

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto De Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

LANA IVONE BARRETO CRUZ

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS HIDRAZINO-**  
**TIAZÓLICOS CONTRA *CANDIDA ALBICANS***

Belo Horizonte  
2019

Lana Ivone Barreto Cruz

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS HIDRAZINO-TIAZÓLICOS  
CONTRA *CANDIDA ALBICANS***

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Susana Johann

Belo Horizonte  
2019

043 Cruz, Lana Ivone Barreto.  
Atividade antifúngica de derivados hidrazino-tiazólicos contra *Candida albicans* [manuscrito] / Lana Ivone Barreto Cruz. – 2019.  
81 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Susana Johann.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Cândida albicans. 3. Tiazóis. 4. Toxicidade. 5. Virulência.  
I. Johann, Susana. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE LANA IVONE BARRETO CRUZ  
Nº REGISTRO: 2014765906

Às 14:00 horas do dia 11 de março de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Danielle Letícia da Silva (UFMG), Marliete Carvalho da Costa (UFMG), Cleide Viviane Buzanello Martins (UNIOESTE), Carolina Paula de Souza Moreira (FUNED) e a Prof<sup>a</sup>. Susana Johann – Orientadora, para julgar o trabalho final “Atividade antifúngica de derivados tiazol-hidrazonas contra *Candida albicans*”, da aluna **Lana Ivone Barreto Cruz** requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 11 de março de 2019.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Letícia da Silva *Danielle Letícia da Silva*  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marliete Carvalho da Costa *Costa*  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleide Viviane Buzanello Martins *Cleide V. Buzanello Martins*  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Paula de Souza Moreira *Carolina Paula de Souza Moreira*  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Susana Johann (Orientadora) *Susana Johann*

*Flávio Guimarães da Fonseca*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Flávio Guimarães da Fonseca  
Coordenador

Dedico este trabalho à Deus por ter me guiado em todos os momentos, me dando forças quando achei que não era possível continuar! À minha mãe Ivone, minhas filhas Luísa e Laura, meu esposo Marlon e minha irmã Maria.

## **Agradecimentos**

Agradeço à Deus, pai todo poderoso, por me conceder o dom da vida e por me proporcionar momentos maravilhosos que eu nunca havia imaginado viver!! Agradeço a ti, Senhor, pelos vários anjos que colocaste em minha vida para me ajudar na caminhada e na concretização dos meus sonhos.

Às minhas amadas e lindas filhas Luísa e Laura, maiores presentes que ganhei durante o doutorado. Vocês com toda a doçura e amor me transformaram em uma pessoa melhor, mais paciente e amável. Indiscutivelmente vocês são um presente que DEUS enviou para transformar a minha vida e de todos os que têm o prazer de conviver com vocês.

Aos meus pais João e Ivone que estiveram ao meu lado me incentivando para nunca desistir e lutar pelos meus objetivos. Em especial, agradeço à minha mãe que me deu forças para não desistir e esteve ao meu lado em cada instante cuidando das minhas pequenas com toda dedicação e amor. Mãe, sem você eu não conseguiria ter chegado aqui. Você sempre foi e sempre será meu maior exemplo na vida.

À minha querida e amada irmã Maria em quem eu me espelho por ser uma mulher guerreira e que sempre luta com muita perseverança e honestidade pelos seus ideais. Você é meu porto-seguro, minha companheira de batalhas!!

Ao meu esposo Marlon que esteve sempre presente desde o primeiro dia do doutorado, que acreditou mais em mim do que eu mesma, que me incentivou a fazer o doutorado sanduíche e que me deu, minhas filhas, os maiores presentes da minha vida. Obrigada pelo esposo companheiro, e pai presente que você é! Te amo!

À minha orientadora Susana Johann que me acolheu com todo carinho e teve sempre paciência para me ensinar e orientar. Você foi um ser de muita luz que Deus colocou em minha vida, além da orientação, me entendeu quando mais precisei e me ensinou a sempre ver as pessoas com mais ternura. Você foi fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por me aceitar e pela dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos e do Laboratório de Sistemática e Biodiversidade de Fungos que me receberam com tanto carinho e amor. Em especial Ana Raquel, Thais, Mari Anzai, Rafael Marques, Belbel, Katarina Barros, Karina Rocha, Mari Zé, Camila Carvalho, Soraia, Jordana e Graci. Tenham certeza que vocês me ensinaram a ser um ser humano melhor.

Aos colegas do grupo de antifúngicos Grazi, Nívea, Thelma, Cris, Carol, Larissa, Lídia, Vitor, Blenda, Hanna e Aline pelo companheirismo, por partilhar experiências e conhecimento e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos orientadores da Brown University Beth Fuchs e Eleftherios Mylonakis por me receberem em seu laboratório e ter me dado a oportunidade de realizar parte dos meus experimentos. De vocês guardarei vários ensinamentos e, principalmente, o carinho com que recebem a tantos estudantes de outros países em seu laboratório.

À inesquecível equipe brasileira com a qual convivi no laboratório da Brown University e em Providence - EUA durante o doutorado sanduíche: Cleide, Felipe, Dani, Noelly e Thaís. Vocês são incríveis e marcaram de uma forma toda especial esse momento da minha vida. Sem vocês não teria aproveitado cada momento. Também agradeço aos agregados brasileiros que deixaram minha viagem mais leve e divertida Bella, Ricardo, Fernanda, Emerson e Fernanda.

Aos colegas do laboratório da Brown University: Nagu, Gabriel, Woosong, Kiho, Dawilmer e Shelihan pela acolhida, ensinamentos e auxílio nos experimentos.

A professora Juliana Junqueira e seus alunos Rodney e Patrícia do laboratório de microbiologia da UNESP pela parceria, colaboração e dedicação com os experimentos.

À todos do laboratório de Micologia da UFMG, em especial, Marliete, Gustavo, Dani, Paulo e Elúcia. O laboratório de vocês é um exemplo de amizade e companheirismo. Muito obrigada por compartilhar o conhecimento e pelo carinho com que sempre me receberam para realização de experimentos.

Aos meus amigos Inara, Thiago, Aline e Larissa que sempre estiveram ao meu lado me incentivando, aconselhando e não me deixando desistir!! Ao lado de vocês sinto mais paz e amor.

À Ana Maria, uma irmã, exemplo de sabedoria. Você me ajudou psicologicamente, com orações e olhando minhas filhas na minha ausência. Obrigada pela paciência e por nunca hesitar em me ajudar.

À Cleide e Danielle que acompanharam meu trabalho desde o início, sendo indispensáveis para minha evolução e para a finalização desta tese. Junto à vocês, como parte da banca examinadora, agradeço a Marliete e Carolina por terem aceitado participar deste momento crucial da minha vida profissional.

A tantos outros anjos que Deus colocou em meu caminho e que foram fundamentais para que eu pudesse finalizar o doutorado.

## RESUMO

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista, sendo *Candida albicans* a espécie mais frequentemente isolada. O tratamento dessas infecções é desafiador devido à resistência que pode se desenvolver durante a terapia e ao número limitado de compostos antifúngicos disponíveis. O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, a atividade antifúngica de quatro substâncias de derivados hidrazino-tiazólicos (**1**, **2**, **3** e **4**) e estudar os possíveis efeitos destas nos fatores de virulência de *C. albicans*. As substâncias hidrazino-tiazólicas **1**, **2**, **3** e **4** mostraram atividade antifúngica, apresentando CIMs de 0,125 - 16,0 µg / mL contra *C. albicans*. A toxicidade das substâncias foi avaliada usando eritrócitos humanos e produziu LC<sub>50</sub> > 64 µg/mL. Quando avaliada a capacidade de inibir alguns fatores de virulência de *C. albicans*, a substância **1** foi capaz de inibir a filamentação em concentração igual ao CIM, as substâncias **1**, **2**, e **3** inibiram a adesão em concentração referente ao valor de CIM e as substâncias **1** e **2** desintegraram o biofilme de *C. albicans*. As substâncias foram avaliadas adicionalmente utilizando a larva *Galleria mellonella* como um modelo *in vivo*. A sobrevivência das larvas foi aumentada quando testadas concentrações entre 5 e 15 mg/kg, com desempenho comparável ao fluconazol. A substância **2** foi avaliada em modelo murino de candidíase oral e sistêmica. No modelo oral, a substância **2** reduziu a carga fúngica na língua do rato; e no modelo sistêmico reduziu a carga fúngica encontrada no rim quando testada a 10 mg/kg. Estes resultados mostram que os derivados hidrazino-tiazólicos apresentam potencial antifúngico contra *C. albicans* com eficácia *in vivo*.

**Palavras-chave:** *Candida* spp.; Tiazóis; *in vivo*, Toxicidade; Virulência;

## ABSTRACT

Candidiasis is an opportunistic fungal infection, being *Candida albicans* the most frequently isolated specie. Treatment of this infection is challenging because of the development of resistance during therapy and the limited number of antifungal compounds available. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of four thiazolyldihydrazone-derived substances (**1**, **2**, **3** and **4**) by *in vitro* and *in vivo* tests and to study the possible effects of these on the virulence factors of *C. albicans*. Thiazolyldihydrazone **1**, **2**, **3** and **4** showed antifungal activity, presenting MICs of 0.125 - 16.0 µg / mL against *C. albicans*. Toxicity of the substances was assessed using human erythrocytes and produced LC50 > 64 µg / mL. When the ability to inhibit some virulence factors of *C. albicans* was evaluated, substance **1** was able to inhibit filamentation in a concentration equal to MIC; substances **1**, **2** and **3** inhibited adhesion at a concentration related to MIC value and substances **1** and **2** disintegrated *C. albicans* biofilm. Substances were further evaluated using *Galleria mellonella* larva as an *in vivo* model. The survival of the larvae was increased when tested concentrations between 5 and 15 mg / kg, with as good as fluconazole performance. Substance **2** was evaluated in murine model of oral and systemic candidacy. In the oral model, substance **2** reduced the fungal load on rat tongue; and in the systemic model it reduced the fungal load found in the kidney when tested at 10 mg / kg. These results show that thiazolyldihydrazones are an antifungal agent for *C. albicans* with *in vivo* efficacy.

**Key words:** *Candida* spp .; Thiazois; *in vivo*, Toxicity; Virulence;

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Abs - Absorbância

ALS - *Agglutinin-Like Sequence*

AMB - Anfotericina B

ASD - Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC - *American Type Culture Collection*

°C - Grau Celsius

CEBH - Células Epiteliais Buciais Humanas

CI - Candidíase invasiva

CIM - Concentração inibitória mínima

CIF - Concentração inibitória fracional

CIFI - Índice de concentração inibitória fracional

CFM - Concentração fungicida mínima

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

CVV - Canididíase vulvovaginal

CVVR - Canididíase vulvovaginal recorrente

DMSO - Dimetilsulfóxido

FLC - Fluconazol

HCl - Ácido clorídrico

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IFS - Infecções Fúngicas Sistêmicas

IS - Índice de Seletividade

NaCl - Cloreto de sódio

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Hidrogenofosfato dissódico

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato salina)

pH - Potencial hidrogeniônico

p/v - Peso/volume

rpm - Rotações por minuto

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SAP - *Secretory Aspartil Proteinase*

SDB - Caldo Sabouraud Dextrose

SFB - Soro fetal bovino

UFC- Unidade formadora de colônia

UTI - Unidade de tratamento intensivo

VRZ - Voriconazol

v/v - Volume/volume

µg/mg - Micrograma por miligrama

µg/mL - Micrograma por mililitro

µL - Microlitros

mL - Mililitro

% - Porcentagem

> - Maior

< - Menor

≥ - Maior ou igual

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Núcleo tiazolínico das substâncias da classe dos heterocíclicos tiazólicos.....	18
Figura 2 - Estruturas químicas dos derivados hidrazino-tiazólicos 1-4 .....	24
Figura 3 - Atividade hemolítica dos derivados hidrazino-tiazólicos 1, 2, 3 e 4.....	42
Figura 4 - Citotoxicidade dos derivados hidrazino-tiazólicos 1, 2, 3 e 4 para células HepG2.....	43
Figura 5 – Avaliação da inibição da filamentação de <i>C. albicans</i> SC5314 no meio Lee tratada com o derivado de hidrazino-tiazólico 2 e fluconazol .....	44
Figura 6 - Percentagem de inibição da adesão do isolado SC5314 de <i>C. albicans</i> tratada por 1 hora com os derivados hidrazino-tiazólicos 1, 2 e 3 e FLZ na CIM em CEBH .....	45
Figura 7. Contagem de UFC/mL (média e desvio padrão) de biofilmes de 48h da cepa de <i>C. albicans</i> SC5314 formados em placas de 96 poços.....	46
Figura 8 - Seleção do melhor gene de referência (PMA e ACT1) pelo website ( <a href="http://www.leonxie.com">http://www.leonxie.com</a> ).....	48
Figura 9 - Análise da quantificação relativa da expressão gênica em biofilmes maduros (48h) tratados com a substância 1 em comparação ao biofilme não tratado (controle).....	49
Figura 10 - Análise da quantificação relativa da expressão gênica em biofilmes maduros (48h) tratados com a substância 2 em comparação ao biofilme não tratado (controle).....	49
Figura 11 - Análise da quantificação relativa da expressão gênica em biofilmes maduros (48h) tratados com a substância 3 em comparação ao biofilme não tratado (controle).....	50
Figura 12 - Sobrevida de <i>C. elegans</i> glp-4, sek-1 infectados com <i>C. albicans</i> e tratados com substâncias 1, 2, 3, e 4.....	51
Figura 13 - Toxicidade de derivados hidrazino-tiazólico em <i>Galleria mellonella</i> .....	52
Figura 14 - Curva de sobrevida de <i>Galleria mellonella</i> .....	54
Figura 15 - Modelo de tratamento murino de candidíase oral.....	54
Figura 16 - Modelo modelo murino de candidíase sistêmica.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima de derivados hidrazino-tiazólicos contra isolados clínicos de <i>Candida</i> spp. e <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	36
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima de derivados hidrazino-tiazólicos contra isolados clínicos de <i>Candida albicans</i> .....	37
Tabela 3 - Concentração inibitória mínima de derivados de hidrazino tiazólico contra isolados clínicos de <i>Candida parapsilosis</i> .....	37
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima de derivados hidrazino-tiazólicos contra isolados clínicos de <i>Candida glabrata</i> .....	38
Tabela 5 - Concentração inibitória mínima de derivados hidrazino-tiazólicos contra isolados clínicos de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	39
Tabela 6 - Índice de concentração inibitória fracional dos derivados hidrazino-tiazólicos 1, 2, 3 e 4 em interação com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol contra os isolados de <i>C. albicans</i> SC5314.....	40
Tabela 7 - Índice de concentração inibitória fracional dos derivados hidrazino-tiazólicos 1, 2, 3 e 4 em interação com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol contra os isolados de <i>C. neoformans</i> H99.....	40
Tabela 8 - Citotoxicidade (IC <sub>50</sub> ) e Índice de seletividade (IS) dos derivados hidrazino-tiazólicos 1 e 2 em células VERO.....	41

## **LISTA DE ANEXO**

<b>Anexo I - Certificado do Comitê de ética em pesquisa com uso de animais.....</b>	<b>80</b>
---	-----------

## LISTA DE APÊNDICE

<b>Apêndice I</b> - Artigo Publicado - Anti- <i>Candida albicans</i> Activity of Thiazolyldrazone Derivatives in Invertebrate and Murine Models – Journal of fungi.....	81
---	----

## SUMÁRIO

1	Revisão de Literatura.....	4
1.1	Leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	4
1.1.1	<i>C. albicans</i> .....	4
1.2	Fatores de Virulência.....	5
1.2.1	Transição morfológica.....	5
1.2.2	Aderência.....	6
1.2.3	Formação de biofilme.....	7
1.2.4	Produção de exoenzimas.....	8
1.3	Candidíase.....	9
1.4	Epidemiologia.....	11
1.5	Antifúngicos.....	12
1.5.1	Polienos .....	15
1.5.2	Azóis.....	14
1.5.3	Equinocandinas.....	15
1.6	Mecanismos de resistência de antifúngicos.....	15
1.7	Novos compostos com atividade antifúngica.....	16
1.7.1	Tiazoles e seus derivados .....	19
1.8	Modelos invertebrados.....	20
1.8.1	<i>Caenorhabditis elegans</i> .....	20
1.8.2	<i>Galleria mellonella</i> .....	21
2	Justificativa.....	22
3	Objetivos.....	23
3.1	Objetivos Específicos.....	23
4	Materiais e Métodos.....	24
4.1	Sustâncias Experimentais.....	24
4.2	Determinação da atividade antifúngica.....	24
4.2.1	Microrganismos e preparo do inóculo.....	24
4.2.2	Determinação da concentração inibitória mínima.....	25
4.3	Ensaio da Concentração Fungicida Mínima.....	25
4.4	Avaliação da concentração inibitória fracional.....	26
4.5	Ensaio de Citotoxicidade in vitro.....	26

4.5.1 Avaliação dos efeitos citotóxicos em células VERO.....	26
4.5.1.1 Índice de seletividade .....	27
4.5.2 Hemólise em eritrócitos humanos.....	27
4.5.3 Teste de citotoxicidade em células do fígado.....	28
4.6 Ensaios de inibição dos fatores de virulência.....	28
4.6.1. Teste de Inibição da Filamentação <i>in vitro</i> .....	28
4.6.2 Avaliação da inibição da atividade de proteinase e fosfolipase.....	28
4.6.3 Inibição da adesão de <i>C. albicans</i> em Células Epiteliais Bucais Humanas.....	29
4.6.4 Susceptibilidade de biofilmes maduros às substâncias 1, 2 e 3.....	30
4.6.4.1 Preparo das Suspensões de <i>C. albicans</i> .....	30
4.6.4.2 Formação do Biofilme.....	30
4.6.4.2 Quantificação de biofilme.....	30
4.7 Análise do efeito das substâncias 1, 2 e 3 sobre a expressão dos genes ALS1, ALS3, HWP1, BCR1, CPH1 e EFG1 de <i>C. albicans</i> .....	31
4.8 Ensaio de sobrevivência em modelos de animais invertebrados e em modelo murino.....	32
4.8.1 Curva de sobrevivência de <i>C. elegans</i> .....	32
4.8.1 Ensaio de toxicidade das substâncias em <i>Galleria mellonella</i> .....	32
4.8.1.2 Ensaio de sobrevivência em <i>G. mellonella</i> .....	33
4.8.3 Ensaio em modelo murino.....	33
4.8.3.1 Animais.....	33
4.8.3.2 Modelo Murino de Candidíase Oral.....	33
4.8.3.3 Modelo Murino de Candidíase Sistêmica.....	34
4.8.3.4 Análise Estatística.....	34
5 Resultados.....	37
5.1 Teste de suscetibilidade antifúngica.....	37
5.2 Interação dos derivados de tiazol-hidrazonas 1, 2, 3 e 4 com os antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol.....	39
5.3 Ensaios de toxicidade das substâncias.....	41
5.3.1 Ensaio de toxicidade em células VERO.....	41
5.3.2 Avaliação da atividade hemolítica dos tiazóis.....	42
5.3.3 Citotoxicidade em células carcinoma hepatocelular humano (HepG2).....	42
5.4 Ensaios de inibição dos fatores de virulência de <i>C. albicans</i> .....	43
5.4.1 Inibição de filamentação <i>in vitro</i> .....	43
5.4.2 Inibição das enzimas proteinase e fosfolipase.....	43

5.4.3 Inibição da adesão em células epiteliais bucais humanas.....	44
5.4.4 Avaliação da viabilidade do biofilme .....	45
5.5 Efeitos das substâncias 1, 2 e 3 na expressão dos genes de <i>C. albicans</i> .....	46
5.6 Ensaio de sobrevivência de <i>C. elegans</i> infectado com <i>C. albicans</i> e tratado com as substâncias 1, 2, 3 e 4.....	50
5.7 Teste de toxicidade e sobrevivência em <i>Galleria mellonella</i> .....	53
5.8 Ensaio In Vivo em Modelo Murino de Candidíase Oral e Sistêmica.....	54
6 Discussão.....	56
7 Conclusão.....	62
Referencial Teórico.....	63
Anexos.....	80

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Leveduras do gênero *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* são classificadas no Reino Fungi, Filo Ascomycota, ordem Saccharomycetales, família Candidaceae (CALDERONE, 2002). Elas reproduzem por brotamento, na forma assexuada e possuem tanto a capacidade fermentativa quanto assimilativa, são capazes de crescer em um grande número de substratos orgânicos e meios de cultura, como o Ágar Sabouraud, Ágar fubá e *Candida* CHROMagar®. Esses microrganismos crescem preferencialmente entre temperaturas de 18° e 45°C, sendo classificados como mesófilos (KURTZMAN et al., 2010).

Os organismos do gênero *Candida* são eucarióticos, com parede celular definida, composta por uma camada de polímero de manose, que junto a proteínas é chamada de manoproteína, uma camada denominada glucana, composta por polímeros de glucanas com  $\beta$ -1,3-D-glucanas,  $\beta$ -1,6-D-glucanas, quitina (polímero de N-acetilglicosamina) e de uma pequena quantidade de proteínas e lipídios. A membrana plasmática é semelhante à dos mamíferos, com dupla camada fosfolipídica e vários tipos de esteróis, onde o principal é o ergosterol (AKPAN; MORGAN, 2002).

Estes microrganismos são considerados ubíquos, fazendo parte da maioria dos ecossistemas naturais e podem ser recuperadas de fontes ambientais, humanas e de outros mamíferos. (DEAK, 2006; MCMANUS & COLEMAN, 2014). Em humanos, as infecções causadas por espécies de *Candida* são as principais causas de morbidade e mortalidade e estão associadas a uma ampla variedade de manifestações clínicas, desde infecções superficiais e da mucosa até infecções amplamente disseminadas e da corrente sanguínea (WÄCHTLER et al., 2012; KULLBERG e ARENDRUP, 2015)

Mais de 150 espécies de *Candida* já foram identificadas, de todas as espécies *C. albicans* é a que mais causa infecções e por isso a mais estudada. Contudo, nos últimos anos, tem-se observado a emergência de outras espécies, tais como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* associadas à candidíases e consideradas importantes patógenos oportunistas (ARANCIA et al., 2009; LIM et al., 2012).

#### 1.1.2 *C. albicans*

O nome *Candida albicans* vem do latim *candidus*, que significa 'branco reluzente' e *albicans* do latim *albicare*, que significa "embranquecer", sugestivo do exsudato branco nas superfícies mucosas infectadas (GOW e YADAV, 2017). A *C. albicans* faz parte da microbiota humana, e coloniza, assintomaticamente, muitos nichos como o trato

gastrointestinal, microbiota oral e vaginal, onde se comporta como um comensal. No entanto, a alteração dos mecanismos de defesa do hospedeiro pode levar a um comportamento patogênico do fungo. Sob certas circunstâncias, esse processo envolve a translocação do fungo para a corrente sanguínea, atingindo órgãos essenciais e causando doenças graves (KUMAMOTO, 2001; PRIETRO et al., 2014).

*Candida albicans* é uma espécie que apresenta grande adaptação, podendo crescer em ambientes extremamente diferentes quanto à disponibilidade de nutrientes, variação de temperatura, pH, osmolaridade e quantidade de oxigênio disponível (PARAMYTHIOTOU et al., 2014). *Candida albicans* é a espécie de *Candida* mais comumente identificada em contextos clínicos, uma das principais causas de infecções hospitalares, e é considerado o patógeno fúngico mais prevalente em humanos (LOHSE et al., 2018).

A capacidade da *C. albicans* de alternar entre diferentes morfologias (polimorfismo) é uma característica importante na patogenicidade do fungo, pois facilita a penetração no tecido e dificulta a fagocitose (JACOBSEN et al., 2012). Quando em forma de levedura, este microrganismo pode ser facilmente disseminado no organismo pelo corpo, enquanto que, na forma de hifa, pode invadir os tecidos e formar biofilmes. Outros fatores de virulência desta levedura são a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, a termotolerância significativa, e a produção de enzimas como proteinases e fosfolipases (SILVA et al., 2002).

## **1.2 Fatores de virulência**

O estabelecimento da candidíase é propiciado pela ruptura do equilíbrio entre as leveduras e o hospedeiro. A capacidade da levedura em aderir, infectar e causar doença, é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Os fatores de virulência são determinados geneticamente, mas somente serão expressos pelos microrganismos quando submetidos a condições favoráveis (TAMURA et al., 2007).

Dentre alguns fatores de virulência podem ser citados: transição morfológica entre leveduras e hifas, expressão de adesinas sobre a superfície da pele, formação de biofilmes, tigmotropismo e secreção de enzimas hidrolíticas (MAYER et al., 2013).

### **1.2.1 Transição morfológica**

A transição morfológica apresentada pelas leveduras permite maior interação do fungo com o hospedeiro. Esta transição entre leveduras e hifas é denominada dimorfismo e é um fator importante na patogenicidade (JACOBSEN et al., 2012). A forma de hifas tem demonstrado ser mais invasiva do que leveduras (BERMAN et al., 2002). Por outro lado, acredita-se que o formato menor da levedura representa a forma envolvida na disseminação (SAVILLE et al., 2003).

Além disso, a formação de hifas promove a invasão da levedura para dentro da mucosa, e evita que as células sejam englobadas por macrófagos e neutrófilos, o que pode contribuir para o aumento da virulência do fungo (VAN BURIK; MAGEE, 2001; YANG et al., 2003). Alguns autores sugerem que as hifas são a forma patogênica enquanto as leveduras são a forma não patogênica. Certamente esta visão é simplificada. Em vez disso, sugere-se que ambas as formas morfológicas são de relevância durante a infecção: leveduras e hifas são encontradas em órgãos infectados e, dependendo do órgão, uma ou outra morfologia predomina (JACOBSEN et al., 2012).

*C. albicans* é uma espécie dimórfica que pode crescer como levedura ou formas filamentosas, e é uma das duas únicas espécies de *Candida* capazes de formar hifas verdadeiras, sendo a outra espécie *C. dubliniensis*, a espécie mais parecida com *C. albicans*. A comparação de ambas as espécies em ambos os modelos de infecção sistêmica e mucosa demonstrou que, apesar da capacidade de ambas as espécies produzirem hifas, a *C. albicans* é um patógeno significativamente mais bem sucedido (ASMUNDSDOTTIR et al., 2009, STOKONES et al., 2007).

### **1.2.1 Aderência**

Os patógenos fúngicos são capazes de aderir a materiais não biológicos como cateteres vasculares, cateteres urinários e próteses e também aderir a diferentes tipos celulares e interagir com componentes da matriz extracelular do hospedeiro. Sendo que a aderência é o primeiro passo no estabelecimento da infecção e pode ser modulada por uma ampla variedade de adesinas que são expressas na superfície da parede celular fúngica (TRONCHIN et al., 2008; NETT, 2018).

As adesinas são glicoproteínas localizadas na superfície celular. Estas medeiam a interação com outras células, permitindo a adesão da parede celular do fungo a receptores extracelulares como fibrinogênio, fibronectina e laminina, presentes nos tecidos humanos. As adesinas também possuem um importante papel no ‘mating’, nas alterações morfológicas das colônias e na formação de biofilmes (TREAGAN, 2008; YANG, 2003).

Essas adesinas incluem proteínas da família ALS, Hwp1p, Eap1p e outros receptores celulares menos conhecidos (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009). Em *C. albicans*, as adesinas mais estudadas são as proteínas Agglutinin-Like Sequence (ALS) que formam uma família de genes composta por oito membros (ALS 1-7 e ALS9). Adesinas como ALS3 e Hwp1p são expressas na formação de hifas e criam morfologia particularmente aderente (ZORDAN; CORMACK, 2012; PLAN et al., 2007).

