o estresse, o ambiente dos experimentos foi mantido silencioso, sem odores, os animais foram previamente treinados e imediatamente antes da inserção das agulhas foi utilizado topicamente o anestésico lidocaína (Germed) 40 mg/g.

**A.** Camundongos não infectados e conscientes: o sinal do ECG foi obtido continuamente antes, durante e até 48 horas após o tratamento com veículo ou caspofungina (figura 6.1 A):

**A.1.** O registro do ECG convencional foi obtido continuamente durante 5 minutos com os animais em contenção manual: a) tempo basal - antes do início do tratamento; b) 1, 6, 12 e 24 horas após a primeira dose do tratamento; c) 24 horas após a terceira dose; d) 1, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a última dose de veículo ou caspofungina.

**A.2.** O registro do sinal de ECG por telemetria foi obtido continuamente com os animais em livre movimentação: a) tempo basal - durante 24 horas antes do início do tratamento; b) durante 15 minutos nos tempos 1, 6, 12 e 24 horas após a primeira dose do tratamento; c) durante 15 minutos, 24 horas após a terceira dose; d) durante 15 minutos nos tempos 1, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a última dose de veículo ou caspofungina.

**B.** Camundongos infectados e conscientes: a infecção por *C. albicans* foi realizada de acordo com o descrito no item 5 e o tratamento com veículo (n=6) ou caspofungina (n=7) foi administrado em dose única 24 horas após a infecção. Para cada registro, o sinal de ECG foi obtido continuamente durante 5 minutos nos animais em contenção manual: a) tempo basal - antes do início da imunossupressão; b) 1, 6 e 24 horas após a administração. Assim, o tempo de 1 hora corresponde a 25 horas após a infecção, 6 horas corresponde a 31 horas e 24 horas corresponde a 48 horas após a infecção dos animais) (figura 6.1 B).

**C.** Camundongos não infectados e conscientes tratados com veículo (n=6) ou ciclofosfamida 100 mg/kg (n=7) IP durante 4 dias (controle da imunossupressão prévia à infecção). O sinal de ECG foi obtido continuamente durante 5 minutos nos animais em contenção: a) tempo basal - antes do início da imunossupressão; b) 24 horas após a administração da primeira dose do tratamento; c) 24 horas após a administração da 4<sup>a</sup> dose do tratamento (figura 6.2).

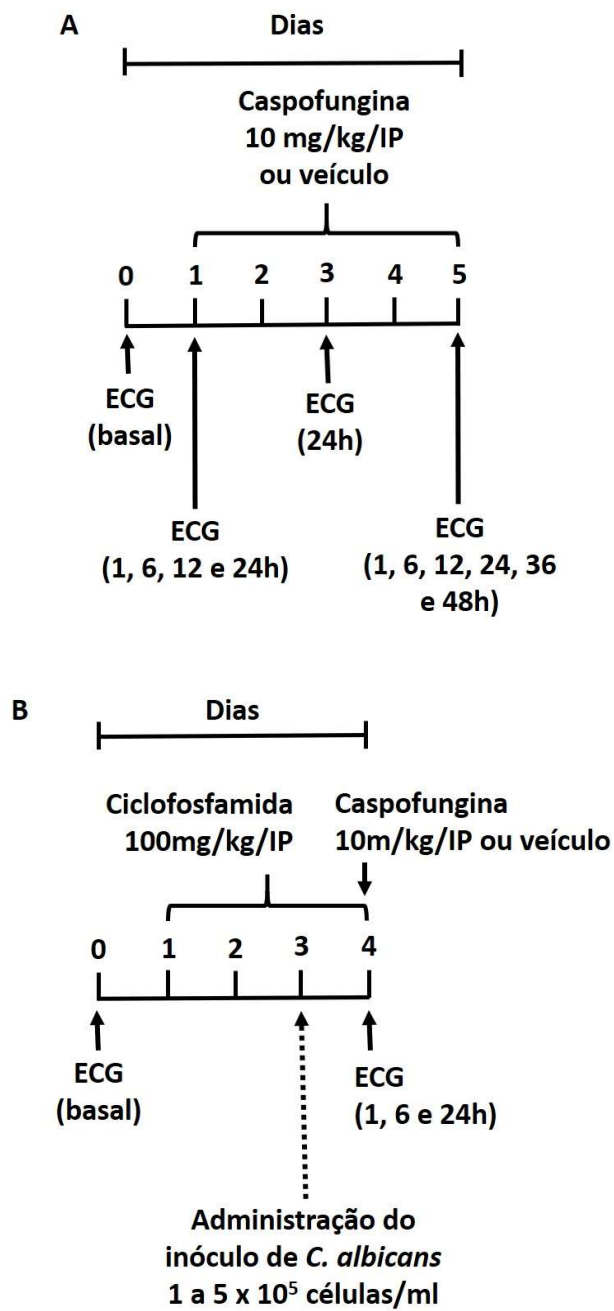


Figura 6.1: Protocolos experimentais de tratamento com a caspofungina e obtenção do sinal de ECG (DII) para a avaliação da cardiotoxicidade *in vivo*. Animais não infectados e conscientes (A) e animais infectados e conscientes (B).

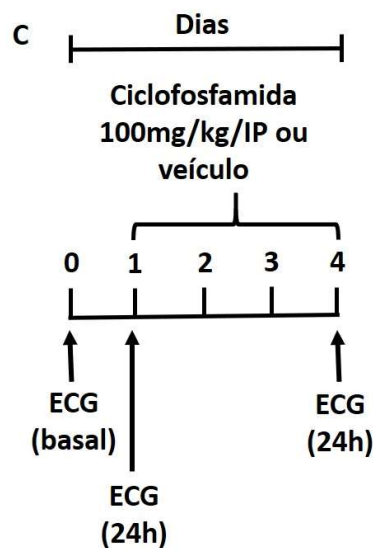


Figura 6.2: Protocolo experimental para avaliação da atividade cardíaca da ciclofosfamida.

### 6.3.2. Obtenção do sinal ECG

O sinal de ECG foi obtido na derivação periférica II (DII) usando eletrodos de agulhas de aço inoxidável inseridas no tecido subcutâneo dos animais. Os animais foram deixados por 5 a 10 minutos para estabilização do sinal antes do início dos registros e realização dos experimentos de acordo com os protocolos adotados. Os sensores de ECG foram acoplados a um sistema condicionador que fornece sinais em tempo real conectados por um cabo blindado a um amplificador biopotencial com uma passagem de banda de 0,5-100 Hz a uma frequência de 1200 Hz, processados por uma placa conversora analógico-digital de resolução de 16 bits (DaqBoard/2001, IOtech, EUA).

Utilizando o software Dataq (EUA), a partir do registro do sinal de ECG três segmentos de dois segundos foram selecionados e extraídos de cada registro para realizar a mensuração dos intervalos do ECG. Os parâmetros obtidos medidos foram: intervalos RR, PR, QRS e QT (figura 6.3). O intervalo RR foi medido entre duas ondas R sucessivas, determinando um ciclo cardíaco completo e usado para calcular a FC em batimentos por minuto (bpm), onde  $FC = 60/RR$ . O intervalo PR foi medido desde o início da onda P até o início do complexo QRS. O intervalo QRS foi medido entre o início da onda R e o fim da onda S. O intervalo QT foi medido entre o início do complexo QRS e o fim da onda T. Além dos intervalos medidos também foi calculado o intervalo QTc, que é o intervalo QT corrigido pela FC utilizando a fórmula de Fridericia, (1920) ( $QTc = QT/(RR)^{1/3}$ ). Este intervalo é um melhor marcador de riscos de arritmias cardíacas, devido a menor dependência da FC.

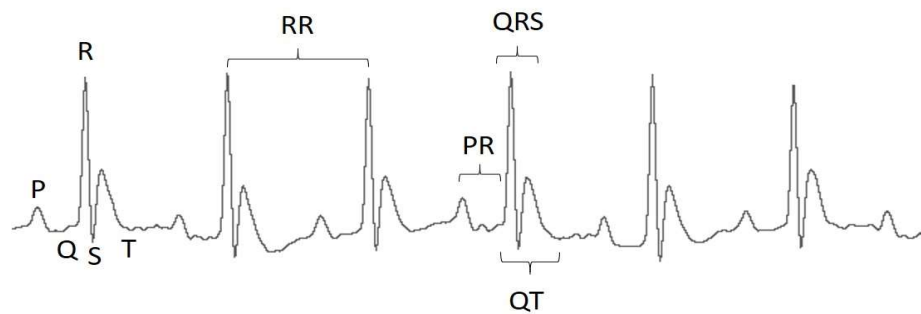


Figura 6.3: Sinal basal de ECG DII de camundongo consciente indicando os intervalos mensurados.

### ***6.3.3. Obtenção do ECG por telemetria e análise da variabilidade da frequência cardíaca***

Os sensores de telemetria (TA10ETA-F20 Implant, USA, Data Sciences International (DSI) para a obtenção do sinal de ECG DII foram preparados e esterilizados a cada novo procedimento e implantados nos animais subcutaneamente na região ventral. Os animais foram anestesiados por cetamina 10 % (Cetamin®, Syntec) (100 mg/kg) e xilasina 2 % (Calmin®, Agener União) (14 mg/kg), por via IP, e os sensores (figura 6.4) foram colocados entre a pele e a musculatura ventral, tendo seus fios presos à mesma por meio de sutura simples próximos aos membros superiores direito e inferior esquerdo com o objetivo de mensurar a diferença de potencial relativa à DII do ECG (Cesarovic *et al.*, 2011). Os animais receberam por via IP a flunixinina (Flunixinina®, UCB) (10 mg/kg) pós-cirúrgico para alívio da dor por 48 horas no período pós-operatório, antes do início dos experimentos.



Figura 6.4: Sensor de telemetria. (DSI).

Para a obtenção do sinal de ECG, os animais foram colocados em caixas individuais sobre plataformas acopladas ao sistema de telemetria DSI que capta o sinal dos transdutores em tempo real a uma frequência de 1200 Hz. Os registros digitais dos experimentos foram adquiridos e analisados a posteriori utilizando o software Biomedical Workbench – LabView. Foram selecionados segmentos de 150 segundos em instantes determinados pelos protocolos experimentais para a análise dos parâmetros do ECG.

Para análise do sinal de ECG para obtenção dos parâmetros de VFC, os intervalos entre as ondas R consecutivas no ECG (intervalo RR) ou onda normal a normal (intervalo NN) foram calculados, em uma janela de tempo de 5 minutos (*short term recording*), para construir a série temporal RR. A partir das séries temporais de intervalos RR, foi realizada uma análise no domínio do tempo da VFC, consistindo em medidas estatísticas e geométricas. As medidas estatísticas calculadas foram a média do intervalo RR (*RR mean* –  $\overline{RR}$ ), o desvio padrão dos intervalos RR (Standard deviation of RR intervals series - SDNN) e o quadrado médio da raiz das sucessivas diferenças do intervalo RR (Square root of the mean of the squares of differences between adjacent RR intervals - RMSSD). As medidas geométricas calculadas foram a largura da linha de base da interpolação triangular do histograma de intervalo RR (Baseline width of the triangular interpolation of the intervals histogram - TINN) e a integral do histograma de intervalo dividida pelo máximo do histograma (Índice Triangular da VFC – HRV index). O SDNN reflete a variabilidade global das séries temporais, o RMSSD reflete a variabilidade das flutuações de curto prazo, representando rápidas mudanças na FC, e é um estimador da atividade parassimpática. As medidas geométricas - índice TINN e VFC - são mais influenciadas pelas flutuações mais lentas, refletindo a variabilidade global, e são mais robustas para valores extremos que o SDNN (Rajendra Acharya *et al.*, 2006; Shaffer e Ginsberg, 2017). Utilizamos também como estimadores da atividade do SNA a FC média (HR mean) e o desvio padrão da FC (HR-SD) obtido das mesmas séries de intervalos RR. Para a melhor acurácia na análise dos índices e a sua comparação com os dados dos tempos definidos previamente, a média dos valores obtidos dentro de cada 24 horas foi calculada como representativo de análise em tempo prolongado.

Para análise da VFC, são utilizados índices obtidos por meio de métodos lineares e não-lineares (Aubert *et al.*, 2003). Métodos lineares são divididos em relação à análise no domínio do tempo ou da frequência, realizada por meio de índices estatísticos e geométricos. A partir da medida de intervalo RR durante determinado tempo utilizando métodos estatísticos ou



geométricos, média, desvio padrão e índices derivados do histograma ou do mapa de coordenadas cartesianas dos intervalos RR, são calculados os índices tradutores de flutuações na duração dos ciclos cardíacos (Rassi, 2000).

#### **6.3.4. Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando-se análise de variância two-way (ANOVA) seguido do pós-teste de Bonferroni. Foram analisados os grupos tratados com caspofungina em relação ao tratamento com veículo em todos os tempos avaliados e cada grupo em relação ao tempo basal e aos demais tempos avaliados. Foi utilizado o software GraphPadPrism® 6.0 (GraphPad Software, EUA) para as análises estatísticas. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.), com intervalo de confiança de 95% e as diferenças consideradas significativas quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 ( $P < 0,05$ ).

### **6.4. Resultados**

#### **6.4.2. ECG de animais infectados com *C. albicans* e conscientes tratados com dose única de caspofungina (protocolo B)**

A figura 6.5 mostra os efeitos da administração em dose única de veículo ou de caspofungina 10 mg/kg por via IP sobre os parâmetros do ECG em animais infectados com *C. albicans*. Para o intervalo PR, foi observado aumento significativo 24 horas após a administração de caspofungina em comparação ao tempo basal do mesmo grupo, embora não seja diferente do grupo tratado com veículo no mesmo tempo. Foi observado aumento de 18,5 % para este parâmetro, com valor absoluto 28,6 ms no tempo basal e 33,9 ms 24 horas após a caspofungina.

A administração da caspofungina induziu ao aumento significativo do intervalo QRS em 26,6 % após 24 horas em comparação ao tempo basal do mesmo grupo. Os valores absolutos encontrados foram 10,9 ms no tempo basal e 13,8 ms 24 horas após caspofungina.

Os intervalos QT e QTc do ECG aumentaram significativamente em todos os tempos avaliados, tanto no grupo tratado com veículo quanto com caspofungina comparados ao tempo basal para os mesmos grupos.

A infecção (tratamento com veículo) induziu ao aumento significativo do intervalo QT de 13,8, 14,4 e 20,2 % nos tempos de 1, 6 e 24 horas, respectivamente. Os valores absolutos de

QT para esse grupo foram 33,2, 33,4 e 35,1 ms em 1, 6 e 24 horas após administração, comparado a 29,2 ms no tempo basal. Para o intervalo QTc, a infecção (tratamento com veículo) induziu ao aumento significativo de 12,8, 16,0 e 16,3 % em 1, 6 e 24 horas após administração, sendo os valores absolutos de 71,2, 73,2 e 73,4 ms, respectivamente, nos tempos avaliados e comparados a 63,1 ms no tempo basal.

A administração da caspofungina induziu ao aumento significativo do intervalo QT de 10,8, 18,5 e 23,9 %, respectivamente aos tempos 1, 6 e 24 horas após sua administração. Os valores absolutos do intervalo QT foram de 32,8, 34,8 e 36,4 ms respectivamente para 1, 6 e 24 horas após caspofungina comparado a 29,1 ms no tempo basal. A caspofungina induziu ao aumento significativo do intervalo QTc, de 13,6, 20,9 e 27,2 %, respectivamente para 1, 6 e 24 horas após administração, os valores absolutos 72,0, 77,3 e 81,6 m respectivamente aos tempos avaliados quando comparado a 62,8 ms no tempo basal. A caspofungina aumentou em 11,2 % o intervalo QTc 24 horas após a administração em dose única comparado ao tratamento com veículo.

A FC permaneceu semelhante nos dois grupos em todos os tempos avaliados após administração de veículo ou caspofungina em comparação ao tempo basal. Estes resultados mostram que a infecção por si só induziu ao prolongamento dos intervalos QT e QTc.

