



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

**Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da
nitroglicerina e da lidocaína, isoladas e em
associação.**

Ana Rita Moça Ramos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Ciclo de Estudos Integrado)

Orientador: Professor Doutor José Martinez de Oliveira
Co-orientadora: Dr^a Ana Palmeira de Oliveira

Covilhã, 3 de Junho de 2011

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as mães que amamentam e a todas aquelas que gostariam de o poder fazer.

Agradecimentos

... ao Professor Doutor José Martinez de Oliveira por todo o apoio e disponibilidade.

... à Dr^a Ana Palmeira de Oliveira a quem devo todo o meu conhecimento laboratorial, por toda a sua disponibilidade e dedicação.

... a todos os colaboradores do laboratório da Faculdade Ciências da Saúde que me auxiliaram nas muitas horas aí dispendidas.

... a toda a minha família e amigos por estarem sempre presentes ao longo desta caminhada.

Resumo

Objetivo: Diversos obstáculos vão surgindo no percurso da amamentação natural, precipitando uma percepção de insuficiente valor nutritivo do leite e levando ao abandono precoce do aleitamento materno. A dor mamilar é a segunda principal causa do desmame precoce. Na literatura é apontada uma relação entre fissuras mamilares e infeção causada pelo fungo *Candida*, sendo que os compostos disponíveis no mercado farmacêutico para o seu tratamento apresentam reduzida eficácia. A associação de dinitrato de isossorbida, lidocaína e rutosídeos, foi usada na forma de creme com base antisséptica para o tratamento de fissuras anais agudas e crónicas. Já faz parte do leque terapêutico uma pomada de nitroglicerina para o mesmo efeito. Nesta dissertação pretende-se testar *in vitro* o potencial efeito anti-*Candida* das soluções de Lidocaína e de Nitroglicerina, isoladamente e em conjunto, de forma a avaliar a aplicabilidade do seu uso no tratamento de infeções mucocutâneas por *Candida* spp, nomeadamente nas fissuras mamilares.

Materiais e Métodos: Foram testadas 10 estirpes de *Candida*. 1 estirpe de *C. albicans* de coleção (American Type Culture Collection strain), e 9 estirpes clínicas: 4 *C. albicans*, 1 *C. parapsilosis*, 1 *C. krusei*, 2 *C. glabrata* e 1 *C. tropicalis*. As estirpes clínicas foram isoladas de infeções mucocutâneas. A atividade anti-*Candida* dos compostos testados foi verificada por determinação da concentração mínima inibitória e da concentração mínima letal. Para a determinação da CMI foi adotado o protocolo do micrométodo descrito na norma CLSI M27-A3. O efeito da associação dos dois fármacos foi estudado em relação a *C. albicans* ATCC 10231 com base no protocolo do *Checkboard* descrito por Vitale *et al.* O mecanismo de ação dos fármacos estudados foi avaliado por citometria de fluxo, com base no procedimento descrito por Pina-Vaz *et al.*

Resultados: Os dois fármacos testados revelaram atividade antifúngica em *Candida* spp, apresentando variações de CMI entre 10 e 20mg/mL para a Lidocaína e 0.15 e 0.30mg/mL para a Nitroglicerina. Verificou-se morte celular (CML) para a Lidocaína entre as concentrações 15 e 30mg/mL, variando para a Nitroglicerina entre 0,15 e 1,25mg/ml. A avaliação do efeito antifúngico em *C. albicans* da combinação das duas moléculas, com base na técnica do *checkboard*, demonstrou redução de uma diluição da CMI relativamente às concentrações dos compostos isolados. Por citometria de fluxo verificou-se que o tratamento de *C. albicans* ATCC 10231 com concentrações equivalentes a 1/2 CMI, CMI e 2CMI de ambos os fármacos, não induziu a entrada do IP, permanecendo as células não marcadas.

Conclusões: Podemos concluir que aos reconhecidos efeitos terapêuticos descritos para cada um dos compostos estudados, se junta a sua concludente atividade anti-*Candida*.

A combinação das duas drogas numa formulação galénica adequada parece promissora para tratamento das fissurações mamilares pelos efeitos individuais de cada um dos fármacos mas também na perspetiva do controlo da infeção, visto se ter verificado um efeito aditivo na conjugação das duas moléculas.

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da nitroglicerina e da lidocaína, isoladas e em associação.

Palavras-chave

Amamentação, Candidose areolar, Fissuras mamilares, Lidocaína, Nitroglicerina.

Abstract

Objective: Several obstacles arise during breastfeeding precipitating a perception of poor nutritional value of milk and leading to early weaning. Nipple pain is the second most common reason for early weaning. The literature points out to a relationship between cracked nipples and *Candida* infection. Products available in the pharmaceutical market present low effect on the management of the referred infection. Recently the association of isosorbide dinitrates, lidocaine and rutosides has been used as an antiseptic cream, proved to be effective for the treatment of acute and chronic anal fissure. There already exists a nitroglycerin ointment to treat the same problem.

In this work we tested the potential anti-*Candida* activity of Lidocaine and Nitroglycerin solution for the treatment of nipple cracks.

Study design: Ten strains of *Candida* were studied: 1 *C. albicans* from collection (American Type Culture Collection strain) and 9 clinical strains: 4 *C. albicans*, 1 *C. parapsilosis*, 1 *C. krusei*, 2 *C. glabrata* and 1 *C. tropicalis*. Clinical strains were isolated from mucocutaneous candidosis cases. The anti-*Candida* activity of both compounds was verified by determination of MIC and MLC. To determine the MIC, it was adopted the micromethod according to CLSI reference M27-A3 protocol. The association of both drugs was studied upon *C. albicans* ATCC 10231 based on *Checkboard* protocol described by Vitale *et al.* Their possible mechanism of action was investigated by flow cytometry, using the procedure described by Pina-Vaz *et al.*

Results: Both tested drugs inhibited the growth of all *Candida* strains, with MICs ranging from 10 to 20 mg/mL for Lidocaine and from 0,15 to 0,30mg/mL for Nitroglycerin. Cell death (MLC), was confirmed for Lidocaine between 15 and 30mg/mL, ranging from 0,15 to 1,25mg/mL for Nitroglycerin. Evaluation of antifungal effect related to *C. albicans* with the combination of both drugs, based on the *checkboard* technique, found a reduction of one dilution of MIC comparatively to the isolated drugs concentrations. Flow cytometry showed that the treatment of *C. albicans* ATCC 10231 with concentrations equivalent to half of MIC, MIC and twice MIC of both drugs, not induced entry of PI, leaving the cells unmarked.

Conclusions: The combination of Lidocaine with Nitroglycerin in an adequate galenic formulation seems promising to treat nipple fissures on behalf of their individual recognized therapeutic effects, now added with an evident *in vitro* anti-*Candida* activity.

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da nitroglicerina e da lidocaína, isoladas e em associação.