As proteínas ALS não foram identificadas em todas as espécies de *Candida* e, provavelmente, nestas outras, polipeptídeos diferentes possam exercer a função de aderência (MENEZES et al., 2013), o que corrobora com estudos que mostram que a capacidade de aderência nas diversas espécies de leveduras é diferente (SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2011; TAMURA et al., 2007). Sendo também uma explicação para o fato de algumas espécies colonizarem mais frequentemente superfícies mucosas do que outras (SILVA et al., 2010).

Além disso, a parede celular das espécies de *Candida* é composta por uma camada externa de manoproteínas que representam cerca de 30 a 50% do peso seco do microrganismo. As manoproteínas tem um papel importante na adesão, antigenicidade, modulação da resposta imune do hospedeiro e no reconhecimento da levedura por células do sistema imune inato (MORA-MONTES et al., 2007).

A capacidade dos microrganismos em aderir às células, tecidos ou outros tipos de superfície exposta à circulação de fluidos, é um pré-requisito para a colonização de determinado habitat e subsequente infecção. Como tal, a adesão parece ter um papel fundamental no processo de infecção (HENRIQUES et al., 2002).

### **1.2.3 Formação de biofilme**

O biofilme é uma forma comum de crescimento dos microrganismos na natureza e a causa mais comum de infecção em humanos (LA FLEUR et al., 2006). Os biofilmes são definidos como comunidades microbianas estruturadas e complexas, capazes de aderir a superfícies abióticas ou bióticas. A formação dos biofilmes inclui a adesão e proliferação das células do microrganismo no substrato, formação de hifas, acumulação de material de matriz extracelular e a dispersão de células de levedura a partir do complexo do biofilme (FINKEL et al., 2011).

Os biofilmes são muito mais resistentes à terapia antifúngica e a fatores imunológicos do hospedeiro em comparação com as células leveduriformes planctônicas (FANNING, MITCHELL, 2012). A resistência aos medicamentos de uso clínico pode advir da incapacidade que alguns antimicrobianos têm de se difundirem através da camada polissacarídica que compõe a matriz extracelular do biofilme. Ou, ainda, devido à existência de subpopulações de microrganismos no interior dos biofilmes, denominadas células persistentes (*Persister cells*) que são fenotipicamente diferentes das demais e tem a habilidade de sobreviver em concentrações superiores à concentração inibitória mínima dos antifúngicos em geral (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; SOTO, 2013).

Os biofilmes de *C. albicans* são altamente estruturados; eles contêm leveduras, pseudo-hifas e hifa envolvidas por uma matriz extracelular (FOX e NOBILE, 2012;

RAMAGE et al., 2009). Além de formar biofilmes em dispositivos médicos implantados (por exemplo, cateteres, marca-passos, válvulas cardíacas, próteses articulares e dentaduras), os biofilmes de *C. albicans* também se formam na superfície do hospedeiro, incluindo superfícies mucosas, revestimentos de células epiteliais e órgãos parenquimatosos (KOJIC & DAROUICHE, 2004; RAMAGE et al., 2006). Os antifúngicos existentes, em concentrações consideradas eficazes contra células planctônicas de *C. albicans*, são amplamente ineficazes contra os biofilmes desta levedura. Embora concentrações muito mais altas possam ser eficazes contra biofilmes, essas doses freqüentemente causam sérios efeitos colaterais ao hospedeiro (isto é, danos nos rins ou no fígado). A resistência a drogas antifúngicas associadas ao biofilme de *C. albicans* e a capacidade de colonizar dispositivos médicos implantados têm sido associadas ao aumento dos custos médicos e aos desfechos negativos dos pacientes (KOJIC & DAROUICHE, 2004; LEBEAUX, GHIGO & BELOIN, 2014).

Um grande desafio na pesquisa do biofilme em leveduras é o desenvolvimento de modelos adequados que correspondam a fatores de diferentes sítios de infecção do hospedeiro e que permitam avaliar a eficácia de novas estratégias de tratamento antifúngico sob condições *in vivo* (NETT; ANDES, 2006). A elucidação dos mecanismos de resistência dos biofilmes é o primeiro passo para a otimização das terapias, seja pelo uso de terapias antifúngicas clássicas como o bloqueio do cateter com antimicrobianos/antissépticos e o uso de cateteres impregnados com antibióticos, ou pelo emprego de terapias com combinação de drogas (SARDI et al., 2013).

Em estudo dos fatores de risco associados à formação de biofilmes realizado por TUMBARELLO et al. (2012), a sondagem vesical e diabetes mellitus foram identificados como fatores de risco especificamente relacionados à formação de biofilme. A hiperglicemia pode favorecer a adaptação e consequente formação de biofilme, uma vez que a glicose é a fonte de carbono utilizado para produção da matriz de polissacáride de comunidades organizadas.

#### **1.2.4 Produção de exoenzimas**

Dentre os atributos de virulência merece destaque a produção de enzimas extracelulares como as proteinases e fosfolipases (HUBE; NAGLIK, 2002; KADIR et al., 2007). A atividade de proteinase de *Candida* spp. está associada com uma família de isoenzimas proteinase aspartil secretora (SAP), codificadas pelos genes Sap1-10, que aumentam a capacidade do microrganismo de colonizar e penetrar nos tecidos do hospedeiro e evadir a resposta imune (NAGLIK et al., 2003; NAGLIK et al., 2004). As proteinases estão

associadas à formação de pseudomicélio e a aderência em leveduras do gênero *Candida* (BEKTIC et al., 2001; NAGLIK et al., 2003).

A regulação de genes SAP resulta de mudanças no ambiente de crescimento, na transição morfológica de levedura para hifa e na mudança de fenótipos alternativos. A expressão desses genes é um processo regulado e interligado a uma complexa co-regulação da transcrição com outros fatores de virulência de *Candida* e com múltiplas funções das proteinases *in vivo* (NAGLIK et al., 2004; SCHALLER et al., 2005).

As fosfolipases são enzimas hidrolíticas que em geral, catalisam a hidrólise de fosfolípidos, que são os maiores componentes da membrana celular do hospedeiro (VINITHA; MAMATHA, 2011). A secreção de fosfolipase extracelular por espécies de *Candida* é considerada um atributo de virulência, pois induz a lesão tecidual por danificar os constituintes lipídicos da membrana celular do hospedeiro auxiliando a invasão da mucosa epitelial (NIEWERTH; KORTING 2001; SAMARANAYAKE, 2006). Os isolados de *Candida* spp. podem apresentar diferentes níveis de atividade desta enzima, a produção de fosfolipases em grandes quantidades está relacionada ao aumento da patogenicidade, aderência às células do hospedeiro e elevado percentual de mortalidade em modelos animais (IVANOVSKA, 2003).

Essas enzimas são classificadas por letras A, B, C e D para diferenciar uma da outra. As fosfolipases A e B são as de maior relevância e as mais estudadas. A fosfolipase A, devido à presença de lisolecitina (produto tóxico) tem o potencial de destruir as membranas dos eritrócitos (hemólise). O encontro desta enzima no sítio de formação do broto da levedura e na formação do tubo germinativo possibilita uma maior ação de hidrólise dos fosfolípidos das membranas intracelulares. A fosfolipase B, também contribui para a patogenicidade das espécies de *Candida* por remover ácidos graxos e degradar o tecido do hospedeiro (NIEWERTH; KORTING, 2001).

É importante salientar que o gênero *Candida* produz diversos fatores de virulência que contribuem para a invasão do hospedeiro, mas o desenvolvimento das infecções é favorecido por uma combinação de fatores e não por um fator de virulência isolado (SCHULZE; SONNENBORN, 2009). Assim, compreender os mecanismos de patogenicidade que *Candida* spp. usa durante a infecção é crucial para o desenvolvimento de novos diagnósticos e terapias antifúngicas.

### **1.3 Candidíase**

A candidíase é uma infecção causada por espécies de leveduras do gênero *Candida* de caráter tipicamente oportunista (SANTOLAYA et al., 2013). A doença pode ocorrer como

consequência do rompimento do equilíbrio parasita-hospedeiro, desencadeado por alterações na barreira tecidual e na microbiota autóctone ou pelo comprometimento das defesas naturais (PLAYFORD et al., 2008).

Estudos afirmam que cerca de 30% das pessoas saudáveis terão algum episódio de candidíase ao longo da vida, percentual esse ainda maior em pessoas imunodeprimidas (BROWN, 2011). De acordo com RODLOFF et al. (2011) a espécie *C. albicans* é responsável por 40 a 60% dos casos da doença, isso porque 30 a 50% da população apresenta esta espécie como componente da microbiota residente. No entanto, outras espécies também são causadoras de candidíases, como *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. rugosa*, *C. guilliermondii* e outras *Candida* não-*albicans* (CHI et al., 2011).

Uma das principais manifestações da doença se dá na cavidade oral, sendo causada na maioria das vezes pela espécie *C. albicans*. Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento de candidíase oral incluem infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV), o uso de prótese oral e idade avançada (PAPPAS et al., 2009). Apesar da candidíase oral não ser uma enfermidade mortal, é a porta de entrada para complicações do tipo orofaríngea, esofágica, laríngea e mesmo sistêmica (BARBEDO e SGARBI, 2010).

A candidíase superficial é a manifestação clínica mais comum dentre as candidíases, acometendo a pele e mucosas, é normalmente causada por *C. albicans* (SAMARANAYAKE, 2006). Outra forma recorrente da doença que acomete milhares de mulheres no mundo é a candidíase vulvovaginal (CVV), uma infecção, causada por leveduras comensais que habitam a mucosa vaginal e que se tornam patogênicas quando o sítio de colonização do hospedeiro passa a ser favorável ao seu desenvolvimento (ÁLVARES et al., 2007; PIETRELLA et al., 2011).

A CVV é um dos diagnósticos mais frequentes nos ambulatórios de ginecologia, sendo que 75% das mulheres tem pelo menos um episódio de CVV durante a vida e 40% a 50% têm dois ou mais, enquanto que 5 a 8% delas sofrem de candidíase vulvovaginal recorrente (SOBEL, 2007). Quando a infecção atinge o sangue é denominada candidemia, que em 40% dos casos leva ao óbito. As espécies de *Candida* ocupam o quarto lugar de microrganismos isolados em culturas de sangue (MUÑOZ et al., 2010). O desenvolvimento de candidemia está associado ao uso prolongado de antibióticos de amplo espectro, presença de cateter venoso central, imunossupressão, nutrição parenteral, internação em unidade de terapia intensiva (UTI) e cirurgia (SANTOS et al., 2014).

Na candidíase sistêmica ocorre disseminação do microrganismo através do sangue, e a infecção pode se instalar em órgãos vitais como cérebro, coração e rins estando relacionada

com altas taxas de mortalidade nestes indivíduos (JAYATILAKE; SAMARANAYAKE, 2010). O desenvolvimento da doença é agravado quando há a formação de biofilmes, pois estes contribuem para a colonização dos tecidos, servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (KUHN et al., 2002).

#### 1.4 Epidemiologia

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por altas incidências de infecção e colonização em humanos, sendo, por isso, objeto de estudo, representando um grande desafio devido às dificuldades de diagnóstico e tratamento (BARBEDO; SGARBI, 2010). *Candida* spp. são responsáveis por 80% de todas as infecções fúngicas sistêmicas e são a quarta, sexta e sétima causas principais de infecções nosocomiais da corrente sanguínea nos EUA, Europa e Brasil, respectivamente (CAGGIANO et al., 2015; COSTA et al., 2014; ROSA et al., 2015; MARRA et al. 2011; CANELA et al., 2017).

Em relação às infecções hospitalares causadas por *Candida* spp., um grande número de pacientes adquirem a candidíase durante a estadia no hospital e alguns destes desenvolvem infecções severas. Na maioria destas infecções, as candidíases invasivas ocorrem entre 1 a 8% dos pacientes admitidos e em cerca de 10% daqueles em unidades de cuidados intensivos, o que pode representar mais de 15% de todas as infecções nosocomiais existentes (EGGIMANN et al., 2003). Apesar dos avanços no apoio médico à pacientes graves, a candidíase leva a hospitalização prolongada e tem uma taxa de mortalidade em torno de 50% (DOI et al., 2016).

A frequência e tipo de espécies envolvidas nas candidemias, assim como a incidência e a epidemiologia mudam de acordo com localização geográfica do paciente (BERGAMASCO et al., 2012). Em pesquisa realizada nos Estados Unidos e na Europa a epidemiologia das infecções da corrente sanguínea causadas por *Candida* spp. está vastamente documentada, sendo a terceira causa mais comum deste tipo de infecção em crianças (STEINBACH et al., 2012).

Estas leveduras ocupam a quarta principal causa de infecção sistêmica adquirida em hospital nos Estados Unidos, com taxas de mortalidade de até 50% (VANDEPUTTE et al., 2005; PFALLER et al., 2010). Na Espanha, *C. albicans* foi apontada como a espécie mais isolada, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (PEMÁN; SALAVERT, 2012). Já em estudo multicêntrico realizado na Índia, a taxa de mortalidade por candidíase invasiva total e atribuível foi de 44,7 e 19,6%, respectivamente (CHAKRABARTI et al., 2015).

Em estudo realizado em cinco regiões do Brasil no período de 2007 a 2010, DOI e colaboradores (2016), mostraram que *Candida* spp. foram o sétimo agente mais prevalente em

infecções da corrente sanguínea nosocomial. As espécies de *Candida* não-*albicans* representaram 65,7% de todos isolados, sendo que, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram as espécies mais prevalentes. Neste período, a taxa de mortalidade bruta de candidemia durante a internação hospitalar foi de 72,2%.

A alta incidência de candidemia no Brasil também foi relatada em um estudo realizado em um hospital terciário em Ribeirão Preto. Durante o estudo, houve 79 episódios de candidemia, correspondendo a uma incidência de 1,52 episódios por 1000 internações e taxa bruta de mortalidade de 52%. *C. albicans* foi a causa predominante de candidemia seguida por *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* (CANELA et al., 2017).

Como se pode observar, a epidemiologia das infecções de *C. albicans* mudou no mundo e houve um aumento progressivo da proporção de candidemia causada por espécies de *Candida* não-*albicans* (AJENJO et al., 2011). Este problema é importante para a escolha da terapia antifúngica, uma vez que algumas espécies de *Candida* não *albicans* podem ter diminuído a susceptibilidade ou terem resistência intrínseca aos azóis (SNYDMAN, 2003; PAPPAS et al., 2009). Alguns desses casos já são relatados, como a baixa suscetibilidade de *C. tropicalis* ao fluconazol quando comparada a *C. albicans*, e a intrínseca resistência de *C. glabrata* e *C. krusei* a esse medicamento (CRUCIANI; SERPELLONI, 2008).

## 1.5 Antifúngicos

Polienos, fluoropirimidinas, equinocandinas e azóis são utilizados como agentes antifúngicos comerciais no tratamento da candidíase (SANTOS et al., 2018).

### 1.5.1 Polienos

Os polienos foram os primeiros antifúngicos para uso clínico. Eles são fungicidas e têm o espectro mais amplo de atividade em comparação com qualquer outra molécula antifúngica. Anfotericina B, nistatina e natamicina são os três polienos em uso clínico. São produtos naturais e foram isolados dos caldos de cultivo de *Streptomyces nodosus*, *Streptomyces noursei* e *Streptomyces natalensis*, respectivamente (CAMPOY e ADRIO, 2017).

A droga antifúngica anfotericina B (AMB) tem sido usada com sucesso no tratamento das doenças fúngicas invasivas mais comuns desde que foi licenciada pela primeira vez na década de 1950 (OURA, STERNBERG, WRIGHT, 1955). A AMB é uma droga antifúngica que se liga ao ergosterol e forma poros na membrana celular. Essa ligação resulta na formação de poros na membrana que alteram a permeabilidade, leva à perda de sódio, potássio e outros componentes citoplasmáticos, levando a morte do fungo (MESA-ARANGO, et al., 2014; COELHO; CASADEVALL, 2016;).

Além do mecanismo de ação clássico que envolve a ligação de AMB ao ergosterol da membrana, foi demonstrado que a AMB induz o acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BELENKY et al., 2013; GONZÁLEZ-PÁRRAGA et al., 2011; MESA-ARANGO et al., 2014). A ativação de enzimas antioxidantes, como a catalase e superóxido dismutase, é um reflexo direto do estresse oxidativo interno causado por um oxidante externo em *C. albicans* e *C. parapsilosis* (GONZÁLEZ-PÁRRAGA et al., 2003, SÁNCHEZ-FRESNEDA et al., 2014). De fato, concentrações tóxicas de AMB promovem uma intensa resposta enzimática antioxidante (GONZÁLEZ-PÁRRAGA et al., 2011), e um aumento acentuado na atividade da catalase reduz o efeito fungicida do AMB contra *C. albicans* (SOKOL-ANDERSON et al., 1986).

No entanto, o ergosterol das células fúngicas e o colesterol presente nas células dos mamíferos possuem estruturas moleculares semelhantes, o que resulta em uma precária capacidade da droga em diferenciá-los (HUANG et al., 2002; FILIPPIN; SOUZA, 2006). Assim, efeitos tóxicos atribuídos a AMB resultam da sua capacidade em ligar-se ao colesterol e outros componentes da membrana celular dos mamíferos (CHAPMAN; et al., 2008).

Dentre os variados efeitos tóxicos que podem surgir, a nefrotoxicidade tem lugar de destaque, quer pela gravidade, quer pela frequência com que aparece (BROOKS et al., 2005; OSSWALD; GUIMARÃES, 2001). Apesar do amplo espectro de ação, caráter fungicida e limitada resistência intrínseca e adquirida, AMB possui uso restrito devido à alta toxicidade e da inexistência de uma formulação oral para a terapia sistêmica (ABADIO et al., 2011). As novas formulações desta droga, como as formulações lipossômicas e associadas a lipídeos, demonstram um direcionamento mais seletivo dos fungos e menor toxicidade do hospedeiro (DERAY, 2002).

A nistatina e a natamicina são ativas contra *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e *Fusarium*. A nistatina é usada para o tratamento de candidíase cutânea, vaginal e esofágica, e a natamicina pode ser usada para o tratamento de queratose fúngica ou infecções da córnea (ZOTCHEV, 2003). Nistatina e natamicina são usadas apenas como agentes tópicos devido à sua baixa absorção no intestino e sua alta toxicidade (ODDS e BROWN, 2003).

### **1.5.2 Azóis**

Os compostos azólicos, constituem o maior grupo de agentes antifúngicos sintéticos e subdivide-se em compostos imidazólicos e triazólicos, de acordo com o número de átomos de nitrogênio existentes na sua estrutura (BROOKS et al., 2005). Possuem boas propriedades farmacocinéticas e vêm sendo utilizados extensivamente substituindo muitas vezes a AMB (FIGUEIREDO, 2006). Os azólicos são a classe de antifúngicos mais utilizados para tratar

infecções fúngicas por serem baratos e disponíveis para administração oral (WHALEY et al. 2016).

Os derivados azólicos são fungistáticos na maioria dos casos e atuam ligando-se e inibindo a enzima lanosterol 14- $\alpha$ -esterol-desmetilase (codificada por ERG11), que está envolvida na conversão do lanosterol em ergosterol (ALCAZAR-FUOLI e MELLADO, 2012; KANAFANI e PERFECT, 2008). Como o ergosterol é um componente essencial da membrana celular fúngica, o rompimento de sua biossíntese inibe o crescimento fúngico (SANGLARD e COSTE, 2016). Outro mecanismo de ação que pode ser atribuído aos derivados azóis é a produção excessiva e acúmulo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no citoplasma da célula, que leva a degeneração dos componentes estruturais das células fúngicas (MOREIRA, 2010).

Os primeiros compostos azólicos utilizados no tratamento da candidíase foram os imidazólicos (cetoconazol, cloritronazol e mitroconazol), empregados no tratamento de micoses superficiais, em seguida os triazólicos de primeira geração, fluconazol e itraconazol, ativos no tratamento de micoses superficiais e invasivas e, mais recentemente, a segunda geração de triazólicos, o voriconazol e posaconazol que possuem espectros de ação mais alargados que os anteriores (MARIE; WHITE, 2009).

O fluconazol (FLC) é atualmente o agente de primeira linha utilizado no tratamento de infecções por *Candida* spp. A eficácia deste fármaco, associada à disponibilidade da fórmula e a relativa baixa toxicidade fazem com que esse medicamento seja utilizado em muitas situações. Este derivado azólico pode ser administrado tanto por via oral como por via intravenosa uma vez que ambas possuem uma farmacocinética semelhante. Os níveis de FLC no sangue são equilibrados de forma rápida, sendo a droga bem distribuída pelos tecidos (BAGG et al., 2005).

É um antifúngico recomendado na terapêutica de candidíase orofaríngea, esofágica, vaginal e invasiva e também como profilaxia em doentes neutropênicos. Porém, algumas limitações relevantes do fluconazol incluem a inatividade contra fungos filamentosos, a resistência intrínseca de *C. krusei*, a resistência adquirida em certas espécies de *Candida*, nomeadamente de *C. glabrata*, a hepatotoxicidade, a necessidade de ajustes de doses em doentes com deficiência renal e as interferências com outros medicamentos (BAGG et al., 2005; GOMES, 2012).

O itraconazol é um agente antifúngico utilizado no tratamento de candidíase sistêmicas por *Candida* spp. candidemia, candidíase disseminada, pneumonia, ou meningite

causada por *Cryptococcus* spp. e ainda na profilaxia antifúngica de pacientes submetidos ao transplante de medula óssea (UPTODATE, 2012).

### 1.5.3 Equinocandinas

As equinocandinas consistem de um grupo de fármacos antifúngicos semissintéticos, foram descobertas na década de 1970 como metabólito da fermentação da *Aspergillus nidulans*, tendo como alvo a parede celular (TÓTH *et al.*, 2012). Três derivados das equinocandinas semissintéticos foram desenvolvidos: caspofungina, micafungina e anidalfungina (UPTODATE, 2012). Estes compostos inibem a síntese da 1,3- $\beta$ -D-glucana, um componente essencial da parede da célula fúngica (CHEN; SLAVIN; SORRELL, 2011). Esta inibição leva ao rompimento da parede celular, seguido por estresse osmótico, lise e morte do fungo (ANTACHOPOULOS; WALSH, 2005).

As equinocandinas são a mais nova adição da última década ao arsenal antifúngico, que, devido ao seu mecanismo de ação único, visam seletivamente as células fúngicas sem afetar as células dos mamíferos. Desde o momento de sua introdução, elas passaram a ocupar um importante nicho na farmacoterapia antifúngica, devido à sua eficácia, segurança, tolerabilidade e perfis farmacocinéticos favoráveis (PATIL, MAJUMDAR, 2017). Todas as equinocandinas exercem efeito fungicida contra as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SILVA *et al.*, 2011). Já em *C. parapsilosis* as equinocandinas são menos ativas (REBOLI *et al.*, 2007).

### 1.6 Mecanismos de resistência de antifúngicos

A resistência a drogas antifúngicas pode ser caracterizada como microbiológica ou clínica. A resistência microbiológica é definida como a não susceptibilidade de um patógeno fúngico a um agente antifúngico, conforme determinado pelo teste de suscetibilidade *in vitro* e comparado com outros isolados da mesma espécie (KANAFASI e PERFECT, 2008). Em contraste, a resistência clínica refere-se à persistência de uma infecção fúngica, apesar do tratamento com terapia adequada. Embora a resistência microbiológica possa contribuir para o desenvolvimento de resistência clínica, outros fatores podem estar envolvidos, como comprometimento da função imunológica, doença subjacente, redução da biodisponibilidade de drogas e aumento do metabolismo de drogas (REX *et al.*, 1997).

Um mecanismo comum de resistência aos azólicos é em grande parte causada pela superexpressão de genes que codificam bombas de efluxo e diminuem a concentração do fármaco dentro da célula fúngica. Bombas de efluxo em espécies de *Candida* são codificadas pelos genes *CDR* da superfamília de cassetes de ligação de ATP e pelos genes *MDR* da grande família de facilitadores (CHEN *et al.*, 2010; COWEN *et al.*, 2015). *CDR1* e *CDR2*

são os principais transportadores envolvidos na resistência a azóis em *C. albicans* (MISHRA et al., 2007).

Outro mecanismo comum de resistência aos azóis envolve a alteração ou a regulação da enzima alvo lanosterol 14- $\alpha$ -esterol desmetilase, que é codificada pelo gene *ERG11*. As mutações no *ERG11* impedem a ligação dos azóis ao sítio enzimático, reduzindo a eficácia do fármaco. Outras alterações genéticas, como duplicação cromossômica, conversão genética e recombinação mitótica, também foram associadas à resistência a azóis em *Candida* (CUENCA-ESTRELLA, 2014).

A suscetibilidade ou resistência reduzida às equinocandinas tem sido associada a mutações pontuais e mutações intrínsecas em regiões específicas de genes que codificam as subunidades FKS da  $\beta$  (1,3) D-glucana sintase (PERLIN et al., 2007). As espécies de *Candida* tornam-se resistentes à equinocandina por aquisição genética de mutações nos genes FKS, que codificam as substituições de aminoácidos em duas regiões estreitas de FKS1 para todas as espécies de *Candida* e FKS2 para *C. glabrata* (ARENDRUP e PERLIN, 2014).

Outro fator importante que promove à tolerância as equinocandinas é o aumento compensatório na síntese de quitina para fortalecer a parede celular (FIRON, BESSAGE e BUSSEY, 2004). A parede celular fúngica é dinâmica e é capaz de aumentar a produção de um ou mais componentes quando outro é inibido. Estudos *in vitro* mostraram que um aumento na síntese de quitina ocorre em espécies de *Candida* em resposta à inibição da síntese de  $\beta$  (1,3) D-glucana pelas equinocandinas, sendo este aumento mediado pela proteína quinase C (WALKER et al., 2008).

O principal mecanismo de resistência aos polienos envolve uma redução no ergosterol da membrana celular. Essa redução do ergosterol pode ser causada pelo tratamento prévio com triazólicos, o que diminui concentrações de esterol da membrana, ou mutações que afetam a biossíntese do esterol, tais como defeitos em *ERG1*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, *ERG6* e *ERG11*. Além disso, os polienos induzem estresse oxidativo nas células fúngicas, e os isolados resistentes podem ter níveis mais altos de enzimas antioxidantes e/ou alterações na produção de radicais livres (HULL, PARKER e BADER, 2012).

### **1.7 Novos compostos com atividade antifúngica**

Visto os problemas de segurança e toxicidade dos fármacos antifúngicos (principalmente da anfotericina B) e o surgimento de resistência microbiológica (especialmente fluconazol), torna-se imprescindível o desenvolvimento de agentes antifúngicos que proporcionem vantagens em relação aos existentes. A descoberta de

moléculas de antifúngicos exige compreensão dos potenciais alvos de ação para minimizar efeitos adversos e de resistência (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2001).

O processo para o desenvolvimento de novos compostos antifúngicos é baseado em duas abordagens básicas: (1) síntese de análogos, modificações ou derivados de compostos existentes para encurtar e melhorar o tratamento de infecções fúngicas (IF), e (2) busca de novas estruturas para o tratamento da IF (RAO; SRINIVAS, 2011). O desenvolvimento de fármacos sintéticos e semissintéticos, a realização de modificações estruturais produzidas pela introdução ou a substituição de grupamentos químicos podem alterar as propriedades físico-químicas das moléculas, tais como a hidrofobicidade e a densidade eletrônica, levando ao desenvolvimento de análogos mais ativos, seletivos e menos tóxicos (MUSIOL et al., 2010).