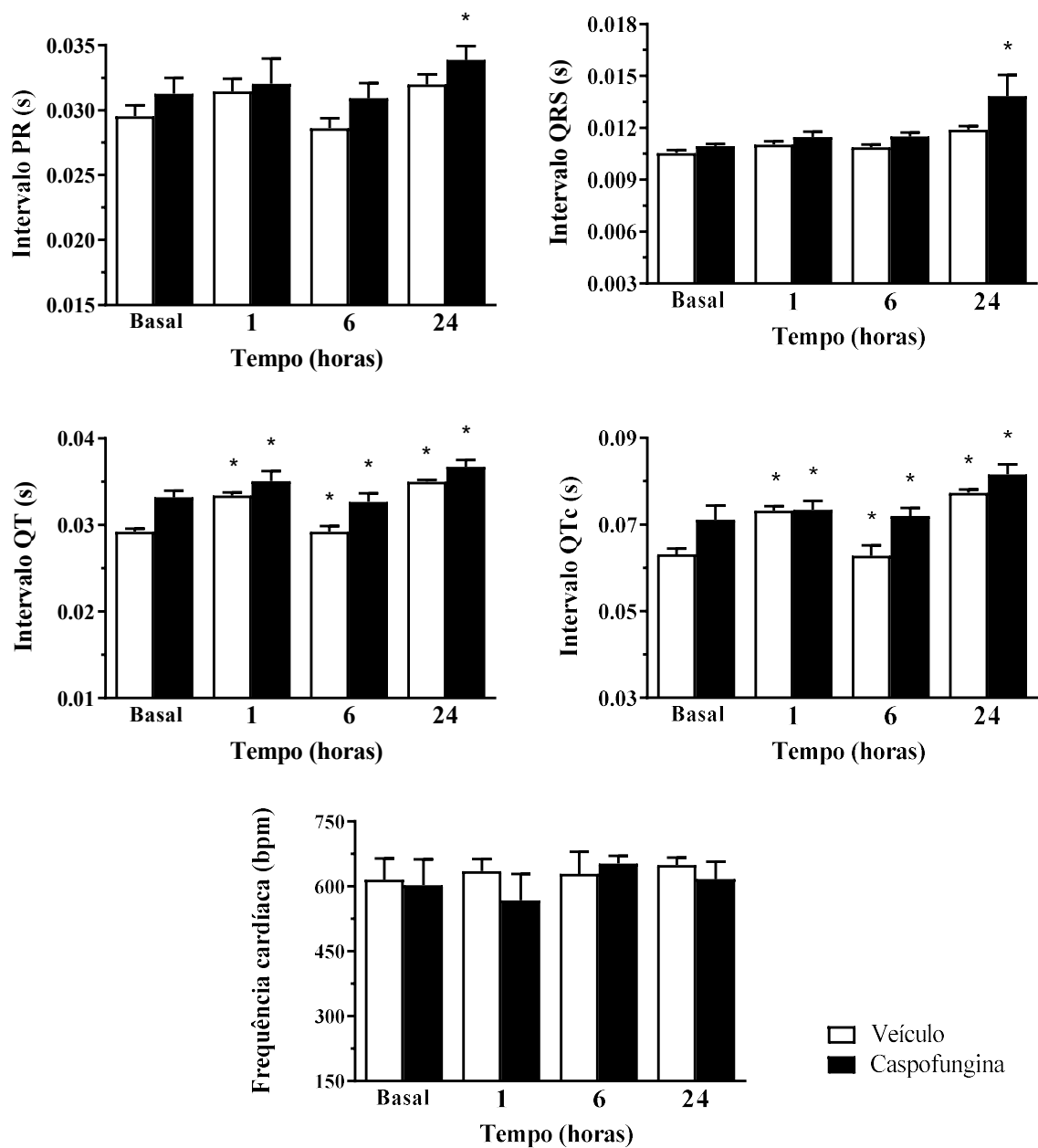


Figura 6.5: Parâmetros do ECG (média  $\pm$  e.p.m. dos valores absolutos) de camundongos Swiss fêmeas infectados por *C. albicans*, antes (basal) e após tratamento em dose única com caspofungina ou veículo.  $P < 0.05$ : ANOVA – pós teste de Bonferroni. \* Diferença significativa comparado ao tempo basal do mesmo grupo.

#### 6.4.2. ECG de animais não infectados e conscientes tratados com doses múltiplas de caspofungina (protocolo B)

As tabelas 6.1 e 6.2 apresentam os valores absolutos dos intervalos do ECG obtidos a partir da administração de cinco doses (cinco dias) de veículo ou caspofungina 10 mg/kg em camundongos não infectados e conscientes. Nenhum dos tratamentos induziu a alterações significativas nos intervalos PR, QRS, QT, QTc e FC após administração nos tempos avaliados, quando comparado aos valores basais do mesmo grupo. Os registros basais foram realizados 1, 6, 12 e 24 horas (anexo II) e o que está representado na tabela 6.1 e 6.2 é uma média desses valores. Os valores obtidos para FC estão apresentados no (anexo III). Foram utilizados para a correção do intervalo QT utilizando a formula de *Fridericia* e variaram de 757 a 789 bpm para o grupo tratado com veículo e de 724 a 778 bpm para o grupo tratado com caspofungina.

A figura 6.6 representa o registro do ECG por telemetria de animais não infectados e conscientes tratados com veículo (A) ou caspofungina (B).

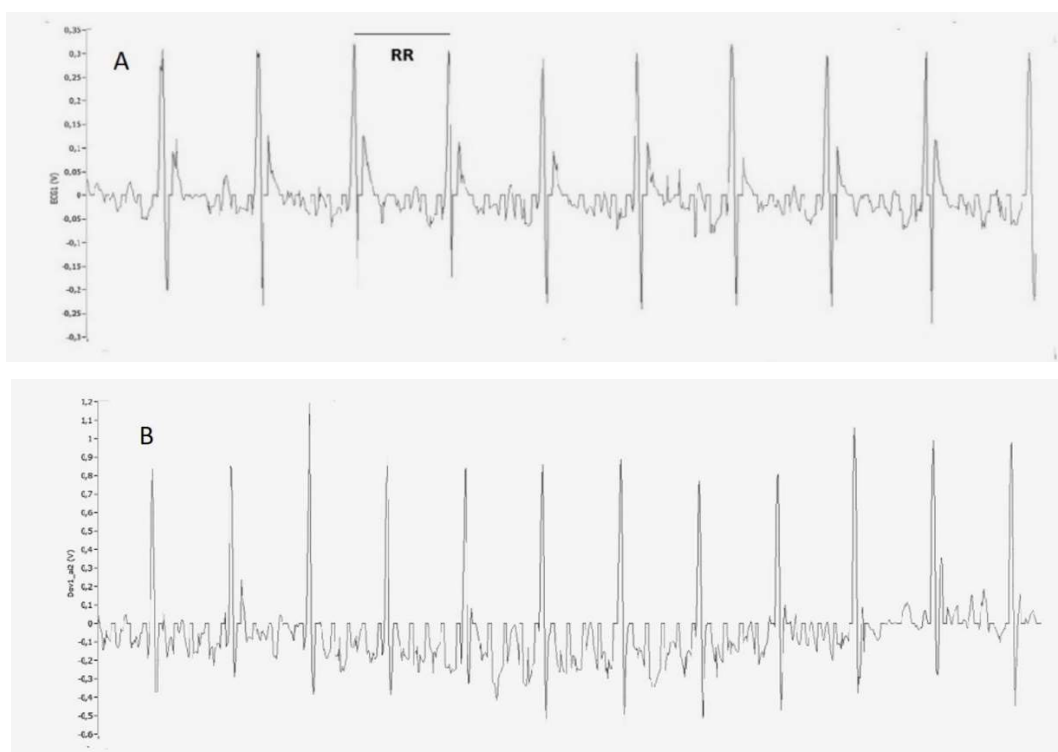


Figura 6.6: Registro do ECG por telemetria de animais tratados com veículo (A) caspofungina (B).

As tabelas 6.3, 6.4, 6.5 e 6.6 mostram os parâmetros da VFC no domínio do tempo ( $\overline{RR}$ , SDNN, HR mean, HR-SD, RMSSD, TINN e HRV index) obtidos a partir do sinal de telemetria

do ECG dos animais não infectados e conscientes em livre movimentação, antes e após a primeira, terceira e quinta doses de veículo ou caspofungina. Todos os parâmetros foram semelhantes após o tratamento com caspofungina, quando comparados aos valores basais do mesmo grupo e comparados ao tratamento com veículo nos mesmos tempos (1, 6, 12 e 24 horas após a primeira dose e 1, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a última dose). Os registros basais foram realizados 1, 6, 12 e 24 horas (anexo IV).

A figura 6.7 apresenta dados das variações em relação ao tempo basal calculados a partir dos valores de 24 horas obtidos dos mesmos sinais de ECG por telemetria e a tabela 6.7 apresenta as médias dos valores absolutos por 24 horas. O coeficiente de variação obtido da análise dos valores absolutos mostrou para o grupo tratado com veículo (n=5) 13,92, 18,48 e 5,14 %; para o grupo tratado com caspofungina (n=5) os valores foram 10,86, 10,62 e 12,21 %, ambos respectivamente para tempo basal, após primeira dose e após quinta dose, também indicando que a caspofungina não induziu a alterações indicativas de toxicidade comparado ao veículo.

A ausência de diferenças entre os tratamentos com veículo ou caspofungina sobre os parâmetros da VFC, aliado ao conjunto de dados obtidos do sinal de ECG DII em camundongos Swiss fêmeas não infectadas demonstram a segurança *in vivo* da caspofungina. Embora essa segurança não tenha sido de forma integral, já que na presença da infecção a administração da caspofungina não foi capaz de evitar a cardiotoxicidade provocada pela *C. albicans* bem como acentuou os efeitos como observados nos intervalos PR e QRS do ECG 24 horas após sua administração.

Tabela 6.1: Intervalos PR e QRS (média  $\pm$  e.p.m) do ECG de camundongos não infectados e conscientes. Valores absolutos mensurados antes do início do tratamento (basal), e em tempos definidos após a administração de veículo ou caspofungina 10 mg/kg IP.

Parâmetros ECG	Tempo (h)	Veículo (n=6)	Caspofungina (n=4)		
Intervalo PR (ms)	<b>Basal</b>	29,4 $\pm$ 0,43	28,8 $\pm$ 0,12		
	<b>1ª Dose</b>	<b>1</b>	29,8 $\pm$ 0,56	29,5 $\pm$ 0,35	
		<b>6</b>	29,8 $\pm$ 0,45	29,7 $\pm$ 0,25	
		<b>12</b>	29,6 $\pm$ 0,39	29,7 $\pm$ 0,45	
		<b>24</b>	30,0 $\pm$ 0,36	29,2 $\pm$ 0,34	
	<b>3ª Dose</b>	<b>24</b>	30,0 $\pm$ 0,32	29,3 $\pm$ 0,26	
	<b>5ª Dose</b>	<b>1</b>	29,5 $\pm$ 0,33	29,8 $\pm$ 0,25	
		<b>6</b>	30,0 $\pm$ 0,50	30,0 $\pm$ 0,19	
		<b>12</b>	29,7 $\pm$ 0,47	29,5 $\pm$ 0,37	
		<b>24</b>	30,2 $\pm$ 0,33	29,6 $\pm$ 0,45	
		<b>36</b>	29,7 $\pm$ 0,35	29,5 $\pm$ 0,46	
		<b>48</b>	29,9 $\pm$ 0,34	29,8 $\pm$ 0,26	
		Intervalo QRS (ms)	<b>Basal</b>	11,7 $\pm$ 0,26	12,0 $\pm$ 0,34
	<b>1ª Dose</b>		<b>1</b>	11,8 $\pm$ 0,20	12,1 $\pm$ 0,24
			<b>6</b>	11,9 $\pm$ 0,21	12,2 $\pm$ 0,29
<b>12</b>			11,9 $\pm$ 0,32	12,3 $\pm$ 0,33	
<b>24</b>			11,7 $\pm$ 0,16	12,4 $\pm$ 0,35	
<b>3ª Dose</b>	<b>24</b>		11,8 $\pm$ 0,18	12,1 $\pm$ 0,39	
<b>5ª Dose</b>	<b>1</b>		11,7 $\pm$ 0,22	12,1 $\pm$ 0,25	
	<b>6</b>		12,0 $\pm$ 0,22	12,3 $\pm$ 0,14	
	<b>12</b>		11,8 $\pm$ 0,22	12,5 $\pm$ 0,28	
	<b>24</b>		11,9 $\pm$ 0,18	12,2 $\pm$ 0,26	
	<b>36</b>		11,8 $\pm$ 0,22	12,2 $\pm$ 0,12	
	<b>48</b>		12,0 $\pm$ 0,27	12,3 $\pm$ 0,35	

Tabela 6.2: Intervalos QT e QTc (média  $\pm$  e.p.m) do ECG de camundongos não infectados e conscientes. Valores absolutos mensurados antes do início do tratamento (basal), e em tempos definidos após a administração de veículo ou caspofungina 10 mg/kg IP.

<b>Parâmetros ECG</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Veículo (n=6)</b>	<b>Caspofungina (n=4)</b>		
<b>Intervalo QT (ms)</b>	<b>Basal</b>	30,0 $\pm$ 0,46	30,5 $\pm$ 0,97		
	<b>1ª Dose</b>	<b>1</b>	30,4 $\pm$ 0,25	30,3 $\pm$ 0,66	
		<b>6</b>	30,7 $\pm$ 0,27	31,5 $\pm$ 0,37	
		<b>12</b>	30,6 $\pm$ 0,21	31,8 $\pm$ 0,64	
		<b>24</b>	30,4 $\pm$ 0,24	31,5 $\pm$ 0,65	
	<b>3ª Dose</b>	<b>24</b>	30,2 $\pm$ 0,32	30,1 $\pm$ 0,38	
	<b>5ª Dose</b>	<b>1</b>	30,2 $\pm$ 0,28	30,9 $\pm$ 0,67	
		<b>6</b>	30,7 $\pm$ 0,18	31,1 $\pm$ 1,08	
		<b>12</b>	30,8 $\pm$ 0,35	31,7 $\pm$ 1,18	
		<b>24</b>	30,8 $\pm$ 0,38	31,3 $\pm$ 0,88	
		<b>36</b>	30,5 $\pm$ 0,39	31,4 $\pm$ 0,96	
		<b>48</b>	30,8 $\pm$ 0,37	31,6 $\pm$ 0,66	
	<b>Intervalo QTc (ms)</b>	<b>Basal</b>	70,7 $\pm$ 1,21	71,4 $\pm$ 2,63	
		<b>1ª Dose</b>	<b>1</b>	71,9 $\pm$ 0,68	70,3 $\pm$ 1,94
			<b>6</b>	71,5 $\pm$ 0,78	73,9 $\pm$ 1,28
			<b>12</b>	72,2 $\pm$ 0,85	73,6 $\pm$ 1,82
			<b>24</b>	71,7 $\pm$ 0,98	70,4 $\pm$ 0,97
		<b>3ª Dose</b>	<b>24</b>	71,2 $\pm$ 0,81	71,7 $\pm$ 1,93
<b>5ª Dose</b>		<b>1</b>	70,6 $\pm$ 0,87	71,3 $\pm$ 1,93	
		<b>6</b>	71,4 $\pm$ 0,97	71,9 $\pm$ 2,60	
		<b>12</b>	72,1 $\pm$ 0,85	74,4 $\pm$ 2,93	
		<b>24</b>	72,2 $\pm$ 1,03	73,2 $\pm$ 2,18	
		<b>36</b>	71,9 $\pm$ 1,01	73,3 $\pm$ 2,79	
		<b>48</b>	72,3 $\pm$ 0,95	73,2 $\pm$ 1,92	

Tabela 6.3: Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo mensurados pelo ECG por telemetria (média  $\pm$  e.p.m.) dos valores absolutos antes do início do tratamento (basal), e em tempos definidos após a administração de veículo ou caspofungina 10 mg/kg IP em camundongos não infectados e com livre movimentação.

Parâmetros	Tempo (h)	Veículo (n=5)	Caspofungina (n=5)		
$\overline{RR}$ (ms)	<b>Basal</b>	144,7 $\pm$ 9,00	129,4 $\pm$ 6,28		
	<b>1ª Dose</b>	<b>1</b>	160,6 $\pm$ 30,03	152,2 $\pm$ 14,27	
		<b>6</b>	177,2 $\pm$ 20,37	140,4 $\pm$ 3,79	
		<b>12</b>	166,6 $\pm$ 12,52	133,6 $\pm$ 4,37	
		<b>24</b>	129,6 $\pm$ 5,66	140,6 $\pm$ 9,90	
	<b>3ª Dose</b>	<b>24</b>	129,6 $\pm$ 8,76	154,0 $\pm$ 21,57	
	<b>5ª Dose</b>	<b>1</b>	123,4 $\pm$ 5,28	143,2 $\pm$ 7,63	
		<b>6</b>	142,0 $\pm$ 4,16	155,8 $\pm$ 17,54	
		<b>12</b>	136,8 $\pm$ 5,49	141,8 $\pm$ 7,11	
		<b>24</b>	141,8 $\pm$ 6,79	143,6 $\pm$ 12,09	
		<b>36</b>	147,4 $\pm$ 6,65	168,0 $\pm$ 21,87	
		<b>48</b>	141,8 $\pm$ 13,77	146,6 $\pm$ 7,97	
	<b>SDNN</b> (ms)	<b>Basal</b>	49,6 $\pm$ 5,49	50,6 $\pm$ 6,11	
		<b>1ª Dose</b>	<b>1</b>	68,4 $\pm$ 19,18	58,0 $\pm$ 11,61
			<b>6</b>	107,8 $\pm$ 23,06	55,4 $\pm$ 5,56
<b>12</b>			100,4 $\pm$ 23,12	56,2 $\pm$ 4,84	
<b>24</b>			51,4 $\pm$ 3,46	54,8 $\pm$ 9,17	
<b>3ª Dose</b>		<b>24</b>	63,2 $\pm$ 8,71	55,0 $\pm$ 8,39	
<b>5ª Dose</b>		<b>1</b>	55,4 $\pm$ 5,25	70,2 $\pm$ 13,46	
		<b>6</b>	61,6 $\pm$ 6,17	89,4 $\pm$ 24,37	
		<b>12</b>	57,6 $\pm$ 5,63	68,8 $\pm$ 8,58	
		<b>24</b>	57,0 $\pm$ 5,89	65,2 $\pm$ 5,98	
		<b>36</b>	73,0 $\pm$ 11,92	70,3 $\pm$ 10,11	
		<b>48</b>	66,4 $\pm$ 10,11	69,2 $\pm$ 6,63	



Tabela 6.4: Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo mensurados pelo ECG por telemetria (média  $\pm$  e.p.m) dos valores absolutos antes do início do tratamento (basal), e em tempos definidos após a administração de veículo ou caspofungina 10 mg/kg IP em camundongos não infectados e com livre movimentação.