Keywords

Breastfeeding, Nipple Candidosis, Nipple Cracks, Lidocaine, Nitroglycerin.

Publicações Resultantes do Trabalho

Apresentação oral intitulada “*In vitro* anti-*Candida* activity of Lidocaine and Nitroglycerin”. XXI World Congress of the International Society for the Study of Vulvovaginal Disease, Paris, 3 a 8 de Setembro de 2011, *aceite para apresentação* e a ser posteriormente publicado no Journal of Lower Genital Tract Disease revista oficial da ISSVD. (Anexo 1)

Índice

DEDICATÓRIA	II
AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
PALAVRAS-CHAVE	V
ABSTRACT	VI
KEYWORDS	VII
PUBLICAÇÕES RESULTANTES DO TRABALHO	VIII
ÍNDICE	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE GRÁFICOS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ACRÓNIMOS	XIII
INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS	5
ESTIRPES DE <i>CANDIDA</i>	5
COMPOSTOS E FÁRMACOS UTILIZADOS	5
METODOLOGIAS UTILIZADAS	5
1. Determinação da atividade anti- <i>Candida</i>	5
2. Determinação do efeito anti- <i>Candida</i> da associação dos compostos	6
3. Citometria de Fluxo	6
ANÁLISE ESTATÍSTICA	7
RESULTADOS	8
ATIVIDADE ANTI- <i>CANDIDA</i>	8
EFEITO ANTI- <i>CANDIDA</i> DA ASSOCIAÇÃO DOS COMPOSTOS	11
CITOMETRIA DE FLUXO	11
DISCUSSÃO	15
CONCLUSÃO	17
BIBLIOGRAFIA	18
ANEXO	21
ANEXO 1	21

Lista de Figuras

FIGURA 1. FISSURA MAMILAR.....	1
FIGURA 2. CANDIDOSE AREOLAR.....	1
FIGURA 3. <i>CANDIDA ALBICANS</i>	2

Lista de Gráficos

GRÁFICO 1. RESULTADOS - CITOMETRIA - DA LIDOCAÍNA	11
GRÁFICO 2. RESULTADOS - CITOMETRIA - DA NITROGLICERINA.....	12
GRÁFICO 3. RESULTADO - CITOMETRIA - DA LIDOCAÍNA.....	14
GRÁFICO 4. RESULTADO - CITOMETRIA - DA NITROGLICERINA.	14

Lista de Tabelas

TABELA 1. SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS CLÁSSICOS FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B. .9	
TABELA 2. SUSCETIBILIDADE DAS ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> TESTADAS À NITROGLICERINA E À LIDOCAÍNA.....	10
TABELA 3. RESULTADOS - CITOMETRIA - DA LIDOCAÍNA.....	12
TABELA 4. RESULTADOS - CITOMETRIA - DA NITROGLICERINA.	13

Lista de Acrónimos

OMS	Organização Mundial de Saúde
AAP	American Academy of Pediatrics
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CML	Concentração Mínima Letal
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MLC	Minimal Lethal Concentration
ATCC	American Type Culture Collection
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
IP	Iodeto de Propídio
PI	Propidium Iodide
PBS	Phosphate Buffered Saline
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index
UFC	Unidade Formadora de Colónias

Introdução

A OMS e a AAP enfatizam a importância da amamentação materna exclusiva pelo menos até aos 6 meses de idade, promovendo a saúde da mãe, do bebê e a prevenção de doenças na infância. ⁽¹⁾

No entanto, diversos obstáculos vão surgindo no percurso da amamentação natural, precipitando uma percepção de insuficiente valor nutritivo do leite e levando ao abandono precoce do aleitamento materno. A dor mamilar é a segunda principal causa de desmame precoce. ⁽²⁾

Na literatura é apontada uma relação entre fissuras mamilares (Figura 1) e infecção causada pelo fungo *Candida*. ⁽³⁾



Figura 1. Fissura mamilar
(problemsolvingbreastfeedingcafe.com/stories/view/29)

A prevalência de *C. albicans* foi relacionada com a percepção de dor em mulheres que amamentam em comparação com as assintomáticas. ⁽⁴⁾

A candidose areolar (Figura 2) é definida como uma infecção fúngica oportunista, do mamilo e região areolar causada por leveduras do género *Candida*, sendo a espécie *C. albicans* a responsável por 70 a 80% de todas as infecções causadas por *Candida spp.* ⁽⁵⁾



Figura 2. Candidose Areolar
(www.arsalgarve.min-saude.pt)

Muito pouco está descrito relativamente a esta infeção, sendo o diagnóstico presuntivo e indicado por sinais e sintomas clínicos: dor, eritema e sensação de queimadura severa no mamilo/aréola, que eventualmente irradia pela mama e é tipicamente mais forte após as mamadas, fissuras persistentes e sem febre. ^(3, 6, 7) Correntemente não é efetuada análise microbiológica por recolha, cultura e /ou pesquisa por biologia molecular em amostras biológicas, no entanto, tendo em conta a consequência previsível da cessação da amamentação, a identificação da espécie patogénica permitindo uma adequada antibioterapia, é urgente.

Relativamente à epidemiologia da infeção, tem sido postulado que a origem dos agentes microbianos é a vagina da mãe, a partir da qual, durante o parto colonizam a mucosa oral do bebé, que por sua vez infeta o mamilo durante a amamentação. ⁽⁸⁾ De facto, a colonização do ser humano inicia-se no nascimento pela exposição a uma variedade de microrganismos presentes no ambiente e nos outros seres humanos. ⁽⁹⁾ Do mesmo modo, a colonização do trato gastrointestinal, respiratório superior, da cavidade oral e da vagina por *C. albicans* ocorre durante o nascimento ou durante a infância-adolescência. ^(10, 11)

As manifestações mais comuns de candidose são lesões superficiais, especialmente infeções das superfícies mucosas da boca e vagina. ⁽³⁾

Habitualmente *Candida* spp coloniza transitoriamente a pele e as mucosas de indivíduos saudáveis, mas não a pele glabra saudável, como o mamilo e a região areolar. ⁽³⁾

Tratam-se de células leveduriformes de forma oval que se apresentam como uma célula única e que se reproduzem predominantemente de forma assexuada por gemulação. ⁽¹²⁾ *C. albicans* é capaz de crescer simultaneamente em pelo menos três formas distintas sob as mesmas condições biológicas. ⁽¹⁰⁾ Este fungo transita entre blastoconídeo (a célula fúngica propriamente dita), tubo germinativo (tubo microscópico que contém múltiplas células fúngicas) e pseudo-hifa (semelhante à verdadeira hifa). ⁽¹⁰⁾ Estas três formas do mesmo fungo coexistem livremente e interconvertem-se. Em conjunto com a capacidade de adesão e produção de enzimas hidrolíticas extracelulares contribuem para a virulência desta levedura. ^(13, 14)