O voriconazol (VRZ), fármaco relativamente novo no mercado tem sido utilizado em pacientes transplantados que apresentam febre e neutropenia (WALSH et al. 2002), apresenta atividade fungicida de largo espectro contra as espécies de *Candida*, incluindo os isolados resistentes ao fluconazol. Possui a mesma atividade, ou até superior, que a anfotericina B, com a vantagem de não ser tão hepatotóxico e nefrotóxico e de poder ser administrado por via oral ou parenteral (BAGG et al., 2005; LINARES et al., 2005; GOMES, 2012). O VRZ não possui atividade contra zigomicetos e tem sua ação limitada contra isolados de *C. glabrata* e *C. albicans* resistentes a FLC (HICHERI; COOK; CORDONNIER, 2012). Entretanto, estudos demonstraram variações significativas na biodisponibilidade e farmacocinética em pacientes administrados com VRZ e posoconazol, o que pode limitar eficácia clínica (THOMPSON, WIEDERHOLD, 2010).

O isavuconazol é um novo antifúngico triazólico disponível nas formas de administração oral e intravenosa. É administrado como isavuconazonium (BAL8857), um pró-fármaco formulado para aumentar a sua solubilidade em água e capacidade de ser administrado por via intravenosa. O produto isavuconazol é estruturalmente semelhante ao voriconazol, no entanto, possui uma cadeia lateral de tiazolil-benzonitrila e não possui a fração 5-fluoropirimidina (RYBAK et al. 2015). Tal como os outros triazóis, ele inibe a síntese do ergosterol através da inibição da 14- $\alpha$ -desmetilase, que é um componente chave da via biossintética do ergosterol (WIEDERHOLD, 2009).

A potente atividade antifúngica do isavuconazol é relatada com amplo espectro de ação contra fungos patogênicos, incluindo *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Scedosporium spp.*, *Candida spp.*, *Zygomycetos* e *Cryptococcus spp.* (THOMPSON, WIEDERHOLD, 2010). Em março de 2015, o isavuconazol foi aprovado pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos e pela Agência Europeia de Medicamentos para o tratamento de

aspergilose e mucormicose invasivas. Atualmente, é o único antifúngico oficialmente indicado para a mucormicose invasiva (NATESAN et al. 2016).

A biafungina (CD101) é uma nova equinocandina que apresenta atividade semelhante à caspofungina e à anidulafungina contra espécies de *Aspergillus* e *Candida*, sendo que sua vantagem está em sua farmacocinética. Sua meia vida é cerca de 4 vezes maior (81 h) do que o intervalo da anidulafungina (24 h), a equinocandina de ação mais longa até o momento (CAMPOY E ADRIO, 2017). A biafungina está atualmente em fase III de estudos clínicos. Os testes de sensibilidade *in vitro* mostraram que a biafungina tem atividade contra cepas de *Candida* resistentes a caspofungina contendo mutações FKS (PFALLER et al., 2016).

O SCY-078 é um novo inibidor da  $\beta$ -1,3-glucana sintase estruturalmente diferente das equinocandinas atuais. É um derivado da enfumafungina, um glicosídeo triterpênico produzido pela fermentação do fungo *Hormonema* sp. O SCY-078 demonstrou atividade *in vitro* e *in vivo* contra todos os isolados testados *Candida* spp., incluindo *Candida auris*, bem como outras espécies resistentes aos triazóis e as equinocandinas (MCCARTHY et al., 2016). Este fármaco recebeu a designação Produto de Doenças Infecciosas Qualificadas (QIDP) e sua formulação oral está atualmente em desenvolvimento clínicos para o tratamento de candidíase invasiva, enquanto sua formulação IV (intravenosa) está na fase 1 (APGAR et al., 2015; SCORNEAUX et al., 2017).

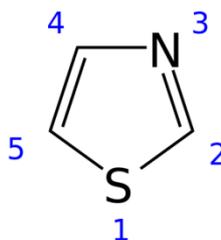
VT-129 e VT1161 pertence a uma nova classe de triazóis que inibem a enzima responsável pela etapa final da biossíntese do ergosterol: a esterase fúngica 14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51). Estes compostos foram identificados como parte de um esforço para encontrar moléculas com baixa afinidade para as enzimas CYP humanas, incluindo o CYP51 humano (WARRILOW et al., 2014). O VT1161 é muito eficaz contra os isolados de *Candida* resistentes ao fluconazol e encontra-se em ensaios de fase clínica 2b para o tratamento de onicomicose e candidíase vulvovaginal recorrente (GARVEY et al., 2015; CAMPOY e ADRIO, 2017). VT-1129 é eficaz contra isolados de *Cryptococcus* e recebeu a designação de QIDP e está atualmente em fase 1 de ensaios clínicos para o tratamento da meningite criptocócica (PIANALTO e ALSPAUGH, 2016).

A Nikomicina Z é uma droga antiga que ressurgiu recentemente devido a um aumento do interesse em drogas antifúngicas que ajam na parede celular fúngica. A nikomicina Z é um inibidor competitivo da quitina sintase, atuando para diminuir a estabilidade da parede celular. O medicamento está sendo testado em ensaios clínicos de fase 1 para o tratamento da coccidioidomicose (CAMPOY e ADRIO, 2017; PIANALTO e ALSPAUGH, 2016).

Outros agentes antifúngicos em desenvolvimento incluem F901318 (inibidor da diidroorotato desidrogenase), VT-1598 (inibidores da metaloenzima do CYP51) e ASP2397 (agente do tipo sideróforos do hidroxamato) (MCCARTHY et al., 2017).

### 1.7.1 Tiazoles e seus derivados

Dentre as diversas moléculas em estudo para o desenvolvimento de novos compostos com atividade antifúngica estão os tiazóis. Tiazol ou 1,3 tiazol é um composto orgânico heterocíclico que possui um anel de cinco membros contendo três átomos de carbono, um de enxofre e um de nitrogênio (**Figura 1**). Esse anel pode ser substituído nas diversas posições, sendo a 2 e 4 as mais comuns. Os tiazoles são membros dos heterociclos azólicos que incluem imidazoles e oxazoles, possuem uma cor amarelo claro e seu ponto de ebulição é de 116-118°C. Esses compostos ocorrem amplamente na natureza na forma de alcalóides, vitaminas, pigmentos e como constituintes de células vegetais e animais (KASHYAP et al. 2012)



**Figura 1.** Núcleo tiazolínico das substâncias da classe dos heterocíclicos tiazólicos.  
Fonte: Própria do autor

Os tiazoles são encontrados em muitos compostos biologicamente ativos potentes, como sulfatiazol (antimicrobiano), ritonavir (antirretroviral), abafungina (antifúngico), bleomicina e tiazofurina (antineoplásico) (KASHYAP et al. 2012). A química dos compostos contendo tiazol é particularmente interessante devido à sua capacidade de fornecer quimioterápicos valiosos, tais como agentes antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório e analgésico, anti-hipertensivo, anti-HIV, antitumoral, anticonvulsivante, herbicida, inseticida, esquistossomicida e anti-helmíntico (LESYK et al., 2006; HOLA et al., 2003; METZGER, 1984; KUCUKGUZEL et al., 2006; CARRADORI et al., 2013).

Por outro lado, as hidrazonas, pertencentes à classe de compostos orgânicos com estrutura C=NNH, possuem diversas propriedades biológicas e farmacológicas, dentre elas atua como antimicrobiano, antiinflamatório, analgésico, antifúngico, antituberculose, antiviral, anticâncer e anticonvulsivante (VERMA et al., 2014). A combinação de hidrazonas com outro grupo funcional leva a formação de compostos com características físicas e químicas únicas (XAVIER, THAKUR e MARIE, 2012). Devido às suas propriedades

biológicas e farmacológicas, elas são consideradas importantes para a síntese de compostos heterocíclicos (BANERJEE et al., 2009).

Hidrazonas heterocíclicas, derivadas dos tiazóis, constituem uma classe importante de moléculas de fármacos biologicamente ativos que atraíram a atenção de químicos medicinais devido à sua gama de propriedades farmacológicas (OZDEMIR et al. 2008). Aliado a isso, estudos mostram que derivados de 2-tiazolil-hidrazona apresentam atividade antifúngica contra isolados de *Candida* spp. (CHIMENT, et al. 2007), *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus* (BHARTI et al. 2010) e *C. tropicalis* (CUKUROVALI et al. 2006).

A atividade antifúngica dessas moléculas foi relatada contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (CHIMENT et al., 2007; BHARTI et al., 2010; SÁ et al., 2015; LINO et al., 2018, CRUZ et al. 2018). Além da atraente atividade antifúngica, esses derivados exibiram baixa toxicidade para as células VERO, embrionárias humanas e hepáticas (SÁ et al., 2017; LINO et al., 2018; CRUZ et al. 2018).

### **1.8 Modelos invertebrados**

A pesquisa em modelos animais é necessária tanto para uma melhor compreensão da natureza da patogênese fúngica e das interações com o hospedeiro, quanto para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento da candidíase (ARVANITIS et al., 2013). Nas últimas décadas, um grande número de modelos de invertebrados foi desenvolvido e estão sendo usados para estudar patogenicidade experimental. Estes modelos podem imitar a patogênese da infecção em seres humanos, incluindo a colonização, invasão e interação com o sistema imunológico do hospedeiro (DE REPENTIGNY, 2004).

Apesar dos vários hospedeiros invertebrados usados para modelar infecções, desde protozoários de células individuais até insetos, nenhum modelo de hospedeiro único pode responder a todas as questões científicas. A seleção do hospedeiro apropriado deve basear-se no traço de virulência ou na resposta do hospedeiro em estudo e no comprometimento financeiro, espacial e temporal requerido. Dentre várias pesquisas, o uso de modelos hospedeiros pode ser usado para facilitar o estudo de substâncias novas ou já existentes (DESALERMOS, FUCHS, MYLONAKIS, 2012).

Os modelos invertebrados *Caenorhabditis elegans* e os insetos *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella* têm sido os mais usados no campo da descoberta de drogas e também tem para estudar a patogênese da candidíase de *C. albicans* (DESALERMOS, FUCHS, MYLONAKIS, 2012; ORTEGA-RIVEROS et al., 2017).

Análises genéticas mostraram que a coordenação das respostas de defesa do nematóide envolve vários elementos altamente conservados que possuem ortólogos de mamíferos (PUKKILA-WORLEY e MYLONAKIS, 2010). Já os insetos e humanos possuem componentes da resposta imune inata conservados, assim, a análise das respostas dos insetos a patógenos fúngicos pode fornecer informações gerais sobre o processo de defesa do hospedeiro contra fungos (COHN et al, 2001; BRENNAN et al, 2002).

### **1.8.1 *Caenorhabditis elegans***

O nematóide *Caenorhabditis elegans* foi usado pela primeira vez em neurobiologia e genética na década de 1960 pelo pesquisador S. Brenner e a partir de então ganhou popularidade como modelo *in vivo* para o estudo de uma variedade de doenças infecciosas e imunológicas. Algumas propriedades que o tornam um modelo favorável são seu rápido ciclo de vida, a sua simplicidade fisiológica, a produção de progênie geneticamente idêntica (hermafrodita autofertilizante), a transparência de sua cutícula que permite a observação direta de processos que acontecem dentro do nematóide, e sua fácil obtenção (ARVANITIS et al., 2013).

*C. elegans* provou ser um modelo essencial para o estudo da virulência de fungos (MYLONAKIS, CASADEVALL, AUSUBEL, 2007; PUKKILA-WORLEY et al., 2009). Além disso, o modelo *C. elegans* é uma poderosa plataforma *in vivo* para identificação de novos compostos antifúngicos, bem como para a elucidação dos mecanismos de ação para drogas eficazes contra infecções causadas por patógenos bacterianos e fúngicos (COLEMAN et al., 2011; BREGER et al., 2007).

### **1.8.2 *Galleria mellonella***

As larvas da traça de cera, *G. mellonella* foram usadas pela primeira vez para estudar fungos entomopatogênicos (GOTTZ et al., 1997). Segundo ARVANITIS et al. (2013) o modelo de *G. mellonella* tornou-se mais popular para o estudo de patogênese fúngica a partir do momento em que COTTER e colaboradores (2000) mostraram que as larvas desse invertebrado podiam ser mortas por *C. albicans*, mas não por *Saccharomyces cerevisiae*. Alguns anos depois, em 2002, BRENNAN e colaboradores encontraram que a resposta à infecção das larvas de *G. mellonella* a uma série de mutantes de *C. albicans* era semelhante aos observados em ratos, comprovando que o uso das larvas poderia ser usado como mecanismo primário de triagem para reduzir o uso de mamíferos em teste de virulência.

Dentre as principais vantagens deste modelo, está a fácil obtenção das larvas, não necessita de equipamentos especiais de laboratório para manuseio e, o mais importante é que as larvas de *G. mellonella* larvas podem crescer a 37°C, tornando-os ideais para o estudo de

interações e fatores que podem estar presentes somente a esta temperatura. Além disso, a incubação das larvas a esta temperatura aumenta sua resposta imune a agentes patogênicos (DUNPHY et al, 2003; ARVANITIS et al, 2013).

Por outro lado, as limitações do modelo comparadas com as hospedeiros modelo são que *G. mellonella* não tem um genoma totalmente sequenciado e não há método estabelecido para criar cepas mutantes (ARVANITIS et al, 2013) .

## 1. JUSTIFICATIVA

A candidíase é uma infecção fúngica de caráter oportunista que afeta principalmente pacientes imunocomprometidos e indivíduos hospitalizados que são submetidos a diferentes tipos de tratamento, sendo causa de altas taxas de mortalidade dentre estes pacientes. O aumento da frequência de infecções fúngicas oportunistas com alta mortalidade e a resistência de algumas espécies de *Candida* spp. aos fármacos já existentes tem acelerado os esforços para o desenvolvimento de novas drogas com amplo espectro e baixa toxicidade que sejam seguros e efetivos para o tratamento da candidíase.

O estudo e desenvolvimento de substâncias sintéticas com atividade biológica e manipulação química podem levar ao desenvolvimento de novas moléculas com melhor atividade antifúngica, com menor toxicidade e redução do tempo de tratamento. Nesse contexto, o estudo de novas substâncias com potencial antifúngico contra *Candida* spp. a partir da avaliação da atividade *in vitro* e em modelo experimental pode direcionar o desenvolvimento de novos medicamentos, ampliando o arsenal de drogas eficientes para o tratamento da candidíase.

### 3 OBJETIVOS

Avaliar *in vitro* e *in vivo* a atividade antifúngica de substâncias de derivados hidrazona-tiazólicos contra *Candida albicans* e estudar os possíveis efeitos destas substâncias nos fatores de virulência e nos genes desta levedura.

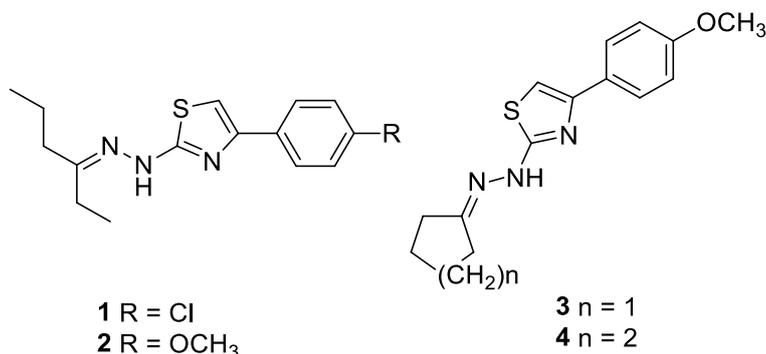
#### 3.1 Objetivos específicos

- Verificar a concentração inibitória mínima, fungicida mínima e concentração inibitória fracional das substâncias em estudo contra isolados de *C. albicans* e *C. neoformans*;
- Verificar a toxicidade das substâncias selecionadas utilizando células de rim de macaco (VERO), eritrócitos humanos e células de fígado derivadas de carcinoma (HepG2);
- Verificar a atividade das substâncias sobre a adesão, filamentação, e biofilme de *C. albicans*.
- Analisar a expressão dos genes ALS1, ALS3, HWP1, BCR1, CPH1 e EFG1 de *C. albicans*, quando tratada com as substâncias.
- Analisar a toxicidade das substâncias selecionadas com melhor atividade antifúngica em modelos de invertebrados;
- Analisar a sobrevida do nematoide *C. elegans* e de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* e tratadas com as substâncias selecionadas;
- Avaliar eficácia do tratamento utilizando as substâncias em candidíase oral e sistêmica em modelo murino;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Substâncias experimentais

As substâncias alvo do presente estudo são derivados hidrazino-tiazólicos que demonstraram atividade contra *Candida* spp. em estudos preliminares e serão denominadas, neste trabalho, por substâncias: **1**, **2**, **3** e **4** (**Figura 2**). Estas substâncias foram gentilmente cedidas pela professora Renata Barbosa de Oliveira do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).



**Figura 2** – Estruturas químicas dos derivados hidrazino-tiazólicos **1- 4**. **2** - [(2- (hexan-3-ilideno) hidrazino) -4- (4-clorofenil) - tiazole (**1**), **2** - [(2- (hexan-3-ilideno) hidrazino) -4- (4-metoxifenil) -tiazol (**2**), **2** - [(2- ciclohexilideno) hidrazino] -4- (4-metoxifenil) -tiazol (**3**) e **2** - [(2- ciclopentilideno) hidrazino] -4- (4-metoxifenilo) -tiazol (**4**) foram sintetizados de acordo com metodologia previamente descrita por LINO et al. (2018).

**Fonte:** Renata Barbosa de Oliveira do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### 4.2 Determinação da atividade antifúngica

#### 4.2.1 Microrganismos e preparo do inóculo

Neste estudo foram utilizados isolados referência de *C. albicans* (CAN14), *C. albicans* (DAY185), *C. dubliniensis* (ATCC MYA-646), *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) (ATCC 6258), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. tropicalis* (ATCC 13803), *Cryptococcus neoformans* (H99) e isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. neoformans* coletados no Massachusetts General Hospital, MA, EUA (FUCHS et al., 2016) e isolados clínicos de *C. parapsilosis* coletados no Brasil (SOUSA et al., 2015). Todas as estirpes foram armazenadas como reservas congeladas a -80 ° C e sub-cultivadas em placas Sabouraud Dextrose Agar (SDA) a 30 °C, conforme necessário.

Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens, com crescimento em ágar Sabouraud Dextrose (ASD), durante 48-72 horas, a 35°C e então, ressuspensas em tubos

contendo solução salina (0,9%) estéril. A transmitância dos inóculos foi então ajudada para 75-77% sob o comprimento de onda de 530 nm. Logo, este inóculo inicial foi diluído em RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) acrescido de MOPS 0,165 mol/L, numa proporção de 1:50 e, em seguida, novamente diluído, numa proporção de 1:20, de maneira a atingir uma suspensão com  $1$  a  $5 \times 10^5$  células/ml, de acordo com o protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008).

#### **4.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com os padrões propostos no CLSI M27-A3 (2008). Substâncias sintéticas e anfotericina B foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) enquanto o fluconazol foi dissolvido em água destilada estéril. Prepararam-se diluições seriadas em meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina, a pH 7,0 com 0,165 M de ácido propanossulfônico de morfolina (MOPS). Em seguida, 50  $\mu$ L de cada diluição foram distribuídos em microplacas de 96 poços (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA). A faixa de concentração testada foi de 0,125 a 64,0  $\mu$ g / mL para as substâncias sintéticas e fluconazol (FLC) e 0,0125 a 16,0  $\mu$ g / mL para a anfotericina B (AMB). Controles negativos contendo meio RPMI e RPMI com o solvente foram incluídos. O controle positivo do crescimento foi composto por inóculo fúngico e RPMI-1640. As placas foram incubadas a 35 ° C durante 48 horas e a leitura foi realizada visualmente. O valor da CIM foi determinado pela inibição do crescimento total em comparação com o controle do crescimento. Três experimentos independentes foram realizados em duplicata.

#### **4.3 Ensaio da concentração fungicida mínima**

O ensaio de concentração fungicida mínima (CFM) foi realizado de acordo com REGASSINI et al. (2009). A CFM *in vitro* de cada substância foi determinada por meio do estriamento de 20 $\mu$ L de cada poço que apresentou 100% de inibição do crescimento fúngico no teste da CIM, em placas de Petri contendo o ágar Sabouraud dextrose (ASD). Essas placas foram incubadas a 35°C por 48 horas para o isolado SC5314 de *C. albicans* e por 72 horas para o isolado H99 de *C. neoformans*. A menor concentração em que não houve crescimento de colônias foi considerada a CFM. Esse experimento foi realizado três vezes e em duplicata.

#### **4.4 Avaliação da concentração inibitória fracional (CIF)**

As substâncias experimentais **1**, **2**, **3** e **4** foram diluídas oito vezes, as concentrações utilizadas foram escolhidas de acordo com os resultados encontrados no ensaio da CIM. Também foram preparadas diluições do fluconazol e da anfotericina B (Sigma, USA). Posteriormente, 50  $\mu$ L de cada diluição da substância a ser testada foi adicionada nas placas

de 96 poços em orientação vertical e 50 µL das diluições do fluconazol foram adicionadas em posição horizontal. Dessa forma, cada placa apresentou várias combinações de concentrações da substância a ser testada com o fluconazol. O mesmo procedimento foi realizado em combinação com a anfotericina B. O inóculo foi preparado de acordo com o item 4.2.1 e as placas foram incubadas a 35°C por um período de 48 horas para *C. albicans* e por 72 horas para *C. neoformans* H99. A concentração inibitória fracional (CIF) foi calculada pela combinação da CIM da substância com anfotericina B (ou fluconazol) dividida pela CIM da substância sozinha e da CIM da anfotericina B (ou fluconazol) sozinha. O índice de CIF (ICIF) foi calculado pela soma das CIFs da anfotericina B e da substância experimental. O efeito de sinergismo foi considerado quando o valor de CIFI foi  $\leq 0,5$ , e a ausência de interação quando o índice foi de  $>0,5$  até 4,0 e o antagonismo quando o índice foi  $>4,0$  (CUENCA-ESTRELLA, 2004). Esse experimento foi realizado duas vezes em duplicata, com o isolado SC5314 de *C. albicans* e H99 de *C. neoformans*.

#### **4.5 Ensaios de citotoxicidade *in vitro***

##### **4.5.1 Avaliação dos efeitos citotóxicos em células VERO**

A linhagem VERO (células de rim de macaco africano) foi utilizada como modelo de células normais e foi gentilmente cedida pela Dr. Erna Kroon (UFMG). Esta linhagem foi mantida em fase de crescimento logarítmica em D-MEM suplementado com 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina enriquecida com 5% de soro bovino fetal. As células VERO foram mantidas a 37°C em um incubadora humidificada com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. O meio foi mudado duas vezes por semana, e as células foram regularmente examinadas e utilizadas até 20 passagens. Células VERO a uma concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço foram pré-incubadas em placas de 96 poços durante 24h a 37°C para permitir que as células se adaptassem antes da adição das substâncias teste. A concentração inibidora semi-máxima (IC<sub>50</sub>) foi determinada em uma gama de concentrações (oito diluições não seriadas: de 100 a 0,0128 µM). As células VERO foram incubadas com as substâncias **1** e **2** em uma atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>/95% de umidade a 37°C por 48 h. A viabilidade celular foi estimada pela mensuração da taxa de redução mitocondrial do corante tetrazólio, 3-(4,5-brometo de dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Amresco, Solon, EUA). Os controles incluíam o meio completo contendo a substância (fundo) e o meio completo sem as substâncias. O meio completo isento das substâncias foi usado como controle (em branco). Os resultados foram expressos como uma porcentagem da inibição da viabilidade celular em comparação com o DMSO a 0,5% controle. Interações entre as substâncias e a mídia foram estimados com base em variações entre o meio contendo as substâncias e meios livres das

substâncias para evitar falsos positivos ou falsos negativos (MONKS et al., 1991). Todas as amostras foram testadas em triplicata em dois experimentos independentes.

#### **4.5.1.1 Índice de seletividade (IS)**

Dados do IC50 em células VERO e de concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizados para calcular o índice de seletividade (IS) das substâncias **1** e **2**. O IS foi determinado pela razão do valor do IC50 em células VERO dividido pelo valor do CIM. Calculou-se  $IS = IC_{50}/CIM$ . Esse cálculo matemático foi realizado com os valores de IC50 em células VERO e o valor de CIM do isolado de *C. albicans* SC5314. Valores maiores que 10 foram considerados indicativos de ausência de toxicidade, enquanto substâncias com valores abaixo de 10 foram consideradas tóxicas (PROTOPOPOVA et al, 2005).

#### **4.5.2 Ensaio de atividade hemolítica das substâncias em eritrócitos humanos**

O ensaio de hemólise em eritrócitos humanos, assim como o teste de toxicidade em células do fígado e os ensaios com *C. elegans* e *Galleria mellonella* foram executados em parceria com a pesquisadora Beth Burgwyn Fuchs e o professor Eleftherios Mylonakis da Brown University – EUA.

A habilidade das substâncias em causar hemólise foi determinada de acordo com o protocolo descrito por ROSCH *et al.* (2010), com modificações. Em uma placa de 96 pocos, 50 µL de 2% eritrócitos humanos suspensos em PBS foram adicionados a 50 µL das substâncias **1**, **2**, **3** e **4** serialmente diluídos (0,125 a 64,0 µg/mL) em PBS e incubados a 37°C por 1 hora. Como controle positivo foi utilizado o Triton-X em concentrações que variaram de 0,001 a 1%. A placa foi em seguida centrifugada a 500 g por 5 minutos e 50 µL do sobrenadante de cada poço da placa foi transferido para uma nova placa de 96 poços. A hemólise foi confirmada por observação visual e lida em um leitor de placa Vmax (MolecularDevice, Sunnyvale, CA, USA) medindo a absorbância em 540nm. O tratamento foi conduzido em triplicata.

#### **4.5.3 Teste de citotoxicidade em células do fígado**

Para mensurar a citotoxicidade das substâncias em células do fígado foi utilizado o protocolo de KWON *et al* (2014) onde células de HepG2 (ATCC HB 8065; Manassas, VA, USA) foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 25mM de D-glicose, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio e 1% penicilina/estreptomicina e mantidas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> até atingir 70-80% de confluência. Em seguida, foi realizada a ressuspensão das células em DMEM e foram adicionados 100 µL de células em placas de 96 poços a uma concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço. As substâncias

**1, 2, 3 e 4** foram diluídas em série (0,25 a 64,0 µg/mL) em DMEM sérico e isento de antibióticos, adicionado à monocamada de células e em seguida as placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Às 4 horas antes do final do período de incubação, 10µL de 2-(4-iodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2, 4-disulfofenil) -2H-tetrazólio (WST-1) (Roche, Mannheim, Alemanha) foi adicionado a cada poço. A redução de WST-1 foi monitorada a 450 nm usando um leitor de microplacas Vmax (MolecularDevice, Sunnyvale, CA, USA). Os ensaios foram realizados em triplicata e a porcentagem de sobrevivência foi calculada pelos controles do veículo tratados com DMSO.

#### **4.6 Ensaios de inibição dos fatores de virulência**

##### **4.6.1. Teste de Inibição da Filamentação *in vitro***

Para o teste de inibição da filamentação *in vitro* o isolado de *C. albicans* SC5314 foi tratado com a substância **2** como descrito no ensaio de concentração inibitória mínima, porém utilizando o meio de Lee (LEE et al., 1975) com modificações (LU et al., 2011). O fluconazol foi empregado como controle. Após 24 horas de incubação a 35°C, a CIM foi determinada e as morfologias celulares foram observadas em microscópio óptico (AXIOPLAN, Carl Zeiss, Thornwood, NY, EUA).