Parâmetros	Tempo (h)	Veículo (n=5)	Caspofungina (n=5)	
HR mean	Basal	421,6 $\pm$ 23,15	430,8 $\pm$ 26,63	
	1 <sup>a</sup> Dose	1	474,0 $\pm$ 48,23	464,0 $\pm$ 29,77
		6	442,0 $\pm$ 33,67	480,0 $\pm$ 26,27
		12	466,0 $\pm$ 19,39	524,0 $\pm$ 10,77
		24	526,0 $\pm$ 16,61	502,0 $\pm$ 22,23
	3 <sup>a</sup> Dose	24	556,0 $\pm$ 31,40	522,0 $\pm$ 1,44
	5 <sup>a</sup> Dose	1	566,0 $\pm$ 24,42	508,0 $\pm$ 18,28
		6	442,0 $\pm$ 33,67	514,0 $\pm$ 39,19
		12	466,0 $\pm$ 19,39	516,0 $\pm$ 15,03
		24	488,0 $\pm$ 19,34	510,0 $\pm$ 35,64
		36	484,0 $\pm$ 21,59	498,0 $\pm$ 29,39
		48	526,0 $\pm$ 31,87	502,0 $\pm$ 20,10
	HR SD	Basal	148,2 $\pm$ 21,29	135,0 $\pm$ 21,53
		1 <sup>a</sup> Dose	1	156,0 $\pm$ 16,31
6			169,4 $\pm$ 23,48	159,8 $\pm$ 28,09
12			184,0 $\pm$ 26,38	192,0 $\pm$ 22,45
24			172,0 $\pm$ 17,72	181,4 $\pm$ 30,03
3 <sup>a</sup> Dose		24	186,8 $\pm$ 30,14	198,8 $\pm$ 28,13
5 <sup>a</sup> Dose		1	188,0 $\pm$ 22,45	196,0 $\pm$ 27,50
		6	185,2 $\pm$ 35,65	212,0 $\pm$ 21,30
		12	160,0 $\pm$ 11,40	196,0 $\pm$ 16,31
		24	162,0 $\pm$ 12,41	202,0 $\pm$ 19,08
		36	178,0 $\pm$ 22,67	210,0 $\pm$ 15,17
		48	208,0 $\pm$ 15,94	204,0 $\pm$ 20,15

Tabela 6.5: Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo mensurados pelo ECG por telemetria (média  $\pm$  e.p.m) dos valores absolutos antes do início do tratamento (basal), e em tempos definidos após a administração de veículo ou caspofungina 10 mg/kg IP em camundongos não infectados e com livre movimentação.

Parâmetros	Tempo (h)	Veículo (n=5)	Caspofungina (n=5)	
RMSSD (ms)	Basal	90,6 $\pm$ 15,10	76,8 $\pm$ 8,38	
	1 <sup>a</sup> Dose	1	96,0 $\pm$ 27,30	83,8 $\pm$ 17,30
		6	122,2 $\pm$ 20,27	78,8 $\pm$ 8,16
		12	118,2 $\pm$ 20,69	80,8 $\pm$ 6,55
		24	73,0 $\pm$ 4,51	76,8 $\pm$ 12,86
	3 <sup>a</sup> Dose	24	90,6 $\pm$ 12,32	80,5 $\pm$ 11,79
	5 <sup>a</sup> Dose	1	81,0 $\pm$ 5,51	101,4 $\pm$ 20,52
		6	86,0 $\pm$ 6,86	120,6 $\pm$ 29,43
		12	80,4 $\pm$ 7,74	98,8 $\pm$ 10,91
		24	81,4 $\pm$ 8,28	90,4 $\pm$ 8,43
		36	105,0 $\pm$ 18,84	202,4 $\pm$ 99,98
		48	97,80 $\pm$ 14,90	100,0 $\pm$ 10,00
	TINN (ms)	Basal	70,86 $\pm$ 18,39	80,5 $\pm$ 22,90
		1 <sup>a</sup> Dose	1	112,6 $\pm$ 78,97
6			61,9 $\pm$ 15,29	85,4 $\pm$ 27,73
12			109,6 $\pm$ 24,48	100,3 $\pm$ 35,43
24			84,7 $\pm$ 31,37	117,0 $\pm$ 46,53
3 <sup>a</sup> Dose		24	106,7 $\pm$ 29,98	133,7 $\pm$ 35,89
5 <sup>a</sup> Dose		1	63,5 $\pm$ 8,80	121,9 $\pm$ 38,61
		6	109,5 $\pm$ 30,98	136,3 $\pm$ 39,73
		12	63,7 $\pm$ 10,45	130,3 $\pm$ 29,18
		24	68,1 $\pm$ 10,54	130,5 $\pm$ 44,85
		36	120,2 $\pm$ 27,80	207,3 $\pm$ 43,37
		48	130,8 $\pm$ 44,87	175,4 $\pm$ 36,88

Tabela 6.6: Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo mensurados pelo ECG por telemetria (média  $\pm$  e.p.m) dos valores absolutos antes do início do tratamento (basal), e em tempos definidos após a administração de veículo ou caspofungina 10 mg/kg IP em camundongos não infectados e com livre movimentação.

<b>Parâmetros</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Veículo (n=5)</b>	<b>Caspofungina (n=5)</b>	
<b>HRV index</b>	<b>Basal</b>	6,0 $\pm$ 1,55	7,1 $\pm$ 1,44	
	<b>1ª Dose</b>	<b>1</b>	8,5 $\pm$ 4,12	9,5 $\pm$ 3,24
		<b>6</b>	6,4 $\pm$ 1,59	7,0 $\pm$ 1,59
		<b>12</b>	11,5 $\pm$ 2,93	13,0 $\pm$ 4,85
		<b>24</b>	6,6 $\pm$ 1,83	8,8 $\pm$ 2,66
	<b>3ª Dose</b>	<b>24</b>	8,0 $\pm$ 2,09	9,8 $\pm$ 2,38
	<b>5ª Dose</b>	<b>1</b>	5,2 $\pm$ 0,53	9,3 $\pm$ 2,24
		<b>6</b>	8,8 $\pm$ 2,18	10,2 $\pm$ 2,28
		<b>12</b>	6,0 $\pm$ 0,62	10,4 $\pm$ 1,80
		<b>24</b>	7,0 $\pm$ 1,14	9,5 $\pm$ 2,63
		<b>36</b>	9,4 $\pm$ 1,39	13,7 $\pm$ 2,62
		<b>48</b>	9,7 $\pm$ 2,57	12,0 $\pm$ 2,83

Tabela 6.7: Valores absolutos (média ± e.p.m.) dos parâmetros da análise da VFC dos sinais de ECG por telemetria por 24 horas, antes e depois da primeira e quinta doses de veículo ou caspofungina 10 mg/kg administrados em camundongos sadios.

Parâmetro	Veículo (n=5)			Caspofungina (n=5)		
	Basal	Dose 1	Dose 5	Basal	Dose 1	Dose 5
$\overline{RR}$ (ms)	144,7 ± 9,00	149,7 ± 12,37	136,0 ± 3,12	129,4 ± 6,28	141,7 ± 6,73	146,1 ± 8,00
SDNN (ms)	66,3 ± 12,66	64,6 ± 9,58	57,9 ± 4,46	53,5 ± 5,73	56,1 ± 6,99	73,4 ± 6,99
HR mean (bpm)	527,0 ± 19,77	477,0 ± 26,63	516,0 ± 12,13	538,5 ± 27,80	492,5 ± 17,07	512,0 ± 21,56
HR- SD (bpm)	185,3 ± 23,87	167,8 ± 19,25	173,8 ± 16,48	168,8 ± 26,14	169,8 ± 26,56	201,5 ± 17,10
RMSSD (ms)	90,6 ± 15,10	84,1 ± 9,96	101,5 ± 5,49	76,8 ± 8,38	80,1 ± 10,0	92,50 ± 8,54
TINN (ms)	67,69 ± 21,83	101,5 ± 33,32	76,24 ± 12,60	86,91 ± 20,70	106,6 ± 31,69	129,7 ± 30,42
HRV index	6,00 ± 1,55	8,30 ± 2,19	6,81 ± 0,95	7,13 ± 1,44	9,56 ± 1,70	9,85 ± 1,86

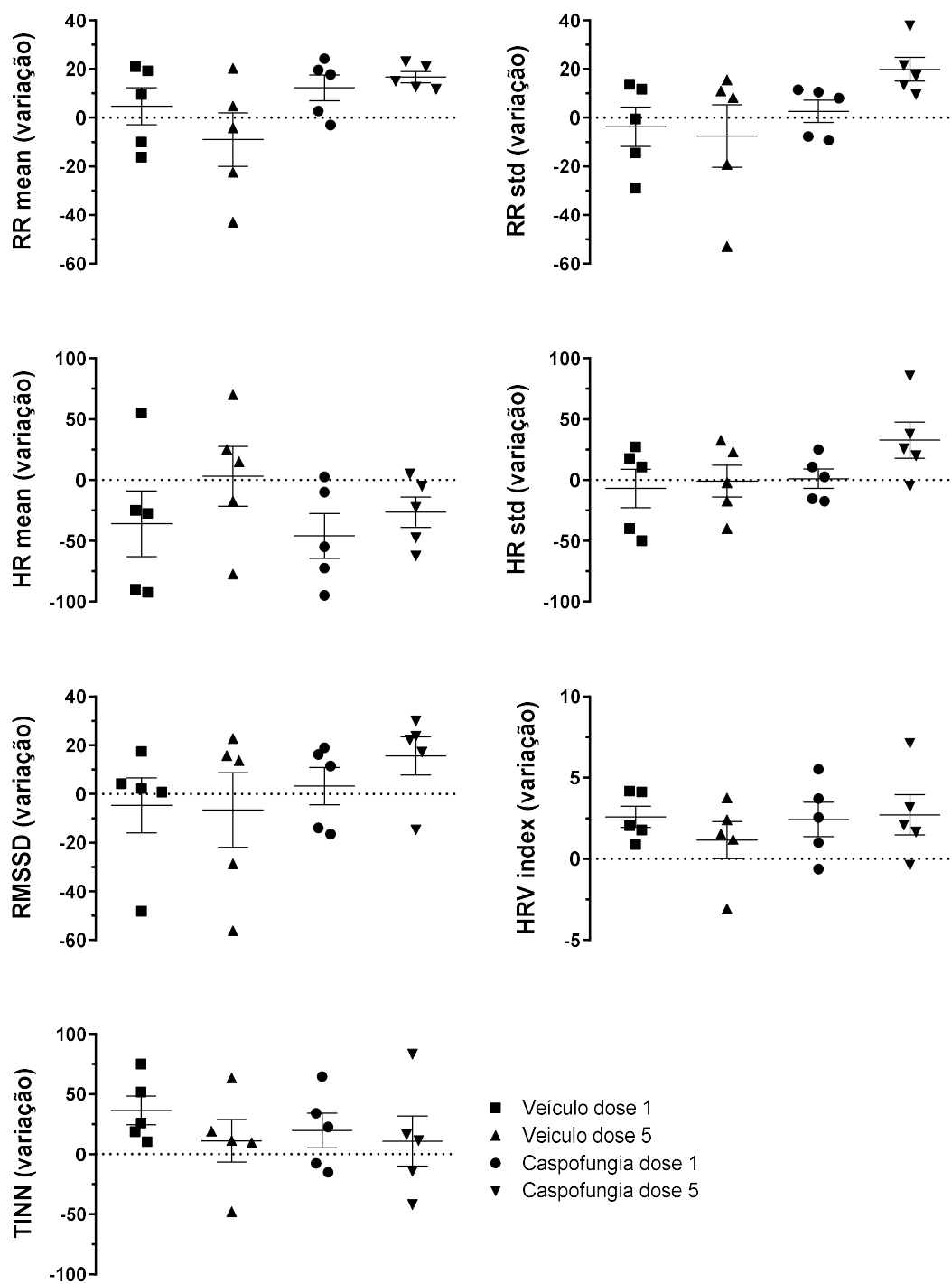


Figura 6.7. Variação dos valores absolutos dos parâmetros da VFC obtidos de registros do ECG por telemetria em 24 horas após primeira (1) e quinta (5) doses de veículo ou caspofungina 10mg/kg.

### 6.4.3. Animais conscientes e não infectados tratados com ciclofosfamida

O tratamento com ciclofosfamida 100 mg/kg IP durante 4 dias, imunossupressor utilizado para facilitar a infecção por *C. albicans*, não induziu alterações nos parâmetros do ECG (tabela 6.8) comparado ao tempo basal e comparado aos animais tratados com veículo, avaliado 24 horas após a primeira e última dose.

Tabela 6.8: Parâmetros do eletrocardiograma (ECG) (média  $\pm$  e.p.m.) dos valores absolutos) mensurados antes (basal) e 24 horas após a 1ª dose e a 4ª dose do tratamento com veículo ou ciclofosfamida 100 mg/kg IP durante 4 dias.

Parâmetros ECG		Veículo (n=6)	Ciclofosfamida (n=7)
Intervalo PR (ms)	Basal	30,9 $\pm$ 0,64	30,1 $\pm$ 0,67
	1ª Dose	30,1 $\pm$ 0,75	29,9 $\pm$ 0,63
	4ª Dose	30,0 $\pm$ 0,79	31,0 $\pm$ 0,52
Intervalo QRS (ms)	Basal	11,0 $\pm$ 0,25	10,4 $\pm$ 0,11
	1ª Dose	11,1 $\pm$ 0,23	10,7 $\pm$ 0,17
	4ª Dose	11,1 $\pm$ 0,15	10,9 $\pm$ 0,15
Intervalo QT (ms)	Basal	29,7 $\pm$ 0,42	29,2 $\pm$ 0,51
	1ª Dose	29,5 $\pm$ 0,75	29,3 $\pm$ 0,37
	4ª Dose	30,0 $\pm$ 0,49	29,9 $\pm$ 0,31
Intervalo QTc (ms)	Basal	65,6 $\pm$ 2,07	64,7 $\pm$ 1,47
	1ª Dose	67,1 $\pm$ 2,08	65,2 $\pm$ 1,41
	4ª Dose	65,6 $\pm$ 1,37	64,5 $\pm$ 1,13
FC (bpm)	Basal	650,5 $\pm$ 38,26	655,5 $\pm$ 18,14
	1ª Dose	704,9 $\pm$ 21,93	667,1 $\pm$ 28,85
	4ª Dose	630,1 $\pm$ 18,12	607,0 $\pm$ 15,90

## 6.5. Discussão

Para avaliação dos efeitos do tratamento com caspofungina sobre os parâmetros do ECG um grupo experimental foi infectado por *C. albicans* como descrito no item 5. Para a infecção dos animais, foi utilizada a ciclofosfamida, um agente alquilante com potente propriedade imunossupressora. A cardiotoxicidade da ciclofosfamida foi relatada em situações de uso crônico (Ogunsanwo *et al.*, 2017) ou na presença de doença cardíaca prévia (Agarwal e Burkart, 2013). No presente estudo, o esquema terapêutico utilizado de ciclofosfamida não foi suficiente para causar alterações cardíacas. Isso demonstra a ausência de interferência do protocolo de infecção, garantindo que quaisquer efeitos que fosse observado seria decorrente da infecção ou do tratamento com a caspofungina.

As alterações causadas no ECG foram observadas nos animais infectados por *C. albicans*, mas não naqueles sem infecção tratados com a caspofungina, indicando a provável segurança desse fármaco. Como as mesmas alterações foram observadas nos animais tratados com veículo, sugerimos que as alterações foram causadas pela infecção. Fairchild *et al.*, (2009) observaram 2 horas após a infecção IP de ratos por *C. albicans* (SC5314) uma bradicardia e uma diminuição da VFC, indicando uma cardiotoxicidade causada pela infecção. A bradicardia induzida foi imediatamente interrompida por administração de atropina, antagonista dos receptores colinérgicos muscarínicos, demonstrando o papel da sinalização eferente vagal nessa resposta. O mecanismo dessas alterações pode ser uma ação direta do fungo causando alterações estruturais dos miócitos levando por sua vez a alterações eletrofisiológicas cardíacas (Fairchild *et al.*, 2009) ou a ação das alterações imunológicas decorrentes da infecção (Tateishi *et al.*, 2007), comprometendo assim a função cardíaca.

No presente estudo foi observado aumento significativo dos intervalos PR e QRS do ECG, 24 horas após o tratamento com caspofungina nos camundongos infectados, porém esta alteração não ocorreu após o tratamento com o veículo. O prolongamento do intervalo PR pode ser um preditor de insuficiência cardíaca e fibrilação ((Holmqvist *et al.*, 2015), indicando disfunção cardíaca (Quintanilla *et al.*, 2017). Como os camundongos infectados tratados com veículo e camundongos não infectados tratados com caspofungina não apresentaram alteração do intervalo PR e QRS, sugerimos que a infecção por *C. albicans* facilitou a ocorrência de toxicidade do fármaco.