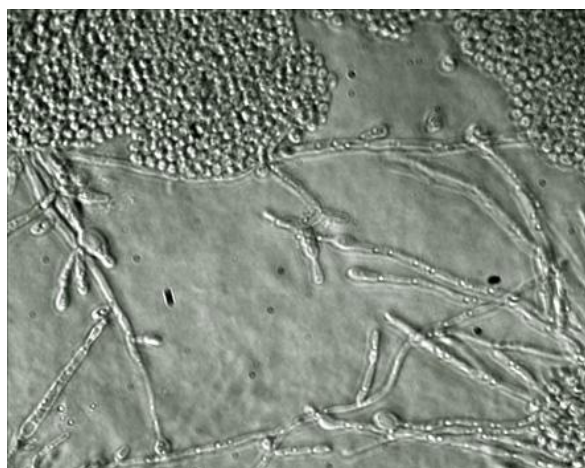


Figura 3. *Candida albicans*
(www.yeast-infectiontreatment.info/candida-albicans)

O género *Candida* é considerado patógeno oportunista visto poder tornar-se agressivo quando se conjugam condições locais para tal favoráveis e determinados fatores predisponentes ⁽⁹⁾, que alteram as defesas do hospedeiro.

Na literatura é sugerida a relação entre candidose e estados caracterizados por imunodepressão e condições patológicas como: prematuridade, gravidez, menopausa, *diabetes mellitus*, disfunção adrenal, infeções, cancro, transplante de órgãos, alcoolismo, trauma mamilar/areolar ⁽¹²⁾.

De facto, a prevalência de infeções por *Candida* tem vindo a aumentar quer devido ao número crescente de indivíduos imunocomprometidos em consequência das infeções por HIV e dos tratamentos quimioterápicos frequentemente agressivos, quer pelo uso disseminado da antibioterapia fúngica que induz o desenvolvimento de resistências. ^(15, 16)

A resistência adquirida aos azóis, nomeadamente ao fluconazol, é a mais frequentemente reportada, quer seja resistência induzida como sucede com as *Candida glabrata* ⁽¹⁷⁾ e *Candida tropicalis* ⁽¹⁸⁾, quer intrínseca, característica da *Candida krusei*. ⁽¹⁹⁾ Deste modo, não só o diagnóstico etiológico da infeção, assim como a determinação do perfil de suscetibilidade da estirpe envolvida na infeção são fundamentais para a correta opção terapêutica em infeções por *Candida* spp.

É portanto perceptível que nos últimos anos o estudo e desenvolvimento de novas drogas antifúngicas tenham despertado o interesse da comunidade científica. ⁽²⁰⁻²³⁾ No entanto, relativamente à candidose areolar, o seu tratamento em mulheres que amamentam não parece ser fácil, uma vez que o mamilo é continuamente exposto ao trauma da maceração e da sucção. Para além disso as fissuras são continuamente expostas à flora comensal da epiderme materna e da mucosa oral do bebé variando constantemente entre o ambiente húmido/seco e o atrito causado pelo vestuário, criando-se um ciclo de dano, cura e novo dano, propenso à infeção. ⁽²⁴⁾

As propostas farmacológicas disponíveis no mercado para o tratamento e prevenção das fissuras mamilares visam a recuperação da derme pelas suas propriedades emolientes, apresentando reduzido efeito no efetivo tratamento da infeção. Por outro lado, diferentes propostas farmacêuticas são contempladas no tratamento das fissuras anais. Algumas aliam o efeito analgésico ao de redução da pressão anal, nomeadamente por ação da Nitroglicerina a 0,4% (Rectogesic®). ⁽²⁵⁾ No mesmo sentido é proposta a associação de dinitrato de isossorbida, lidocaína e rutosídeos, na forma de um creme com base antissética. Na presunção de que a fissura anal crónica tem origem na isquémia dos tecidos ⁽²⁶⁾, a formulação destes 3 compostos, combina os efeitos do dinitrato de isossorbida, que reduz a pressão anal e melhora o fluxo sanguíneo da derme, com os efeitos anestésicos da lidocaína. Por fim, a adição de rutosídeos à formulação, que são membros da família dos flavonóides, permite uma melhoria na perfusão microvascular e microcirculação, reduzindo a sua hiperpermeabilidade e edema. ^(26, 27) A associação das características destes fármacos promove uma cicatrização mais rápida das fissuras anais, assim como diminui a dor associada a esta patologia. Deste modo, a associação de nitroglicerina e lidocaína, pelas suas propriedades farmacológicas descritas perspectiva-se

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da nitroglicerina e da lidocaína, isoladas e em associação.

como interessante no tratamento de fissuras. No caso das fissuras areolares a adição de efeito antifúngico parece ser essencial no controlo da infeção.

Neste trabalho pretendemos testar *in vitro* o potencial efeito anti-*Candida* das soluções de Lidocaína e de Nitroglicerina, isoladamente e em conjunto de forma a avaliar a aplicabilidade do seu uso no tratamento de infeções mucocutâneas por *Candida* spp. nomeadamente das fissuras mamilares.

Materiais e Métodos

Estirpes de *Candida*

Foram testadas 10 estirpes de *Candida*. 1 *C. albicans* de coleção (American Type Culture Collection strain) e 9 estirpes clínicas: 4 *C. albicans*, 1 *C. parapsilosis*, 1 *C. krusei*, 2 *C. glabrata* e 1 *C. tropicalis*. As estirpes clínicas foram isoladas de casos com infecções mucocutâneas, algumas severas, com suscetibilidade variável aos antifúngicos clássicos (tabela 1).

As estirpes foram conservadas em meio *Brain-Heart Broth* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) adicionado de glicerol a 5% e congeladas a -70°C . Antes de cada experiência, cada levedura foi repicada duas vezes em meio de Sabouraud (Difco) em 24h a 37°C , para garantir a pureza da cultura e a sua viabilidade.

Compostos e Fármacos Utilizados

A solução de Lidocaína a 6% foi preparada a partir de 0,6g de Cloridrato de Lidocaína (Sigma) diluídos em 10ml de água estéril. A solução de Nitroglicerina a 0,5% foi preparada a partir de uma solução a 1% de Trinitrato de Glicerol (Merck), depois diluída em RPMI. As diferentes diluições testadas foram preparadas em RPMI (Sigma).

O Iodeto de Propídio (Molecular Probes) foi adquirido à Invitrogen e o PBS à Sigma.

Metodologias Utilizadas

1. Determinação da atividade anti-*Candida*

A atividade anti-*Candida* dos compostos testados foi verificada por determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima letal (CML).

Para a determinação da CMI foi adotado o protocolo do micrométodo descrito na norma CLSI M27-A3.⁽²⁸⁾ Resumidamente: preparou-se uma suspensão com densidade ótica de 0.5 MacFarland (que corresponde a 1×10^6 a 5×10^6 células por mL) em água estéril de cada uma das estirpes selecionadas que foi posteriormente diluída em RPMI até uma concentração final de $5,0 \times 10^2$ - $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Cada um dos compostos foi diluído sequencialmente em RPMI e incubado em placa de 96 poços com cada uma das estirpes preparadas. As leituras foram realizadas após 24 e 48h de incubação a 37°C , por avaliação visual do crescimento em cada concentração testada. Os controlos de crescimento serviram de padrão de comparação.