##### **4.6.2 Avaliação da inibição da atividade de proteinase e fosfolipase**

Os valores de CIM para as substâncias alvo obtidos para cada isolado foram utilizados para verificar a inibição da atividade de proteinase e fosfolipase de *C. albicans* SC5314. Uma suspensão de levedura foi preparada em SDB 75% de transmitância a 530 nm, 1 mL desta suspensão foi adicionada a 4 ml de SDB com as substâncias alvo **1, 2, e 3** e o fluconazol. Um controle que consiste SDB sem qualquer droga foi utilizado. Os tubos foram incubados a 37°C durante 60 minutos. Depois desta breve exposição, as substâncias foram removidas por dois ciclos de centrifugação com PBS por 10 minutos a 3000 x g. Ao precipitado foi adicionado 3 mL de caldo SDB. Antes dos ensaios, as contagens de células viáveis do controle e das amostras de teste foram realizadas após a lavagem das subatâncias através da inoculação de uma alíquota das suspensões em SDB.

Para determinação da inibição da produção de proteinase pelas leveduras foi feito um meio sólido contendo 11,7g de Yeast Carbon Base (YCB), 1,0g de extrato de levedura, e 2,0g de albumina de soro bovino (ASB) em 100ml de água, a solução foi ajustada para pH 5,0, esterilizada por filtração e adicionada a uma solução de ágar esterilizada em autoclave (18g de ágar em 900mL de água destilada). O inóculo composto por 10µL de uma suspensão de 10<sup>6</sup> células/mL foi colocado na placa com o meio contendo ASB. As placas foram incubadas por sete dias a 28 °C e a proteólise da ASB foi visualizada como um halo transparente após a

coloração com negro de amido (negro de amido, 1g, ácido acético glacial, 199mL, água destilada, 100mL). A atividade da proteinase foi observada com uma clarificação visível presente ao redor da colônia. Cada uma das amostras foi testada em triplicata.

Para verificação da inibição da fosfolipase, um meio base contendo 20g de glicose, 10g de peptona, 5g de extrato de levedura, 58,5 g de cloreto de sódio, 0,55g de cloreto de cálcio e 20g de ágar em 840mL de água destilada foi preparado. O meio foi autoclavado e, após o resfriamento, foram adicionados 160 ml de uma emulsão de gema de ovo (50% gema de ovo, 50% solução salina). O inóculo de 10 $\mu$ L de uma suspensão de 10<sup>6</sup> células/mL foi depositado sobre este meio. As placas foram incubadas a 37°C por quatro dias. A atividade da fosfolipase foi avaliada da mesma forma como para proteinase descrita no item anterior.

#### **4.6.3 Inibição da adesão de *C. albicans* em Células Epiteliais Buciais Humanas (CEBH)**

Para realizar o teste de adesão foi utilizado o método descrito por KIMURA e PEARSALL (1978) com adaptações. Primeiramente, uma suspensão de 1 mL de 10<sup>6</sup> células / substâncias **1**, **2**, e **3** ou fluconazol em concentrações iguais ao CIM, e foi preparado um controle positivo contendo meio sem presença de agente antifúngico. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora com agitação a 120  $\times$  g. Após o período de tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS antes da suspensão em 3 mL de PBS.

CEBH de voluntários adultos saudáveis foram recolhidos de manhã. A suspensão de CEBH foi lavada quatro vezes em PBS e centrifugada a 3000  $\times$  g durante 10 minutos e ressuspensa em PBS, a uma concentração final de 10<sup>5</sup> células / mL. Em seguida, 0,5 mL de suspensão de CEBH e 0,5 mL de suspensão de levedura foram misturados suavemente e incubados em um agitador rotativo a 37°C por 1 hora. No final deste período, as células foram filtradas em filtro de policarbonato com tamanho de poro 12  $\mu$ m e lavadas com 100 mL de PBS para remover leveduras não aderidas. Em seguida, o filtro foi removido e colocado em uma lâmina de vidro. As lâminas foram secas ao ar, fixadas com calor e coradas com violeta de cristal. As leveduras aderentes às células bucais foram contadas sob um microscópio de luz (40x). Em cada lâmina, foram examinadas cinquenta CEBH e contados o número de células fúngicas associadas às CEBH.

#### **4.6.4 Susceptibilidade de biofilmes maduros às substâncias **1**, **2** e **3****

##### **4.6.4.1 Preparo das Suspensões de *C. albicans***

Suspensões padronizadas foram preparadas a partir de culturas da cepa de referência de *Candida albicans* SC5314, crescidas em 5 mL de caldo base de azoto de levedura (YNB) (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, EUA) a 37°C durante 18 h. Em seguida, as células

foram centrifugadas a  $2.000 \times g$  por 10 min, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensão em salina estéril (NaCl 0,9%). A suspensão foi homogeneizada por 30 s no vórtex. Esse processo foi repetido por duas vezes. As densidades celulares foram ajustadas a  $1 \times 10^7$  células viáveis/mL por meio de um hemocítômetro.

#### **4.6.4.2 Formação do Biofilme**

A formação do biofilme foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por SENEVIRATNE et al. (2009) e COSTA et al. (2013) com algumas modificações. Inicialmente, 100  $\mu$ L da suspensão padronizada de *C. albicans* contendo  $10^7$  células/mL com RPMI foi adicionada em cada poço das placas de microtitulação de 96 poços e incubada a 37 °C por 90 minutos sob agitação a 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo). Após o período de adesão inicial, o sobrenadante foi aspirado e cada poço lavado com 200  $\mu$ l de solução de salina estéril. Esse procedimento foi repetido por 2 vezes. Em seguida, 200  $\mu$ l de RPMI foram adicionados e as placas incubadas a 37 °C por 48 h sob agitação. O caldo RPMI foi trocado a cada 24 horas

Transcorrido o tempo de 48 h, os biofilmes formados foram tratados com diferentes concentrações dos compostos **1**, **2** e **3**. Os compostos foram diluídos em RPMI em concentrações referentes a 1X MIC, 2X MIC e 4X MIC e as placas incubadas a 37 °C por 24 h sob agitação.

#### **4.6.4.2 Quantificação de biofilme**

A quantificação dos biofilmes tratados com os compostos 1, 2 e 3 foi realizada através da contagem de células viáveis (UFC/mL). O caldo do biofilme foi aspirado e lavado com solução salina. Essa etapa foi realizada por 2 vezes. Posteriormente, 200  $\mu$ L de solução salina foi adicionada em cada poço e os biofilmes rompidos por homogeneização dos poços por 30 s em homogeneizador com amplificação de 25%. Diluições seriadas foram realizadas e alíquotas de 0,1 mL de foram semeadas em placas de *Petri* contendo ágar Sabouraud-Dextrose e incubadas a 37°C por 48h. Após esse período, a UFC/mL foi calculada.

### **4.7 Análise do efeito das substâncias 1, 2 e 3 sobre a expressão dos genes *ALS1*, *ALS3*, *HWPI*, *BCR1*, *CPH1* e *EFG1* de *C. albicans***

Os genes alvos investigados *ALS1*, *ALS3*, *HWPI* (envolvidos na aderência), *BCR1*, *CPH1* e *EFG1* (formação de biofilme e filamentação) foram normalizados pelo gene de referência. Para a escolha do gene de referência, os genes *PMA* (gene ATPase da membrana plasmática) e *ACT1* (Actina 1) foram analisados no software *RefFinder* (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>). A amostra calibradora do ensaio foi o grupo formado por *C. albicans* (biofilme de 48h tratado com solução salina). Todos os iniciadores

(primers) utilizados foram específicos para *C. albicans* e não houve amplificação em nenhum outro tipo de microrganismo.

Para a análise da expressão gênica, os biofilmes foram previamente formados em fundo de placas de 24 poços da mesma maneira descrita anteriormente (item “Formação de biofilme”).

Após a formação do biofilme maduro, foi realizada a extração de RNA total utilizando-se o Kit Trizol (Ambion, Inc, AM1926), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA extraído foi quantificado usando micro-espectrofotômetro Nanodrop 2000c UV- Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante, e os tubos armazenados no freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para cada reação de síntese da primeira fita de cDNA, foi utilizado 700 ng de RNA, previamente tratado com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), utilizando o Kit SuperScript™ IV First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as especificações do fabricante. A cada reação foi adicionado: 8  $\mu\text{L}$  do RNA tratado; 10  $\mu\text{L}$  de mix RT (2X); 2  $\mu\text{L}$  de Enzima mix para um volume final de 20  $\mu\text{L}$  de reação. As reações foram incubadas em termociclador (Mastercycler-Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 20 min a  $25^{\circ}\text{C}$ , seguidos por 30 min a  $50^{\circ}\text{C}$  e 5 min a  $85^{\circ}\text{C}$ . Transcorrido esse ciclo, os tubos foram colocados no gelo e adicionado 1  $\mu\text{L}$  de RNase H. A seguir, os tubos foram incubados por mais 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$  e o cDNA armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para as reações de RT-qPCR foi utilizado o kit SYBR® Green (Kit Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG - Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. As reações foram realizadas, em triplicata, no termociclador Step One Plus Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, Foster, CA, USA), constituindo-se de 12,5  $\mu\text{L}$  de Supermix Platinum SYBR Green, 1  $\mu\text{L}$  de ROX (corante de referência), 10  $\mu\text{M}$  de primer forward, 10  $\mu\text{M}$  de primer reverse, cDNA alvo, sendo completado com água livre de RNase para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram  $50^{\circ}\text{C}$  por 2 min;  $95^{\circ}\text{C}$  por 2 min; seguidos de 45 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 s e  $60^{\circ}\text{C}$  por 30 s, sendo os dados coletados na última etapa. O nível de expressão gênica foi calculado aplicando-se o método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

#### **4.8 Ensaio de sobrevivência em modelos de animais invertebrados e em modelo murino**

##### **4.8.1 Curva de sobrevivência de *C. elegans***

###### ***Preparo das placas com o inóculo***

Para este experimento, as metodologias descritas por BREGER et al. (2007) e foram usados com algumas modificações. O isolado de *C. albicans* (SC5314) foram crescidas em

meio YPD a 30°C por 48 hrs. Após esse período de crescimento, 200µL deste inóculo foi adicionado em placas contendo meio sólido de BHI adicionado de canamicina (45 µg / mL), ampicilina (100 µg / mL) e estreptomicina (100 µg / mL).

#### ***Ensaio de sobrevivência***

Primeiramente, *C. elegans* foram cultivados em placas de NGM, com uma cultura prévia de 12 horas de *E. coli* OP50, por 60 horas a 25°C para atingir o estágio de desenvolvimento denominado “Young adults”, ideal para trabalhar com *C. albicans* nesse modelo invertebrado. Decorrido esse tempo, os nemátodos foram lavados 2 vezes com tampão M9, através de centrifugação (1100 rpm durante 30 segundos). Os vermes sincronizados foram adicionados ao centro das placas de BHI contendo uma camada de *C. albicans* SC5314 e incubadas por 4 horas a 25 °C. Após o período de incubação os vermes foram lavados da placa usando meio M9, e foram posteriormente lavados por mais quatro vezes com M9 e coletados por centrifugação suave. Os vermes infectados com a levedura e devidamente lavados foram então transferidos para uma placa de seis poços contendo 2 mL de meio de cultura líquido composto por 80% de tampão M9, 20% de BHI, 10 mg/mL de colesterol em etanol e 45 mg/mL de canamicina. Aos poços foram adicionadas concentrações de 1, 2, 4 e 8 µg/mL das substâncias **1**, **2**, **3**, e **4**. Os controles com poços contendo apenas o meio e poços com fluconazol (4 µg/mL) foram adicionados. As placas foram incubadas a 25° C e foram então examinados em intervalos de 24 horas para sobrevivência. Neste ensaio, foram utilizados 45 vermes por grupo experimental e os vermes foram considerados mortos quando não responderam ao toque por uma palheta de platina; vermes mortos foram removidos. A curva de morte e estimativa das diferenças na sobrevivência foi determinada pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

#### **4.8.1 Ensaio de toxicidade das substâncias em *Galleria mellonella***

Para realizar o ensaio de toxicidade das substâncias em *G. mellonella*, as larvas compradas em Vanderhorst Wholesale em St. Mary’s, Ohio foram tratadas com as substâncias na concentração de 10 mg/kg, sendo que as substâncias foram injetadas na última pata direita da larva. A toxicidade foi avaliada por um período de 7 dias. Em seguida foi realizado o ensaio de sobrevida para as substâncias que não apresentaram toxicidade.

#### **4.8.1.2 Ensaio de sobrevida em *G. mellonella***

O ensaio de *G. mellonella* infectada com *C. albicans* foi realizado como descrito por FUCHS et al. (2010). Para realização do ensaio, o isolado de *C. albicans* (SC5314) foram crescidas em meio YPD. Após o crescimento, as células foram lavadas por três vezes para

retirada do meio de cultura, ressuspendidas em PBS, contadas em câmara de Neubauer e, em seguida, o número de células foi ajustado para uma densidade de  $1,0 \times 10^5$  células/larva. Posteriormente, foram selecionadas larvas de cor clara e com peso de  $250 \pm 25$  mg para realizar a infecção. Foram utilizadas 16 larvas para cada grupo testado. Uma seringa Hamilton de 10  $\mu$ l foi utilizada para injetar 10  $\mu$ L do inóculo dentro da hemocele de cada larva por meio da última pata esquerda de cada larva. Antes de cada injeção a área foi limpa com swab embebido em álcool para evitar possíveis contaminações. Após a infecção, os compostos tiazólicos (5, 10, 15 mg / Kg), assim como o fluconazol (16mg / Kg) foram administrados na última pata do lado direito utilizando a mesma técnica descrita acima. Foram adicionados três grupos controle: um sem nenhuma inoculação para testar a viabilidade das larvas, outro apenas com o inóculo e sem tratamento e por último, um grupo apenas com PBS para monitorar a morte de larvas devido a lesão física ou infecção por contaminantes patogênicos. Após as injeções de infecção e tratamento as larvas de todos os grupos foram transferidas para placas de Petri, armazenadas no escuro à 37°C e monitoradas diariamente.

### **4.8.3 Ensaio em modelo murino**

#### **4.8.3.1 Animais**

Camundongos C57BL/6 foram adquiridos pelo Centro Biológico da Universidade Federal de Minas Gerais (Cebio, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Para o modelo de candidíase oral foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas com 10 a 12 semanas de idade, enquanto que para o modelo de candidíase sistêmica foram utilizados camundongos de 6 a 8 semanas. Os testes nos modelos animais foram de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA / UFMG), protocolo nº 207/2017 (ANEXO 1).

#### **4.8.3.2 Modelo Murino de Candidíase Oral**

O modelo murino de candidíase oral foi estabelecido de acordo com o protocolo descrito anteriormente por WONG et al. (2014) com modificações. O antibiótico cloridrato de tetraciclina (0,83 mg/mL) foi administrado na água potável dois dias antes da infecção, e um dia antes da infecção os animais foram imunossuprimidos com injeção subcutânea de prednisolona (100 mg/kg de peso corporal, amphora, Belo Horizonte, MG, Brasil), e a imunossupressão foi reforçada em dias alternados até o final dos testes. Para a infecção, os camundongos foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Syntec, Hortolândia, São Paulo, Brasil) e cloridrato de cetamina (80 mg/kg, Syntec, Hortolândia, São Paulo, Brasil) via injeção intraperitoneal. Anestesiados, as cavidades orais foram esfregadas com swabs estéreis previamente imersos no inóculo de *C. albicans* SC5314 a uma concentração de  $10^8$  leveduras/mL. Uma segunda infecção foi realizada após 48 horas passadas da primeira

infecção. No dia seguinte o tratamento foi iniciado, sendo administrado a cada 12 horas durante 4 dias até os animais serem sacrificados. Foram administrados 200 µL da substância **2** (100 mg/kg; n = 3), 20 µL de nistatina (600 UI; n = 3, Neoquímica, Anápolis, Goiás, Brasil) ou 100 µL de veículos (como controle; n = 3) administrada aos camundongos pipetando em suas bocas. A substância **2** foi diluída em polietilenoglicol 400 (700 µL, 20%, Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), Tween 80 (5 µL, 0,05%, Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), DMSO (100 µL) e PBS (1.200 µL). Os camundongos foram sacrificados, através do deslocamento cervical, 72 horas após a segunda infecção e foram imediatamente observados macroscopicamente por lesões e as línguas foram esfregadas com swabs estéreis, que foram então submersos em 1000 µL de PBS estéril. Da suspensão resultante 100 µL foram plaqueados em CHROMagar Candida (Difco, Sparks, MD, EUA), e o número de UFCs foi contado após incubação a 37°C por 48 horas.

#### **4.8.3.3 Modelo Murino de Candidíase Sistêmica**

O modelo murino de candidíase sistêmica foi estabelecido de acordo com o protocolo descrito anteriormente por WONG et al. (2014), com modificações. Os camundongos foram infectados através da veia lateral da cauda com 30 µL de suspensão celular de *C. albicans* SC5314, resultando em 10<sup>5</sup> leveduras por animal 3 horas antes do início do tratamento antifúngico. Os tratamentos aos camundongos, realizado por injeção intraperitoneal, foram iniciados 3 horas após a infecção e persistiu de 12 em 12 horas por 5 dias. Para o tratamento foi utilizado o fluconazol (10 mg/kg) ou a substância **2** (10 mg/kg) (n = 6 animais/grupo). Todos os camundongos foram sacrificados, através de deslocamento cervical, após 5 dias e os rins foram removidos, observados macroscopicamente para lesões e colônias, pesados, masserados e homogeneizados em PBS. Os homogeneizados foram diluídos em série e plaqueados em placas com meio Sabouraud. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e a carga fúngica foi expressa como a razão de UFC/g de rim.

#### **4.8.3.4 Análise Estatística**

As curvas de sobrevivência de *C.elegans* e *G. mellonella* foram plotadas e a análise estatística foi realizada pelo teste de Kaplan-Meier usando o software estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Califórnia, CA, EUA). Um valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo. Para a análise estatística dos resultados dos testes murinos utilizou Newman-Keuls Multiple e o teste t de Student utilizando GraphPad Prism e o valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo e os resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da variável.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Teste de suscetibilidade antifúngica

Os derivados hidrazino-tiazólicos incluídos no presente estudo foram previamente descritos (CHIMENTI et al., 2007; BHARTI et al., 2010; LINO et al., 2018). As CIMs foram determinadas para quatro derivados hidrazino-tiazólico contra isolados de referência de várias leveduras de interesse clínico, a fim de avaliar o espectro de ação dessas substâncias (**Tabela 1**). Em geral, as 4 substâncias de derivados hidrazino-tiazólicos testadas apresentaram maior eficácia contra *C. neoformans*, *C. albicans* e *C. krusei* do que *C. glabrata*. A substância **1** apresentou os menores valores de CIM entre os isolados de referência (0,5 - 32,0 µg/mL), com CIMs de 2 µg/mL ou inferiores em 7 das 8 cepas, seguido pela substância **2**, sendo que 6 de 8 cepas foram suscetíveis com CIMs <2 µg / mL.

**Tabela 1** - Concentração inibitória mínima\* de derivados hidrazino-tiazólicos contra *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*.

Isolados	Referência	Hidrazino-tiazólicos				Fluconazol	Anfotericina B
		1	2	3	4		
<i>C. albicans</i>	SC5314	0,5	0,5	4,0	8,0	0,5	<b>1,0</b>
<i>C. albicans</i>	CAN14	1,0	0,5	4,0	4,0	0,125	<b>1,0</b>
<i>C. krusei</i>	ATCC6258	1,0	2,0	2,0	4,0	64,0	<b>8,0</b>
<i>C. glabrata</i>	ATCC90030	32	16,0	32,0	32,0	4,0	<b>2,0</b>
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC22019	0,5	2,0	2,0	16,0	8,0	<b>2,0</b>
<i>C. tropicalis</i>	ATCC13803	2,0	8,0	8,0	32,0	>64,0	<b>4,0</b>
<i>C. dublinensis</i>	MYA-646	1,0	2,0	2,0	8,0	1,0	<b>1,0</b>
<i>C. neoformans</i>	H99	0,5	0,5	0,25	2,0	2,0	<b>4,0</b>

\*Concentração em (µg/mL)

Uma vez que as substâncias exibiram atividade contra os isolados de referência, foi examinado se estas substâncias poderiam inibir isolados clínicos de *C. albicans*, espécies não-*albicans* e *C. neoformans*. A **Tabela 2** resume as CIMs das quatro substâncias testadas para nove isolados clínicos de *C. albicans*, para as quais as cepas de referência foram mais suscetíveis às substâncias **1** e **2**. Todas as substâncias apresentaram atividade antifúngica contra os isolados clínicos de *C. albicans* testados. As substâncias **1**, **2** e **3** apresentaram os menores valores de CIM (0,125 - 2,0 µg/mL); em contraste, a substância **4** apresentou os maiores valores de CIM (8,0 a 16,0 µg/mL). Assim, dentro do grupo de isolados clínicos, a substância **3** apresentou, ligeiramente, mais inibição, com valores de CIMs menores do que foi observado contra as estirpes de referência de *C. albicans*. Fluconazol e anfotericina B apresentaram CIM 90 de 2,0 e 0,25 µg/mL, respectivamente.

**Tabela 2** – Concentração inibitória mínima\* de derivados hidrazino-tiazólicos contra isolados clínicos de *Candida albicans*

Isolados	Hidrazino-tiazólicos				Fluconazol	Anfotericina B
	1	2	3	4		
02A	1,0	1,0	0,25	8,0	4,0	0,25
02B	0,5	1,0	0,25	8,0	2,0	0,25
7	2,0	2,0	2,0	16,0	1,0	0,125
6	1,0	1,0	0,25	16,0	1,0	0,5
13	0,5	1,0	0,5	8,0	1,0	0,125
1	1,0	1,0	0,5	8,0	1,0	0,25
11	1,0	1,0	0,5	16,0	1,0	0,125
9	1,0	2,0	0,5	16,0	0,5	0,25
10	0,5	1,0	0,5	16,0	0,5	0,25
<b>CIM 50</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,5</b>	<b>16,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,25</b>
<b>CIM 90</b>	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>16,0</b>	<b>2,0</b>	<b>0,25</b>

\*Concentrações em µg/mL

A CIM das substâncias para os isolados clínicos de *C. parapsilosis* variou de 1,0 a 4,0 µg/mL e a substância **1** exibiu a atividade mais efetiva, com um CIM 90 de 2,0 µg/mL (**Tabela 3**). Os valores de CIM 90 para estes isolados foram de 16 µg/mL para o fluconazol e 0,5 µg/mL para a anfotericina B. De acordo com os pontos de corte do CLSI M27-S4 (2010), os valores de CIM iguais a 4,0 e  $\geq 8,0$  µg/mL para os isolados de *C. parapsilosis* são considerados dose-dependentes e resistentes ao fluconazol, respectivamente. Portanto, no presente estudo os isolados 7449 e 8662 de *C. parapsilosis* mostraram resistência ao fluconazol e, curiosamente, os isolados clínicos resistentes ao fluconazol apresentam suscetibilidade às substâncias hidrazino tiazólicos. Assim, o mecanismo de resistência dos isolados 7449 e 8662 de *C. parapsilosis* pode não conferir resistência às hidrazino tiazólico em investigação.

**Tabela 3.** Concentração inibitória mínima\* de derivados hidrazino-tiazólicos contra isolados clínicos de *Candida parapsilosis*.

Isolados	Hidrazino-tiazólicos				Fluconazol	Anfotericina B
	1	2	3	4		
7970A	2,0	4,0	4,0	2,0	1,0	0,25
7652	2,0	2,0	2,0	4,0	4,0	0,25
7449	2,0	4,0	4,0	4,0	16,0	0,5
8662	2,0	4,0	4,0	4,0	16,0	0,25
6901	1,0	4,0	2,0	4,0	0,25	0,5
6917	2,0	4,0	4,0	4,0	0,25	0,25
7839	2,0	4,0	4,0	4,0	0,5	0,5
6933	1,0	4,0	2,0	2,0	0,25	0,5
7585	1,0	4,0	4,0	4,0	0,25	0,25
8044	1,0	2,0	2,0	2,0	0,25	0,5

**Tabela 3.** Concentração inibitória mínima\* de derivados hidrazino-tiazólicos contra isolados clínicos de *Candida parapsilosis*.

<b>CIM 50</b>	<b>2,0</b>	<b>4,0</b>	<b>4,0</b>	<b>4,0</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>
<b>CIM 90</b>	<b>2,0</b>	<b>4,0</b>	<b>4,0</b>	<b>4,0</b>	<b>16,0</b>	<b>0,5</b>

\*Concentrações em µg/mL

Embora o isolado de referência de *C. glabrata* não tenha sido inibido em altas concentrações pelas substâncias hidrazino-tiazólico testadas, alguns isolados clínicos exibiram maior suscetibilidade. Entre os isolados clínicos de *C. glabrata*, observamos que os valores de CIM variaram de 2,0 - 8,0 µg/mL para a substância **1** e de 2,0 - 16,0 µg/mL para as substâncias **2** e **3**. Para a maioria dos isolados de *C. glabrata* a substância 4 apresentou CIM variando de 2,0 - 16 µg/mL, somente para um dos isolados, o 6943 não foi possível encontrar valor de CIM, já que este cresceu em todas as concentrações testadas (**Tabela 4**). FLC e AMB apresentaram valores de CIM inferiores aos encontrados para as substâncias em teste e de acordo com o CLSI M27-S4 (2010), todos os isolados foram sensíveis a estes fármacos.

**Tabela 4** - Concentração inibitória mínima\* de derivados hidrazino-tiazólicos contra isolados clínicos de *Candida glabrata*.

<b>Isolados</b>	<b>Hidrazino-tiazólicos</b>				<b>Fluconazol</b>	<b>Anfotericina B</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>		
6922	4,0	16,0	8,0	8,0	2,0	0,5
6927	4,0	8,0	8,0	8,0	2,0	1,0
6931	8,0	16,0	16,0	16,0	0,5	0,5
6932	4,0	8,0	8,0	16,0	0,5	0,5
6943	8,0	16,0	16,0	>32	8,0	1,0
7110	4,0	4,0	4,0	8,0	1,0	0,5
7221	8,0	16,0	16,0	16,0	0,5	0,5
7255	2,0	4,0	4,0	4,0	2,0	1,0
7815	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0,5
7871	4,0	8,0	8,0	4,0	2,0	1,0
<b>CIM 50</b>	<b>4,0</b>	<b>8,0</b>	<b>8,0</b>	<b>8,0</b>	<b>2,0</b>	<b>0,5</b>
<b>CIM 90</b>	<b>8,0</b>	<b>16,0</b>	<b>16,0</b>	<b>16,0</b>	<b>2,0</b>	<b>1,0</b>

\*Concentrações em µg/mL

A atividade antifúngica das substâncias foi também testada contra isolados clínicos de *C. neoformans* (**Tabela 5**). Os valores de CIM variaram de 0,25 a 2,0 µg/mL para as substâncias **1**, **2** e **3**. A substância **4** (0,5 - 32,0 µg/mL) exibiu valores mais elevados de CIM para alguns isolados de *C. neoformans* (CIM 90 = 16 µg/mL). No geral, os isolados de *C. neoformans* apresentaram altos valores de CIM para o fluconazol com CIM90 de 16 µg/mL. Como é possível observar na tabela 5, alguns isolados como o BF113, BF114, 41295, 41296 e 90896 que mostraram resistência ao fluconazol foram susceptíveis às substâncias **1**, **2** e **3** em baixas concentrações de CIM. A maioria dos isolados apresentaram baixos valores de CIM

para a AMB com CIM90 de 0,25 µg/mL. É possível observar que o isolado WP que apresentou resistência à AMB foi susceptível às substâncias **1** e **3**.