Adicionalmente, foi observado um prolongamento dos intervalos QT e QTc em ambos os grupos de animais infectados, tratados com veículo ou caspofungina. A infecção por *C. albicans* pode causar endocardite, caracterizado pela presença no coração das hifas e leveduras do fungo observado histologicamente (Victorio *et al.*, 2017). O crescimento fúngico pode afetar estruturas cardíacas, como miocárdio e pericárdio (Durack e Beeson, 1972), o que pode causar alterações fisiológicas como arritmias (Fairchild *et al.*, 2009). Assim, as alterações observadas parecem ter ocorrido pela presença do fungo no coração, o que foi demonstrado no modelo experimental do presente trabalho, detectado pelo crescimento de *C. albicans* no coração (estudo 1). A endocardite infecciosa pode levar a complicações como acidente vascular cerebral, aneurismas e infartos ou abscessos (Werdan *et al.*, 2014; Sung *et al.*, 2018). O prolongamento dos intervalos QT e do índice QTc são fatores de risco para a morte cardíaca súbita, associado a *TdP*, insuficiência cardíaca e cardiomiopatia hipertrófica (Chan *et al.*, 2007; Isbister e Page, 2013). É fato que estados infecciosos aumentam a predisposição à toxicidade de fármacos, como observado anteriormente por nosso grupo de pesquisa de alterações no ECG de animais infectados por malária e tratados com halofantrina (Leite *et al.*, 2007) ou arteméter (Souza *et al.*, 2018). O ECG é uma importante ferramenta utilizada para a detecção desses efeitos cardiotóxicos causados por fármacos (Farraj *et al.*, 2011).

Para verificar se este aumento de sensibilidade em relação às potenciais alterações induzidas pela caspofungina, associado à infecção seriam de origem de alterações do sistema nervoso autônomo (SNA), a análise da VFC em animais infectados foi inicialmente proposta no presente trabalho, mas não foi realizada pois em experimentos pilotos os animais infectados vieram a óbito na cirurgia de implantação do sensor de ECG por telemetria. Nos animais não infectados a ausência de alterações dos intervalos do ECG foi acompanhada pela ausência significativa de alterações dos parâmetros da VFC. A VFC é uma ferramenta de avaliação do SNA, pois o coração sofre alterações da sua FC pelos ramos simpático e parassimpático (Rassi, 2000). Uma variação da FC ao longo do dia ou de alguma atividade é normal, pois indica a habilidade do coração em responder com equilíbrio entre os sistemas simpático e parassimpático aos estímulos fisiológicos ambientais, bem como em compensar desordens induzidas por doenças (Catai *et al.*, 2002; Rajendra Acharya *et al.*, 2006). Assim, uma redução na VFC pode ser um indicador de adaptação anormal e insuficiente do SNA, o que pode indicar a presença de mau funcionamento fisiológico. Em revisão recente de Shaffer e Ginsberg, (2017), foi descrita a VFC no domínio do tempo considerando intervalos de tempo menores, como registros de 5 minutos como uma boa metodologia para estimar a VFC. Entretanto,



fatores como idade, estado de saúde, condição de medição, podem influenciar mais as medições ultra curtas do que em gravações mais longas. No presente estudo, devido à limitação de uso da bateria dos sensores de telemetria, foram realizados registros de 15 minutos para cada tempo avaliado nos protocolos.

Em nosso estudo não foi observado nenhuma alteração da VFC após a administração da caspofungina, indicando que esse fármaco não causa desequilíbrio do SNA. O presente trabalho é o primeiro a demonstrar a segurança terapêutica da caspofungina sob este aspecto, o que corrobora o seu uso em condições de infecção associadas a alterações de base que já interferem no controle autonômico da função cardíaca (Singh, Lanzarini e Santosh, 2019); (Martinez-Matilla *et al.*, 2019). Além disso, reforça sua segurança de uso em infecções em crianças como revisado recentemente por Tsekoura *et al.*, (2019), que demonstraram eficácia da caspofungina semelhante ao “padrão ouro” anfotericina B com menos efeitos adversos. Essa segurança inclui o sistema cardiovascular, já que não foi relatado nenhum efeito adverso dessa natureza.

As equinocandinas possuem excelente atividade contra a maioria de espécies de *Candida* e contribuem para o arsenal de agentes com toxicidade aparentemente menor em relação aos antifúngicos mais antigos, triazóis (Wang *et al.*, 2015). No entanto, como esses agentes tornaram-se mais amplamente utilizados, principalmente em pacientes de UTI, novas reações adversas, como edema pulmonar (Hindahl e Wilson, 2012), hipotensão grave (Fink *et al.*, 2013), arritmia (FDA, 2013) começaram a ser relatadas. Na base de dados do sistema de notificação de eventos adversos do FDA, são relatados quatro casos que podem refletir o impacto das equinocandinas sobre o sistema cardiovascular: dois relatos de arritmia, taquicardia ventricular e supraventricular (anidulafungina), um de insuficiência cardíaca (anidulafungina) e um de morte súbita cardíaca (caspofungina) (FDA, 2013). Outros casos relataram eventos adversos com a administração dessas equinocandinas. A administração de anidulafungina em paciente de UTI infectado por *C. glabrata* induziu a hipotensão grave e bradicardia cerca de 10 minutos após infusão do fármaco. A estabilidade hemodinâmica foi recuperada após a interrupção imediata da infusão e ressuscitação cardiopulmonar (Fink *et al.*, 2013). Foi observado edema pulmonar instantâneo associado à infusão de anidulafungina. O paciente apresentou tosse espasmódica com falta de ar e aperto no peito e saturação de oxigênio reduzida, por isso o tratamento foi descontinuado e o paciente se recuperou (Hindahl e Wilson, 2012). Já em relato de caso de três pacientes hospitalizados, foram observadas 15 minutos após início da infusão de anidulafungina (dois pacientes) e caspofungina (um paciente) redução da PA, débito

cardíaco e frequência cardíaca (Lichtenstern *et al.*, 2013). Esses efeitos não foram acumulativos durante o tratamento e por isso não houve necessidade de interrupção do mesmo. Em alguns desses casos, os pacientes apresentavam hipertrofia e/ou disfunção ventricular preexistentes (Lichtenstern *et al.*, 2013), o que pode ter contribuído para agravamento da toxicidade das equinocandinas. O uso prévio de medicamentos cardiotoxicos não foi documentado na maioria dos casos, no entanto, uma história ou uso concomitante de algumas substâncias pode exacerbar ainda mais os efeitos cardiotoxicos das equinocandinas, já que existem vários mecanismos possíveis de cardiomiopatia induzida por anfetaminas, antaciclina, antineoplásicos, entre outros (ver revisão Figueredo, 2011). Apesar desses efeitos cardiotoxicos relatados com uso de equinocandinas, Lahmer *et al.* (2015) observaram que a administração de caspofungina em pacientes na UTI foi segura, mesmo nos casos mais graves, avaliado imediatamente e 4 horas após a administração de dose única do fármaco. A caspofungina não provocou alterações significativas nos parâmetros FC e débito cardíaco.

Em nossos estudos, foram avaliados os efeitos da caspofungina 10 mg/kg em dose única nos animais infectados e os efeitos do tratamento completo (5 doses) em camundongos saudáveis e as alterações do ECG observadas não foram suficientes para indicar a sua cardiotoxicidade, como já descrito experimentalmente para a anfotericina B (Butler *et al.*, 1964) e azólicos (Tian *et al.*, 2006). No entanto, na literatura há relatos do efeito deletério da caspofungina em modelos experimentais. A caspofungina foi infundida por 5 minutos em coração isolado de ratos em concentrações de 6-48 µg/ml, concentrações que correspondem à aproximadamente metade até 4 vezes as concentrações alcançadas no sangue após a administração periférica. Essas concentrações foram associadas a uma redução na contratilidade cardíaca e um aumento da FC, efeitos que foram reversíveis após a interrupção da infusão (Stover *et al.*, 2014). Após a incubação com 10 µg/ml de caspofungina, concentração considerada semelhante ao encontrado durante tratamento, foi observado redução da contratilidade de cardiomiócitos isolados de ratos (Arens *et al.*, 2014). Stover e Cleary, (2015) observaram uma diminuição da FC nos animais que receberam caspofungina 6 mg/kg IV, com efeito máximo em aproximadamente 33 minutos após administração. Koch *et al.*, (2016) avaliaram o efeito da infusão de caspofungina por 1 hora em ratos endotoxêmicos, condição que mimetiza pacientes hospitalizados com infecção sistêmica, e observaram uma disfunção cardíaca, com redução do débito cardíaco, da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e da PA. Além disso, foi observado citotoxicidade dose-dependente em cardiomiócitos isolados expostos à caspofungina.

A cardiotoxicidade da caspofungina observada nos estudos anteriores (Arens *et al.*, 2014; Stover *et al.*, 2014; Stover e Cleary, 2015; Koch *et al.*, 2016) foi imediata e pronunciada e os efeitos ocorreram com concentrações representativas do medicamento sérico total após a administração diretamente no coração, em cardiomiócitos ou por via IV, condições que permitem uma maior concentração cardíaca do fármaco. Dessa forma, seria possível levantar a hipótese de que em nosso estudo, modelo *in vivo* com administração da caspofungina IP, ocorreria início mais lento de toxicidade já que esse fármaco é altamente ligado à proteínas plasmáticas (Stone *et al.*, 2002; Stone *et al.*, 2004). No presente estudo, nos tempos avaliados (1, 6, 12, 24, 36 e 48 horas) após administração da caspofungina, não foi possível observar alterações significativas nos parâmetros do ECG analisados nos animais não infectados. Já nos animais infectados por *C. albicans* observamos uma alteração adicional no ECG no grupo que recebeu caspofungina. Em pacientes com infecções fúngicas invasivas, deve-se levar em consideração que os níveis de albumina no soro são frequentemente diminuídos (Comisar *et al.*, 2014), o que poderia aumentar a concentração plasmática do fármaco, agravando assim a disfunção cardíaca, como observado nos animais infectados, no presente trabalho.

Os mecanismos de cardiotoxicidade da caspofungina ainda estão em discussão e necessitam de mais investigação. Inicialmente, suspeitou-se de dano mitocondrial como resultado da análise de corações isolados de ratos por microscopia eletrônica de transmissão após infusão de caspofungina (Stover *et al.*, 2014). No entanto, esses achados não foram capazes de identificar danos mitocondriais no tecido cardíaco ou alteração na atividade enzimática mitocondrial. Recentemente, Koch *et al.*, (2018) observaram que caspofungina modula a liberação de cálcio intracelular em cardiomiócitos mediada por receptor de rianodina, e essa alteração pode ser responsável pela cardiotoxicidade.

O efeito imunomodulador das equinocandinas foi relatado anteriormente em outros estudos e esse efeito pode ser uma possível causa da cardiotoxicidade desses fármacos. Kounis, (2013) observou bradicardia e hipotensão, progredindo para o bloqueio cardíaco fatal, em paciente após uma dose única de 70 mg de infusão IV de caspofungina, causado provavelmente por alteração no sistema imunológico, sendo o motivo da falha cardíaca e hemodinâmica e não um efeito cardiotóxico do fármaco por si só. A caspofungina induziu aumento significativo da liberação de histamina quando incubada na presença de mastócitos humanos de voluntários saudáveis (Cleary *et al.*, 2003). As equinocandinas apresentaram hipersensibilidade imediata e cruzada, sugerindo que a estrutura do peptídeo cíclico dessa classe de antifúngicos seja o local

de reconhecimento dos anticorpos IgE, e consequente, liberação de histamina (Patel *et al.*, 2009). O efeito imunomodulador da caspofungina, induzindo a resposta inflamatória foi capaz de regular positivamente a expressão do receptor toll-like 9 (TLR9) nos neutrófilos polimorfonucleares (Moretti *et al.*, 2012). Recentemente, foi observado que a caspofungina *in vitro* alterou as funções efetoras de neutrófilos polimorfonucleares, prejudicando a degranulação dessas células e a produção de espécies reativas de oxigênio, porém aumentou a fagocitose (Ries *et al.*, 2019).

Os achados clínicos e experimentais mostraram que hipersensibilidade e anafilaxia podem induzir vários tipos de bloqueio cardíaco. Bloqueio cardíaco e isquemia miocárdica foram descritas após reação anafilática durante a anestesia de paciente de 83 anos (Rebet *et al.*, 2008) e bloqueio atrioventricular transitório foi relatado devido à reação anafilática após aplicação de contraste de tomografia computadorizada em uma mulher idosa (Mohamed *et al.*, 2008). Kounis *et al.*, (2011) descreveram uma síndrome que pode causar alterações cardíacas como elevação do segmento ST do ECG, arritmia ou bloqueios cardíacos, consequência do uso de medicamentos ou exposições ambientais associados à ativação de mastócitos, envolvendo células inflamatórias (Kounis *et al.*, 2012). No presente estudo não foi avaliado nenhum parâmetro do sistema imunológico para confirmar se realmente as alterações causadas nos animais infectados poderiam estar ocorrendo devido a algum desequilíbrio do sistema imunitário, sendo exacerbado pela caspofungina na presença do fungo.

Assim, em relação aos seus efeitos cardíacos avaliados no presente estudo, podemos dizer que a caspofungina pode ser considerada um fármaco seguro, já que induziu a leves alterações adicionais dos intervalos PR, QRS e QTc, sem induzir a alterações adicionais do intervalo QT e nem dos parâmetros da VFC, e ainda, não foi capaz de evitar as alterações induzidas pelo fungo.

## 7- Discussão geral

*C. albicans* é considerado um dos fungos oportunistas que mais causa infecção sistêmica (McCarty e Pappas, 2016). Atualmente, a caspofungina é usada clinicamente como uma opção terapêutica no tratamento de candidíase sistêmica e aspergilose (Balkovec *et al.*, 2014). Com base nisso, o primeiro passo de nosso trabalho foi reproduzir a eficácia da caspofungina em modelo de camundongos infectados. Em seguida, a dose de melhor eficácia foi utilizada para a avaliação de seus efeitos cardíacos *in vivo*, em animais infectados pelo fungo *C. albicans* ou não infectados (animais saudáveis). A infecção sistêmica por *C. albicans in vivo* foi obtida usando o inóculo do fungo (SC5314) e tratamento prévio e concomitante com o imunossupressor ciclofosfamida (Berényi *et al.*, 2014), reproduzindo a candidíase humana. O modelo de infecção usado para o tratamento foi apropriado, uma vez que todos os camundongos do grupo controle, tratados com veículo, morreram durante o estudo. O modelo também foi adequado para mostrar a eficácia da caspofungina, como já revisado por Patil e Majumdar (2017). A caspofungina foi capaz de aumentar a sobrevivência dos camundongos, reduziu significativamente UFC nos órgãos avaliados e auxiliou no reestabelecimento do peso dos animais. A medição da perda de peso de camundongos infectados é um marcador de gravidade da doença nos modelos de *C. albicans* (Arendrup *et al.*, 2002). A eficácia da caspofungina observada aqui está de acordo com a baixa resistência de *C. albicans* às equinocandinas (Castanheira *et al.*, 2010). Um estudo farmacocinético da caspofungina (Hajdu *et al.*, 1997) mostrou sua maior concentração nos rins, fígado e baço em comparação aos níveis sanguíneos. No presente trabalho, observamos que a caspofungina foi eficaz em reduzir a presença do fungo nesses órgãos avaliados em relação ao tratamento com veículo (Dimopoulou *et al.*, 2014). A carga fúngica foi significativamente reduzida e a taxa de sobrevivência aumentada como observado em estudos anteriores (Spellberg *et al.*, 2005; Dimopoulou *et al.*, 2014).

Antes de determinar a eficácia *in vivo*, confirmamos se a cepa de *C. albicans* era suscetível à caspofungina. A CIM de caspofungina observada no presente trabalho está de acordo com estudos de vigilância da atividade *in vitro* desse fármaco (Gil-Alonso *et al.*, 2016). Essa avaliação é importante, uma vez que o aumento do uso de fármacos antifúngicos pode induzir alterações na epidemiologia das infecções, além de aparecimento de resistência (Lass-Flörl, 2009).

Como a eficácia da caspofungina foi melhor na dose de 10 mg/kg esta foi escolhida para prosseguir com o estudo de avaliação do efeito cardíaco *in vivo* em animais infectados e não

infectados. Usamos o sinal de ECG em DII obtido em camundongos conscientes em duas condições diferentes, com contenção manual ou por telemetria com livre movimentação, para obter dados da VFC. Os parâmetros do ECG mais relevantes avaliados foram os intervalos QT e QTc, devido à capacidade de medir indiretamente a alteração da atividade elétrica do ventrículo cardíaco, sendo as alterações preditores de arritmias, incluindo *TdP* (Shah *et al.*, 2015).