Foram consideradas para CMI a concentração mais baixa para a qual se verificou ausência de crescimento após 48h de incubação.

A Concentração Mínima Letal (CML) foi determinada com base na técnica descrita por Canton *et al* ⁽²⁹⁾. Resumidamente: após incubação durante 48 horas, plaquearam-se em meio de Sabouraud, 100µl de cada poço com ausência de crescimento nítido. As placas foram incubadas por 24 horas e foram consideradas concentrações mínimas letais (CML), aquelas em que se não observou crescimento.

Todos os ensaios foram realizados em duplicado e foram considerados os resultados concordantes de 3 experiências independentes.

2. Determinação do efeito anti-*Candida* da associação dos compostos

A associação dos dois fármacos foi estudada para *C. albicans* ATCC 10231 com base no protocolo do *Checkboard* descrito por Vitale *et al* em *Métodos e Medicina Molecular*.⁽³⁰⁾ Resumidamente: em placa de 96 poços, cruzaram-se 50µl de cada uma das diluições da solução de Lidocaína com 50µl de cada uma das diluições da solução de Nitroglicerina. A inoculação da estirpe foi realizada por adição de 100µl da suspensão final da levedura em RPMI, com uma concentração final de 1×10^3 a 5×10^3 células por mL. Para avaliar a interação dos dois compostos, foi calculado o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI), com base na fórmula referida por Vitale *et al* (2005) ⁽³⁰⁾

$$(CMI \text{ A combinado}/CMI \text{ A isolado}) + (CMI \text{ B combinado}/CMI \text{ B isolado}) \quad (1)$$

Todas as concentrações foram testadas em duplicado.

Foi realizado controlo da esterilidade do meio de cultura (RPMI), das diferentes soluções (Nitroglicerina, Lidocaína) e o controlo de crescimento das leveduras. As placas foram incubadas em estufa a 37°C.

3. Citometria de Fluxo

O mecanismo de ação dos fármacos estudados foi avaliado por citometria de fluxo, com base no procedimento descrito por Pina-Vaz *et al*.⁽³¹⁾

Sumariamente: de uma cultura recente de *C. albicans* ATCC 10231 foi preparada uma suspensão celular de 1×10^6 células/mL em tampão PBS. As células foram incubadas a 37°C em estufa estática durante uma hora com Lidocaína e com Nitroglicerina isoladamente, nas concentrações referentes à CMI, metade da CMI e ao dobro da CMI. Após o período de incubação as células foram marcadas com Iodeto de Propídio (IP), 1µg/mL, protegidas da luz, à temperatura ambiente, durante 15 minutos.

O IP é um marcador fluorescente que penetra seletivamente células que apresentam um grave dano da membrana celular. Após marcação das células, estas foram analisadas no citómetro FACSCalibur (BD Biosciences, Sydney) a FL3 (620nm-red).

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da nitroglicerina e da lidocaína, isoladas e em associação.

Células não tratadas com os compostos e não marcadas com IP foram utilizadas para determinar a auto-florescência, as células não tratadas e marcadas com IP foram usadas como controlo de viabilidade e células tratadas com Etanol a 70% durante 10 minutos e marcadas com IP, foram utilizadas como controlos de morte celular.

Paralelamente, após o tratamento com Lidocaína e Nitroglicerina durante 60 minutos nas condições descritas, plaquearam-se alicotas das suspensões de células em Saboraud agar, para avaliação do número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) e relacionar com os resultados obtidos pela citometria. De igual modo foi realizado um estudo cinético do efeito dos fármacos, por tratamento das leveduras com concentrações correspondentes às CMI de cada uma das drogas durante 5, 10, 15 e 30 minutos. As células foram marcadas com IP segundo a metodologia acima descrita.

Análise Estatística

Na análise dos resultados da Citometria de Fluxo, foi efetuada a média e o desvio padrão dos diferentes resultados para cada um dos testes efetuados.

Resultados

Atividade anti-*Candida*

Os dois fármacos testados revelaram atividade antifúngica em *Candida* spp, apresentando variações de CMI entre 10 e 20mg/mL para a Lidocaína e 0.15 e 0.30mg/mL para a Nitroglicerina (Tabela 2).

Em doses de CMI, o fármaco Lidocaína não apresentou ação fungicida verificando-se morte celular (CML) em concentrações imediatamente acima à CMI, variando entre 15 e 30mg/ml.

A *C. krusei* a par com a estirpe *C. albicans* ATCC 10231 revelaram-se como as espécies mais sensíveis à lidocaína (CMI 10mg/mL). As restantes estirpes de *C. albicans* apresentaram uma CMI mais elevada, 15mg/ml, semelhante à estirpe de *C. parapsilosis*. Em oposição, *C. glabrata* e *C. tropicalis* apresentaram-se como as espécies menos suscetíveis à Lidocaína, verificando-se para ambas as espécies uma CMI de 20mg/mL.

No que diz respeito à Nitroglicerina, de um modo geral a sua atividade revelou-se fungicida para as mesmas concentrações de inibição de crescimento das estirpes testadas. *C. albicans* revelou-se mais suscetível (0.15mg/mL) do que as restantes espécies testadas. Estas apresentaram um valor superior de CMI (0.30mg/mL), coincidente com a CML no caso da *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e da *C. glabrata* MC 426; mas inferior à CML no caso da *C. glabrata* MC 425 (0.625mg/mL) e da *C. krusei* (1.25mg/ml).

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da nitroglicerina e da lidocaína, isoladas e em associação.

Tabela 1. Suscetibilidade aos antifúngicos clássicos Fluconazol e Anfotericina B.
CMI- Concentração Mínima Inibitória

Espécie	Isolado	CMI Fluconazol (µg/mL)	CMI Anfotericina B (µg/mL)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	ATCC 10231	1	0.5
<i>C. albicans</i> MC440	Vaginal	0.25	0.25
<i>C. albicans</i> MC416	Vaginal	<0.125	1
<i>C. albicans</i> MC437	Vaginal	2	0.5
<i>C. albicans</i> MC439	Vaginal	0.5	1
<i>C. glabrata</i> MC426	Vaginal	32	0.25
<i>C. glabrata</i> MC425	Vaginal	32	0.25
<i>C. krusei</i> OL103	Vaginal	>64	0.5
<i>C. tropicalis</i> MC407	Vaginal	2	1
<i>C. parapsilosis</i> 011	Vaginal	1	0.5

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da nitroglicerina e da lidocaína, isoladas e em associação.