**Tabela 5.** Concentração inibitória mínima\* de derivados hidrazino-tiazólicos contra isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*.

Isolados	Hidrazino-tiazólicos				Fluconazol	Anfotericina B
	1	2	3	4		
BF113	1,0	2,0	1,0	16,0	16,0	1,0
BF114	0,5	1,0	1,0	1,0	64,0	<0,0625
41292	0,5	1,0	1,0	1,0	8,0	0,125
41295	1,0	2,0	1,0	8,0	32,0	0,125
41296	2,0	4,0	2,0	32,0	16,0	1,0
41297	1,0	2,0	1,0	16,0	8,0	0,125
41298	1,0	2,0	1,0	8,0	8,0	0,125
41299	0,5	0,5	0,25	4,0	4,0	0,125
C31	0,25	0,25	0,25	8,0	4,0	0,125
F10	1,0	1,0	1,0	4,0	4,0	0,25
RN01	1,0	0,5	0,25	4,0	4,0	0,125
WP	0,5	1,0	0,25	8,0	8,0	1,0
27JF	1,0	2,0	2,0	2,0	8,0	0,25
28JF	0,5	0,5	0,5	8,0	8,0	0,125
90896	1,0	1,0	0,5	8,0	32,0	0,125
93	1,0	1,0	1,0	1,0	4,0	0,25
94	0,25	0,5	1,0	0,5	8,0	0,25
646B	1,0	2,0	2,0	2,0	1,0	0,125
975	1,0	1,0	0,5	16,0	2,0	0,125
9220	0,5	1,0	1,0	1,0	2,0	0,125
9273	0,5	0,5	0,5	0,5	2,0	0,125
10131	0,25	0,5	0,25	0,5	8,0	0,125
10211	0,5	1,0	1,0	1,0	4,0	0,125
10264	0,25	0,5	0,25	0,5	4,0	0,125
10335	0,5	0,5	2,0	0,5	8,0	0,125
10379	0,5	1,0	0,25	8,0	8,0	0,125
92868	0,5	0,5	2,0	0,5	8,0	0,25
<b>CIM 50</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>4,0</b>	<b>8,0</b>	<b>0,125</b>
<b>CIM 90</b>	<b>1,0</b>	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>16,0</b>	<b>16,0</b>	<b>0,25</b>

\*Concentrações em µg/mL

O ensaio de concentração fungicida mínima foi realizado com as substâncias derivados hidrazino-tiazólicos para avaliar se tais substâncias seriam fungicidas ou fungistáticas. As células de *C. albicans* e *C. neoformans* tratadas com as substâncias **1**, **2**, **3** e **4** e que apresentaram 100% de inibição em meio RPMI, cresceram em todas as concentrações de tratamento quando plaqueadas em meio Sabouraud, o que indica que todas as substâncias apresentaram atividade fungistática.

## 5.2 Interação dos derivados de hidrazino tiazólicos 1, 2, 3 e 4 com os antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol

Para verificar a interação das substâncias de derivados hidrazino-tiazólicos com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol foi realizado o ensaio de combinação em concentrações iguais, superiores e inferiores aos valores de CIM.

O ensaio de interação foi realizado com os isolados de *C. albicans* (**Tabela 6**) e *C. neoformans* (**Tabela 7**). Os valores do índice de concentração inibitória fracional (ICIF) das substâncias com os antifúngicos para ambos isolados foram considerados indiferentes frente aos dois antifúngicos comerciais avaliados. A substância 4 em combinação com a AMB apresentou o menor valor de ICIF para o isolado de *C. neoformans* H99 com 0,79 µg/mL e o maior valor foi observado para a substância 1. A interação do FLC com a substância 4 foi que apresentou o menor valor de ICIF igual a 0,90 µg/mL.

**Tabela 6** – Índice de concentração inibitória fracional dos derivados hidrazino-tiazólicos 1, 2, 3 e 4 em interação com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol contra os isolados de *C. albicans* SC5314

Substância	AMB	Interação	Fluconazol	Interação
1	1,29	Indiferente	0,80	Indiferente
2	0,98	Indiferente	0,90	Indiferente
3	0,88	Indiferente	1,40	Indiferente
4	0,88	Indiferente	1,40	Indiferente

**Tabela 7** – Índice de concentração inibitória fracional dos derivados hidrazino-tiazólicos 1, 2, 3 e 4 em interação com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol contra os isolados de *C. neoformans* H99

Substância	AMB	Interação	Fluconazol	Interação
1	0,934	Indiferente	1,29	Indiferente
2	0,932	Indiferente	1,29	Indiferente
3	0,98	Indiferente	1,13	Indiferente
4	0,79	Indiferente	0,90	Indiferente

## 5.3 Ensaios de toxicidade das substâncias

### 5.3.1 Ensaio de toxicidade em células VERO

No ensaio com células VERO foi observado que as substâncias 1 e 2 não afetaram a viabilidade destas células em concentrações de até 100 µM e apresentaram seletividade para

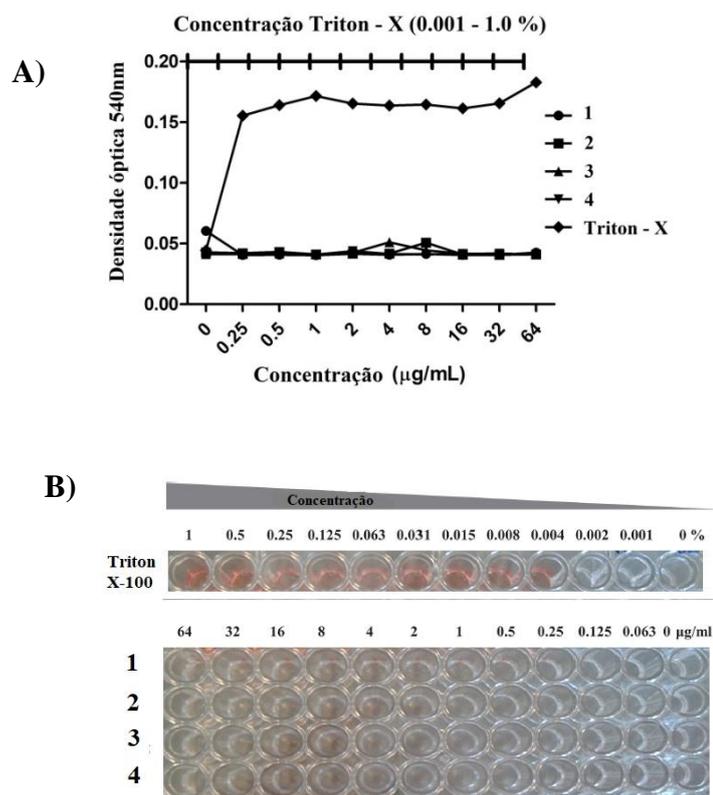
*C. albicans*, sendo o IS da substância **1** de 31,25 e o da substância **2** de 34,8, como observado na **Tabela 8**. O índice de seletividade (SI) mede o quanto um composto é ativo contra o parasito sem causar danos à viabilidade das células de mamíferos. De acordo com PROTOPOPOVA *et al.* (2005) valores maiores que 10 são considerados indicativos de ausência de toxicidade, enquanto substâncias com valores abaixo de 10 são consideradas tóxicas.

**Tabela 8.** Citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) e Índice de seletividade (IS) dos hidrazino-tiazólicos **1** e **2** em células VERO.

Tiazol- hidrazonas	CIM (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	IS
<b>1</b>	3,24	>100	31,25
<b>2</b>	1,74	Inativo	34,08

### 5.3.2 Avaliação da atividade hemolítica dos tiazóis

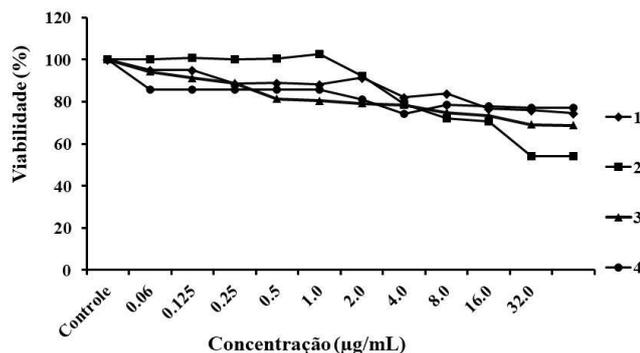
O ensaio de hemólise foi realizado usando eritrócitos humanos para avaliar se as substâncias testadas no presente trabalho poderiam exibir qualquer atividade contra essas células. Como observado na **Figura 3**, nenhuma das substâncias causou lise de eritrócitos nas concentrações testadas (LC<sub>50</sub>> 64,0 µg / mL). Em contraste, o controle positivo, Triton X-100, causou hemólise em todas as concentrações.



**Figura 3 - Atividade hemolítica dos derivados hidrazino-tiazólicos 1, 2, 3 e 4.** Os eritrócitos humanos foram tratados com diluições seriadas das substâncias hidrazino-tiazólicas **1**, **2**, **3** e **4** (0,25 – 64,0 µg/mL) ou Triton X-100 (0,001 - 1%). **(A)** Hemólise medida espectrofotometricamente a 540 nm. **(B)** A avaliação visual da atividade hemolítica demonstrou que as substâncias hidrazino-tiazólicas (**1** - **4**) não lisavam os eritrócitos humanos. Os poços em cor vermelha indicaram que o Triton X-100 lisou os eritrócitos humanos e atuou como controle positivo.

### 5.3.3 Citotoxicidade em células carcinoma hepatocelular humano (HepG2)

No ensaio de citotoxicidade em HepG2, o IC<sub>50</sub> das substâncias testadas variou de 8,0 a 16,0 µg/mL (**Figura 4**), oito vezes maior que a CIM observada para as substâncias **1** e **2** (0,5 µg/mL) e duas vezes a concentração que **3** e **4** inibiram *C. albicans*. As células tratadas com os derivados hidrazino-tiazólicas foram quase 80% viáveis para concentrações das substâncias até 8,0 µg/ml e a viabilidade diminuiu com um aumento adicional na concentração.



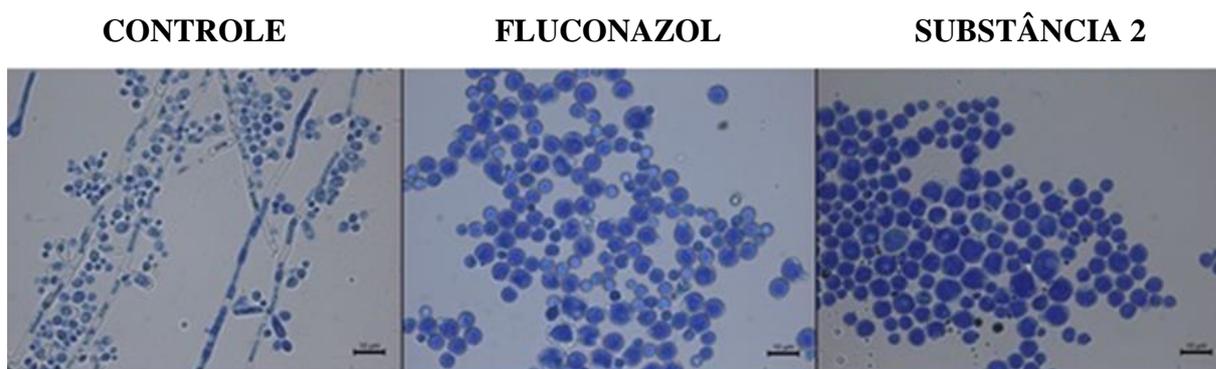
**Figura 4 - Citotoxicidade dos derivados hidrazino-tiazólicos 1, 2, 3 e 4 para células HepG2.** A viabilidade das células HepG2 foi quantificada após o tratamento com diluições seriadas dos derivados hidrazino-tiazólicos (0,06 – 64 µg/ml). A viabilidade celular foi mensurada por meio de espectrofotometria detectando degradação do corante WST-1 em formazan para células viáveis, o que produz uma cor

## 5.4 Ensaios de inibição dos fatores de virulência de *C. albicans*

### 5.4.1 Inibição de filamentação *in vitro*

O ensaio de filamentação foi executado apenas com a substância **2** devido a falta de verba para compra de reagente para as demais substâncias. Para escolha da substância foi feita uma observação ao microscópio óptico da morfologia das células de *C. albicans* após o tratamento com a concentração igual ao CIM referente a cada substância. A substância que apresentou a menor quantidade de hifas após o tratamento foi escolhida.

No ensaio de inibição da filamentação de *C. albicans* foi observado que a CIM no meio indutor foi de 4 µg/mL para o derivado de hidrazino tiazólico **2** e de 8 µg/mL para o fluconazol. A substância **2** apresentou capacidade para inibir a filamentação de *C. albicans* SC5314 em meio indutor na concentração sub-inibitória de 2 µg/mL, e o fluconazol na concentração de duas vezes abaixo do CIM (2 µg/mL). Tanto para a substância **2** quanto para o fluconazol, nas concentrações de inibição da filamentação de *C. albicans*, foi observado apenas a presença de muitas leveduras de variados tamanhos e alguns brotamentos. Entretanto, quando se observa o controle, nota-se a presença de poucas leveduras e brotamentos, e uma considerável quantidade de hifas, pseudo-hifas e blastoconídios, como é possível observar na **Figura 5**.



**Figura 5.** Avaliação da inibição da filamentação de *C. albicans* SC5314 no meio de Lee tratada com o derivado vvhidrazino-tiazólico **2** e com fluconazol. Fotos de microscopia óptica (100X) de células de *C. albicans* SC5314 coradas com lactofenol.

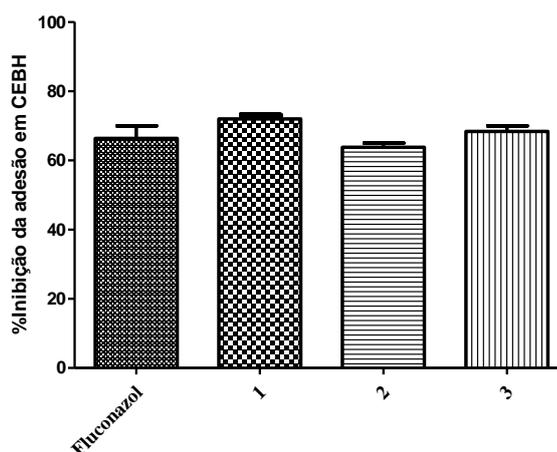
#### 5.4.4 Inibição das enzimas proteinase e fosfolipase

Devido aos resultados obtidos com a substância **4** no ensaio de susceptibilidade, aliado à falta de recursos financeiros não foram realizados os experimentos de inibição das enzimas fosfolipase e protinase, inibição da adesão em células epiteliais bucais, biofilme e expressão gênica com esta substância.

No ensaio com as enzimas proteinase e fosfolipase nenhuma das substâncias foram capazes de inibir o halo ao redor das colônias, mostrando que as substâncias **1**, **2** e **3** não agem neste fator de virulência.

#### 5.4.3 Inibição da adesão em células epiteliais humanas

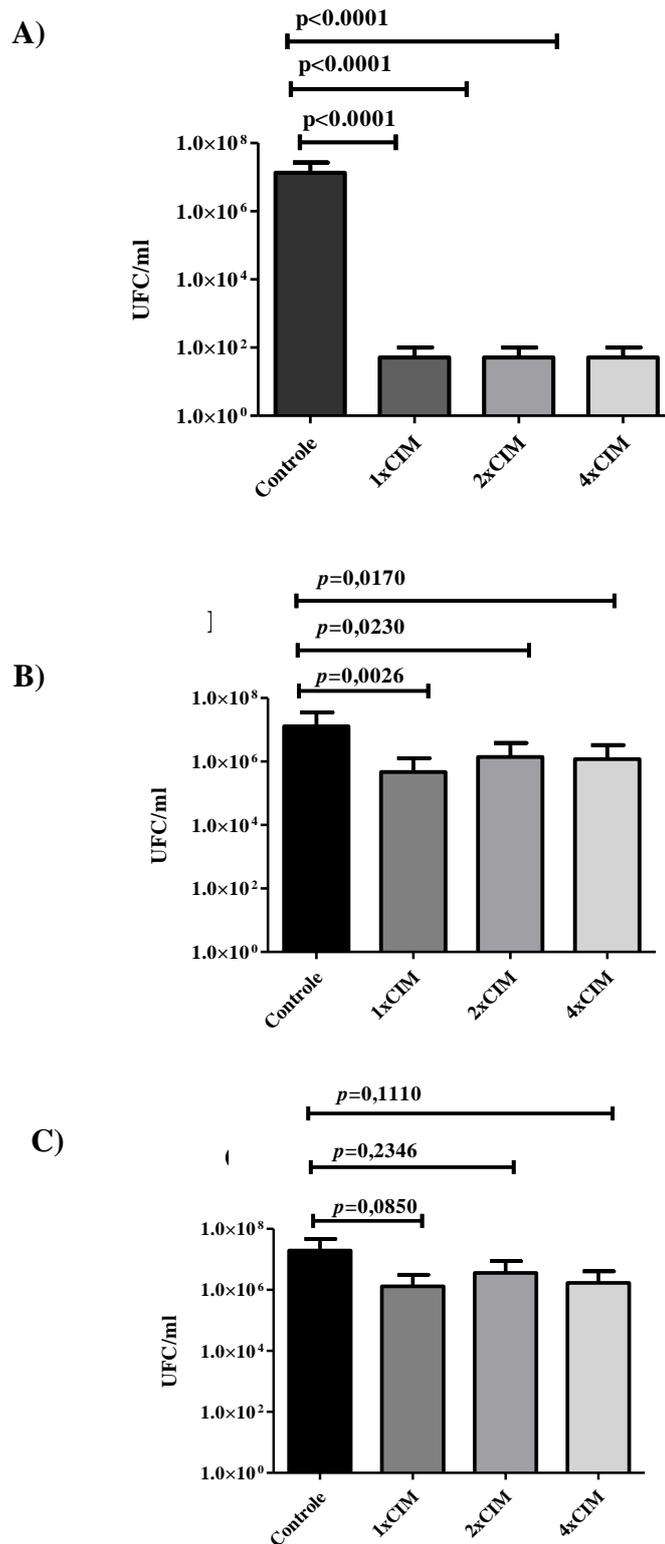
As CEBH foram colocadas em contato com o isolado SC5314 de *C. albicans* tratado por 1 hora com as substâncias **1**, **2**, e **3** em concentração igual a CIM. Observou-se que as substâncias testadas foram capazes de inibir a adesão do isolado de *C. albicans*, sendo que a substância **1** apresentou o melhor resultado, inibindo a adesão em 74,5%, seguida da substância **3** com 66,6%. O fluconazol e a substância **2** apresentaram valores de inibição da adesão muito próximos (62,7% e 62,6%, respectivamente) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Percentagem de inibição da adesão do isolado SC5314 de *C. albicans* tratada por 1 hora com as substâncias **1**, **2**, **3** e FLZ na CIM em CEBH. O grupo controle sem tratamento representa 100% de adesão de leveduras CEBH (0% de inibição). A análise estatística foi realizada por Newman-Keuls Teste de comparação múltipla. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SD).

#### 5.4.4 Avaliação da viabilidade do biofilme

No presente estudo, biofilmes maduros de *C. albicans* SC5314 formados em 48h foram tratados com as substâncias **1**, **2**, e **3** nas concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM por 24h. Na contagem de UFC/mL, observou-se redução significativa das células viáveis de *C. albicans* nos biofilmes tratados com a substância **1**. Essas reduções foram encontradas em todas as concentrações testadas ( $p \leq 0,0001$ ). A redução obtida foi de 99% para todas as concentrações (**Figura 7A**). Na presença da substância **2** também foi observado que o valor da UFC/ml reduziu 94%, 86% e 80% com diferença significativa para as concentrações de 1x CIM ( $p=0,0026$ ), 2x CIM ( $p=0,0230$ ) e 4x CIM ( $p=0,0170$ ), respectivamente (**Figura 7B**). No entanto, ao contar as UFC/mL da levedura em biofilmes tratados com a substância **3**, é possível notar que nenhuma das concentrações testadas apresentou diferença estatística do controle sem tratamento (**Figura 7C**).



**Figura 7.** Contagem de UFC/mL (média e desvio padrão) de biofilmes de 48h da cepa de *C. albicans* SC5314 formados em placas de 96 poços. O biofilme formado foi tratado por 24h com a substância 1 (A), substância 2 (B) e substância 3 (C) nas concentrações de 1xCIM, 2xCIM e 4xCIM. Foi utilizado teste *t* de Student para a comparação entre os grupos testados.

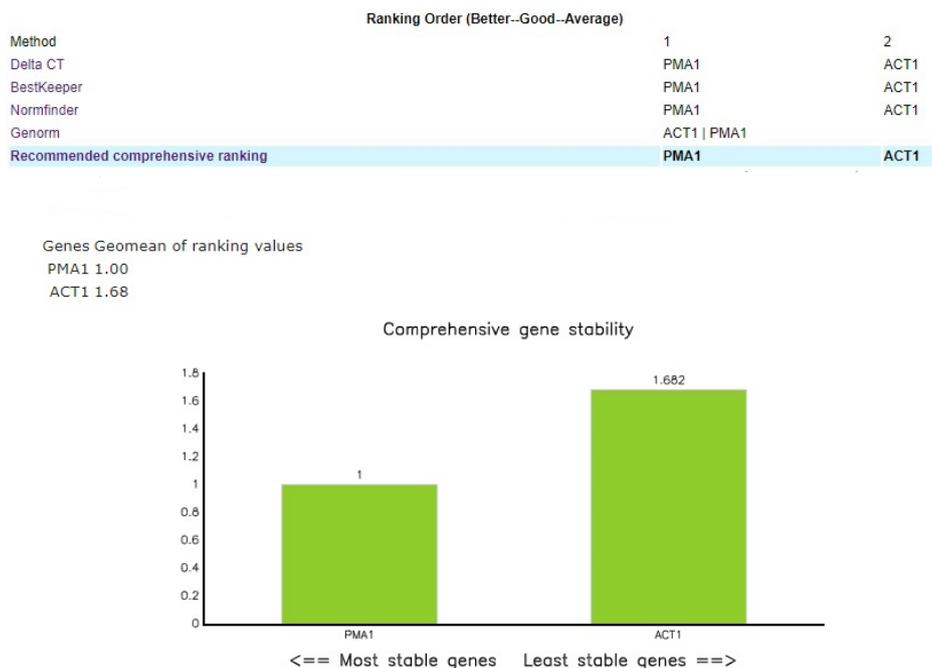
### 5.5 Efeitos das substâncias 1, 2 e 3 na expressão dos genes de *C. albicans*

Com a finalidade de elucidar os efeitos das substâncias sobre o biofilme maduro de *C. albicans*, foi utilizada a qPCR para avaliar o nível de expressão de genes relacionados a adesão, formação de biofilme e filamentação. Para isso, os biofilmes formados após 48h e tratados com as substâncias por 24h foram submetidos à extração do RNA total e quantificados na concentração de ng/ $\mu$ L. A quantidade obtida e a pureza das amostras, a relação 260/280 nm foram maiores que 1,80, sendo assim, adequadas para o processo de transcrição reversa.

Os primers utilizados neste estudo foram específicos para os genes de *C. albicans* amplificando o fragmento de PCR esperado, verificado através do peso molecular obtido. As eficiências da reação de PCR obtidas foram entre 95% e 100% para cada primer testado, indicando a validação dos mesmos e a padronização dos ensaios da PCR em tempo real. As análises das curvas de melting obtidas confirmaram a presença de um único pico, demonstrando a especificidade dos primers testados.

O próximo passo foi a seleção do controle endógeno (gene de referência), que é utilizado para normalizar diferenças na quantidade de cDNA que é colocado nos poços de reação da PCR, e os níveis de expressão do controle endógeno devem ser semelhantes em todas as amostras do estudo. Essa análise foi realizada pelo website <http://www.leonxie.com>, no qual este avalia por quatro métodos diferentes: Delta CT, BestKeeper, NormFinder e Genorm. Após avaliação pelos quatro métodos, Delta CT, BestKeeper, NormFinder e Genorm, o website <http://www.leonxie.com> recomendou o gene ACT1 para realizar a quantificação relativa (**Figura 8**).

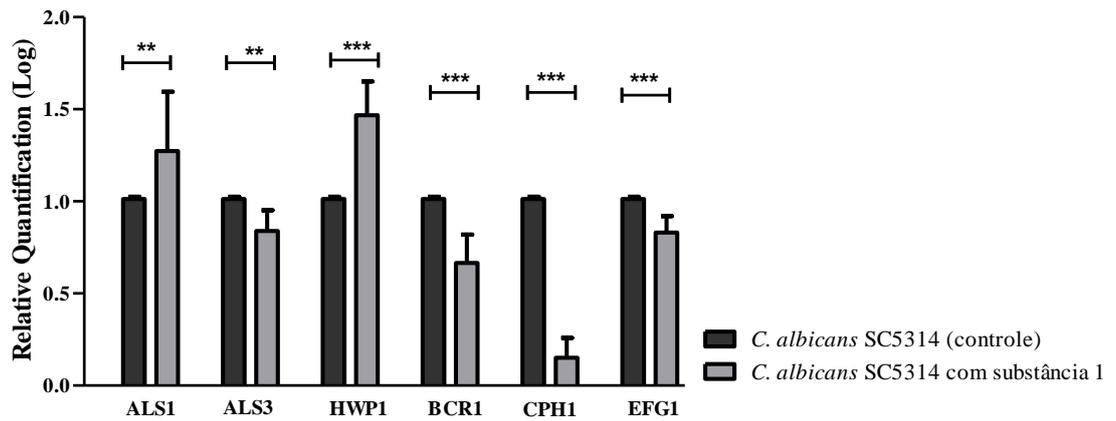
Os resultados da quantificação relativa representam a variação no nível de expressão dos genes alvos dos grupos tratados (*C. albicans* + substância **1**); (*C. albicans* + substância **2**); (*C. albicans* + substância **3**) em relação a amostra calibradora (*C. albicans* + PBS) não tratada. Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica (com base na fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) em comparação a um alvo-interno de referência, previamente selecionado, e que resulta em valor 1. O experimento foi realizado pelo aparelho StepOnePlus™ System (Life Technologies, Carlsbad, California, EUA) que já calculou a quantificação relativa na base Log. O perfil de expressão dos genes *ALSI*, *ALS3*, *HWPI*, *BCR1*, *CPH1* e *EFG1* de *C. albicans* foi calculado em relação ao gene de referência ACT1, como mostrado na **Figuras 9, 10 e 11**.