A infecção por *C. albicans* por si só aumentou os intervalos QT e QTc e, de fato, uma quantidade importante de UFC foi encontrada no coração dos animais infectados. Nossa hipótese é que as alterações cardíacas, como no presente trabalho, são complicações da candidíase cardíaca (Parker, 1980) e esse efeito provavelmente estava relacionado à endocardite infecciosa causada pelo fungo (Victorio *et al.*, 2017). A caspofungina não foi capaz de prevenir as alterações nos intervalos QT e QTc induzidas pela infecção por *C. albicans*, mesmo quando nenhuma UFC foi encontrada no coração dos animais tratados. Podemos hipotetizar que ocorreram alterações estruturais dos miócitos, que por sua vez induziram a um distúrbio de repolarização (Shah *et al.*, 2015) e este não foi reparado até 24 horas após a última dose de caspofungina, apesar do tratamento bem sucedido e da ausência do fungo. O prolongamento do intervalo PR também observado, pode ser um preditor de insuficiência cardíaca e fibrilação atrial (Holmqvist *et al.*, 2015). A caspofungina não piorou as alterações no ECG, um resultado importante deste trabalho para mostrar a segurança desse medicamento, pelo menos no coração, em condições de infecção sistêmica.

Os parâmetros da VFC foram usados aqui para avaliar os efeitos gerais da caspofungina da influência do SNA sobre o sistema cardiovascular (Shaffer e Ginsberg, 2017). No entanto, nenhuma alteração significativa foi observada em nenhum parâmetro analisado, portanto, um possível efeito indireto que influencia o efeito cardíaco após o tratamento com caspofungina não foi detectado, confirmando sua segurança. A cardiotoxicidade não foi observada em camundongos não infectados, mesmo até 48 horas após 5 dias de tratamento. Outro trabalho mostrou segurança da caspofungina, como Lahmer *et al.* (2015), que relataram estabilidade hemodinâmica quando avaliaram índices de resistência e permeabilidade vascular e contratilidade ventricular. Foi observada redução da PA logo após a aplicação da equinocandina em pacientes de UTI, mas com retorno à normalidade após 4 horas.

As equinocandinas foram descritas como menos tóxicas em comparação aos medicamentos de primeira linha para tratar infecções fúngicas, por exemplo, anfotericina B

(Balkovec *et al.*, 2014). Consequentemente, com o maior uso clínico da caspofungina, novos efeitos adversos, incluindo o aumento da toxicidade cardiovascular foram descritos (Fink *et al.*, 2013; Lichtenstern *et al.*, 2013). Experimentalmente, foram observados efeitos da caspofungina como: citotoxicidade dose-dependente em cardiomiócitos isolados (Koch *et al.*, 2015), redução da contratilidade de cardiomiócitos isolados *in vitro* (Arens *et al.*, 2014), além de diminuição da FC em ratos (Stover e Cleary, 2015). Algumas hipóteses sobre a carditoxicidade da caspofungina foram levantadas, como liberação de cálcio intracelular em cardiomiócitos mediada por receptor de rianodina (Koch *et al.*, 2018) e uma reação imunomoduladora (Moretti *et al.*, 2012; Ries *et al.*, 2019).

Nosso trabalho amplia o conhecimento acerca da segurança cardiovascular da caspofungina em um contexto de fármacos antifúngicos com resistência e diversos efeitos adversos. Estas observações contribuem para o uso em pacientes com doença cardiovascular prévia (Singh *et al.*, 2019; Martinez-Matilla *et al.*, 2019) e o uso em crianças, como já relatado em estudo de metanálise realizada por Tsekoura *et al.*, (2019).

## **8- Conclusão**

A partir dos resultados obtidos neste trabalho foi demonstrado a eficácia da caspofungina em um modelo experimental de infecção fúngica sistêmica por *C. albicans* na dose de 10 mg/kg/IP durante cinco dias. A eficácia foi, demonstrada também pela redução da carga fúngica no coração, rins, fígado e baço, aumentando a taxa de sobrevivência dos camundongos.

As análises dos parâmetros extraídos do sinal de ECG na derivação periférica II em camundongos Swiss fêmeas em contenção manual (ECG convencional experimental) mostraram alterações indicativas de toxicidade provocada pela presença do fungo no coração. A caspofungina induziu a leves alterações adicionais dos intervalos PR, QRS e QTc nos animais infectados por *C. albicans*, sem induzir a alterações adicionais do intervalo QT e da FC e ainda, não foi capaz de evitar as alterações induzidas pelo fungo. Na análise dos parâmetros da VFC a partir do sinal de ECG por telemetria em animais não infectados em livre movimentação, não foram observadas alterações significativas do tratamento com a caspofungina (10 mg/kg) em comparação ao tratamento com veículo, indicando sua segurança cardiovascular. Pela primeira vez, foi mostrado o efeito da caspofungina *in vivo* nos parâmetros de ECG do modelo experimental infectado por *C. albicans* e não infectado. A caspofungina pode ser considerada um fármaco relativamente seguro, em relação aos seus efeitos cardíacos avaliados no presente estudo.



## 9- Referências Bibliográficas

ABRUZZO, G. K. *et al.* Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 11, p. 2333–2338, nov. 1997.

AGARWAL, N.; BURKART, T. A. Transient, high-grade atrioventricular block from high-dose cyclophosphamide. **Texas Heart Institute Journal**, v. 40, n. 5, p. 626–627, 2013.

AGGARWAL, A.; SHERAZI, S.; LEVITAN, B.; LAKSHMANADOSS, U.; CHOUDHARY, N.; SHAH, A.; HSI, D. Corrected QT interval as a predictor of mortality in elderly patients with syncope. **Cardiology Journal**, v. 18, n. 4, p. 395–400, 2011.

ANDES, D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 679–697, set. 2006.

ANDES, D.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; BOHRMULLER, J.; MARCHILLO, K.; LEPAK, A. In vivo comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2497–2506, jun. 2010.

ANTUNES, A. G. V.; PASQUALOTTO, A. C.; DIAZ, M. C.; AZEVEDO, P. A. D'; SEVERO, L. C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 239–241, out. 2004.

ARATHOON, E. G.; GOTUZZO, E.; NORIEGA, L. M.; BERMAN, R. S.; DINUBILE, M. J.; SABLE, C. A. Randomized, double-blind, multicenter study of caspofungin versus amphotericin B for treatment of oropharyngeal and esophageal candidiases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 451–457, fev. 2002.

ARENDRUP, M.; HORN, T.; FRIMODT-MØLLER, N. In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. **Infection**, v. 30, n. 5, p. 286–291, out. 2002.

ARENS, C.; UHLE, F.; WOLFF, M.; RÖHRIG, R.; KOCH, C.; SCHULTE, A.; WEITERER, S.; HENRICH, M.; WEIGAND, M. A.; SCHLÜTER, K.-D.; LICHTENSTERN, C. Effects of

echinocandin preparations on adult rat ventricular cardiomyocytes. Preliminary results of an in vitro study. **Der Anaesthetist**, v. 63, n. 2, p. 129–134, fev. 2014.

ASCIOGLU, S.; CHAN, K. A. Utilization and Comparative Effectiveness of Caspofungin and Voriconazole Early after Market Approval in the U.S. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. 7, 2014.

AUBERT, A. E.; SEPS, B.; BECKERS, F. Heart rate variability in athletes. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 33, n. 12, p. 889–919, 2003.

AUTHIER, S. *et al.* The Diplome in Safety Pharmacology (DSP) certification scheme. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, Focused Issue on Safety Pharmacology. v. 75, p. 1–4, 1 set. 2015.

BACHMANN, S. P.; VANDEWALLE, K.; RAMAGE, G.; PATTERSON, T. F.; WICKES, B. L.; GRAYBILL, J. R.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3591–3596, nov. 2002.

BADIEE, P.; AMIRGHOFRAN, A. A.; GHAZI NOUR, M.; SHAFI, M.; NEMATI, M. H. Incidence and outcome of documented fungal endocarditis. **International Cardiovascular Research Journal**, v. 8, n. 4, p. 152–155, dez. 2014.

BAILLARD, C.; MANSIER, P.; ENNEZAT, P. V.; MANGIN, L.; MEDIGUE, C.; SWYNGHEDAUW, B.; CHEVALIER, B. Converting enzyme inhibition normalizes QT interval in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 36, n. 3, p. 350–354, set. 2000.

BALDESBERGER, S. *et al.* Sinus node disease and arrhythmias in the long-term follow-up of former professional cyclists. **European Heart Journal**, v. 29, n. 1, p. 71–78, jan. 2008.

BALKOVEC, J. M.; HUGHES, D. L.; MASUREKAR, P. S.; SABLE, C. A.; SCHWARTZ, R. E.; SINGH, S. B. Discovery and development of first in class antifungal caspofungin (CANCIDAS®)--a case study. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 1, p. 15–34, jan. 2014.

BARCHIESI, F.; ARZENI, D.; CASELLI, F.; SCALISE, G. Primary resistance to flucytosine among clinical isolates of *Candida* spp. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 408–409, mar. 2000.

BARTIZAL, K.; GILL, C. J.; ABRUZZO, G. K.; FLATTERY, A. M.; KONG, L.; SCOTT, P. M.; SMITH, J. G.; LEIGHTON, C. E.; BOUFFARD, A.; DROPINSKI, J. F.; BALKOVEC, J. In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 11, p. 2326–2332, nov. 1997.

BEN-AMI, R.; BERMAN, J.; NOVIKOV, A.; BASH, E.; SHACHOR-MEYOUHAS, Y.; ZAKIN, S.; MAOR, Y.; TARABIA, J.; SCHECHNER, V.; ADLER, A.; FINN, T. Multidrug-Resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, 2017.

BEN-AMI, R.; GARCIA-EFFRON, G.; LEWIS, R. E.; GAMARRA, S.; LEVENTAKOS, K.; PERLIN, D. S.; KONTOYIANNIS, D. P. Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 4, p. 626–635, 15 ago. 2011.

BENJAMIN, D. K.; DRISCOLL, T.; SEIBEL, N. L.; GONZALEZ, C. E.; RODEN, M. M.; KILARU, R.; CLARK, K.; DOWELL, J. A.; SCHRANZ, J.; WALSH, T. J. Safety and pharmacokinetics of intravenous anidulafungin in children with neutropenia at high risk for invasive fungal infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 632–638, fev. 2006.

BERDICHEVSKI, R. H.; LUIS, L. B.; CRESTANA, L.; MANFRO, R. C. Amphotericin B-related nephrotoxicity in low-risk patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p. 94–99, abr. 2006.

BERÉNYI, R.; KOVÁCS, R.; DOMÁN, M.; GESZTELYI, R.; KARDOS, G.; JUHÁSZ, B.; PERLIN, D.; MAJOROS, L. Efficacy of single large doses of caspofungin in a neutropenic murine model against the “psilosis” group. p. 8, [s.d.].

BETTS, R. F. *et al.* A Multicenter, double-blind trial of a high-dose caspofungin treatment regimen versus a standard caspofungin treatment regimen for adult patients with invasive candidiasis. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 48, n. 12, p. 1676–1684, 15 jun. 2009.

BITTENCOURT, M. I.; ROBERTO, P.; BARBOSA, B.; NETO, C. D.; BEDIRIAN, R.; BARBOSA, E. C.; BRASIL, F.; BOMFIM, A. D. S. Original Article. v. 85, p. 388–396, 2005.

BLÁZQUEZ, E. P. Fondo de ojo en el paciente crítico no neutropénico: endoftalmitis candidiásica. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 1, p. 16–19, 1 mar. 2006.

BOUFFARD, F. A.; ZAMBIAS, R. A.; DROPINSKI, J. F.; BALKOVEC, J. M.; HAMMOND, M. L.; ABRUZZO, G. K.; BARTIZAL, K. F.; MARRINAN, J. A.; KURTZ, M. B. Synthesis and Antifungal Activity of Novel Cationic Pneumocandin B Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 222–225, 1 jan. 1994.

BOWLER, W. A.; WEISS, P. J.; HILL, H. E.; HOFFMEISTER, K. A.; FLECK, R. P.; BLACKY, A. R.; OLDFIELD, E. C. Risk of ventricular dysrhythmias during 1-hour infusions of amphotericin B in patients with preserved renal function. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 11, p. 2542–2543, nov. 1992.

BOYCE, M. J.; BAISLEY, K. J.; WARRINGTON, S. J. Pharmacokinetic interaction between domperidone and ketoconazole leads to QT prolongation in healthy volunteers: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study: QT study of domperidone and ketoconazole. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 411–421, mar. 2012.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 19 dez. 2012.

BUTLER, W. T.; BENNETT, J. E.; HILL, G. J. ELECTROCARDIOGRAPHIC AND ELECTROLYTE ABNORMALITIES CAUSED BY AMPHOTERICIN B IN DOG AND MAN. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 116, p. 857–863, set. 1964.

CASTANHEIRA, M.; WOOSLEY, L. N.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Low prevalence of fks1 hot spot 1 mutations in a worldwide collection of *Candida* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2655–2659, jun. 2010.

CATAI, A. M. *et al.* Effects of aerobic exercise training on heart rate variability during wakefulness and sleep and cardiorespiratory responses of young and middle-aged healthy men. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 35, n. 6, p. 741–752, jun. 2002.

CAVERO, I.; CRUMB, W. The use of electrocardiograms in clinical trials: a public discussion of the proposed ICH E14 regulatory guidance. April 11-12, 2005, Bethesda, MD, USA. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 4, n. 4, p. 795–799, jul. 2005.

CAVERO, I.; MESTRE, M.; GUILLON, J. M.; CRUMB, W. Drugs that prolong QT interval as an unwanted effect: assessing their likelihood of inducing hazardous cardiac dysrhythmias. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 1, n. 5, p. 947–973, jul. 2000.

CESAROVIC, N.; JIRKOF, P.; RETTICH, A.; ARRAS, M. Implantation of radiotelemetry transmitters yielding data on ECG, heart rate, core body temperature and activity in free-moving laboratory mice. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 57, 21 nov. 2011.

CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 3, p. 495–544, 1 set. 2008.

CHAMPEROUX, P.; THIREAU, J.; JUDÉ, S.; LAIGOT-BARBÉ, C.; MAURIN, A.; SOLA, M. L.; FOWLER, J. S. L.; RICHARD, S.; LE GUENNEC, J. Y. Short-term variability in QT interval and ventricular arrhythmias induced by dofetilide are dependent on high-frequency autonomic oscillations. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 11, p. 2878–2891, jun. 2015.

CHAN, A.; ISBISTER, G. K.; KIRKPATRICK, C. M. J.; DUFFUL, S. B. Drug-induced QT prolongation and torsades de pointes: evaluation of a QT nomogram. **QJM: monthly journal of the Association of Physicians**, v. 100, n. 10, p. 609–615, out. 2007.

CHANDRASEKAR, P. H.; SOBEL, J. D. Micafungin: a new echinocandin. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 42, n. 8, p. 1171–1178, 15 abr. 2006.

CHAVES, G. M.; CAVALCANTI, M. A. DE Q.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. DOS A.; LOPES, S. L. Model of experimental infection in healthy and immunosuppressed swiss albino mice (*Mus musculus*) using *Candida albicans* strains with different patterns of enzymatic activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 311–315, dez. 2004.

CHAVES, G. M.; CAVALCANTI, M. A. DE Q.; PORTO, A. L. F. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeasts strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 197–202, jul. 2003.

CLEARY, J. D.; HAYMAN, J.; SHERWOOD, J.; LASALA, G. P.; PIAZZA-HEPP, T. Amphotericin B overdose in pediatric patients with associated cardiac arrest. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 27, n. 6, p. 715–719, jun. 1993.

CLEARY, J. D.; SCHWARTZ, M.; ROGERS, P. D.; MESTRAL, J. DE; CHAPMAN, S. W. Effects of Amphotericin B and Caspofungin on Histamine Expression. **Pharmacotherapy**, v. 23, n. 8, p. 966–973, ago. 2003.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F. A.; RICHTMANN, R.; QUEIROZ-TELLES, F. DE; SALLES, M. J. C.; CUNHA, C. A. DA; YASUDA, M. A. S.; MORETTI, M. L.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, maio 2013.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; ALMEIDA MONFARDINI, L. P. DE; CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 570–576, maio 2007.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A. DA; WARNOCK, D.; MORGAN, J.; BRAZILIAN NETWORK CANDIDEMIA STUDY. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, ago. 2006.

COMISAR, W.; SUN, P.; LI, S.; SABLE, C.; SCHWARTZ, M.; BI, S.; CHOW, J.; NGAI, A.; WINCHELL, G.; KARTSONIS, N.; STONE, J. Caspofungin exposure-response relationships in adult patients with mucosal or invasive candidiasis: Clinical Pharmacology in Drug Development. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, v. 3, n. 1, p. 43–50, jan. 2014.

CORNELY, O. A. *et al.* Caspofungin for the treatment of less common forms of invasive candidiasis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 363–369, ago. 2007.

CORNELY, O. A. *et al.* ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients. **Clinical Microbiology and Infection: The**

**Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18 Suppl 7, p. 19–37, dez. 2012.

COSTA, I. C.; FELIPE, I.; GAZIRI, L. C. J. Resposta imune a *Candida albicans* Immune response to *Candida albicans*. **I. C.**, v. 29, n. 1, p. 14, 2008.

COSTA, S. F.; MARINHO, I.; ARAÚJO, E. A.; MANRIQUE, A. E.; MEDEIROS, E. A.; LEVIN, A. S. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. **The Journal of Hospital Infection**, v. 45, n. 1, p. 69–72, maio 2000.

DANAHER, P. J.; CAO, M. K.; ANSTEAD, G. M.; DOLAN, M. J.; DEWITT, C. C. Reversible dilated cardiomyopathy related to amphotericin B therapy. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 115–117, jan. 2004.