Tabela 2. Suscetibilidade das espécies de *Candida* testadas à Nitroglicerina e à Lidocaína.
CMI- Concentração Mínima Inibitória; CML- Concentração Mínima Letal

Espécie	CMI Nitroglicerina (mg/mL)	CML Nitroglicerina (mg/mL)	CMI Lidocaína (mg/mL)	CML Lidocaína (mg/mL)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.15	0.15	10	15
<i>C. albicans</i> MC440	0.15	0.15	15	20
<i>C. albicans</i> MC416	0.15	0.15	15	20
<i>C. albicans</i> MC437	0.15	0.15	15	20
<i>C. albicans</i> MC439	0.15	0.15	15	20
<i>C. glabrata</i> MC426	0.30	0.30	20	30
<i>C. glabrata</i> MC425	0.30	0.625	20	30
<i>C. krusei</i> OL103	0.30	1.25	10	20
<i>C. tropicalis</i> MC407	0.30	0.30	20	30
<i>C. parapsilosis</i> 011	0.30	0.30	15	25

Efeito anti-*Candida* da associação dos compostos

A avaliação do efeito antifúngico em *C. albicans* ATCC 10231 da combinação das duas moléculas, com base na técnica do *checkboard*, permitiu verificar a redução da CMI numa diluição, relativamente aos compostos isolados (Lidocaína isolada- 7,5mg/mL, Lidocaína combinada - 5mg/mL; Nitroglicerina isolada - 0,15mg/mL, Nitroglicerina combinada - 0,075mg/mL). No cálculo do FICI obtivemos o resultado de 1,17.

Citometria de Fluxo

Por citometria de fluxo verificou-se que o tratamento de *C. albicans* ATCC 10231 com concentrações equivalentes a 1/2 CMI, CMI e 2CMI de ambos os fármacos, não induziu a entrada do IP, permanecendo as células não marcadas (Gráficos 1, 2 e Tabelas 3, 4). A ausência de fluorescência não se relacionou com viabilidade celular já que a morte das células em cada uma das suspensões sujeitas a tratamento e de controlo foi confirmada por contagem de UFC. Nas células tratadas com 1/2CMI foi possível observar algum crescimento celular, não comparável com o controlo; nas células sujeitas ao tratamento com CMI e 2CMI observou-se raro ou ausente o crescimento da levedura (resultados não apresentados).

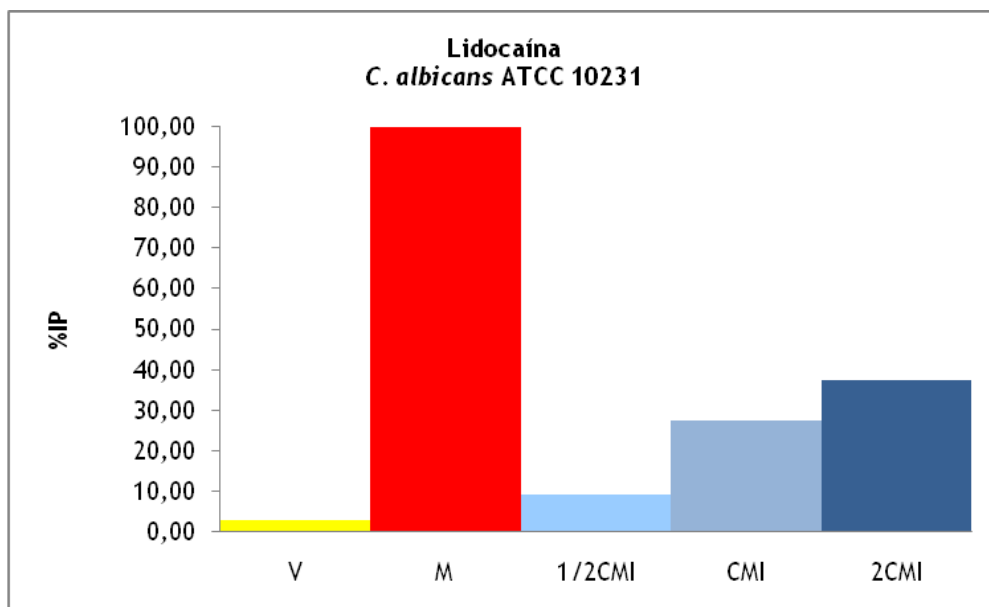


Gráfico 1. Resultados - Citometria - da Lidocaína (média das 3 experiências). Percentagem de IP que penetra em células de *C. albicans* ATCC 10231 viáveis, mortas e em células que foram expostas durante 60 minutos a metade da CMI, à CMI e ao dobro da CMI. V- Células Viáveis; M- Células Mortas; CMI- Concentração Mínima Inibitória.

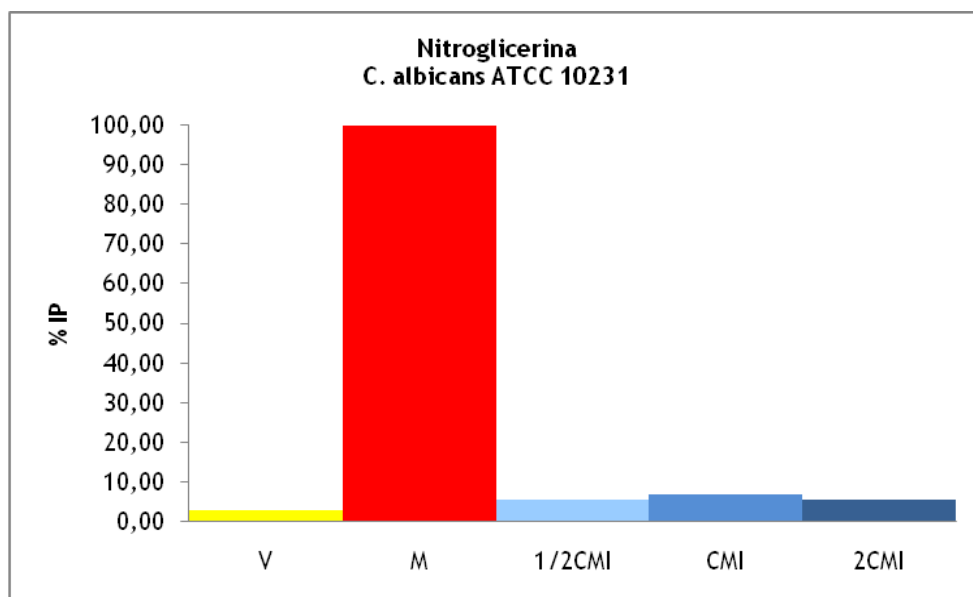


Gráfico 2. Resultados - Citometria - da Nitroglicerina (média das 3 experiências). Percentagem de IP que penetra em células de *C. albicans* ATCC 10231 viáveis, mortas e em células que foram expostas durante 60 minutos a metade da CMI, à CMI e ao dobro da CMI.

V- Células Viáveis; M- Células Mortas; CMI- Concentração Mínima Inibitória.