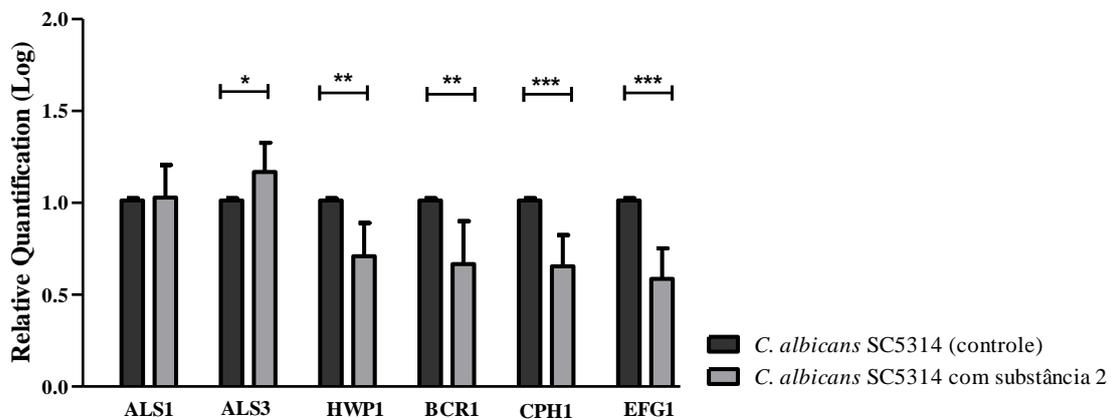
**Figura 8** – Seleção do melhor gene de referência (PMA e ACT1) pelo website (<http://www.leonxie.com>).

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

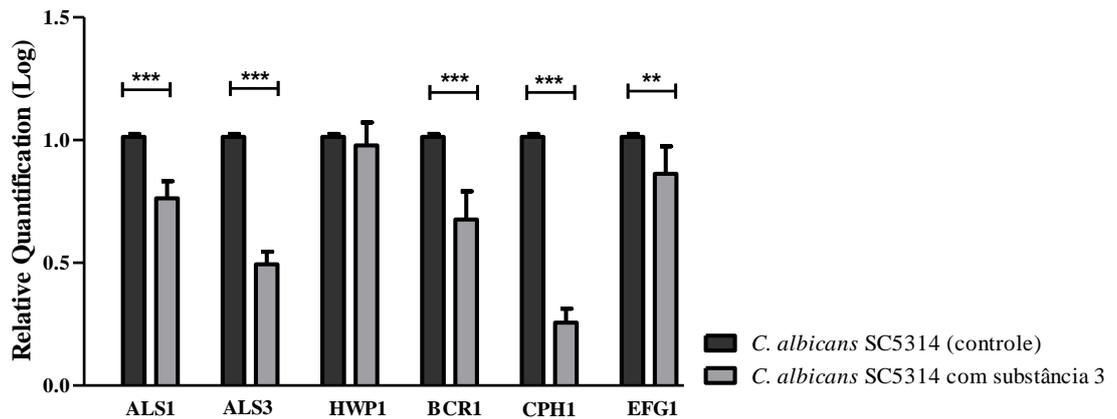
Com base nos resultados obtidos foi possível observar que para as células tratadas com a substância **1**, os genes ALS3, BCR1, CPH1 e EFG1 foram regulados negativamente com valores significantes comparados ao gene de referência (**Figura 9**). Em relação à quantificação relativa com os genes ALS3 ( $p=0,0036$ ), BCR1, CPH1 e EFG1 foi observada uma diminuição na sua expressão de 1,5 ( $p=0,0003$ ); 6,8 ( $p<0,0001$ ) e 1,22 ( $p=0,0006$ ) vezes, respectivamente na presença da substância **1**. A **figura 10** mostra que quando as células foram tratadas com a substância **2** não foi observada alteração na expressão dos genes ALS1 e ALS3, relacionados a adesão. Já os genes HWP1, BCR1, CPH1 e EFG1 apresentaram diminuição na expressão de 1,42 ( $p=0,0022$ ); 1,52 ( $p=0,0046$ ); 1,54 ( $p=0,0004$ ) e 1,72 ( $p<0,0001$ ) vezes, respectivamente. A expressão dos genes ALS1 ( $p<0,0001$ ), ALS3 ( $p<0,0001$ ), BCR1 ( $p<0,0001$ ), CPH1 ( $p<0,0001$ ) e EFG1 ( $p=0,0084$ ) na presença da substância **3** foi reduzida significativamente em 1,33; 2,68; 1,51; 4,05 e 1,18 vezes quando comparados ao controle de células sem tratamento (**Figura 11**).



**Figura 9. Análise da quantificação relativa da expressão gênica em biofilmes maduros (48h) tratados com a substância 1 em comparação ao biofilme não tratado (controle).** Quantificação relativa (log) dos níveis de expressão de genes de adesão (ALS1 e ALS3), filamentação (EFG1, HWP1) e formação de biofilme (BCR1, EFG1). Os valores foram expressos como média e SD. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar a expressão gênica entre os grupos estudados ( $p \leq 0,05$ ). \*\* indica  $p \leq 0,01$ . \*\*\* indica  $p \leq 0,0001$ .



**Figura 10. Análise da quantificação relativa da expressão gênica em biofilmes maduros (48h) tratados com a substância 2 em comparação ao biofilme não tratado (controle).** Quantificação relativa (log) dos níveis de expressão de genes de adesão (ALS1 e ALS3), filamentação (EFG1, HWP1) e formação de biofilme (BCR1, EFG1). Os valores foram expressos como média e SD. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar a expressão gênica entre os grupos estudados ( $p \leq 0,05$ ). \*\* indica  $p \leq 0,01$ . \*\*\* indica  $p \leq 0,0001$ .

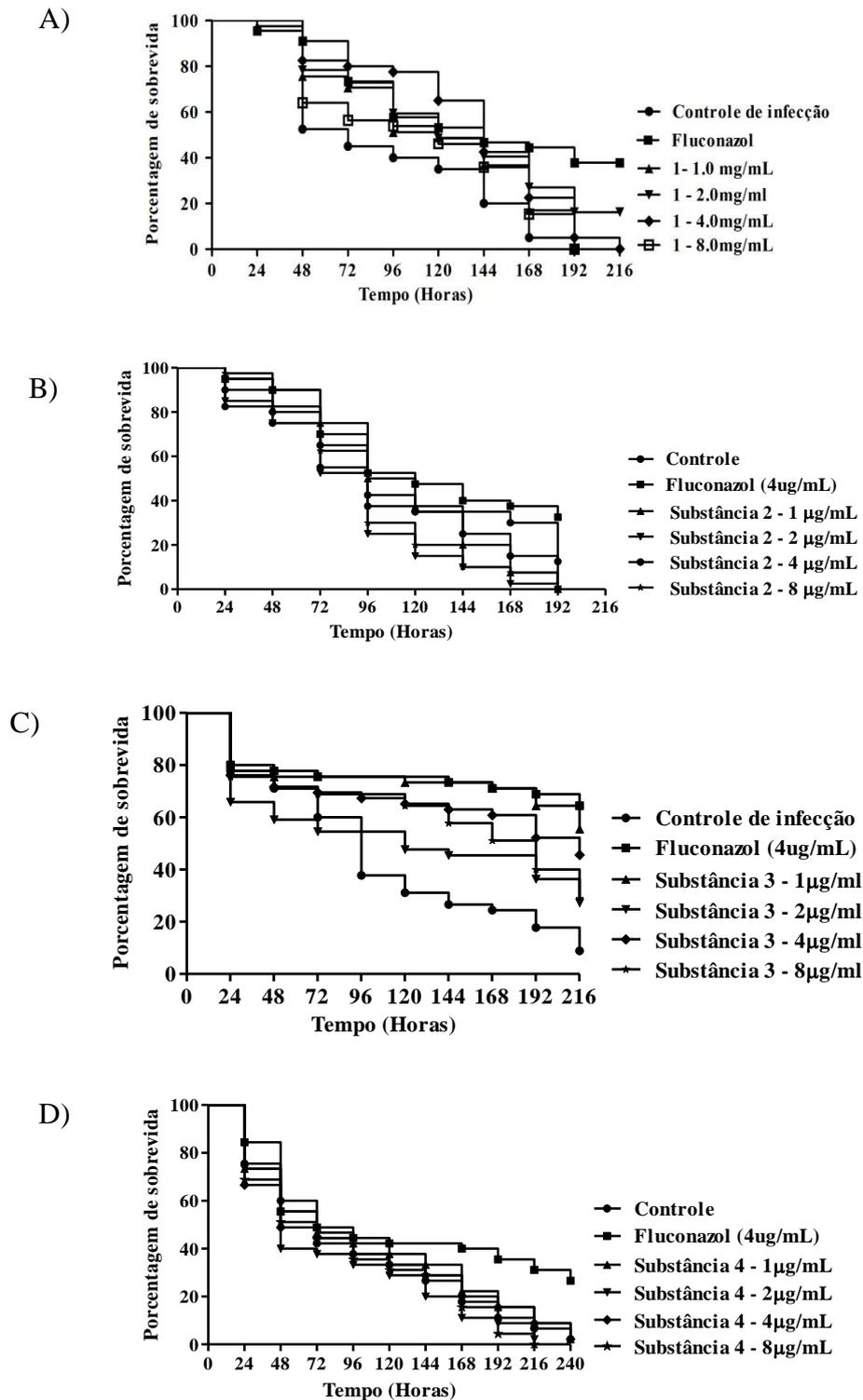


**Figura 11. Análise da quantificação relativa da expressão gênica em biofilmes maduros (48h) tratados com a substância 3 em comparação ao biofilme não tratado (controle).** Quantificação relativa (log) dos níveis de expressão de genes de adesão (ALS1 e ALS3), filamentação (EFG1, HWP1) e formação de biofilme (BCR1, EFG1). Os valores foram expressos como média e SD. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar a expressão gênica entre os grupos estudados ( $p \leq 0,05$ ). \*\* indica  $p \leq 0,01$ . \*\*\* indica  $p \leq 0,0001$ .

### 5.6 Ensaio de sobrevivência de *C. elegans* infectado com *C. albicans* e tratado com as substâncias 1, 2, 3 e 4

Com base nos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, o estudo foi expandido para ensaios em dois modelos *in vivo* de candidíase experimental usando *C. elegans* e *G. mellonella* como modelo de hospedeiro invertebrado.

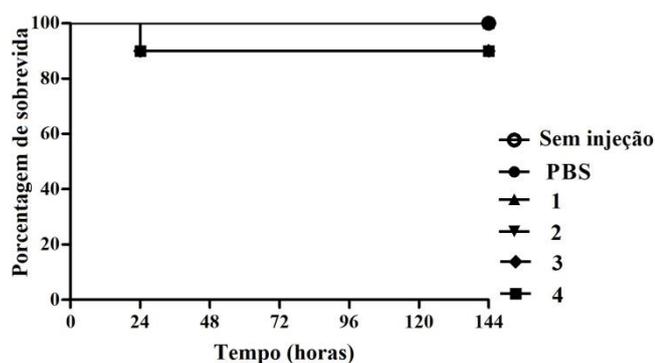
As substâncias 1, 2, 3, e 4 não foram efetivas no aumento da sobrevivência de *C. elegans* infectado com *C. albicans* CAN14 em nenhuma das concentrações testadas (**Figura 12**). Apesar da concentração de 2,0  $\mu\text{g/mL}$  da substância 1 ter apresentado vermes, ainda vivos, no último dia de contagem, este número não foi diferente estatisticamente do controle sem tratamento.



**Figura 12.** Sobrevida de *C. elegans* *glp-4, sek-1* infectados com *C. albicans* e tratados com substâncias 1, 2, 3, e 4. Os nematóides se alimentaram de *E. coli* OP50 foram transferidos para o isolado de *C. albicans* por 2 h e, então, transferidos para o meio líquido contendo (A) substância 1, (B) substância 2, (C) substância 3 e (D) substância 4. Os nemátodos mortos foram contados e removidos diariamente. Os vermes transferidos de *C. albicans* diretamente para o meio líquido foram usados como ao controle.

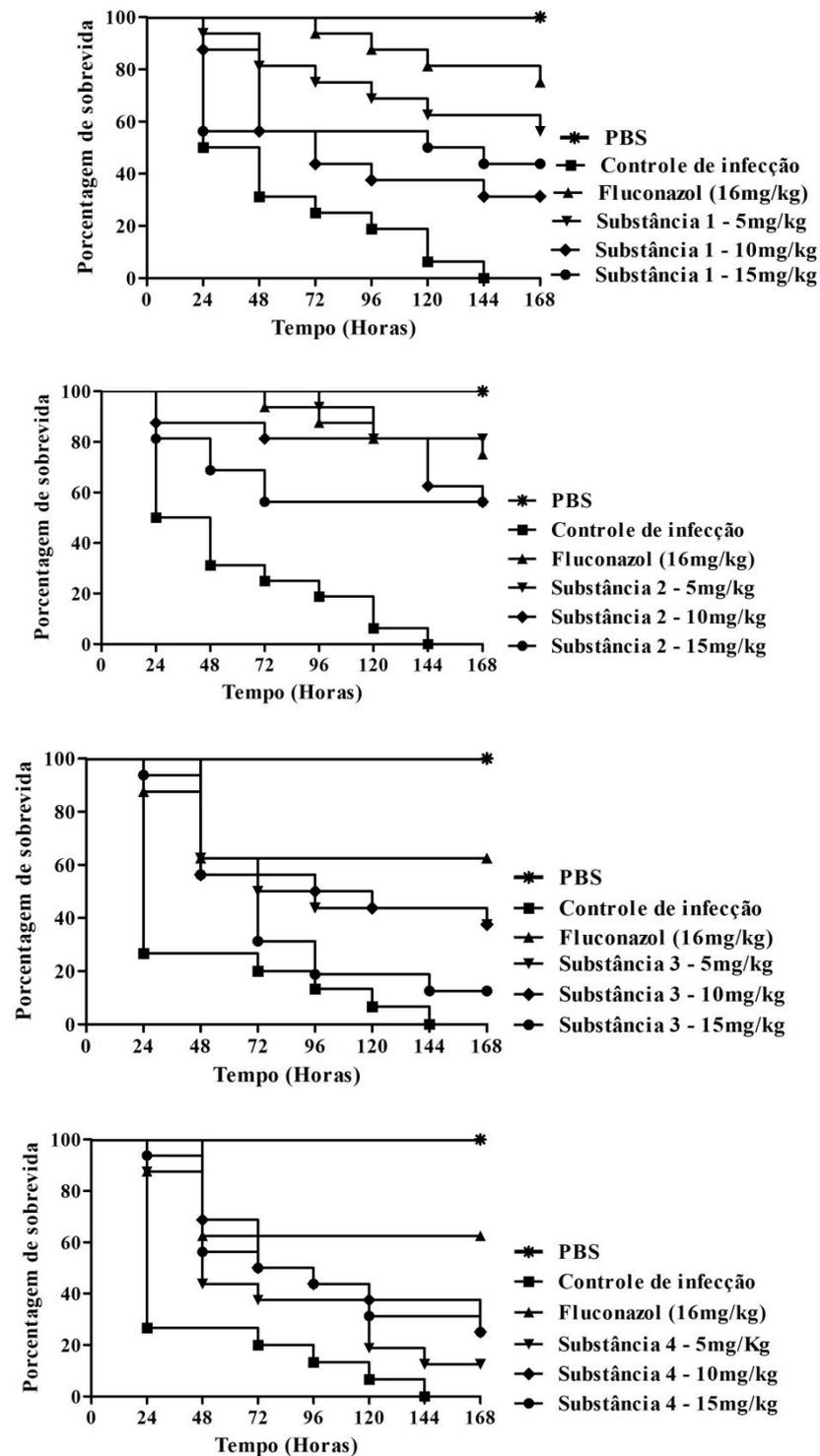
### 5.7 Teste de toxicidade e sobrevivência em *Galleria mellonella*

A toxicidade das substâncias foi realizada na ausência de infecção fúngica no modelo invertebrado de *G. mellonella*. Observamos LD50 <10 mg/kg para todas as substâncias testadas. Tendo em vista a ausência de toxicidade, foi realizado o teste de sobrevivência destas larvas com as substâncias em estudo (**Figura 13**).



**Figura 13 - Toxicidade de derivados hidrazino-tiazólicos em *Galleria mellonella*.** As larvas foram injetadas com as substâncias **1**, **2**, **3** e **4** de tiazolil-hidrazona na concentração de 10 mg/kg e sua sobrevivência foi avaliada até 144 horas após o tratamento. A sobrevivência das larvas foi de 100% com as substâncias **1** e **2** e 95% com as substâncias **3** e **4**.

No ensaio de sobrevivência de *G. mellonella* infectada com *C. albicans*, todas as concentrações testadas (5, 10 e 15 mg / kg) das substâncias **1**, **2**, **3** e **4** exibiram uma sobrevivência significativamente prolongada em comparação com controles não tratados (**Figura 14**). As substâncias **1** e **2** demonstraram a maior porcentagem de larvas vivas após o sétimo dia de experimento. Para a substância **1**, a concentração de 5 mg/kg foi a mais efetiva ( $p < 0,0001$ ), mostrando uma sobrevivência de 56,3% após o sétimo dia de tratamento. A concentração de 5 mg/kg ( $p < 0,0001$ ) da substância **2** apresentou a melhor porcentagem de sobrevivência em 81,3%, as demais concentrações de 10 mg/kg ( $p < 0,0001$ ) e 15 mg/kg ( $p = 0,0007$ ) apresentaram aumento de 56% na sobrevivência das larvas. A substância **3** exibiu sobrevivência de apenas 37% nas concentrações de 5 mg/kg ( $p = 0,005$ ) e de 10 mg/kg ( $p = 0,005$ ). As concentrações mais elevadas da substância **4** a 10 e 15 mg/kg prolongaram apenas 25% da sobrevivência das larvas no 7º dia do ensaio.



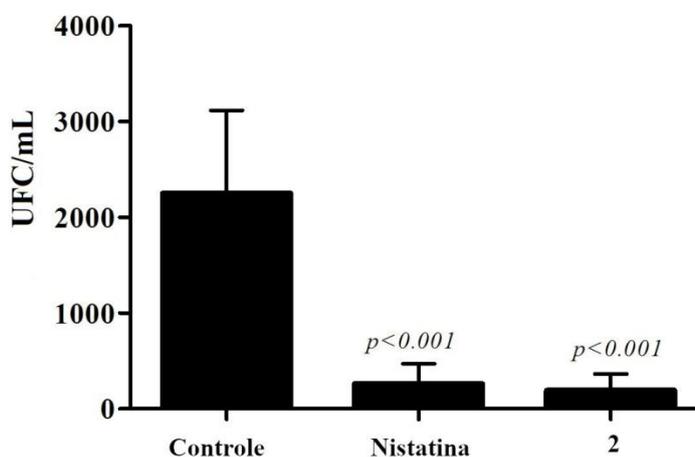
**Figura 14 - Curva de sobrevivência de *Galleria mellonella*.** A) *G. mellonella* infectada com *C. albicans* (CAN14) e tratada com tiazolil-hidrazona 1 a 5,0 mg / kg ( $p < 0,0001$ ); 10 mg / kg ( $p < 0,0128$ ) e 15 mg / kg ( $p < 0,005$ ) B) *G. mellonella* infectada com *C. albicans* (CAN14) e tratada com tiazolil-hidrazona 2 a 5,0 mg / kg; 10mg / kg e 15mg / kg foi diferente do controle negativo ( $p < 0,0001$ ), C) *G. mellonella* infectada com *C. albicans* (CAN14) e tratada com tiazolilhidrazona 3 a 5,0mg / kg ( $p = 0,0005$ ); 10 mg / kg ( $p = 0,0002$ ) e 15 mg / kg ( $p = 0,0356$ ) D) *G. mellonella* infectada com *C. albicans* (CAN14) e tratada com tiazolilhidrazona 4 a 5,0 mg / kg ( $p = 0,0224$ ); 10 mg / kg ( $p = 0,0010$ ) e 15 mg / kg ( $p = 0,0026$ ).

### 5.8 Ensaio *In Vivo* em Modelo Murino de Candidíase Oral e Sistêmica.

Em vista dos resultados promissores obtidos com a substância **2** nos experimentos anteriores, onde mostrou atividade efetiva contra isolados de *C. albicans*, baixa citotoxicidade e aumento da sobrevivência de larvas de *G. mellonella*, investigamos a eficácia do composto usando modelos murinos de candidíase oral e sistêmica com este composto a 10 mg/kg.

No modelo de candidíase oral, um teste piloto foi realizado na presença e ausência de imunossupressão com uma e duas inoculações de *C. albicans* (dados não mostrados). No entanto, os animais sem imunossupressão não apresentaram leveduras estáveis na língua após 5 dias e o número de colônias recuperadas com apenas uma inoculação foi muito baixo, de modo que somente os experimentos com animais imunossuprimidos e provisão de dois momentos de infecção em dias alternados são mostrados.

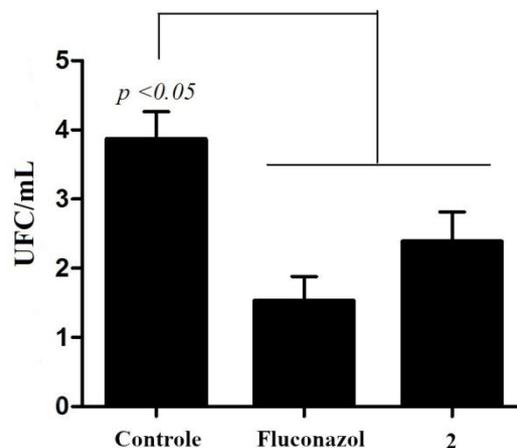
Após o tratamento, os animais foram sacrificados e a carga fúngica presente na língua foi avaliada. Pode-se observar que os animais que receberam o tratamento com a substância **2** neste estudo apresentaram redução drástica da carga fúngica em relação aos animais controle que não receberam nenhum tratamento, ( $p < 0,001$ ). O mesmo ocorreu para os animais tratados com nistatina (**Figura 15**). Estes resultados mostram o potencial terapêutico do derivado hidrazino tiazólico **2** no modelo murino de candidíase oral.



**Figura 15. Tratamento modelo murino de candidíase oral.** O número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas da língua de fêmeas C57BL/6 infectadas com *C. albicans* SC5314 foi menor nos animais tratados com nistatina (600 UI) e hidrazino-tiazólico **2** (100 mg/kg) do que no grupo controle que não recebeu tratamento (teste de Comparação Múltipla de Newman-Keuls).

No modelo de candidíase sistêmica observamos que no tratamento com fluconazol e a substância **2** ocorreu uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da carga fúngica nos rins em relação aos animais infectados e não tratados (**Figura 16**). Assim, reduzindo a carga fúngica em

animais tratados com a substância de interesse, os resultados deste ensaio demonstram o potencial terapêutico significativo da hidrazino tiazólico **2**.



**Figura 16.** Tratamento modelo murino de candidíase sistêmica. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperado dos rins de fêmeas C57BL/6 infectadas com *C. albicans* SC5314 foi menor nos animais tratados com fluconazol (10 mg/kg) e hidrazino-tiazólico **2** (10 mg/kg) do que no grupo controle que não recebeu tratamento (teste de Comparação Múltipla de Newman-Keuls).

## 6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a incidência de infecções fúngicas tem aumentado, particularmente entre pacientes com sistema imunológico comprometido devido a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, transplante de órgãos e/ou quimioterapia para tratamento do câncer. As terapias atuais para o tratamento de infecção fúngica sistêmica têm eficácia limitada e criaram problemas de reações adversas e resistência aos fármacos (HIRAI et al., 2017). Essas questões, portanto, nos motiva na busca de substância com potencial antifúngico.

Neste trabalho foram avaliadas a atividade de 4 substâncias de derivados hidrazino-tiazólico. A avaliação da CIM dos derivados hidrazino-tiazólico para isolados clínicos e de referência mostrou que estas substâncias são eficazes contra patógenos fúngicos, e a melhor atividade pode ser observada contra isolados de *C. albicans* e *C. neoformans*. Estes resultados são interessantes porque *C. albicans* é o principal agente causador de candidíase, a infecção fúngica mais comum em humanos (PIERCE et al., 2015) e *C. neoformans* é um patógeno que causa criptococose em pacientes com HIV/AIDS e tem tratamento limitado devido à relativa escassez de antifúngicos potentes em pacientes com HIV (PRATES et al., 2013). Os resultados também mostraram que as substâncias hidrazino-tiazólicas testadas possuem um amplo espectro de ação contra leveduras de interesse médico. Entre os isolados testados, a substância **1** demonstrou as CIMs mais baixas.

Após notar a efetiva atividade das substâncias contra importantes patógenos fúngicos foram realizados ensaios de toxicidade para avaliar se tais substâncias causariam danos às células humanas. Primeiramente, foi realizado o ensaio com eritrócitos humanos, visto que, este modelo de triagem para toxicidade é rápido, reproduzível e barato para avaliar a atividade hemolítica dos eritrócitos contra muitos compostos, um fato que permite reduzir o uso de animais de laboratório para testes *in vivo* (ORSINE et al., 2012). Em nenhuma das concentrações testadas as substâncias de derivados hidrazino-tiazólico apresentaram caráter hemolítico. Esses achados são consistentes com estudos anteriores mostrando que as substâncias heterocíclicas tiazólicas não causam danos às células sanguíneas dos mamíferos (SÁ et al., 2018; SÁ et al., 2017).

Os ensaios de citotoxicidade são os métodos de avaliação de danos biológicos causados por substâncias. A realização destes testes é fundamental antes de qualquer investigação sobre o mecanismo de ação de diferentes moléculas (PAGANO; FAGGIO, 2015). Deste modo, foi avaliado se as substâncias causariam toxicidade à dois tipos celulares: células VERO e células de linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). As substâncias não causaram danos em nenhum dos tipos celulares testados, mostrando ausência

de toxicidade, o que é fundamental na escolha de um novo antifúngico. Resultados semelhantes foram publicados anteriormente descrevendo a baixa toxicidade das substâncias **1** e **2** para células renais embrionárias humanas (HEK-293) (LINO et al., 2018). Além disso, foi encontrado um alto índice de seletividade para células VERO com as substâncias **1** e **2**. É sabido que compostos com alta seletividade oferecem o potencial para uma terapia mais segura com menos efeitos colaterais e um mecanismo para identificar candidatos a estudos de eficácia em camundongos (MAGALHÃES et al., 2013).

Tendo em vista a promissora atividade das substâncias e a ausência de toxicidade frente aos diferentes tipos celulares mostrados foi avaliado se essas substâncias poderiam inibir alguns dos fatores de virulência de *C. albicans* como a filamentação, adesão, proteinase, fosfolipase e biofilme. Como os fungos são eucariotos, o desenvolvimento de novos antifúngicos é complicado devido ao limitado número de alvos que podem ser explorados por novos compostos. Com isso, o direcionamento específico dos mecanismos de virulência representa uma opção atraente para o desenvolvimento de drogas antifúngicas (VILA et al., 2016).

Dentre os fatores de virulência de *C. albicans*, a filamentação é a que mais tem recebido atenção e talvez seja a mais promissora como um alvo para novas estratégias de anti-virulência para combater infecções por *C. albicans* (VILA et al., 2016). No ensaio de filamentação, a substância **2** apresentou capacidade para inibir a filamentação de *C. albicans* em um meio indutor na concentração sub-inibitória, o que sugere que a substância estudada apresenta capacidade de anti-filamentação, o que poderia tornar as leveduras de *C. albicans* menos virulentas em um processo infeccioso.

Outro fator de virulência avaliado foi a capacidade das substâncias em alterar a integridade de biofilmes maduros de *C. albicans*. Entre os fatores de virulência de *C. albicans*, a capacidade de formar biofilme em cateteres, próteses (abióticos) e superfícies mucosas (biótico) é um dos mais importantes porque facilita a adesão, proliferação e disseminação deste microrganismo para outros locais de infecção (HASSAN et al., 2009; FINKEL, MITCHELL, 2011). A contagem de UFC/mL mostrou que o biofilme de *C. albicans* foi desestruturado quando as células foram tratadas pelas substâncias **1** e **2**. Esses resultados são satisfatórios, visto que, as células de biofilme de *C. albicans* são muito mais resistentes do que as células planctônicas a um espectro de drogas antifúngicas (DESAI, MITCHELL, 2015). E a desestruturação do biofilme é de extrema importância, pois possibilita que o antifúngico atinja o máximo de células planctônicas.