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet (London, England)**, v. 362, n. 9390, p. 1142–1151, 4 out. 2003.

DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 36, n. 11, p. 1445–1457, 1 jun. 2003.

DIMOPOULOU, D.; HAMILOS, G.; TZARDI, M.; LEWIS, R. E.; SAMONIS, G.; KONTOYIANNIS, D. P. Anidulafungin versus caspofungin in a mouse model of candidiasis caused by anidulafungin-susceptible *Candida parapsilosis* isolates with different degrees of caspofungin susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 229–236, 2014.

DOMÁN, M.; KOVÁCS, R.; PERLIN, D. S.; KARDOS, G.; GESZTELYI, R.; JUHÁSZ, B.; BOZÓ, A.; MAJOROS, L. Dose escalation studies with caspofungin against *Candida glabrata*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 998–1007, set. 2015.

DURACK, D. T.; BEESON, P. B. Experimental bacterial endocarditis. I. Colonization of a sterile vegetation. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 53, n. 1, p. 44–49, fev. 1972.

EKSI, F.; GAYYURHAN, E. D.; BALCI, I. In vitro susceptibility of *Candida* species to four antifungal agents assessed by the reference broth microdilution method. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 236903, 2013.

ENOCH, D. A.; YANG, H.; ALIYU, S. H.; MICALLEF, C. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1508, p. 17–65, 2017.

ERWIG, L. P.; GOW, N. A. R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 163–176, mar. 2016.

ESCHENAUER, G.; DEPESTEL, D. D.; CARVER, P. L. Comparison of echinocandin antifungals. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 1, p. 71–97, mar. 2007.

FAIRCHILD, K. D.; SAUCERMAN, J. J.; RAYNOR, L. L.; SIVAK, J. A.; XIAO, Y.; LAKE, D. E.; MOORMAN, J. R. Endotoxin depresses heart rate variability in mice: cytokine and steroid effects. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 297, n. 4, p. R1019-1027, out. 2009.

FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K. Z. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. e954-966, nov. 2010.

FARRAJ, A. K.; HAZARI, M. S.; CASCIO, W. E. The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 121, n. 1, p. 11–30, maio 2011.

FELTON, T.; TROKE, P. F.; HOPE, W. W. Tissue penetration of antifungal agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 68–88, jan. 2014.

FERREIRA, M. T.; MESSIAS, M.; VANDERELI, L. C. M.; PASTRE, C. M. Caracterização do Comportamento Caótico da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) em Jovens Saudáveis. **TEMA - Tendências em Matemática Aplicada e Computacional**, v. 11, n. 2, 2010.

FIGUEREDO, V. M. Chemical cardiomyopathies: the negative effects of medications and nonprescribed drugs on the heart. **The American Journal of Medicine**, v. 124, n. 6, p. 480–488, jun. 2011.



FINK, M.; ZERLAUTH, U.; KAULFERSCH, C.; RAB, A.; ALBERER, D.; PREISS, P.; STERNAD-KLOBSCHAUER, K.; HABERNIG, E.; WANDSCHNEIDER, W.; GRIMM, G. A severe case of haemodynamic instability during anidulafungin administration. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 38, n. 3, p. 241–242, jun. 2013.

FISHER, J. F.; SOBEL, J. D.; KAUFFMAN, C. A.; NEWMAN, C. A. Candida urinary tract infections--treatment. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52 Suppl 6, p. S457-466, maio 2011.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186–194, 11 abr. 2012.

FOLDVARI, M.; RADHI, J.; YANG, G.; HE, Z.; RENNIE, R.; WEARLEY, L. Acute vaginal candidosis model in the immunocompromized rat to evaluate delivery systems for antimycotics. **Mycoses**, v. 43, n. 11–12, p. 393–401, 2000.

FRIDERICIA, L. S. Die Systolendauer im Elektrokardiogramm bei normalen Menschen und bei Herzkranken. **Acta Medica Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 469–486, 1920.

GARTH, J. M.; STEELE, C. Innate Lung Defense during Invasive Aspergillosis: New Mechanisms. **Journal of Innate Immunity**, v. 9, n. 3, p. 271–280, 2017.

GIL-ALONSO, S.; JAUREGIZAR, N.; ERASO, E.; QUINDÓS, G. Postantifungal effect of caspofungin against the *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* clades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 2, p. 172–177, out. 2016.

GILLUM, A. M.; TSAY, E. Y.; KIRSCH, D. R. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. **Molecular & general genetics: MGG**, v. 198, n. 2, p. 179–182, 1984.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225–234, jun. 2010.

GODOY, G. DE; WAHAB, S. A.; LIMA, A. L. H. DE; MOREIRA, H. Endoftalmite por *Candida albicans* após transplante penetrante de córnea: relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, n. 2, p. 349–352, abr. 2004.

GONZÁLEZ, G. M.; TIJERINA, R.; NAJVAR, L. K.; BOCANEGRA, R.; LUTHER, M.; RINALDI, M. G.; GRAYBILL, J. R. Correlation between antifungal susceptibilities of *Coccidioides immitis* in vitro and antifungal treatment with caspofungin in a mouse model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 1854–1859, jun. 2001.

GOW, N. A. R.; VEERDONK, F. L. VAN DE; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112–122, fev. 2012.

GRAYBILL, J. R.; NAJVAR, L. K.; MONTALBO, E. M.; BARCHIESI, F. J.; LUTHER, M. F.; RINALDI, M. G. Treatment of histoplasmosis with MK-991 (L-743,872). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 151–153, jan. 1998.

GROLL, A. H.; ATTARBASCHI, A.; SCHUSTER, F. R.; HERZOG, N.; GRIGULL, L.; DWORZAK, M. N.; BEUTEL, K.; LAWS, H.-J.; LEHRNBECHER, T. Treatment with caspofungin in immunocompromised paediatric patients: a multicentre survey. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 527–535, mar. 2006.

GUIMARÃES, J. I. Diretriz de interpretação de eletrocardiograma de repouso. **Arq Bras Cardiol**, v. 80, p. 18, 2003.

HAJDU, R.; THOMPSON, R.; SUNDELOF, J. G.; PELAK, B. A.; BOUFFARD, F. A.; DROPINSKI, J. F.; KROPP, H. Preliminary animal pharmacokinetics of the parenteral antifungal agent MK-0991 (L-743,872). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 11, p. 2339–2344, nov. 1997.

HASSAN, I.; POWELL, G.; SIDHU, M.; HART, W. M.; DENNING, D. W. Excess mortality, length of stay and cost attributable to candidaemia. **The Journal of Infection**, v. 59, n. 5, p. 360–365, nov. 2009.

Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 1043–1065, 1 mar. 1996.

HEDAYATI, M. T. *et al.* In vitro antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from diabetic patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 542–545, ago. 2018.

HINDAHL, C. B.; WILSON, J. W. Flash pulmonary oedema during anidulafungin administration: Flash pulmonary oedema and anidulafungin. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 37, n. 4, p. 491–493, ago. 2012.

HODGES, R. L.; HODGES, D. W.; GOGGANS, K.; XUEI, X.; SKATRUD, P.; MCGILVRAY, D. Genetic modification of an echinocandin B-producing strain of *Aspergillus nidulans* to produce mutants blocked in sterigmatocystin biosynthesis. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 372–381, 1 nov. 1994.

HOLMQVIST, F.; THOMAS, K. L.; BRODERICK, S.; ERSBØLL, M.; SINGH, D.; CHISWELL, K.; SHAW, L. K.; HEGLAND, D. D.; VELAZQUEZ, E. J.; DAUBERT, J. P. Clinical outcome as a function of the PR-interval—there is virtue in moderation: data from the Duke Databank for cardiovascular disease. **Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology**, v. 17, n. 6, p. 978–985, jun. 2015.

ISBISTER, G. K.; PAGE, C. B. Drug induced QT prolongation: the measurement and assessment of the QT interval in clinical practice. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 48–57, jul. 2013.

JONG, A. Y.; CHEN, S. H. M.; STINS, M. F.; KIM, K. S.; TUAN, T.-L.; HUANG, S.-H. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. Pt 8, p. 615–622, ago. 2003.

JONG, A. Y.; STINS, M. F.; HUANG, S. H.; CHEN, S. H.; KIM, K. S. Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4536–4544, jul. 2001.

KARTSONIS, N.; KILLAR, J.; MIXSON, L.; HOE, C.-M.; SABLE, C.; BARTIZAL, K.; MOTYL, M. Caspofungin susceptibility testing of isolates from patients with esophageal

candidiasis or invasive candidiasis: relationship of MIC to treatment outcome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3616–3623, set. 2005.

KEATING, G.; FIGGITT, D. Caspofungin: a review of its use in oesophageal candidiasis, invasive candidiasis and invasive aspergillosis. **Drugs**, v. 63, n. 20, p. 2235–2263, 2003.

KEIRNS, J. *et al.* QT Interval Shortening With Isavuconazole: *In Vitro* and *In Vivo* Effects on Cardiac Repolarization. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 101, n. 6, p. 782–790, jun. 2017.

KIVARIA, F. M.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. A retrospective study of the aetiology and temporal distribution of bovine clinical mastitis in smallholder dairy herds in the Dar es Salaam region of Tanzania. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 173, n. 3, p. 617–622, maio 2007.

KJELLGREN, O.; GOMES, J. A. Heart rate variability and baroreflex sensitivity in myocardial infarction. **American Heart Journal**, v. 125, n. 1, p. 204–215, jan. 1993.

KLIMAS, J.; STANKOVICOVA, T.; KYSELOVIC, J.; BACHAROVA, L. Prolonged QT interval is associated with blood pressure rather than left ventricular mass in spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Hypertension (New York, N.Y.: 1993)**, v. 30, n. 7, p. 475–485, out. 2008.

KMECOVA, J.; KLIMAS, J. Heart rate correction of the QT duration in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, n. 2–3, p. 187–192, 1 set. 2010.

KOCH, C.; JERSCH, J.; SCHNECK, E.; EDINGER, F.; MAXEINER, H.; UHLE, F.; WEIGAND, M. A.; MARKMANN, M.; SANDER, M.; HENRICH, M. Caspofungin Modulates Ryanodine Receptor-Mediated Calcium Release in Human Cardiac Myocytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 11, 2018.

KOCH, C.; UHLE, F.; WOLFF, M.; ARENS, C.; SCHULTE, A.; LI, L.; NIEMANN, B.; HENRICH, M.; ROHRBACH, S.; WEIGAND, M. A.; LICHTENSTERN, C. Cardiac effects of echinocandins after central venous administration in adult rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 1612–1619, mar. 2015a.

\_\_\_\_. Cardiac Effects of Echinocandins after Central Venous Administration in Adult Rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 1612–1619, mar. 2015b.

KOCH, C.; WOLFF, M.; HENRICH, M.; WEIGAND, M. A.; LICHTENSTERN, C.; UHLE, F. Cardiac Effects of Echinocandins in Endotoxemic Rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 301–306, 2016.

KOHNO, S.; IZUMIKAWA, K.; YOSHIDA, M.; TAKESUE, Y.; OKA, S.; KAMEI, K.; MIYAZAKI, Y.; YOSHINARI, T.; KARTSONIS, N. A.; NIKI, Y. A double-blind comparative study of the safety and efficacy of caspofungin versus micafungin in the treatment of candidiasis and aspergillosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 387–397, mar. 2013.

KONG, E. F.; TSUI, C.; KUCHARÍKOVÁ, S.; DIJCK, P. V.; JABRA-RIZK, M. A. Modulation of Staphylococcus aureus Response to Antimicrobials by the Candida albicans Quorum Sensing Molecule Farnesol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 12, 1 dez. 2017.

KOUNIS, N. G. Caspofungin-induced fatal complete heart block: Another manifestation of Kounis syndrome. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 2, p. 161–162, abr. 2013.

KOUNIS, N. G.; GIANNOPOULOS, S.; TSIGKAS, G. G.; GOUDEVENOS, J. Eosinophilic responses to stent implantation and the risk of Kounis hypersensitivity associated coronary syndrome. **International Journal of Cardiology**, v. 156, n. 2, p. 125–132, 19 abr. 2012.

KOUNIS, N. G.; MAZARAKIS, A.; TSIGKAS, G.; GIANNOPOULOS, S.; GOUDEVENOS, J. Kounis syndrome: a new twist on an old disease. **Future Cardiology**, v. 7, n. 6, p. 805–824, nov. 2011.

KOVÁCS, R.; GESZTELYI, R.; BERÉNYI, R.; DOMÁN, M.; KARDOS, G.; JUHÁSZ, B.; MAJOROS, L. Killing rates exerted by caspofungin in 50 % serum and its correlation with in vivo efficacy in a neutropenic murine model against Candida krusei and Candida inconspicua. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. Pt 2, p. 186–194, fev. 2014.

KRAMER, K.; KINTER, L. B. Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. **Physiological Genomics**, v. 13, n. 3, p. 197–205, 13 maio 2003.

KRAUSE, D. S.; SIMJEE, A. E.; RENSBURG, C. VAN; VILJOEN, J.; WALSH, T. J.; GOLDSTEIN, B. P.; WIBLE, M.; HENKEL, T. A randomized, double-blind trial of anidulafungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 39, n. 6, p. 770–775, 15 set. 2004.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 8 out. 2015.

KUSE, E.-R. *et al.* Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. **Lancet (London, England)**, v. 369, n. 9572, p. 1519–1527, 5 maio 2007.

KYRIAKIDIS, I.; TRAGIANNIDIS, A.; MUNCHEN, S.; GROLL, A. H. Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 16, n. 2, p. 149–165, fev. 2017.

LACAZ, C. DA S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 332–332, ago. 1991.

LALITHA, P. *et al.* Antimicrobial susceptibility of Fusarium, Aspergillus, and other filamentous fungi isolated from keratitis. **Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)**, v. 125, n. 6, p. 789–793, jun. 2007.

LAMPING, E.; RANCHOD, A.; NAKAMURA, K.; TYNDALL, J. D. A.; NIIMI, K.; HOLMES, A. R.; NIIMI, M.; CANNON, R. D. Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 354–369, fev. 2009.

LAROSA, C.; SGUEGLIA, G. A.; SESTITO, A.; INFUSINO, F.; NICCOLI, G.; LAMENDOLA, P.; MARIANI, L.; SANTANGELI, P.; LOMBARDO, A.; CREA, F.; LANZA, G. A. Predictors of impaired heart rate variability and clinical outcome in patients

with acute myocardial infarction treated by primary angioplasty. **Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown, Md.)**, v. 9, n. 1, p. 76–80, jan. 2008.

LARREGINA, A.; BARTOLETTI, B.; ROMANO, H.; PANICCIA, L.; POLINI, N. Candidíasis hepatoesplénica en un paciente con leucemia mieloide aguda. **Revista argentina de microbiología**, v. 36, p. 28–30, 1 mar. 2004.

LASS-FLÖRL, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. **Mycoses**, v. 52, n. 3, p. 197–205, maio 2009.

LEITE, E. A.; GRABE-GUIMARÃES, A.; GUIMARÃES, H. N.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V. C. F. Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. **Life Sciences**, v. 80, n. 14, p. 1327–1334, 13 mar. 2007.

LEPAK, A.; ANDES, D. Fungal Sepsis: Optimizing Antifungal Therapy in the Critical Care Setting. **Critical Care Clinics**, v. 27, n. 1, p. 123–147, jan. 2011.

LEROY, O. *et al.* Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 5, p. 1612–1618, maio 2009.

LESTNER, J. M.; ROBERTS, S. A.; MOORE, C. B.; HOWARD, S. J.; DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Toxicodynamics of Itraconazole: Implications for Therapeutic Drug Monitoring. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 928–930, 15 set. 2009.

LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 513–521, mar. 2003.

LICHTENSTERN, C.; WOLFF, M.; ARENS, C.; KLIE, F.; MAJEED, R. W.; HENRICH, M.; UHLE, F.; WEITERER, S.; RÖHRIG, R.; WEIGAND, M. A. Cardiac effects of echinocandin preparations - three case reports. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 38, n. 5, p. 429–431, out. 2013.

LOPERA, D.; ARISTIZABAL, B. H.; RESTREPO, A.; CANO, L. E.; GONZÁLEZ, A. Lysozyme plays a dual role against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 50, n. 3, p. 169–175, jun. 2008.

LOPES, A.; ROCHA, G.; VILAN, A.; GUEDES, M. B.; GUIMARÃES, H. UTILIZAÇÃO COM SUCESSO DE CASPOFUNGINA NA CANDIDÍASE INVASIVA REFRACTÁRIA No Recém-nascido de Extremo Baixo Peso. **Acta Med Port.**, p. 4, [s.d.].

MAERTENS, J. *et al.* Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 39, n. 11, p. 1563–1571, 1 dez. 2004.

MAGILL, S. S.; SHIELDS, C.; SEARS, C. L.; CHOTI, M.; MERZ, W. G. Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 529–535, fev. 2006.

MAIOLO, E. M.; OLIVA, A.; FURUSTRAND TAFIN, U.; PERROTET, N.; BORENS, O.; TRAMPUZ, A. Antifungal activity against planktonic and biofilm *Candida albicans* in an experimental model of foreign-body infection. **The Journal of Infection**, v. 72, n. 3, p. 386–392, mar. 2016.