Tabela 3. Resultados - Citometria - da Lidocaína. Percentagem de auto-florescência das células *C. albicans* ATCC 10231. Percentagem de IP que penetra nas células viáveis, nas células mortas, nas células expostas à CMI aos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, e nas expostas a metade da CMI e ao dobro da CMI ao fim de 60 minutos. São mostrados os resultados das 3 experiências realizadas. 1, 2 e 3 - número da experiência; AF- Auto-florescência, V - Células Viáveis, M- Células Mortas, CMI- Concentração Mínima Inibitória.

	1	2	3	Média	DP
AF	0,15	0,16	0,20	0,17	0,022
V	3,16	3,38	2,70	3,08	0,283
M	99,25	99,73	99,75	99,58	0,231
5'CMI	9,06	13,42	12,76	11,75	1,919
10'CMI	10,32	10,79	12,97	11,36	1,154
15'CMI	11,39	12,32	12,20	11,97	0,413
30'CMI	24,24	19,73	27,23	23,73	3,083
60'1/2CMI	11,40	7,76	8,42	9,19	1,583
60'CMI	27,76	25,43	28,83	27,34	1,419
60'2CMI	35,91	38,80	37,33	37,35	1,180

Tabela 4. Resultados - Citometria - da Nitroglicerina. Percentagem de auto-florescência das células *C. albicans* ATCC 10231. Percentagem de IP que penetra nas células viáveis, nas células mortas, nas células expostas à CMI aos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, e nas expostas a metade da CMI e ao dobro da CMI ao fim de 60 minutos. São mostrados os resultados das 3 experiências realizadas. 1, 2 e 3 - número da experiência; AF- Auto-florescência, V - Células Viáveis, M- Células Mortas, CMI- Concentração Mínima Inibitória.

	1	2	3	Média	DP
AF	0,15	0,16	0,20	0,17	0,022
V	3,16	3,38	2,70	3,08	0,283
M	99,25	99,73	99,75	99,58	0,231
5'CMI	6,02	4,19	10,80	7,00	2,787
10'CMI	5,24	5,93	9,98	7,05	2,091
15'CMI	4,94	4,09	4,93	4,65	0,398
30'CMI	4,53	4,53	4,64	4,57	0,052
60'1/2CMI	5,35	6,59	5,08	5,67	0,657
60'CMI	4,16	6,25	10,21	6,87	2,509
60'2CMI	5,45	5,56	5,43	5,48	0,057

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da nitroglicerina e da lidocaína, isoladas e em associação.

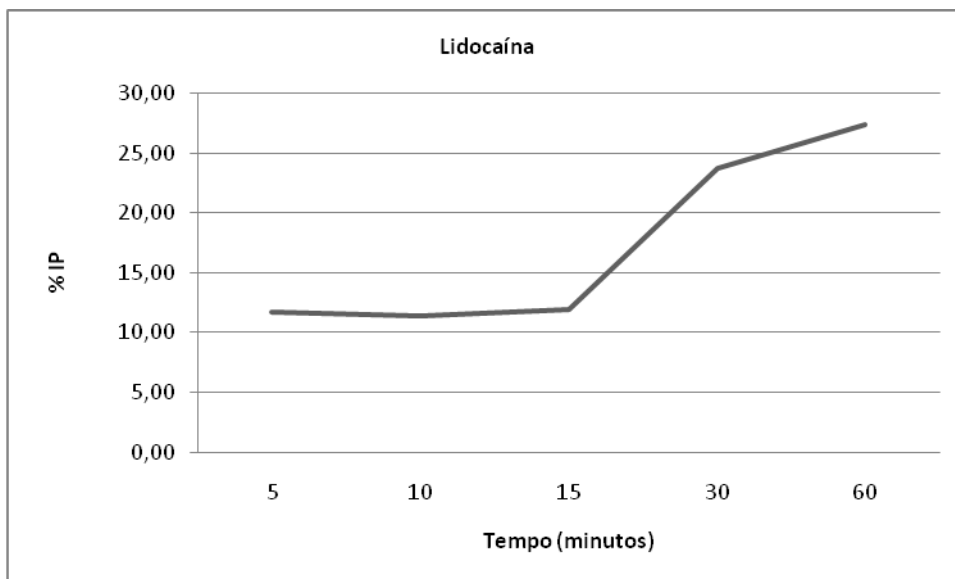


Gráfico 3. Resultado - Citometria - da Lidocaína. Percentagem de IP que penetra nas células de *C. albicans* ATCC 10231 ao longo de 60 minutos, quando expostas à CMI da Lidocaína.

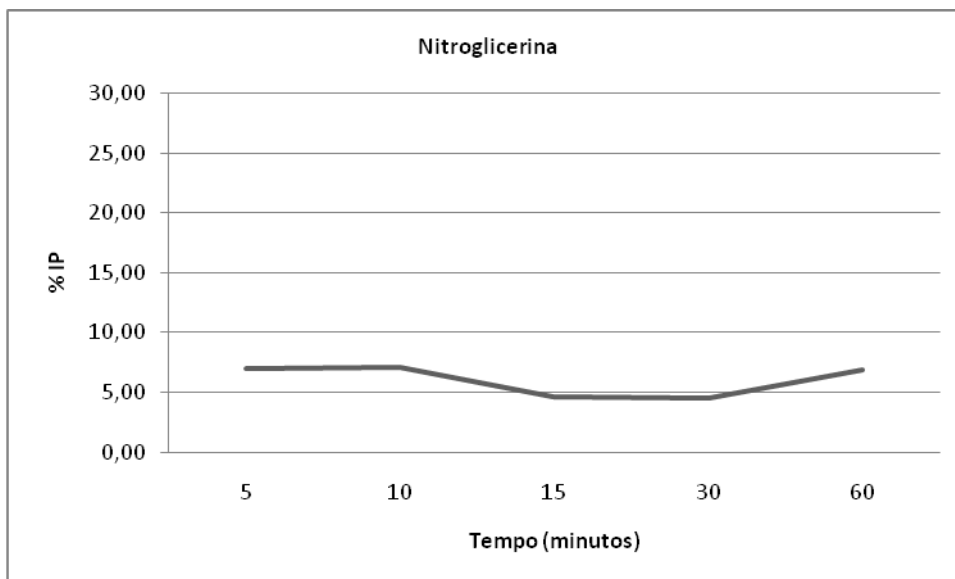


Gráfico 4. Resultado - Citometria - da Nitroglicerina. Percentagem de IP que penetra nas células de *C. albicans* ATCC 10231 ao longo de 60 minutos, quando expostas à CMI da Nitroglicerina.

Discussão

Nas dez espécies do género *Candida* testadas, a Nitroglicerina, fármaco utilizado clinicamente pelas suas propriedades vasodilatadoras, e a Lidocaína, anestésico local, apresentaram atividade fungicida.

Os resultados da atividade anti-*Candida* da nitroglicerina e da lidocaína mostram não haver relação entre a suscetibilidade a estas moléculas e a aos antifúngicos clássicos, Anfotericina B e Fluconazol.