O sucesso na formação do biofilme depende da capacidade de adesão celular para ancorar fungos a um dispositivo ou tecido (MATHE; VAN DIJCK, 2013). Além de atuar na integridade do biofilme as substâncias **1** e **2** também foram capazes de inibir a adesão de leveduras de *C. albicans* a CEBH, etapa fundamental para colonização, formação do biofilme e sobrevivência no hospedeiro (HOFS, MOGAVERO, HUBE, 2016). Assim, podemos sugerir que essas substâncias atuam tanto na inibição do estágio de formação do biofilme, como na desestruturação do mesmo.

A capacidade de formar biofilme tem sido associada com a presença de genes regulatórios transcricionais (FINKEL, MITCHELL, 2011). Com a finalidade de elucidar os mecanismos envolvidos na redução da adesão, formação de biofilme e da filamentação de *C. albicans* observados em nossas análises, expandimos nosso estudo ao nível da expressão gênica para determinar a interferência das substâncias **1**, **2**, e **3** na expressão gênica de ALS1, ALS3, HWP1, CPH1, BCR1 e EFG1. A maioria dos estudos usa expressão gênica para quantificar genes envolvidos na virulência desta levedura contra condições ambientais adversas, tais como tipos de nutrientes utilizados para o crescimento, produção de biofilmes *in vitro* e *in vivo*, presença ou ausência de substâncias inibitórias produzidas por outros microrganismos e sensibilidade ou resistência a agentes antifúngicos (NAILIS et al., 2010; SEMLALI et al., 2014; BARROS et al., 2016).

Genes como ALS e HWP1 são apresentados em processos como a regulação da adesão e produção de hifas em *C. albicans* (GARCIA-SANCHEZ et al. 2004; NOBILE et al. 2006). A expressão dos genes ALS1 e HWP1 na presença da substância **1** e dos genes ALS1 e ALS3 na presença da substância **2** não foram alterados significativamente. No ensaio de adesão foi mostrado que essas substâncias inibiram a adesão das células de *C. albicans* em CEBH (**Figura 6**), esse episódio pode ser explicado porque o estágio da aderência na formação do biofilme de *C. albicans* acontece entre as primeiras 11 horas no qual os patógenos fúngicos aderem de forma reversível (0-4 h) e irreversivelmente (5-11 h) a um agente abiótico / biótico (TOBUDIC et al., 2012). Como a expressão desses genes foi avaliada no biofilme maduro, ou seja, após 48 horas de formação, os genes ALS1 e ALS3 poderiam já não estar sendo expressos naquele momento.

O gene HWP1 codifica uma proteína principal de *C. albicans* que está envolvida em várias funções, incluindo montagem de parede celular, sinalização intracelular, desenvolvimento de hifas e media principalmente uma forte ligação às células da mucosa (como células epiteliais orais / vaginais) (SUNDSTROM et al. 2002; NOBILE et al., 2006; BISWAS et al. 2007; CHAFFIN 2008). Apenas nas células tratadas com a substância **2**, o

gene HWP1 apresentou regulação negativa. Esse resultado corrobora com os resultados encontrados neste trabalho na inibição da adesão e da filamentação pela substância **2** (**Figura 5 e 6**).

Importantes genes regulatórios transcricionais do biofilme em *C. albicans* foram identificados, incluindo EFG1, CPH1 e BCR1, que regulam os diferentes estágios da formação do biofilme (LEWIS et al. 2002; RAMAGE et al. 2002; NOBILE e MITCHELL 2005; NOBILE et al. 2006). Os genes BCR1 e EFG1 são essenciais para a formação de um biofilme maduro e estável resistente à terapia antifúngica e à proteção do sistema imunológico, permitindo a propagação de infecções causadas por esse microrganismo (FINKEL & MITCHELL, 2011; FOX & NOBILE, 2012; NOBILE et al., 2006; NOBILE et al., 2012). O gene CPH1, além de atuar na formação do biofilme, tem sido relacionado na manutenção e organização da parede celular e na formação de pseudo-hifas em resposta ao estresse oxidativo (EINSMAN et al., 2006; MAITI et al., 2015).

Neste trabalho, a expressão dos genes BCR1, CPH1 e EFG1 foi regulada negativamente por todas as substâncias estudadas, **1**, **2**, e **3**, sendo possível correlacionar este resultado à diminuição da UFC / mL por estas substâncias e mostrar que a regulação destes genes pode estar associada à desestruturação do biofilme maduro. A down-regulation do gene CPH1 sugere que o mecanismo de ação destas substâncias pode estar relacionado com a parede celular e direciona futuros experimentos para o estudo da atividade destas substâncias na parede celular de *C. albicans*.

Os biofilmes totalmente maduros têm uma mistura de levedura, hifas e pseudo-hifas na matriz extracelular que sugere que a transição de levedura para hifas está diretamente correlacionada com o desenvolvimento de biofilmes (NOBILE e MITCHELL, 2005). A substância **3** regulou negativamente os genes ALS1, ALS3, CPH1, EFG1 e BCR1 o que mostra que esta substância poderia atuar em todas as etapas da formação do biofilme, desde a adesão, filamentação até a maturação.

Uma vez que uma nova substância antimicrobiana se mostra potente e não tóxica *in vitro*, é importante avaliar se esta substância é eficaz contra o microrganismo alvo em um modelo de infecção animal. A atividade antimicrobiana de uma substância pode ser reduzida *in vivo* devido à degradação por enzimas, ligação aos componentes do hospedeiro e efeitos de condições fisiológicas, como o pH. Dessa forma, os modelos de infecção animal são essenciais, pois fornecem dados sobre a eficácia de um agente antimicrobiano e permitem a avaliação da toxicidade *in vivo* (ZAK e O'REILLY, 1991).

A ação das substâncias foi avaliada primeiramente no modelo invertebrado de *C. elegans*. Este invertebrado já provou ser um modelo essencial para o estudo da virulência de fungos e para triagem de novos compostos (BREGGER et al., 2007). No entanto, neste trabalho, nenhuma das substâncias aumentou a sobrevivência de *C. elegans*. Devido ao tamanho reduzido, a injeção direta do fungo no nematóide não é prática (ARVANITIS et al., 2013), assim ele é colocado em uma placa contendo o fungo, do qual se alimenta, para que a infecção ocorra (MUHAMMED et al., 2012). No entanto, este processo não permite o cálculo preciso do inóculo, pois é impossível prever de quanto cada verme irá se alimentar. Dessa forma, como nenhuma das concentrações das substâncias aumentou a sobrevivência dos vermes em relação ao controle, o conteúdo de *C. albicans* ingerido pelos nematoides pode ter sido elevado e, assim, as substâncias não foram efetivas para o tratamento da infecção neste verme.

A próxima etapa foi avaliar a toxicidade e atividade das substâncias hidrazino tiazólicas em outro modelo invertebrado, nas larvas de *G. mellonella*. Tendo em vista que os estudos de toxicidade usando modelos de mamíferos são caros e demorados (NASS e HAMZA, 2007; TRALAU et al., 2012), as larvas de *G. mellonella* foram utilizadas para realizar o ensaio de toxicidade *in vivo* das hidrazino tiazólicas. Este modelo invertebrado é altamente adequado para avaliar a toxicidade e a eficácia de novos agentes antimicrobianos candidatos a estudos *in vivo* antes dos testes em mamíferos, além de produzir resultados comparáveis àqueles que podem ser obtidos usando modelos vertebrados (DESBOIS e COOTE, 2012; BRENNAN et al., 2002; MAGUIRE et al., 2016).

As substâncias derivadas de hidrazino tiazólicas, assim como nas células cultiváveis, não causou toxicidade às larvas de *G. mellonella*, o que levou a realizar o ensaio de sobrevivência com esse invertebrado. No geral, o tratamento de larvas com as substâncias sob investigação resultou em um aumento na sobrevivência das larvas, um resultado semelhante foi encontrado por SÁ e colaboradores (2015), que mostrou um aumento de 70% na sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* na dose de 5 mg/kg após o tratamento com 2-(2-(ciclohexilmetileno)hidrazinil)-4-5 feniltiazol (CHT), um composto análogo aos utilizados neste trabalho.

A efetiva atividade das substâncias contra isolados clínicos e isolados de referência, baixa toxicidade dos compostos *in vitro* e resultados promissores em *G. mellonella* com aumento da sobrevivência desses vermes, possibilitou a realização do ensaio de candidíase oral e sistêmica em camundongos com a substância **2**. Nos experimentos *in vivo*, foram utilizados os modelos de candidíase oral e sistêmica, por serem as infecções mais comumente causadas por

fungos patogênicos oportunistas do gênero *Candida* presentes na microbiota indígena, que estão diretamente ligados à imunossupressão do indivíduo afetado (PUPULIN et al., 2014).

A nistatina foi utilizada como controle no modelo oral, pois é o agente tópico mais utilizado no tratamento da candidíase oral, apresentando melhor eficácia e menor custo em relação aos demais medicamentos existentes. Por não ser absorvido pelo intestino, esse antifúngico tem baixo potencial de efeitos colaterais, como vômitos, diarreia e náusea, adicionando mais vantagens (AKPAN & MORGAN, 2002). Em estudo realizado por WONG et al. (2014), os autores demonstraram maior ou similar eficácia de novos compostos sobre a nistatina. Em nosso estudo, a substância **2** foi capaz de reduzir a carga fúngica na língua de camundongos semelhante à nistatina (**Figura 11**).

No modelo murino de candidíase sistêmica, a infecção pode ser encontrada em vários órgãos. No entanto, os rins foram os órgãos selecionados para a análise, porque *C. albicans* normalmente se acumula nos órgãos e leva à insuficiência renal (XU et al., 2015; SZABO & MACCALLUM, 2011). A redução da carga fúngica foi observada ao analisar os rins dos animais tratados com a substância **2**, assim como o fluconazol mostrando a eficiência da substância hidrazino tiazólico no tratamento da infecção fúngica.

## 7. SÍNTESE DOS RESULTADOS

As quatro substâncias de derivados hidrazino-tiazólicos apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans*, e mostraram atividade *in vitro* contra vários patógenos fúngicos, porém as substâncias **1** e **2** apresentaram os melhores resultados, com menor toxicidade nos modelos celulares estudados e foram aqueles que prolongaram a sobrevivência de *G. mellonella* infectados com *C. albicans*. A substância **2** inibiu a filamentação, as substâncias **1**, **2**, e **3** inibiram a adesão e as substâncias **1** e **2** diminuíram a viabilidade do biofilme maduro de *C. albicans*. Na análise de expressão gênica todas as substâncias regularam negativamente genes relacionados ao biofilme. A atividade da substância **2** foi confirmada no modelo murino de candidíase oral e sistêmica por redução da carga fúngica na língua e nos rins de animais infectados com fungos. Assim, demonstrando o potencial antifúngico deste grupo de substâncias de derivados hidrazino-tiazólicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadio, AKR; Kioshima, ES; Teixeira, MM; Martins, NF; Maigret, B; Felipe, MSS. Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC Genomics*, v. 12, n. 75, p. 1-10, 2011.

Ajenjo, HMC; Aquevedo, SA; Guzmán, DAM; Poggi, MH; Calvo, AM; Castillo, VC; León, CE; Andresen, HM; Labarca, LJ. Epidemiological profile of invasive candidiasis in intensive care units at a university hospital. *Revista Chilena Infectologia*, v. 28, p. 118–122, 2011.

Akpan A; Morgan R. Oral candidiasis. *Postgraduate Medical Journal*, v. 78, p. 455-459, 2002.

Alcazar-Fuoli L, Mellado E. Biossíntese de ergosterol em *Aspergillus fumigatus*: sua relevância como alvo antifúngico e papel na resistência a drogas antifúngicas. *Frente Microbiol.*; v. 3; p. 439, 2012.

Álvares, CA; Svidzinski, TIE; Consolaro, MEL. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

Antachopoulos, C; & Walsh, TJ. New agents for invasive mycoses in children. *Current opinion in pediatrics*, v. 17(1), p. 78-87, 2005.

Apgar, JM; Wilkening, RR; Greenlee, ML; Balkovec, JM; Flattery, AM; Abruzzo, GK; et al. Novel orally active inhibitors of b-1,3-glucan synthesis derived from enfumafungin *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 25, pp. 5813-5818, 2015.

Arancia, S; Sandini, S; Cassone, A; De Bernardis, F. Use of 65kDa mannoprotein gene primers in PCR methods for the identification of five medically important *Candida* species. *Molecular and Cellular Probes*, v. 23, p. 218–226, 2009.

Arendrup, MC; Perlin DS. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? *Curr Opin Infect Dis*; v. 27; p. 484-492, 2014.

Arvanitis, M; Glavis-Bloom, J; & Mylonakis, E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1832(9), p. 1378-1383, 2013.

Asmundsdottir, LR; Erlendsdóttir, H; Agnarsson, BA; & Gottfredsson, M. The importance of strain variation in virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*: results of a blinded histopathological study of invasive candidiasis. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15(6), p. 576-585, 2009.

Bagg, J; Sweeney, M.P; Davies, AN; Jackson, MS; & Brailsford, S. Voriconazole susceptibility of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. *Journal of medical microbiology*, v. 54(10), p. 959-964, 2005.

Banerjee, S; Mondal, S; Chakraborty, W; Sen, S; Gachhui, R; Butcher, RJ; et al. Síntese, estruturas de cristal de raios-X, ligação ao DNA, clivagem oxidativa e estudos antimicrobianos de duas combinações de hidrazona de Cu (II). *Polyhedron*; v. 28; p. 2785-93, 2009.

Barbedo, LS; Sgarb, DBG. Candidíase. DTS: Jornal Brasileiro de Doenças sexualmente transmissíveis, v. 22, p. 22-38, 2010.

Bektic, J; Lell, CP; Fuchs, A; Stoiber, H; Speth, C; Lass-Florl, C; Borg-von Zepelin M; Dierich, MP; Wurzner, R. HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol* v. 31; p. 65–71, 2001.

Belenky, P; Camacho, D; Collins, JJ. Drogas fungicidas induzem uma via comum de morte celular por dano oxidativo. *Cell Rep.*, v. 3, p. 350 – 358, 2013.

Bergamasco, MD; Garnica, M; Colombo, AL and Nucci, M. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. *Mycoses*, v. 56, p. 256–263, 2013.

Berman, J; Sudbery, PE. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nature Reviews Genetics*; v. 3(12), p. 918-30, 2002.

Bharti, SK; Nath, G; Tilak, R; Singh, SK. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 45, p. 651–660, 2010.

Biswas, S; Van Dijck, P; & Datta, A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 71(2), p. 348-376, 2007.

Breger, J; Fuchs, BB; Aperis, G; Moy, TI; Ausubel FM; Mylonakis E; et al. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathog*; v. 3(2); p.e18, 2007.

Brennan, M; Thomas, DY; Whiteway, M; Kavanagh, K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 34, p. 153–157, 2002.

Brooks, GF; Butel, JS; Morse, SA. *Microbiologia Médica*. 22<sup>a</sup> Edição, McGraw-Hill, 2005.

Brown, GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annual Review of Immunology*, v. 23(29), p. 1-21, 2011.

Caggiano, G; Coretti, C; Bartolomeo, N; et al. Infecções da corrente sanguínea da *Candida* na Itália: mudando a epidemiologia durante 16 anos de vigilância . *Biomed Res Int.*; p. 256580, 2015.

Calderone, RA; & Gow, NA. Host recognition by *Candida* species. *Candida and candidiasis*. ASM Press, Washington, DC, p. 67-86, 2002.

Campoy, S; Adrio J. L. "Antifungals." *Biochemical pharmacology* v. 133; p. 86-96, 2017.

Canela, HMS; Cardoso, B; Vitali, LH; Coelho, HC; Martinez, R; & Ferreira, MEDS. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses*, v. 61(1), p. 11-2, 2018.

Carradori, S; Secci, D; Bolasco, A; Rivanera, D; Mari, E; Zicari, A; ... & Bizzarri, B. Synthesis and cytotoxicity of novel (thiazol-2-yl) hydrazine derivatives as promising anti-*Candida* agents. *European journal of medicinal chemistry*, v. 65, p. 102-111, 2013.

Carrillo-Muñoz, AJ; Brió, S; & Quindós, G. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Rev Iberoam Micol*, v. 18(1), p. 2-5, 2001.

Chaffin, WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 72(3), p. 495-544, 2008.

Chakrabarti A, Sood P, Rudramurthy SM, Chen S, Kaur H, Capoor M, et al. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Med*; v. 41; p. 285-95, 2015.

Chapman, SW; Sullivan, DC; Cleary, JD. In search of the holy grail of antifungal therapy. *Transactions of The American Clinical and Climatological Association*, v. 119, p. 197-216, 2008.

Chen, LM; Xu, YH; Zhou, CL; Zhao, J; Li, CY; Wang R. A superexpressão dos genes CDR1 e CDR2 desempenha um papel importante na resistência ao fluconazol em *Candida albicans* com mutações G487T e T916C. *J Int Med Res*; v. 38; p. 536 – 545, 2010.

Chen, SCA; Slavin, MA; & Sorrell, TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections. *Drugs*, v. 71(1), p. 11-41, 2011.

Chi, HW; Yang, YS; Shang, ST; Chen, KH; Yen, KM; Chang, FY; Lin, JC. *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infection. The comparison of risk factors and outcome. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 2011.

Chimenti, F., Bizzarri, B., Maccioni, E., Secci, D., Bolasco, A., Fioravanti, R., ... & Lilli, D. Synthesis and in vitro activity of 2-thiazolylhydrazone derivatives compared with the activity of clotrimazole against clinical isolates of *Candida* spp. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 17(16), p. 4635-4640. 2007.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, thirded, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. CLSI document M27-A3, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; fourth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. CLSI document M27-S4, 2012.

Coelho, C; Casadevall, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. *Cellular Microbiology*, v. 18, n. 6, p. 792–799, 2016

Cohn, J; Sessa, G and Martin, G. Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Immunol.*; v. 13, p. 55-62, 2001.

Coleman, JJ; Ghosh, S; Okoli, I; Mylonakis, E. Antifungal activity of microbial secondary metabolites, *PLoS One*; v. 6, p. e25321, 2011.

Costa, ACBP; Pereira, AC; Freire, F; et al. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. *Mycoses.*; v. 56; p. 614–22, 2013.

Da Costa, VG; Quesada, RMB; Abe, ATS; Furlaneto-Maia, L, & Furlaneto, MC. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. *Mycopathologia*, v. 178(3-4), p. 243-250, 2014.

Cowen, LE; Sanglard, D; Howard, SJ; Rogers, PD; Perlin, DS. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*; v. 5; p. 019752, 2015.

Cruciani, M; Serpelloni, G. Management of *Candida* infections in the adult intensive care unit. *Expert Opin Pharmacother*, v. 9, p.175–191, 2008.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect*; v. 20 (Suppl. 6); p. 54–59, 2014.

Cukurovalı, A; Yılmaz, I; Gu" r S, Kazaz C. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of some new thiazolylhydrazone derivatives containing 3-substituted cyclobutane ring. *Eur J Med Chem*; v. 41; p. 201–207, 2006.

Cotter, G; Doyle, S; Kavanagh, K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*; v. 27; p. 163–169, 2000.

Dunphy, GB; Oberholzer, U; Whiteway, M; Zakarian, RJ; Boomer, I. Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae), *Can. J. Microbiol.*; v.49; p. 514–524, 2003.

Deak, T. Environmental factors influencing yeasts. In: ROSA, C. A.; PÉTER, G. (Eds.) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Germany: Springer Berlin Heidelberg, p. 155–174, 2006.

Deray, G. Amphotericin B nephrotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49(1), p. 37-42, 2002.

de Repentigny, L. Animal models in the analysis of *Candida* host–pathogen interactions. *Current opinion in microbiology*, v. 7(4), p. 324-329, 2004.

Desai, JV, & Mitchell, AP. *Candida albicans* biofilm development and its genetic control. *Microbiology spectrum*, v.3(3), 2015.

Desalermos, A; Fuchs, BB; Mylonakis, E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis, *PLoS Pathog.*; v. 8, p.1002451, 2012.

Desbois, AP; Coote PJ. Utility of greater wax moth larva (*Galleria mellonella*) for evaluating the toxicity and efficacy of new antimicrobial agents. *Adv Appl Microbiol.*; v.78; p. 25–53, 2012.

Doi, AM; Pignatari, ACC; Edmond, MB; Marra, AR; Camargo, LFA; Siqueira, RA; ... & Colombo, AL. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. *PloS one*, v. 11(1), p. 0146909, 2016.

Eggimann, P; Garbino, J; Pittet, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3 (11), p. 685-702, 2003.

Fanning, S; Mitchell, AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog.* V. 8(4); p. 1002585, 2012.

Filippin, FB; Souza, LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

Finkel, JS; Mitchell, AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*; v. 9, p.109-18, 2011.

Firon, A; Lesage, G; & Bussey, H. Integrative studies put cell wall synthesis on the yeast functional map. *Current opinion in microbiology*, v. 7(6), p. 617-623, 2004.

Fox, EP; Nobile, CJ. Uma situação complicada: desemaranhando a rede transcricional que controla o desenvolvimento do biofilme em *Candida albicans*. *Transcrição.*; v. 3; p. 315-322, 2012.

Fuchs, BB., O'Brien, E; Khoury JB et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* v. 1; p. 475–482, 2010.

Fuchs, BB; RajaMuthiah, R; Souza, ACR; Eatemadpour, S; Rossoni, RD; Santos, DA; Junqueira, JC; Rice, LB; Mylonakis, E. Inhibition of bacterial and fungal pathogens by the orphaned drug auronofin. *Future Med. Chem.* V. 8, p. 117–132, 2016.

Gabler, IG; Barbosa, AC; Velela, RR; Lyon, S; Rosa, CA. Incidence and anatomic localization of oral candidiasis in patients with Aids hospitalized in a public hospital in elo Horizonte, MG, Brazil. *Journal applied oral Science*; v. 16(4), p. 247-50, 2008.

García-Sánchez, S; Aubert, S; Iraqui, I; Janbon, G; Ghigo, JM; d'Enfert C. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic cell.* V. 3(2); p. 536-45, 2004.

Garvey, EP; Hoekstra,WJ; Schotzinger, RJ; Sobel, JD; Lilly, EA; Fidel, PL. Eficácia do agente clínico VT-1161 contra *Candida albicans* sensíveis e sensíveis ao fluconazol em um modelo murino de Candidíase vaginal *Antimicrob. Agentes Chemother.*, v. 59, p. 5567 – 5573, 2015.

González-Párraga, P; Hernández, JA; & Argüelles, JC. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast*, v. 20(14), p. 1161-1169, 2003.

González-Párraga, P; Sánchez-Fresneda, R; Zaragoza, Ó; & Argüelles, JC. Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1810(8), p. 777-783, 2011.

Gotz, P; Matha, V; Vilcinskas, A. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*, *J. Insect Physiol.*; V. 43 p. 1149–1159, 1997.

Gow, NA; & Yadav, B. Microbe profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology*, v. 163(8), p. 1145-1147, 2017.

Hassan, S. T; Berchová-Bímová, K; & Petráš, J. Plumbagin, a Plant-Derived Compound, Exhibits Antifungal Combinatory Effect with Amphotericin B against *Candida albicans* Clinical Isolates and Anti-hepatitis C Virus Activity. *Phytotherapy research*, v. 30(9), p. 1487-1492, 2016.

Henriques, M; Gasparetto, Azeredo, J; Oliveira, R. Experimental methodology to quantify *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. *Biotechnology Letters*, v.24, p.1111-1115, 2002.

Hicheri, Y; Cook, G; & Cordonnier, C. Antifungal prophylaxis in haematology patients: the role of voriconazole. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, p. 1-15, 2012.

Hofs, S; Mogavero, S; Hube, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J. of Microbiol.* V. 54(3); p. 149–169, 2016.

Holla, BS. et al. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.38, n. 3, p. 313–318, 2003.

Huang, W; Zhang, Z; Han, X; Tang, J; Wang, J; Dong, S; & Wang, E. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol-or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophysical journal*, v. 83(6), p. 3245-3255, 2002.

Hube, B; Naglik, JR. Extracellular hydrolases. In: Calderone RA, editor. *Candida and candidiasis*. Washington: ASM Press; p. 107-22, 2002.

Hull, CM; Parker, JE; Bader, O et al. Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in *ERG11* and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* V. 56, p. 4223–4232, 2012.

Ivanovska, N. Phospholipases as a factor of pathogenicity in microorganisms. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Amsterdam, v. 22, p. 357-1, 2003.

Jacobsen, ID; Wilson, D; Wächtler, B; Brunke, S; Naglik, JR; Hube, B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 10, p.85- 93, 2012.

Jayatilake, JAM; Samaranayake, LP. Experimental superficial candidiasis on tissue models. *Mycoses*, v. 53, p. 285–295, 2010.

Kamalian L, et al. The utility of hepg2 cells to identify direct mitochondrial dysfunction in the absence of cell death. *Toxicology in Vitro*. V. 29(4); p.732–40, 2015.

Kanafani, ZR; Perfect, JR . Resistência a agentes antifúngicos: mecanismos e impacto clínico. *Clin Infect Dis.*; v. 46; p. 120 – 8, 2008.

Karkowska-Kuleta, J; RPI-Kosik, M; Kosik, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta biochimica polonica*,v. 5, p. 211-224, 2009.

Kashyap, SJ; Garg, VK, Sharma, PK; Kumar, N; Dudhe, R; & Gupta, JK. Thiazoles: having diverse biological activities. *Medicinal Chemistry Research*, v. 21(8), p. 2123-2132, 2012.

Kimura, LH; & Pearsall, NN. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*, v. 21(1), p. 64-68, 1978.

Kojic, EM; Darouiche RO. Infecções de *Candida* de dispositivos médicos. *Clin Microbiol Rev*. v. 17; p. 255-267, 2004.

Kumamoto, CA. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Curr. Opin. Microbiology*; v. 14, p. 386–391, 2011.

Kuhn, DM; Chandra, J; Mukherjee, PK; Ghannoum, MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immunology*, v.70, n.2, p. 878-888, 2002.

Kullberg, BJ, & Arendrup, MC. Invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*, v. 373(15), p. 1445-1456, 2015.

Kurtzman, CP; Fell, JW; Boekhout, T. *The Yeasts: A taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam.Elsevier Science Publisher, p. 1075, 2010.

Ku"cu"kgu" zel, SG; Kocatepe, A; Clercq, ED; S, ahin F, Gu" llu"ce M. Synthesis and biological activity of 4-thiazolidinones, thiosemicarbazides derived from diflunisal hydrazide. *Eur J Med Chem.*;v. 41; p. 353–359, 2006.

Kwon, B; Kumar, P; Lee, HK; Zeng, L; Walsh, K; Fu, Q; et al. Aberrant cell cycle reentry in human and experimental inclusion body myositis and polymyositis. *Human molecular genetics*. v. 23(14); p. 3681–94, 2014.

LaFleur, MD; Kumamoto, CA; Lewis, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother*; v. 50, p. 3839–3846, 2006.

Lebeaux, D; Ghigo, JM; Beloin, C. Infecções relacionadas ao biofilme: colmatar a lacuna entre o manejo clínico e os aspectos fundamentais da recalcitrância em relação aos antibióticos. *Microbiol Mol Biol Rev.*; v. 78, p. 510–543, 2014.