MARQUIS, G.; MONTPLAISIR, S.; GARZON, S.; STRYKOWSKI, H.; AUGER, P. Fungitoxicity of muramidase. Ultrastructural damage to *Candida albicans*. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 46, n. 6, p. 627–636, jun. 1982.

MARR, K. A.; WHITE, T. C.; BURIK, J. A. VAN; BOWDEN, R. A. Development of fluconazole resistance in *Candida albicans* causing disseminated infection in a patient undergoing marrow transplantation. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 25, n. 4, p. 908–910, out. 1997.

MARRIOTT, D. J. E.; PLAYFORD, E. G.; CHEN, S.; SLAVIN, M.; NGUYEN, Q.; ELLIS, D.; SORRELL, T. C.; AUSTRALIAN CANDIDAEMIA STUDY. Determinants of mortality



in non-neutropenic ICU patients with candidaemia. **Critical Care (London, England)**, v. 13, n. 4, p. R115, 2009.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449–460, out. 2006.

MARTINEZ-MATILLA, M. *et al.* Genetic susceptibility in pharmacodynamic and pharmacokinetic pathways underlying drug-induced arrhythmia and sudden unexplained deaths. **Forensic Science International. Genetics**, v. 42, p. 203–212, 2019.

MASCHMEYER, G.; GLASMACHER, A. Pharmacological properties and clinical efficacy of a recently licensed systemic antifungal, caspofungin. **Mycoses**, v. 48, n. 4, p. 227–234, jul. 2005.

MAXIMOVA, N.; SCHILLANI, G.; SIMEONE, R.; MAESTRO, A.; ZANON, D. Comparison of Efficacy and Safety of Caspofungin Versus Micafungin in Pediatric Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: A Retrospective Analysis. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 5, p. 1184–1199, maio 2017.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103–124, mar. 2016.

MCCORMACK, P. L.; PERRY, C. M. Caspofungin: a review of its use in the treatment of fungal infections. **Drugs**, v. 65, n. 14, p. 2049–2068, 2005.

MELLINGHOFF, S. C.; BASSETTI, M.; DÖRFEL, D.; HAGEL, S.; LEHNERS, N.; PLIS, A.; SCHALK, E.; VENA, A.; CORNELLY, O. A. Isavuconazole shortens the QTc interval. **Mycoses**, v. 61, n. 4, p. 256–260, abr. 2018.

MOHAMED, A.; ANDRADE, J.; BAYLISS, M.; WONG, G. C. Transient 2:1 atrioventricular block following anaphylactic reaction to low-ionic strength computed tomography contrast agent. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 24, n. 12, p. e96-98, dez. 2008.

MORA-DUARTE, J.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; COLOMBO, A. L.; THOMPSON-MOYA, L.; SMIETANA, J.; LUPINACCI, R.; SABLE, C.; KARTSONIS, N.; PERFECT, J. Comparison of Caspofungin and Amphotericin B for Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 2020–2029, 19 dez. 2002.

MORETTI, S.; BOZZA, S.; D'ANGELO, C.; CASAGRANDE, A.; DELLA FAZIA, M. A.; PITZURRA, L.; ROMANI, L.; AVERSA, F. Role of Innate Immune Receptors in Paradoxical Caspofungin Activity *In Vivo* in Preclinical Aspergillosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4268–4276, ago. 2012.

MORGANROTH, J.; LYNESS, W. H.; PERHACH, J. L.; MATHER, G. G.; HARR, J. E.; TRAGER, W. F.; LEVY, R. H.; ROSENBERG, A. Lack of Effect of Azelastine and Ketoconazole Coadministration on Electrocardiographic Parameters in Healthy Volunteers. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 37, n. 11, p. 1065–1072, nov. 1997.

MOSKOVITZ, J. B.; HAYES, B. D.; MARTINEZ, J. P.; MATTU, A.; BRADY, W. J. Electrocardiographic implications of the prolonged QT interval. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 31, n. 5, p. 866–871, maio 2013.

MOSS, A. J.; WILBER, D. J.; BROWN, M. W. Prophylactic Implantation of a Defibrillator in Patients with Myocardial Infarction and Reduced Ejection Fraction. **The New England Journal of Medicine**, p. 7, 2002.

MOYSSAKIS, I.; VASSILAKOPOULOS, T. P.; SIPSAS, N. V.; PERAKIS, A.; PETROU, A.; KOSMAS, N.; PANGALIS, G. A. Reversible dilated cardiomyopathy associated with amphotericin B treatment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 5, p. 444–447, 1 maio 2005.

**Murray - Microbiologia médica 8. ed. — bibicbs.** Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/bibicbs/livros-novos/murray-microbiologia-medica-8.-ed>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

NAGLIK, J. R.; FIDEL, P. L.; ODDS, F. C. Animal models of mucosal *Candida* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 283, n. 2, p. 129–139, 1 jun. 2008.

NETEA, M. G.; BROWN, G. D.; KULLBERG, B. J.; GOW, N. A. R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 67–78, jan. 2008.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 6, n. 3, p. 124–128, jun. 2002.

OGUNSANWO, O. R.; OYAGBEMI, A. A.; OMOBOWALE, T. O.; ASENUGA, E. R.; SABA, A. B. Biochemical and electrocardiographic studies on the beneficial effects of gallic acid in cyclophosphamide-induced cardiorenal dysfunction. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 14, n. 3, 28 jan. 2017.

OLAECHEA, P. M.; PALOMAR, M.; LEÓN-GIL, C.; ALVAREZ-LERMA, F.; JORDÁ, R.; NOLLA-SALAS, J.; LEÓN-REGIDOR, M. A.; EPCAN STUDY GROUP. Economic impact of Candida colonization and Candida infection in the critically ill patient. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 323–330, abr. 2004.

OLIVEIRA, J. C. DE. Diagnóstico Micológico por Imagens. p. 104, [s.d.].

PAGANO, L. *et al.* The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. **Haematologica**, v. 91, n. 8, p. 1068–1075, ago. 2006.

PAPPAS, P. G. *et al.* A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 37, n. 5, p. 634–643, 1 set. 2003.

\_\_\_\_\_. Invasive candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 485–506, set. 2006.

\_\_\_\_\_. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 48, n. 5, p. 503–535, 1 mar. 2009.

\_\_\_\_\_. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 62, n. 4, p. e1-50, 15 fev. 2016.

PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B. J. Invasive candidiasis. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 4, p. 18026, 11 2018.

PARK, S. *et al.* Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3264–3273, ago. 2005.

PARKER, J. C. The potentially lethal problem of cardiac candidosis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 73, n. 3, p. 356–361, mar. 1980.

PATEL, S.; ALANGADEN, G. J.; LUM, L. G.; CRONIN, S. M.; ABIDI, M. H.; DIETERLE, N.; IBRAHIM, R. B. Immediate cross-hypersensitivity between Micafungin and Caspofungin: A case report. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, v. 15, n. 3, p. 187–189, set. 2009.

PATIL, A.; MAJUMDAR, S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1635–1660, dez. 2017.

PECYNA, M. B. The level of intelligence and heart rate variability in men after myocardial infarction. **Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society**, v. 57 Suppl 4, p. 283–287, set. 2006.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical Mycology**, v. 45, n. 4, p. 321–346, jun. 2007.

PERSI, M. A.; BURNHAM, J. C.; DUHRING, J. L. Effects of carbon dioxide and pH on adhesion of *Candida albicans* to vaginal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 50, n. 1, p. 82–90, out. 1985.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; KROEGER, J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 150–156, jan. 2008.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: four years of global surveillance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 760–763, mar. 2006.

PFALLER, M. A.; CHATURVEDI, V.; DIEKEMA, D. J.; GHANNOUM, M. A.; HOLLIDAY, N. M.; KILLIAN, S. B.; KNAPP, C. C.; MESSER, S. A.; MISKOU, A.; RAMANI, R. Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with CLSI microdilution

for antifungal susceptibility testing of the echinocandins against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 365–368, ago. 2012.

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

\_\_\_\_\_. Progress in Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* spp. by Use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods, 2010 to 2012. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2846–2856, 1 set. 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; ANDES, D.; ARENDRUP, M. C.; BROWN, S. D.; LOCKHART, S. R.; MOTYL, M.; PERLIN, D. S. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: Integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 3, p. 164–176, jun. 2011.

PITARCH, A.; DÍEZ-OREJAS, R.; MOLERO, G.; PARDO, M.; SÁNCHEZ, M.; GIL, C.; NOMBELA, C. Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. **Proteomics**, v. 1, n. 4, p. 550–559, abr. 2001.

**Protocolos Clínicos - Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais - FHEMIG.** Disponível em: <<http://www.fhemig.mg.gov.br/aceso-rapido/protocolos-clinicos>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

PRÜFER, S.; WEBER, M.; STEIN, P.; BOSMANN, M.; STASSEN, M.; KREFT, A.; SCHILD, H.; RADSAK, M. P. Oxidative burst and neutrophil elastase contribute to clearance of *Aspergillus fumigatus* pneumonia in mice. **Immunobiology**, v. 219, n. 2, p. 87–96, fev. 2014.

PUMESAT, P.; MUANGKAEW, W.; AMPAWONG, S.; LUPLERTLOP, N. *Candida albicans* biofilm development under increased temperature. **The New Microbiologica**, v. 40, n. 4, p. 279–283, out. 2017.

QI, Q. G.; HU, T.; ZHOU, X. D. Frequency, species and molecular characterization of oral *Candida* in hosts of different age in China. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 34, n. 6, p. 352–356, jul. 2005.

QUINTANILLA, J. G. *et al.* QRS duration reflects underlying changes in conduction velocity during increased intraventricular pressure and heart failure. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 130, n. Pt B, p. 394–403, 2017.

RAJENDRA ACHARYA, U.; PAUL JOSEPH, K.; KANNATHAL, N.; LIM, C. M.; SURI, J. S. Heart rate variability: a review. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 44, n. 12, p. 1031–1051, dez. 2006.

RASSI, A. Compreendendo melhor as medidas de análise da variabilidade da frequência cardíaca. **J Diag Cardiol**, v. 8, 1 jan. 2000.

RAVENSWAAIJ-ARTS, C. M. VAN; KOLLÉE, L. A.; HOPMAN, J. C.; STOELINGA, G. B.; GEIJN, H. P. VAN. Heart rate variability. **Annals of Internal Medicine**, v. 118, n. 6, p. 436–447, 15 mar. 1993.

REBET, O.; LECLERC, C.; SILLARD, B.; BARTHÉLÉMY, S.; LAROCHE, D.; VERGNAUD, M.-C. [Complete heart block and myocardial ischaemia during a severe anaphylactic reaction]. **Annales Francaises D'anesthesie Et De Reanimation**, v. 27, n. 12, p. 1026–1029, dez. 2008.

RIES, F.; ALFLEN, A.; ARANDA LOPEZ, P.; BECKERT, H.; THEOBALD, M.; SCHILD, H.; TESCHNER, D.; RADSAK, M. P. Antifungal Drugs Influence Neutrophil Effector Functions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 6, p. e02409-18, /aac/63/6/AAC.02409-18.atom, 25 mar. 2019.

ROBERT, M.; SALVÀ, M.; SEGARRA, R.; PAVESI, M.; ESBRI, R.; ROBERTS, D.; GOLOR, G. The Prokinetic Cinitapride Has No Clinically Relevant Pharmacokinetic Interaction and Effect on QT during Coadministration with Ketoconazole. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 7, p. 1149–1156, jul. 2007.

RODRÍGUEZ, V. E.; FREULER, C. B.; EZCURRA, C.; DURLACH, R. A. [Acute cholecystitis and biliary tract infections due to Candida]. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 24, n. 2, p. 152–154, jun. 2007.

ROSA, L. P.; SILVA, F. C. DA; VIANA, M. S.; MEIRA, G. A. In vitro effectiveness of 455-nm blue LED to reduce the load of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* biofilms in compact bone tissue. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 1, p. 27–32, jan. 2016.

- SABLE, C. A.; NGUYEN, B.-Y. T.; CHODAKEWITZ, J. A.; DINUBILE, M. J. Safety and tolerability of caspofungin acetate in the treatment of fungal infections. **Transplant Infectious Disease: An Official Journal of the Transplantation Society**, v. 4, n. 1, p. 25–30, mar. 2002.
- SAVILLE, S. P.; LAZZELL, A. L.; MONTEAGUDO, C.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Engineered Control of Cell Morphology In Vivo Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida albicans* during Infection. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 1053–1060, out. 2003.
- SENET, J. M. Risk factors and physiopathology of candidiasis. **Revista Iberoamericana De Micologia**, v. 14, n. 1, p. 6–13, mar. 1997.
- SHAFFER, F.; GINSBERG, J. P. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. **Frontiers in Public Health**, v. 5, p. 258, 2017.
- SHAH, R. R.; MORGANROTH, J.; KLEIMAN, R. B. ICH E14 Q&A(R2) document: commentary on the further updated recommendations on thorough QT studies. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 79, n. 3, p. 456–464, mar. 2015.
- SILVA DANTAS, A. DA; LEE, K. K.; RAZIUNAITE, I.; SCHAEFER, K.; WAGENER, J.; YADAV, B.; GOW, N. A. Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 111–118, dez. 2016.
- SINGH, J.; LANZARINI, E.; SANTOSH, P. Autonomic dysfunction and sudden death in patients with Rett syndrome: a systematic review. **Journal of psychiatry & neuroscience: JPN**, v. 45, n. 1, p. 190033, 8 nov. 2019.
- SIPSAS, N. V.; LEWIS, R. E.; TARRAND, J.; HACHEM, R.; ROLSTON, K. V.; RAAD, I. I.; KONTOYIANNIS, D. P. Candidemia in patients with hematologic malignancies in the era of new antifungal agents (2001-2007): stable incidence but changing epidemiology of a still frequently lethal infection. **Cancer**, v. 115, n. 20, p. 4745–4752, 15 out. 2009.
- SOFAIR, A. N.; LYON, G. M.; HUIE-WHITE, S.; REISS, E.; HARRISON, L. H.; SANZA, L. T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; FRIDKIN, S. K. Epidemiology of community-onset candidemia in Connecticut and Maryland. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 43, n. 1, p. 32–39, 1 jul. 2006.

- SOLL, D. R. The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*. **Journal of Oral Microbiology**, v. 6, 15 jan. 2014.
- SOUZA, A. C. M.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SILVEIRA, A. P. A.; ANTUNES, L. R.; RICHARD, S.; GUIMARÃES, H. N.; GRABE-GUIMARÃES, A. Reduced cardiotoxicity and increased oral efficacy of artemether polymeric nanocapsules in *Plasmodium berghei*-infected mice. **Parasitology**, v. 145, n. 8, p. 1075–1083, 2018.
- SPELLBERG, B.; IBRAHIM, A. S.; EDWARDS, J. E.; FILLER, S. G. Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 2, p. 336–343, 15 jul. 2005.
- SPILIOPOULOU, A.; DIMITRIOU, G.; JELASTOPULU, E.; GIANNAKOPOULOS, I.; ANASTASSIOU, E. D.; CHRISTOFIDOU, M. Neonatal intensive care unit candidemia: epidemiology, risk factors, outcome, and critical review of published case series. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4, p. 219–228, abr. 2012.
- SPREGHINI, E.; ORLANDO, F.; TAVANTI, A.; SENESI, S.; GIANNINI, D.; MANSO, E.; BARCHIESI, F. In vitro and in vivo effects of echinocandins against *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2195–2202, set. 2012.
- STEIN, P. K.; BOSNER, M. S.; KLEIGER, R. E.; CONGER, B. M. Heart rate variability: A measure of cardiac autonomic tone. **American Heart Journal**, v. 127, n. 5, p. 1376–1381, maio 1994.
- STONE, J. A. *et al.* Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 739–745, mar. 2002.
- \_\_\_\_\_. Disposition of caspofungin: role of distribution in determining pharmacokinetics in plasma. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 815–823, mar. 2004.
- STOVER, K. R.; CLEARY, J. D. Cardiac response to centrally administered echinocandin antifungals: Echinocandin cardiac response. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 9, p. 1279–1283, set. 2015.



STOVER, K. R.; FARLEY, J. M.; KYLE, P. B.; CLEARY, J. D. Cardiac toxicity of some echinocandin antifungals. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 13, n. 1, p. 5–14, jan. 2014.

STOVER, K. R.; KING, S. T.; CLEARY, J. D. Cardiac toxicity of the echinocandins: chance or cause and effect association? **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 39, n. 1, p. 1–3, fev. 2014.

SUCHER, A. J.; CHAHINE, E. B.; BALCER, H. E. Echinocandins: the newest class of antifungals. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 43, n. 10, p. 1647–1657, out. 2009.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 737–748, 16 ago. 2011.

SUNG, J.; PEREZ, I. E.; FEINSTEIN, A.; STEIN, D. K. A case report of purulent pericarditis caused by *Candida albicans*: Delayed complication forty-years after esophageal surgery. **Medicine**, v. 97, n. 28, p. e11286, jul. 2018.

SWAMINATHAN, P. D. *et al.* Oxidized CaMKII causes cardiac sinus node dysfunction in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 8, p. 3277–3288, ago. 2011.

TATEISHI, Y.; ODA, S.; NAKAMURA, M.; WATANABE, K.; KUWAKI, T.; MORIGUCHI, T.; HIRASAWA, H. Depressed heart rate variability is associated with high IL-6 blood level and decline in the blood pressure in septic patients. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 28, n. 5, p. 549–553, nov. 2007.