A Nitroglicerina apresentou um efeito fungicida para as concentrações inibidoras do crescimento na maior parte das leveduras testadas. Duas estirpes, uma *C. glabrata* e uma *C. krusei* apresentaram um perfil de maior resistência, tendo sido confirmado o efeito letal para concentrações superiores às inibitórias. *C. albicans* surgiu como a espécie mais sensível ao respetivo fármaco, necessitando de uma menor concentração para atingir o efeito fungistático e fungicida. Por citometria de fluxo, verificou-se que o mecanismo de ação da nitroglicerina não é dependente de lesão primária da membrana citoplasmática (gráfico 2 e 4).

Também a Lidocaína demonstrou ter atividade fungistática e fungicida sobre as espécies do género *Candida* testadas.

No entanto, nenhuma das concentrações mínimas inibitórias das diferentes espécies coincidiu com a concentração mínima letal, podendo-se assim presumir a existência de um claro efeito dose-dependente. Foi verificada a mesma tendência descrita para a nitroglicerina, surgindo a *C. albicans* como a espécie mais sensível à lidocaína. Os nossos resultados estão de acordo com os publicados por outros autores.⁽²²⁾ Nesse trabalho, *C. albicans* é também referida como a espécie mais sensível à Lidocaína, embora se tenha verificado alguma variação intra-espécie na sua atividade⁽²²⁾. A diferença de valores encontrados para as CMI e CML (efeito de uma diluição de diferença) poderá ser explicado pelo facto de os autores terem optado pelo macrométodo da norma CLSI M27-A3 e os nossos resultados terem sido obtidos por recurso ao micrométodo da mesma norma.

Por citometria de fluxo, verificou-se que o mecanismo de ação da lidocaína, à semelhança do que ocorreu com a nitroglicerina, não é dependente de lesão primária da membrana citoplasmática. No entanto, a observação em pormenor destes resultados (Gráficos 1 e 3) sugere que o aumento do tempo de incubação e da concentração de lidocaína influencia a marcação celular com IP. Este efeito dose-dependente já previsto na determinação da atividade antifúngica foi também verificado nos ensaios de citometria reportados por Pina-Vaz (2000).⁽²²⁾ Os autores concluíram que ao contrário do que acontecia para concentrações de inibição (CMI), o tratamento de *C. albicans* com uma concentração de lidocaína claramente acima da inibitória (três vezes mais), permeabilizava as células ao IP, anunciando um efeito dose-dependente, agora com lesão da membrana citoplasmática.

Por outro lado, a Lidocaína parece inibir de forma igualmente dose-dependente e, em concentrações inferiores às testadas, um importante mecanismo de patogenicidade descrito

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da nitroglicerina e da lidocaína, isoladas e em associação.

para *Candida*, a formação do tubo germinativo. ⁽³²⁾ A possível redução da patogenicidade da levedura na fase inicial de invasão tecidual surge como uma interessante propriedade antifúngica.

A avaliação da combinação dos dois compostos, com base na técnica do *checkboard*, permitiu verificar a diminuição da CMI para a *C. albicans*. Desta forma, após o cálculo do FICI (1,17) concluímos que a combinação dos dois compostos resulta num efeito antifúngico aditivo, por este se encontrar acima de 0,5 e abaixo de 4.

Embora seja unânime entre investigadores que estudam mecanismos de patogenicidade de *Candida* que a origem das estirpes parece não influenciar a suscetibilidade aos antifúngicos, seria coerente incluir no futuro estirpes isoladas de candidoses areolares.

Paralelamente, a elucidação por citometria de fluxo do mecanismo de ação da nitroglicerina poderá passar futuramente pela inclusão de marcadores de atividade metabólica.

O interessante efeito da associação dos compostos estudados anuncia a pertinência do estudo e desenvolvimento de uma formulação galénica que permita a veiculação das duas moléculas numa base de excipientes compatíveis com a aplicação cutânea e com a amamentação. O estudo *in vitro* da eficácia terapêutica da formulação deverá ser igualmente confirmado.

Por último, se bem que o estudo laboratorial aponte para a sua utilidade clínica, apenas um ensaio randomizado e em dupla ocultação poderá confirmar as esperanças que se depositam na combinação destes dois fármacos, seguros e de baixo custo.

Conclusão

A pesquisa de novas soluções terapêuticas para o tratamento de candidoses mucocutâneas tem sido impulsionada pelo crescente aumento dos casos de resistência aos antifúngicos clássicos.⁽³³⁾

A candidose areolar, infecção cutânea da areola mamilar, pode causar severo desconforto e dor. A dor mamilar é uma das razões mais frequentemente citadas para o abandono da amamentação.⁽⁷⁾ O tratamento mais comumente utilizado em casos localizados de candidose areolar é a aplicação tópica de um agente antifúngico.⁽⁷⁾

Deste modo, o controlo da sintomatologia associada a esta infecção, precipitante da cessação do processo de amamentação, é frequentemente descurado.

Perante este panorama estudaram-se as propriedades anti-*Candida* de dois fármacos utilizados separadamente no tratamento das fissuras retais, a Nitroglicerina e a Lidocaína. O efeito vasodilatador da Nitroglicerina é um reconhecido potenciador da cicatrização. A ação anestésica da Lidocaína permite o controlo da dor associada à fissura.

Com base no trabalho aqui apresentado concordante com outros já publicados por outros autores, podemos concluir que aos reconhecidos efeitos terapêuticos descritos para cada um destes compostos junta-se a sua concludente atividade anti-*Candida*.

A combinação das duas drogas numa mesma formulação galénica parece ter interesse também na perspetiva do controlo da infecção, visto se ter verificado um efeito aditivo resultante da conjugação das duas moléculas. Aquela poderá permitir um precoce tratamento da candidose areolar que será essencial para garantir o sucesso da amamentação, em particular quando do aparecimento de fissuras mamilares.