Lee, KL, Buckley, HR, and Campbell, CC. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia*; v. 13; p. 148–153, 1975.

Lesyk, R. et al. Anticancer thiopyrano[2,3-d][1,3]thiazol-2-ones with norbornane moiety. Synthesis, cytotoxicity, physico-chemical properties, and computational studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 15, p. 5230–5240, 2006

Lim, CSY; RosliR.; Seow HF; Chong, PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*; v. 31; p. 21–31, 2012.

Linares, MJ; Solís, F; & Casal, M. In vitro activity of voriconazole against *Prototheca wickerhamii*: comparative evaluation of Sensititre and NCCLS M27-A2 methods of detection. *Journal of clinical microbiology*, v. 43(5), p. 2520-2522, 2005.

Lino, CI; Gonçalves de Souza, I; Borelli, BM; Silvério Matos, TT; Santos Teixeira, IN; Ramos, JP; Maria de Souza Fagundes, E; de Oliveira Fernandes, P; Maltarollo, VG; Johann, S; de Oliveira, RB. Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 151, p. 248–260, 2018.

Livak, KJ;& Schmittgen, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *methods*, v. 25(4), p. 402-408, 2001.

Lohse, MB; Gulati, M; Johnson, AD; & Nobile, CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, v.16(1), p.19, 2018.

Maguire, R; Duggan, O; Kavanagh, K. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an in vivo model for assessing the relative toxicity of food preservative agents. *Cell Biology and Toxicology*, v. 32, i. 3, p. 209–216, 2016.

Marie, C; & White, TC. Genetic basis of antifungal drug resistance. *Current fungal infection reports*, v. 3(3), p. 163-169, 2009.

Marra, AR; Camargo, LF; Pignatari, AC; et al. Infecções hospitalares nosocomiais em hospitais brasileiros: análise de 2563 casos de um estudo prospectivo de vigilância nacional. *J Clin Microbiol.*; v. 49; p. 1866 – 1871, 2011.

Mayer, FL; Duncan, W; Hube, B. Rewien: *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, v. 4:2, p. 119–128, 2013.

Mathé, L; Van Dijck, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance Mechanisms. *Current Genetics*, v. 59, n. 4, p. 251-264, 2013.

McCarthy, MW; Kontoyiannis, DP; Perfect, J; Cornely, OS; Walsh TJ. Novel agents and drug targets to meet the challenges of resistant fungi. *J Infect Dis*; v. 216(Suppl 3); p. 474-483, 2017.

Menezes, EA; Cunha, MCSO; Ferreira, EB; Capelo, LG; Braz, BHL; Cunha, FA. Perfil de susceptibilidade de *Candida tropicalis* a antifúngicos sistêmicos. *Revista Patologia Tropical*. v. 42 (1), p.49-55, 2013.

Mersch-Sundermann, V; Knasmüller, S; Wu, XJ; Darroudi, F; Kassie, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, v.198, I. 1–3, p. 315-328, 2004.

Mesa-Arango, A. C., Trevijano-Contador, N., Román, E., Sánchez-Fresneda, R., Casas, C., Herrero, E., ... & Zaragoza, O. The production of reactive oxygen species is an universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug: AMPHORES study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-03570, 2014.

Metzger, JV, in: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry I*, Pergamon, New York, NY Vol. 6, p. 328, 1984.

Mishra, NN; Prasad, T.; Sharma, N.; Payasi, A.; Prasad, R.; Gupta, DK; Singh, R. Patogenicidade e resistência a drogas em *Candida albicans* e outras espécies de leveduras. Uma revisão. *Acta Microbiol. Immunol. Pendurado.* , v. 54, p. 201 – 235, 2007.

Monks, A; Scudiero, D; Skehan, P; Shoemaker, R; Paull, K; Vistica, D; Hose, C; Langley, J; Cronise, P; A. Vaigro-Wolff, M. GrayGoodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd, Feasibility of a high flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *J. Natl. Cancer. I.* v. 83, p. 757-766, 1991.

Mora-Montes, HM; Bates, S; Netea, MG; Diaz-Jimenes, DF; Lopez-Romero, E; Zinker, S; et al. Endoplasmic reticulum glycosidases of *Candida albicans* required for n-glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryotic cell*, v. 6, n. 12, p. 2184-2196, 2007.

Muñoz, P; Guinea, J; Rojas, L; Bouza, E. New antifungal agents for the treatment of candidaemia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 36S; p.S63-S69, 2010.

Musiol, R; Magdziarz, T; & Kurczyk, A. Quinoline scaffold as a privileged substructure in antimicrobial drugs. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz, Spain: Formatex, p. 72-83, 2011.

Mylonakis, E, Casadevall, A; & Ausubel, FM. Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS pathogens*, v. 3(7), p. 101, 2007.

Naglik, JR; Challacombe, J; Hube, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67(3), p. 400-428, 2003.

Naglik, J; Albrecht, A; Bader, O; Hube, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiology*, v. 6, p. 915–926, 2004.

Natesan, SK; Chandrasekar, PH. Isavuconazole for the treatment of invasive Aspergillosis and Mucormycosis: current evidence, safety, efficacy, and clinical recommendations. *Infect Drug Resist.*; v. 9, p. 291–300, 2016.

Nett, J; Andes, D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, p. 340–345, 2006.

Nett, J. E. Special Issue: *Candida* and Candidiasis. *J Fungi (Basel)*. Sep; v. 4(3), p. 74, 2018.

Niewerth, M; Korting, HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*, Hoboken, v.44, n.9, p. 361-367, 2001.

Nobile, CJ; Mitchell, AP. Regulation of cell surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol.*; v. 15, p.1150–5, 2005.

Nobile, CJ; Mitchell, AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.*;v. 8, p.1382–9, 2006.

Odds, FC; Brown, A.J.P.; Gow, NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.*, v. 11, p. 272-279, 2003.

Ortega-Riveros, M; De-la-Pinta, I; Marcos-Arias, C; Ezpeleta, G; Quindós, G; & Eraso, E. Usefulness of the Non-conventional *Caenorhabditis elegans* Model to Assess *Candida* Virulence. *Mycopathologia*, v. 182(9-10), p.785-795, 2017.

Orsine JVC, Costa R, Silva R, Santos M, Novaes M. The acute cytotoxicity and lethal concentration (LC50) of *Agaricus sylvaticus* through hemolytic activity on human erythrocyte. *Int J Nutr Met*; v. 4, p. 19–23, 2012.

Oswald W; Guimarães S. *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas*. (4ªEdição). Porto Editora, 2001.

Oura M, Sternberg TH, Wright ET. Um novo antibiótico anti-fúngico, Anfotericina B. *Antibiótico*. Annu v. 3; p. 566 – 573, 1995 .

Özdemir, A, Zitouni, GT, & Kaplancikli, ZA. Novel analogues of 2-pyrazoline: synthesis, characterization, and antimycobacterial evaluation. *Turkish Journal of Chemistry*, v. 32(5), p. 529-538, 2008.

Pagano, M.; Faggio, C. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell Biochemistry and Function*. v. 33, p. 351–355, 2015.

Pappas, PG; Kauffman, CA; Andes, D; Benjamin, DK Jr.; Calandra, TF; Edwards, JE Jr.; et al. Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, p.503-35, 2009.

Paramythiotou, E, Frantzeskaki, F, Flevari, A, Armaganidis, A, & Dimopoulos, G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Molecules*, v. 19(1), p. 1085-1119, 2014.

Patil, A, & Majumdar, S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 69(12), p. 1635-1660, 2017.

Pietrella, D; Angiolella, L; Vavalaz, E; Rachini, A; Mondello, F; Ragno, R; Bistoni, F e Vecchiarwlli, A. Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 11, n. 1, p. 18, 2011.

Pemán, J; Salavert, M. General epidemiology of invasive fungal disease, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* v. 30(2), p.90-8, 2012.

Pianalto, KM, A & Alspaugh, JA. "New horizons in antifungal therapy." *Journal of Fungi* v. 2.4; p. 26, 2016.

Pfaller, MA, Diekema, DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 36, p.1-53, 2010.

Pfaller MA, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN, Castanheira M. Activity of a long-acting echinocandin, CD101, determined using CLSI and EUCAST reference methods, against *Candida* and *Aspergillus* spp., including echinocandin- and azole-resistant isolates. *J Antimicrob Chemother*; v. 71; p. 2868-2873, 2016.

Pierce, C. G.; Chaturvedi, A. K.; Lazzell, A. L.; Powell, A. T.; Saville, S. P.; Mchardy, S. F.; Lopez-Ribot, J. L. A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. *npj Biofilms Microbiomes*, v. 1, p. 1–8, 2015.

Plan, QT; Myers, CL; Fu, Y; Sheppard, DC; Yeaman, MR; Welch, WH; et al. Als3 is a *Candida albicans* invasion that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biology*, v. 5; p. e64, 2007.

Playford, EG; Marriott, D; Nguyen, Q. Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: risk factors for non-*albicans Candida* spp. *Critical Care Medicine*, v. 36, p. 2034-9, 2008.

Prates, RA; Fuchs, BB; Mizuno, K; Naqvi, Q; Kato, IT; Ribeiro, MS; Mylonakis, E; Tegos, GP; Hamblin, MR. Effect of Virulence Factors on the Photodynamic Inactivation of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, v. 8, p. 10–13, 2013.

Prieto, D; Román E; Correia, I; Pla, J. The HOG pathway is critical for the colonization of the mouse gastrointestinal tract by *Candida albicans*. *Plos One*, v. 9(1); p. e87128, 2014.

Protopopova, M. et al. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, n. 5, p. 968–974, 2005.

Pukkila-Worley, R; Peleg, AY; Tampakakis, E; Mylonakis, E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model, *Eukaryot. Cell*, p.1750–1758, 2009.

Pukkila-Worley, R, & Mylonakis, E. From the outside in and the inside out: antifungal immune responses in *Caenorhabditis elegans*, *Virulence*, v. 1(3) p. 111-112, 2010.

Ramage, G; Bachmann, S; Patterson, TF; Wickes, BL; Lopez Ribot, JL. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to flucoazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob.Chemother.*, v. 4, p. 973–980, 2002.

Pupulin, ÁR; Carvalho, PG; Nakamura, CV. Susceptibilidade a antifúngicos e produção de enzimas por leveduras do (levaduras del) gênero *Candida* isoladas (aisladas) de pacientes com HIV/AIDS. *Salud(i)Ciencia*, v. 20, p. 471–476, 2014.

Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. Biofilmes de *Candida* em biomateriais implantados: um problema clinicamente significativo. *FEMS Fermento Res.* v.6; p. 979-986, 2006.

Ramage G, E Mowat, Jones B., Williams C, Lopez-Ribot J. Nossa compreensão atual de biofilmes fúngicos. *Crit Rev Microbiol.*, v. 35; p. 340-355, 2009.

Rao VS, Srinivas K. Modern drug discovery process. *J Bioinform Seq Anal*; v. 2; p. 89–94, 2011.

Reboli, AC, Rotstein, C, Pappas, PG, Chapman, SW, Kett, DH, Kumar, D, ... & Krause, DS. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *New England Journal of Medicine*, v. 356 (24), p. 2472-2482, 2007.

Regassini, LO. et al. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. *African Journal of Biotechnology*. v.8, n.12, p. 2866 - 2870, 2009.

Rex JH , Pfaller MA , Galgiani JN , et al. Desenvolvimento de pontos de corte interpretativos para o teste de susceptibilidade antifúngica: estrutura conceitual e análise de dados de correlação in vitro-in vivo para infecções por fluconazol, itraconazol e *Candida* . Subcomitê de Testes de Susceptibilidade Antifúngica do Comitê Nacional de Padrões de Laboratórios Clínicos . *Clin Infect Dis*, v. 24; p.235 – 47, 1997.

Rodloff, A.C.; Koch, D.; Schaumann, R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *European Journal of Medical Research*, v.16; p.187-195, 2011.

Rosa FG, Corcione S, Filippini C, et al. O efeito na mortalidade do tratamento com fluconazol ou equinocandinas em candidemia em enfermarias de medicina interna. *PLoS ONE* . 20; v. 10; p. e0125149, 2015.

Rosch JW, Boyd AR, Hinojosa E, Pestina T, Hu Y, Persons DA, et al. Statins protect against fulminant pneumococcal infection and cytolysin toxicity in a mouse model of sickle cell disease. *The Journal of clinical investigation.*,v.120(2); p.627–35, 2010.

Rybak JM, Marx KR, Nishimoto AT, Rogers PD. Isavuconazole: pharmacology, pharmacodynamics, and current clinical experience with a new triazole antifungal agent. *Pharmacotherapy*. , v. 35; p. 1037–51, 2015.

Sá, NP; Lima, CM; Lino, CI; C; Barbeira, PJS; Baltazar, LM; Santos, DA; Oliveira, RB; Mylonakis, E; Fuchs, BB; Johann, S. Heterocycle Thiazole Compounds Exhibit Antifungal Activity through Increase in the Production of Reactive Oxygen Species in the *Cryptococcus neoformans*- *Cryptococcus gattii* Species Complex. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 61, p. 2700–16, 2017.

Sá, NP; Lima, CM; A dos Santos, JR; Costa, MC; de Barros, PP; Junqueira, JC; Vaz, JA; Oliveira, RB; Fuchs, BB; Mylonakis, E; Rosa, CA; Santos, DA; Johann, S. A phenylthiazole derivative demonstrates efficacy on treatment of the cryptococcosis & candidiasis in animal models. *Futur. Sci. OA* 2018, 4, FSO305, doi:10.4155/fsoa-2018-0001.

Sá, NP; Lino, CI; Fonseca, NC; Borelli, BM; Ramos, JP; Souza-Fagundes, EM; Rosa, CA; Santos, DA; Oliveira, RB; Johann, S. Thiazole compounds with activity against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 102, p. 233–242, 2015.

Samaranayake, LP. *Essential microbiology for dentistry*. 3rd ed. London: Churchill Livingstone, 2006.

Sánchez-Fresneda, R, Martínez-Esparza, M, Maicas, S, Argüelles, JC, & Valentín, E. In *Candida parapsilosis* the ATC1 gene encodes for an acid trehalase involved in trehalose hydrolysis, stress resistance and virulence. *PloS one*, v. 9(6), p. e99113, 2014.

Sanglard, D, & Coste, AT. Activity of isavuconazole and other azoles against *Candida* clinical isolates and yeast model systems with known azole resistance mechanisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 60(1), p. 229-238, 2016.

Sardi, JCO; Scorzoni, L; Bernardi, T; Fusco-Almeida, AM; Mendes Giannini, MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, p. 10-24, 2013.

Santolaya, ME, Matute, TA, de Queiroz Telles, F, Colombo, AL, Zurita, J, Tiraboschi, IN, ... & Echevarría, J. Recomendaciones para el manejo de la candidemia en neonatos en América Latina. *Revista iberoamericana de micología*, v. 30(3), p. 158-170, 2013.

Santos ER, Dal Forno CF, Hernandez MG, et al. Suscetibilidade de *Candida*spp. isoladas de hemoculturas avaliadas utilizando os pontos de interrupção aprovados pelo M27-A3 e novos M27-S4 . *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v. 56, p. 477 – 482, 2014.

Santos, GCDO, Vasconcelos, CC, Lopes, AJO, Cartagenes, MDSDS, Barros Filho, AKD, Nascimento, FR, ... & Monteiro, CDA. *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Frontiers in microbiology*, 9, 1351, 2018.

Saville, SP; Lazzell, AL;Monteagudo, C; Lopez-Ribot, JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryotic Cells*, v.2, p.1053–1060, 2003.

Schaller, M, Korting, HC, Borelli, C, Hamm, G & Hube, B. Candida albicans-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. *Infection and Immunity*, v. 73, p. 2758–2765, 2005.

Schulze J, Sonnenborn U. Yeasts in the Gut: From Commensals to Infectious Agents. *Deutsches Ärzteblatt International*, v. 106(51–52), p. 837–42, 2009.

Scorneaux, B, Angulo, D, Borroto-Esoda, K, Ghannoum, M; Peel, M, & Wring, S. SCY-078 is fungicidal against Candida species in time-kill studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 61(3), p. 01961-16, 2017.

Seneviratne CJ, Silva WJ, Jin LJ, et al. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of Candida albicans and Candida glabrata biofilms. *Arch Oral Biol.*; v. 54: p. 1052–60, 2009.

Silva, V; Cristina Díaz, MJ; Naldy F; y Red De Diagnóstico en Micología Médica. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Revista chilena de infectología*, v.19, Supl.2, 2002.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Silicone colonization by non-Candida albicans Candida species in the presence of urine. *Journal of Medical Microbiology*, v. 59; p. 747-754, 2010.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species. *Trends in Microbiology*, v. 19, p. 241-247, 2011.

Snydman, DR. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial Candida infections. *Chest Journal*; v.123; p. 500-503, 2003.

Sobel, JD. Vulvovaginal candidosis. *The Lancet*; v. 369(9577), p.1961-71, 2007.

Sokol-Anderson, ML, Brajtburg, J, & Medoff, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of Candida albicans. *Journal of Infectious Diseases*, v. 154(1), p. 76-83, 1986.

Soto, SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, v. 4, n. 3, p. 223–229, 2013.

Souza, ACR; Fuchs, BB; Pinhati, HMS; Siqueira, RA; Hagen, F; Meis, JF; Mylonakis, E; Colombo, AL. Candida parapsilosis resistance to fluconazole: Molecular mechanisms and in vivo impact in infected Galleria mellonella larvae. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 59, p. 6581–6587, 2015.

Steinbach WJ; Roilides E; Berman D; Hoffman JA; Groll AH; Bin-Hussain I; Palazzi DL; et al. and the International Pediatric Fungal Network. Results from a prospective, international, Epidemiologic Study of Invasive Candidiasis in Children and Neonates. *The Pediatric Infectious Disease Journal.*, v. 31(12), p. 1252-1257, 2012.

Stokes, C, Moran, GP, Spiering, MJ, Cole, GT, Coleman, DC, & Sullivan, DJ. Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 44(9), p. 920-931, 2007.

Sundstrom, P. Adhesion in *Candida* spp. *Cellular microbiology*, 4(8), 461-469, 2002.

Szabo EK, MacCallum DM. The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis. *FEMS Microbiol Lett*, v. 320(1); p.1–8, 2011.

Taff, HT; Nett, JE; Zarnowski, R; Ross, KM; Sanchez, H; Cain, MT; Hamaker, J; Mitchell, AP; Andes, DR. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 8, p. 1-13, 2012.

Tamura, NK; Negri, MFN; Bonassoli, LAE, Svidzinski, TIE. Virulence factors for *Candida* spp. recovered from intravascular catheters and hospital workers' hands. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40(1), p.91-93, 2007.

Thompson, GR, & Wiederhold, NP. Isavuconazole: a comprehensive review of spectrum of activity of a new triazole. *Mycopathologia*, v. 170(5), p. 291-313, 2010.

Tobudic, S, Kratzer, C, Lassnigg, A, & Presterl, E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*, v. 55(3), p.199-204, 2012.

Tóth, V, Nagy, CT, Pócsi, I, & Emri, T. The echinocandin B producer fungus *Aspergillus nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 does not possess innate resistance against its lipopeptide antimycotic. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 95(1), p.113-122, 2012.

Treagan, L. *Candida* and its role in opportunistic mycosis. California Association for Medical Laboratory Technology, Estados Unidos da América, 2008.

Tronchin, G; Pihet, M; Lopes-Bezerra, LM; Bouchara, JP; Adherence mechanism in human pathogenic fungi. *Medical Microbiology*, v. 46, p. 749-772, 2008.

Tumbarello M, Fiori B, Treçarichi EM, Posteraro P, Losito AR, Luca A, et al. Risk Factors and Outcomes of Candidemia Cused by Biofilm-Forming Isolates in a Tertiary Care Hospital. *Plos One*, v. 7(3), e33705, 2012.

Van Burik, JAH ; Magee, PT. Aspects of fungal pathogenics in Humans. *Annual Review of Microbiology*, v. 55, p. 743- 772, 2001.

Vandeputte, P; Larcher, G; Bergès, T; Renier, G; Chabasse, D; Bouchara, J-P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; v. 49(11), p. 4608-4615, 2005.

Verma, G; Marella, A; , Shaquiquzzaman, M; Akhtar, M; Ali, M; e Alam, M. Uma revisão explorando atividades biológicas de hidrazonas. *Revista de Farmácia e Bio Ciências Aliadas*. v. 6(2); p. 69, 2014.

Vinitha, M; Mamatha, B. Distribution of *Candida* Species in different clinical samples and their virulence: Biofilm formation, proteinase and phospholipase production: A study on hospitalized patients in Southern India, v. 3(1), p. 4-8, 2011.

Xavier AJ, Thakur M, Marie JM. Síntese e caracterização espectral de complexos de Ni (II) macrocíclicos octaaza de 14 membros baseados em hidrazona. *J Chem Pharm Res*; v. 4; p. 986-90, 2012.

Xu, W; Solis, NV; Ehrlich, RL; Woolford, CA; Filler, SG; Mitchell, AP. Activation and Alliance of Regulatory Pathways in *C. albicans* during Mammalian Infection. *PLoS Biol.*, v. 13, p. 1–32, doi:10.1371/journal.pbio.1002076, 2015.

Yang, Y. Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.*, Hong Kong, v. 36, p. 223-8, 2003.

Wächtler, B, Citiulo, F, Jablonowski, N, Förster, S, Dalle, F, Schaller, M, & Hube, B. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PloS one*, v. 7(5), p. e36952, 2012.

Walker, L. A., Munro, C. A., De Bruijn, I., Lenardon, M. D., McKinnon, A., & Gow, N. A. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS pathogens*, v. 4(4), p. e1000040, 2008.

Walsh TJ, Pappas P, Winston DJ, Lazarus HM, Petersen F, Raffalli J, Yanovich S, Stiff P, Greenberg R, Donowitz G, Lee J, National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *N Engl J Med* v. 346: p. 225–234, 2002.

Warrilow, AGS; Hull, CM; Parker, JE; Garvey, EP; Hoekstra, WJ; Moore, WR; et al. The clinical candidate VT-1161 is a highly potent inhibitor of *Candida albicans* CYP51 but fails to bind the human enzyme Antimicrob. Agents Chemother., v. 58, pp. 7121-7127, 2014.

Whaley, SG; Berkow, EL; Rybak, JM; Nishimoto, AT; Barker, KS; Rogers, PD. Azole resistência antifúngica em *Candida albicans* e emergentes espécies não- *albicans* *Candida*. *Frente Microbiol*, v. 7, p. 2173, 2016.

Wiederhold, NP. Pharmacology, in vitro activity, and in vivo efficacy of new antifungal agents. *Current Fungal Infection Reports*, v. 3(2), p. 77-85, 2009.

Wong SSW, Kao RYT, Yuen KY, Wang Y, Yang D, Samaranayake LP, et al. In vitro and in vivo activity of a novel antifungal small molecule against *Candida* infections. *PLoS ONE*; v. 9(1): p. e85866, 2014.

Zak, O, O'Reilly, T. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, p. 1527–1531, 1991.

Zordan, R; Cormack, B. Adhesins on Opportunistic Fungal Pathogens. In: Calderone RA, Clancy CJ, ed. *Candida and Candidiasis*: ASM Press, Washington, DC, p. 243-259, 2012.

Zotchev, SB. Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Curr. Med. Chem.*, v. 10, p. 211-223, 2003.

**ANEXO I - Certificado do Comitê de ética em pesquisa com uso de animais**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 207/2017**Título do projeto:** Estudo da atividade antifúngica de compostos sintéticos e própolis em modelo de candidíase experimental**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Susana Johann**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Microbiologia**Situação atual:** **Decisão Final - Aprovado**Aprovado na reunião do dia 30/10/2017. Validade: 30/10/2017 à 29/10/2022  
Belo Horizonte, 31/10/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)Universidade Federal de [Minas Gerais](#)  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@proq.ufmg.br](mailto:cetea@proq.ufmg.br)

## ANEXO II – Artigo publicado



Article

## Anti-*Candida albicans* Activity of Thiazolylhydrazone Derivatives in Invertebrate and Murine Models

Lana Ivone Barreto Cruz <sup>1</sup>, Larissa Ferreira Finamore Lopes <sup>1</sup>, Felipe de Camargo Ribeiro <sup>2</sup>, Nivea Pereira de Sá <sup>1,3</sup>, Cleudiomar Inácio Lino <sup>4</sup>, Nagendran Tharmalingam <sup>5</sup>, Renata Barbosa de Oliveira <sup>4</sup>, Carlos Augusto Rosa <sup>1</sup>, Eleftherios Mylonakis <sup>5</sup>, Beth Burgwyn Fuchs <sup>5</sup> and Susana Johann <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte—Minas Gerais 31270-901, Brasil; lanabarretocruz@gmail.com (L.I.B.C.); lafinamore@gmail.com (L.F.F.L.); niveasap@gmail.com (N.P.d.S.); carlosa@icb.ufmg.br (C.A.R.)

<sup>2</sup> Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos—UNESP, Av. Francisco José Longe, 777, Jardim São Dimas, São José dos Campos—São Paulo 12245-000, Brasil; felipe\_c\_ribeiro@hotmail.com

<sup>3</sup> Department of Molecular Genetics and Microbiology, Division of Infectious Diseases, Stony Brook University, 150 Life Science Building, Stony Brook, NY 11794, USA

<sup>4</sup> Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte—Minas Gerais 31270-901, Brasil; inaciol@hotmail.com (C.I.L.); renatabo.ufmg@gmail.com (R.B.d.O.)

<sup>5</sup> Division of Infectious Diseases, Rhode Island Hospital, Alpert Medical School, and Brown University, Providence, RI 02903, USA; nagendran\_tharmalingam@brown.edu (N.T.); emylonakis@lifespan.org (E.M.); helen\_fuchs@brown.edu (B.B.F.)

\* Correspondence: sjohann@icb.ufmg.br; Tel.: +55-3349-7700; Fax: +55-31-3295-3115

Received: 16 October 2018; Accepted: 10 December 2018; Published: 12 December 2018



**Abstract:** Candidiasis is an opportunistic fungal infection with *Candida albicans* being the most frequently isolated species. Treatment of these infections is challenging due to resistance that can develop during therapy, and the limited number of available antifungal compounds. Given this situation, the aim of this study was to evaluate the antifungal activity of four thiazolylhydrazone compounds against *C. albicans*. Thiazolylhydrazone compounds 1, 2, 3, and 4 were found to exert antifungal activity, with MICs of 0.125–16.0 µg/mL against *C. albicans*. The toxicity of the compounds was evaluated using human erythrocytes and yielded LC<sub>50</sub> > 64 µg/mL. The compounds were further evaluated using the greater wax moth *Galleria mellonella* as an in vivo model. The compounds prolonged larval survival when tested between 5 and 15 mg/kg, performing as well as fluconazole. Compound 2 was evaluated in murine models of oral and systemic candidiasis. In the oral model, compound 2 reduced the fungal load on the mouse tongue; and in the systemic model it reduced the fungal burden found in the kidney when tested at 10 mg/kg. These results show that thiazolylhydrazones are an antifungal towards *C. albicans* with in vivo efficacy.

**Keywords:** *Candida albicans*; thiazolylhydrazone derivatives; antifungal

### 1. Introduction

Systemic fungal infections are responsible for high mortality and morbidity, constituting a serious public health problem [1]. Among the opportunistic fungi, *Candida albicans* is responsible for most fungal infections [2,3] and has emerged as a major public health problem during the past two decades [4].