TESTONI, D.; SMITH, P. B.; BENJAMIN, D. K. The Use of Antifungal Therapy in Neonatal Intensive Care. **Clinics in Perinatology**, v. 39, n. 1, p. 83–98, mar. 2012.

THALER, F.; BERNARD, B.; TOD, M.; JEDYNAK, C. P.; PETITJEAN, O.; DEROME, P.; LOIRAT, P. Fluconazole penetration in cerebral parenchyma in humans at steady state. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 5, p. 1154–1156, maio 1995.

THIREAU, J.; ZHANG, B. L.; POISSON, D.; BABUTY, D. Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 1, p. 83–94, 2008.

THURSKY, K. A.; PLAYFORD, E. G.; SEYMOUR, J. F.; SORRELL, T. C.; ELLIS, D. H.; GUY, S. D.; GILROY, N.; CHU, J.; SHAW, D. R. Recommendations for the treatment of established fungal infections. **Internal Medicine Journal**, v. 38, n. 6b, p. 496–520, jun. 2008.

TIAN, M.; DONG, M.-Q.; CHIU, S.-W.; LAU, C.-P.; LI, G.-R. Effects of the antifungal antibiotic clotrimazole on human cardiac repolarization potassium currents. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 3, p. 289–297, fev. 2006.

TILL, J. W. O. VAN; MODDERMAN, P. W.; BOER, M. DE; HART, M. H. L.; BELD, M. G. H. M.; BOERMEESTER, M. A. Mannose-binding lectin deficiency facilitates abdominal *Candida* infections in patients with secondary peritonitis. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 15, n. 1, p. 65–70, jan. 2008.

TOD, M.; LORTHOLARY, O.; PADOIN AND, C.; CHAINE, G. Intravitreal penetration of fluconazole during endophthalmitis. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 379A, jun. 1997.

TOMISHIMA, M.; OHKI, H.; YAMADA, A.; TAKASUGI, H.; MAKI, K.; TAWARA, S.; TANAKA, H. FK463, a Novel Water-soluble Echinocandin Lipopeptide. Synthesis and Antifungal Activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 52, n. 7, p. 674–676, 1999.

TSEKOURA, M.; IOANNIDOU, M.; PANA, Z.-D.; HAIDICH, A.-B.; ANTACHOPOULOS, C.; IOSIFIDIS, E.; KOLIOS, G.; ROILIDES, E. Efficacy and Safety of Echinocandins for the Treatment of Invasive Candidiasis in Children: A Meta-analysis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2019.

TURNIDGE, J.; PATERSON, D. L. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 391–408, table of contents, jul. 2007.

UTZ, J. P. Flucytosine. **The New England Journal of Medicine**, v. 286, n. 14, p. 777–778, 6 abr. 1972.

VANDERLEI, L. C. M.; PASTRE, C. M.; HOSHI, R. A.; CARVALHO, T. D. DE; GODOY, M. F. DE. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 24, n. 2, p. 205–217, jun. 2009.

VAZQUEZ, J. A. Anidulafungin: a new echinocandin with a novel profile. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 657–673, jun. 2005.

VERMITSKY, J.-P.; EDLIND, T. D. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3773–3781, out. 2004.

VICTORIO, G. B.; BOURDON, L. M. B.; BENAVIDES, L. G.; HUERTA-OLVERA, S. G.; PLASCENCIA, A.; VILLANUEVA, J.; MARTINEZ-LOPEZ, E.; HERNÁNDEZ-CAÑAVERAL, I. I. Antifungal activity of caspofungin in experimental infective endocarditis caused by *Candida albicans*. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 5, p. 370–375, maio 2017.

VILLANUEVA, A.; ARATHOON, E. G.; GOTUZZO, E.; BERMAN, R. S.; DINUBILE, M. J.; SABLE, C. A. A randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin for the treatment of candidal esophagitis. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 33, n. 9, p. 1529–1535, 1 nov. 2001.

VILLANUEVA, A.; GOTUZZO, E.; ARATHOON, E. G.; NORIEGA, L. M.; KARTSONIS, N. A.; LUPINACCI, R. J.; SMIETANA, J. M.; DINUBILE, M. J.; SABLE, C. A. A randomized double-blind study of caspofungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 4, p. 294–299, set. 2002.

VINCENT, J.-L. *et al.* International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **JAMA**, v. 302, n. 21, p. 2323–2329, 2 dez. 2009.

WÄCHTLER, B.; WILSON, D.; HAEDICKE, K.; DALLE, F.; HUBE, B. From Attachment to Damage: Defined Genes of *Candida albicans* Mediate Adhesion, Invasion and Damage during Interaction with Oral Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17046, 23 fev. 2011.

WALSH, T. J. *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 3, p. 327–360, 1 fev. 2008.

WALSH, T. J.; TEPLER, H.; DONOWITZ, G. R.; MAERTENS, J. A.; BADEN, L. R.; DMOZYNSKA, A.; CORNELLY, O. A.; BOURQUE, M. R.; LUPINACCI, R. J.; SABLE, C. A.; DEPAUW, B. E. Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 14, p. 1391–1402, 30 set. 2004.

WANG, J.-F.; XUE, Y.; ZHU, X.-B.; FAN, H. Efficacy and safety of echinocandins versus triazoles for the prophylaxis and treatment of fungal infections: a meta-analysis of RCTs. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 651–659, abr. 2015.

WANG, Y.-C.; TSAI, I.-C.; LIN, C.; HSIEH, W.-P.; LAN, C.-Y.; CHUANG, Y.-J.; CHEN, B.-S. Essential Functional Modules for Pathogenic and Defensive Mechanisms in *Candida albicans* Infections. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–15, 2014.

WATANABE, S. *et al.* Simultaneous heart rate variability monitoring enhances the predictive value of flow-mediated dilation in ischemic heart disease. **Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society**, v. 77, n. 4, p. 1018–1025, 2013.

WERDAN, K.; DIETZ, S.; LÖFFLER, B.; NIEMANN, S.; BUSHNAQ, H.; SILBER, R.-E.; PETERS, G.; MÜLLER-WERDAN, U. Mechanisms of infective endocarditis: pathogen-host interaction and risk states. **Nature Reviews. Cardiology**, v. 11, n. 1, p. 35–50, jan. 2014.

WET, N. DE; LLANOS-CUENTAS, A.; SULEIMAN, J.; BARALDI, E.; KRANTZ, E. F.; DELLA NEGRA, M.; DIEKMANN-BERNDT, H. A randomized, double-blind, parallel-group, dose-response study of micafungin compared with fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis in HIV-positive patients. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 39, n. 6, p. 842–849, 15 set. 2004.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 39, n. 3, p. 309–317, 1 ago. 2004.

XIANG, M.-J.; LIU, J.-Y.; NI, P.-H.; WANG, S.; SHI, C.; WEI, B.; NI, Y.-X.; GE, H.-L. Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **FEMS yeast research**, v. 13, n. 4, p. 386–393, jun. 2013.

YANG, Y.-L.; LI, S.-Y.; CHENG, H.-H.; LO, H.-J.; TSARY HOSPITALS. The trend of susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species from 1999 to 2002 in Taiwan. **BMC infectious diseases**, v. 5, p. 99, 3 nov. 2005.

ZILBERBERG, M. D.; SHORR, A. F. Fungal infections in the ICU. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 625–642, set. 2009.

## ***10- Anexos***

### **10.1. ECG de animais não infectados e anestesiados**

Para a avaliação dos efeitos cardíacos da caspofungina em animais não infectados, os animais foram tratados com a dose 10 mg/kg por via IP durante 5 dias. Os animais foram anestesiados e tiveram os registros do ECG obtidos antes do início do tratamento e 48 horas após o final do tratamento (tabela I). O grupo controle recebeu veículo nas mesmas condições. Os resultados em valores absolutos dos intervalos do ECG mensurados estão apresentados na tabela abaixo. Os intervalos do ECG são expressos como valores absolutos (média  $\pm$  erro padrão da média) em segundos (s) ou milissegundos (ms). Este procedimento foi realizado para verificar se o estresse produzido pela contenção dos camundongos para o registro do ECG produziu alteração dos intervalos do ECG.

Para os animais tratados com caspofungina não foram observadas alterações dos parâmetros avaliados em 48 horas após o final do tratamento comparado aos valores antes do tratamento, assim como não houve diferenças significativas para os animais tratados apenas com veículo. Assim, os resultados mostram que o tratamento com a caspofungina na dose eficaz avaliada, não altera os parâmetros do ECG avaliados 48 horas após o final do tratamento. Os valores encontrados aqui também não foram diferentes daqueles apresentados no capítulo 3 para os animais conscientes.

Tabela I: Parâmetros do eletrocardiograma (ECG) (média  $\pm$  e.p.m.) dos valores absolutos) mensurados antes (basal) e 48 horas após o tratamento com caspofungina 10 mg/kg IP durante 5 dias ou veículo.

<b>Parâmetros ECG</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Veículo (n=6)</b>	<b>Caspofungina (n=5)</b>
<b>Intervalo PR (ms)</b>	<b>0</b>	39,1 $\pm$ 0,79	41,3 $\pm$ 1,88
	<b>48</b>	40,6 $\pm$ 0,88	42,8 $\pm$ 1,45
<b>Intervalo QRS (ms)</b>	<b>0</b>	14,0 $\pm$ 0,31	13,8 $\pm$ 0,45
	<b>48</b>	14,8 $\pm$ 0,22	14,3 $\pm$ 0,50
<b>Intervalo QT (ms)</b>	<b>0</b>	37,8 $\pm$ 0,63	40,6 $\pm$ 2,50
	<b>48</b>	37,8 $\pm$ 0,73	41,2 $\pm$ 2,10
<b>Intervalo QTc (ms)</b>	<b>0</b>	66,8 $\pm$ 0,83	66,7 $\pm$ 3,20
	<b>48</b>	59,8 $\pm$ 0,99	71,5 $\pm$ 5,80
<b>FC (bpm)</b>	<b>0</b>	334,0 $\pm$ 17,50	271,0 $\pm$ 16,80
	<b>48</b>	241,0 $\pm$ 21,80	316,0 $\pm$ 38,90

## 10.2. ECG de animais não infectados e conscientes tratados com doses múltiplas de caspofungina (protocolo B)

Tabela II. Intervalos PR, QRS, QT e QTc (média  $\pm$  e.p.m) do ECG de camundongos não infectados e conscientes. Valores absolutos mensurados antes do início do tratamento (basal) dos animais do grupo veículo ou caspofungina 10 mg/kg.

Parâmetros ECG		Tempo (h)	Veículo (n=6)	Caspofungina (n=4)
<b>Intervalo PR (ms)</b>	<b>Basal</b>	<b>1</b>	29,2 $\pm$ 0,44	28,8 $\pm$ 0,32
		<b>6</b>	29,7 $\pm$ 0,48	29,3 $\pm$ 0,48
		<b>12</b>	29,6 $\pm$ 0,35	29,3 $\pm$ 0,48
		<b>24</b>	29,4 $\pm$ 0,43	28,8 $\pm$ 0,12
<b>Intervalo QRS (ms)</b>	<b>Basal</b>	<b>1</b>	11,8 $\pm$ 0,28	12,3 $\pm$ 0,18
		<b>6</b>	11,9 $\pm$ 0,27	12,6 $\pm$ 0,14
		<b>12</b>	11,8 $\pm$ 0,32	11,3 $\pm$ 0,22
		<b>24</b>	11,7 $\pm$ 0,26	12,0 $\pm$ 0,34
<b>Intervalo QT (ms)</b>	<b>Basal</b>	<b>1</b>	30,3 $\pm$ 0,52	30,3 $\pm$ 1,5
		<b>6</b>	30,1 $\pm$ 0,26	30,9 $\pm$ 0,38
		<b>12</b>	30,5 $\pm$ 0,32	30,1 $\pm$ 0,59
		<b>24</b>	30,0 $\pm$ 0,46	30,5 $\pm$ 0,97
<b>Intervalo QTc (ms)</b>	<b>Basal</b>	<b>1</b>	71,3 $\pm$ 1,32	70,5 $\pm$ 2,28
		<b>6</b>	70,2 $\pm$ 0,48	70,8 $\pm$ 0,92
		<b>12</b>	71,9 $\pm$ 0,96	70,4 $\pm$ 1,61
		<b>24</b>	70,7 $\pm$ 1,21	71,4 $\pm$ 2,63



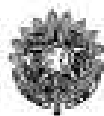
Tabela III: FC (média  $\pm$  e.p.m) de camundongos não infectados e conscientes. Valores absolutos mensurados antes do início do tratamento (basal) dos grupos veículo e caspofungina 10 mg/kg.

Parâmetros ECG	Tempo (h)	Veículo (n=6)	Caspofungina (n=4)	
FC (bpm)	Basal	1	775,4 $\pm$ 14,60	758,5 $\pm$ 11,30
		6	761,0 $\pm$ 5,76	724,0 $\pm$ 18,20
		12	787,4 $\pm$ 13,20	766,2 $\pm$ 15,70
		24	785,8 $\pm$ 19,30	769,2 $\pm$ 15,00
	1ª Dose	1	792,2 $\pm$ 9,51	749,0 $\pm$ 19,40
		6	755,9 $\pm$ 16,30	744,2 $\pm$ 19,20
		12	787,4 $\pm$ 12,20	748,2 $\pm$ 18,10
		24	789,3 $\pm$ 15,70	767,7 $\pm$ 12,00
	3ª Dose	24	783,6 $\pm$ 9,57	767,9 $\pm$ 11,70
	5ª Dose	1	766,9 $\pm$ 18,80	753,1 $\pm$ 21,50
		6	757,1 $\pm$ 20,40	741,6 $\pm$ 18,00
		12	771,4 $\pm$ 9,47	777,6 $\pm$ 6,50
		24	775,7 $\pm$ 7,24	768,0 $\pm$ 3,80
		36	788,5 $\pm$ 11,30	763,2 $\pm$ 28,00
		48	778,6 $\pm$ 7,46	751,4 $\pm$ 20,90

Tabela IV: Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo mensurados pelo ECG por telemetria (média  $\pm$  e.p.m) dos valores absolutos antes do início do tratamento (basal) dos grupos veículo e caspofungina 10 mg/kg.

Parâmetros		Tempo (h)	Veículo (n=5)	Caspofungina (n=5)
$\overline{RR}$ (ms)	Basal	1	150,8 $\pm$ 13,30	124,0 $\pm$ 9,52
		6	150,8 $\pm$ 13,30	134,4 $\pm$ 6,80
		12	156,2 $\pm$ 12,50	133,0 $\pm$ 5,77
		24	120,8 $\pm$ 6,51	126,3 $\pm$ 9,65
SDNN (ms)	Basal	1	75,6 $\pm$ 24,97	50,4 $\pm$ 8,66
		6	63,8 $\pm$ 10,56	54,8 $\pm$ 4,53
		12	76,2 $\pm$ 12,94	58,2 $\pm$ 5,96
		24	49,6 $\pm$ 5,49	50,6 $\pm$ 6,11
HR mean	Basal	1	592,0 $\pm$ 28,18	556,0 $\pm$ 44,23
		6	472,0 $\pm$ 35,41	520,0 $\pm$ 29,98
		12	470,0 $\pm$ 24,29	526,0 $\pm$ 16,31
		24	574,0 $\pm$ 27,86	552,0 $\pm$ 43,63
HR SD	Basal	1	151,8 $\pm$ 29,35	220,0 $\pm$ 31,14
		6	184,0 $\pm$ 23,58	155,0 $\pm$ 35,3
		12	186,0 $\pm$ 23,37	174,0 $\pm$ 16,91
		24	153,2 $\pm$ 31,35	192,0 $\pm$ 23,11
RMSSD (ms)	Basal	1	99,8 $\pm$ 27,83	71,8 $\pm$ 13,15
		6	87,2 $\pm$ 15,73	80,0 $\pm$ 7,66
		12	102,8 $\pm$ 14,63	82,8 $\pm$ 7,39
		24	72,6 $\pm$ 8,23	72,6 $\pm$ 10,15
TINN (ms)	Basal	1	76,9 $\pm$ 34,30	54,6 $\pm$ 11,48
		6	50,82 $\pm$ 10,26	101,0 $\pm$ 36,40
		12	72,1 $\pm$ 31,19	111,6 $\pm$ 37,09
		24	70,86 $\pm$ 18,39	80,5 $\pm$ 22,90
HRV index	Basal	1	6,2 $\pm$ 2,15	5,5 $\pm$ 1,24
		6	5,6 $\pm$ 1,36	8,5 $\pm$ 2,00
		12	6,5 $\pm$ 1,65	8,3 $\pm$ 2,23
		24	5,9 $\pm$ 1,36	6,3 $\pm$ 1,47

### 10.3. Certificado de aprovação CEUA



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Monte do Cruzeiro - ICED-1, Sala 20  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone: (31) 3559-1388 Fax: (31) 3559-1370  
E-mail: [comissao@ufop.br](mailto:comissao@ufop.br)



#### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2014/37, intitulado "Antifúngico caspofungina veiculada em nanocarreadores administrada em camundongos Swiss", que tem como responsável a Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP.

Este certificado expira em 04/02/2017.

Ouro Preto, 4 de novembro de 2014.

**Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima**  
Coordenador da CEUA/UFOP