Bibliografia

1. Taveras EM, Li R, Grummer-Strawn L, Richardson M, Marshall R, Rego VH, et al. Opinions and practices of clinicians associated with continuation of exclusive breastfeeding. *Pediatrics*. 2004 Apr;113(4):e283-90.
2. Woolridge MW. Aetiology of sore nipples. *Midwifery*. 1986 Dec;2(4):172-6.
3. Tanguay KE, McBean MR, Jain E. Nipple candidiasis among breastfeeding mothers. Case-control study of predisposing factors. *Can Fam Physician*. 1994 Aug;40:1407-13.
4. Andrews JI, Fleener DK, Messer SA, Hansen WF, Pfaller MA, Diekema DJ. The yeast connection: is *Candida* linked to breastfeeding associated pain? *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Oct;197(4):424 e1-4.
5. Martin AG, Kobayashi GS. Yeast Infections: Candidiasis, Pityriasis (Tinea) versicolor. In: *Dermatology in General Medicine* (Fitzpatrick TB, ed) 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 1993. p. 2453.
6. Tait P. Nipple pain in breastfeeding women: causes, treatment, and prevention strategies. *J Midwifery Womens Health*. 2000 May-Jun;45(3):212-5.
7. Wiener S. Diagnosis and management of *Candida* of the nipple and breast. *J Midwifery Womens Health*. 2006 Mar-Apr;51(2):125-8.
8. Mukherjee SC. Moniliasis Breast. *J Indian Med Assoc*. 1964 Dec 1;43:536-8.
9. Costa K, Candido R. Diagnóstico laboratorial de candidíase oral. *NewsLab*. 2007;83:138-45.
10. Rodrigues A. Germ tube formation-a pathogenic mechanism by *Candida albicans*. Porto: Universidade do Porto; 1999.
11. Fitzpatrick's Color Atlas and Synopsis of Clinical Dermatology. 6 ed: McGraw-Hill Professional; 2009.
12. Schulze J, Sonnenborn U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Dtsch Arztebl Int*. 2009 Dec;106(51-52):837-42.
13. Monod M, Borg-von Zepelin M. Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. *Chem Immunol*. 2002;81:114-28.
14. Umbrella AM, Racca L, Ramos L. Actividades proteínasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. *Revista Iberoam Micol*. 2008;25(1):12-6.
15. Boken DJ, Swindells S, Rinaldi MG. Fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Clin Infect Dis*. 1993 Dec;17(6):1018-21.
16. Denning DW. Can we prevent azole resistance in fungi? *Lancet*. 1995 Aug 19;346(8973):454-5.

17. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Miller CB, Karp JE, Saral R. Association of *Torulopsis glabrata* infections with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Sep;37(9):1847-9.
18. Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, Falconi Di Francesco L, Caselli F, Giannini D, et al. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jun;44(6):1578-84.
19. Wingard JR M, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE & Saral, R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *New Engl J Med*. 1991;325:1274-7.
20. Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Pina-Vaz C, Queiroz JA, et al. Anti-*Candida* activity of essential oils. *Mini Rev Med Chem*. 2009 Oct;9(11):1292-305.
21. Palmeira-de-Oliveira A, Ribeiro MP, Palmeira-de-Oliveira R, Gaspar C, Costa-de-Oliveira S, Correia IJ, et al. Anticandida Activity of a Chitosan Hydrogel: Mechanism of Action and Cytotoxicity Profile. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2010;70(4):322-27.
22. Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Sansonetty F, Martinez-De-Oliveira J, Fonseca AF, Mardh PA. Antifungal activity of local anesthetics against *Candida* species. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2000;8(3-4):124-37.
23. Barodka VM, Acheampong E, Powell G, Lobach L, Logan DA, Parveen Z, et al. Antimicrobial effects of liquid anesthetic isoflurane on *Candida albicans*. *J Transl Med*. 2006;4:46.
24. Brent N, Rudy SJ, Redd B, Rudy TE, Roth LA. Sore nipples in breast-feeding women: a clinical trial of wound dressings vs conventional care. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1998 Nov;152(11):1077-82.
25. Fenton C, Wellington K, Easthope SE. 0.4% nitroglycerin ointment : in the treatment of chronic anal fissure pain. *Drugs*. 2006;66(3):343-9.
26. Yakoot M, Abdel Salaam M. Study of efficacy and safety of a new local cream ('healer') in the treatment of chronic anal fissure: a prospective, randomized, single-blind, comparative study. *Arq Gastroenterol*. 2009 Jul-Sep;46(3):179-82.
27. Wadworth AN, Faulds D. Hydroxyethylrutosides. A review of its pharmacology, and therapeutic efficacy in venous insufficiency and related disorders. *Drugs*. 1992 Dec;44(6):1013-32.
28. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. Third Edition ed; 2008.
29. Canton E, Peman J, Viudes A, Quindos G, Gobernado M, Espinel-Ingroff A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003 Mar;45(3):203-6.
30. Vitale RG, Afeltra J, Dannaoui E. Antifungal combinations. *Methods Mol Med*. 2005;118:143-52.

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica da nitroglicerina e da lidocaína, isoladas e em associação.

31. Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Evaluation of antifungal susceptibility using flow cytometry. *Methods Mol Biol.*638:281-9.
32. Rodrigues A, Vaz CP, Fonseca AF, de Oliveira JM, Barros H. In vitro effect of local anesthetics on candida albicans germ tube formation. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1994;1(4):193-7.
33. Pinto e Silva AT, Costa-de-Oliveira S, Silva-Dias A, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Dynamics of in vitro acquisition of resistance by Candida parapsilosis to different azoles. *FEMS Yeast Res.* 2009 Jun;9(4):626-33.

Anexo

Anexo 1

“*In vitro anti-Candida activity of Lidocaine and Nitroglycerin*”

Ramos ARM, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J

Objective: Areolar and genital fissures are hard to treat. A combined formulation of lidocaine and nitroglycerin showed to have good results in anal fissures. As a first basic research we studied the anti-*Candida* activity of both substances, separated and combined.

Methods: Five strains of *Candida* were studied: 1 *C. albicans* (1 American Type Culture Collection strain); 1 *C. krusei* clinical strain, 1 *C. parapsilosis* clinical strain, 1 *C. glabrata* clinical strain and 1 *C. tropicalis* clinical strain. Clinical strains were isolated from mucocutaneous candidosis cases. The anti-*Candida* activity of both compounds was tested by the micromethod, according to CLSI reference M27-A3 protocol.

6% Lidocaine solution was prepared from 0,6g of Lidocaine Hydrochloride (Sigma) diluted in 10ml of H₂O and 0,5% Nitroglycerin solution was prepared from 1% Glycerol Trinitrate solution (Merck).

Results: The two drugs tested inhibited growth of all *Candida* strains, with MICs ranging from 10 to 20 mg/mL for Lidocaine and from 0.15 to 0.3mg/mL for Nitroglycerin.

MIC Lidocaine:

C. albicans ATCC10231 - 1% --> 10mg/mL

C. krusei OL103 - 1% --> 10mg/mL

C. glabrata MC425- 2% --> 20mg/mL

C. tropicalis MC407- 2% --> 20mg/mL

C. parapsilosis 011- 1,5% --> 15mg/mL

MIC Nitroglycerin:

C. albicans ATCC10231 - 0,015% --> 0,15 mg/mL

C. krusei OL103 - 0,030% --> 0,3 mg/mL

C. glabrata MC425- 0,030% --> 0,3 mg/mL

C. tropicalis MC407- 0,030% -->0, 3 mg/mL

C. parapsilosis 011- 0,030% --> 0,3 mg/mL

Conclusions: Both studied drugs are able to inhibit *Candida* growth. Lidocaine anesthetic effect and Nitroglycerin as vasodilator, in addition to their anti-*Candida* activity, seem to be a good combination for the treatment of mucocutaneous fissuring candidosis.