

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

**Eficácia antifúngica *in vitro* e *in vivo* da miltefosina em nanocarreador de
alginato no tratamento da aspergilose e candidíase sistêmica**

Thayná Lopes Barreto

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Thayná Lopes Barreto

Eficácia antifúngica *in vitro* e *in vivo* da miltefosina em nanocarreador de alginato no tratamento da aspergilose e candidíase sistêmica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Ishida

Versão corrigida

São Paulo

2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Barreto, Thayná Lopes
Eficácia antifúngica in vitro e in vivo da
miltefosina em nanocarreador de alginato no
tratamento da aspergilose e candidíase sistêmica /
Thayná Lopes Barreto; orientadora Kelly Ishida. --
São Paulo, 2020.
104 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. miltefosina. 2. nanocarreador de alginato. 3.
aspergilose. 4. Candida auris. I. Ishida, Kelly,
orientador. II. Título.



ATA DE DEFESA

Aluno: 42132 - 10627895 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa de Dissertação do(a) Senhor(a) Thayna Lopes Barreto no Programa: Ciências Biológicas (Microbiologia), do(a) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos 16 dias do mês de outubro de 2020, no(a) via remota realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Thayna Lopes Barreto, apresentada para a obtenção do título de Mestra intitulada:

"Eficácia antifúngica *in vitro* e *in vivo* da miltefosina em nanocarreador de alginato no tratamento da aspergilose e candidíase sistêmica"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Kelly Ishida	Presidente	ICB - USP	Não Votante
Carlos Pelleschi Taborda	Titular	ICB - USP	APROVADO
Lucas Xavier Bonfietti	Titular	IAL - Externo	APROVADO
Wagner Luiz Batista	Titular	UNIFESP - Externo	APROVADO

Resultado Final: APROVADO

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Lucianna Vicente da Silva _____, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 16 dias do mês de outubro de 2020.

Carlos Pelleschi Taborda

Lucas Xavier Bonfietti

Wagner Luiz Batista

Kelly Ishida
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em _____ e, portanto, o(a) aluno(a) _____ jus ao título de Mestra em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Microbiologia) - Área de concentração: Microbiologia.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Eficácia antifúngica da miltefosina em nanocarreador de alginato no tratamento da aspergilose", protocolada sob o CEUA nº 5026060618, sob a responsabilidade de **Kelly Ishida e equipe; Thayná Lopes Barreto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 06/11/2018.

We certify that the proposal "Antifungal Efficacy of miltefosine in alginate nanocarrier in the treatment of aspergillosis", utilizing 105 Isogenics mice (105 males), protocol number CEUA 5026060618, under the responsibility of **Kelly Ishida and team; Thayná Lopes Barreto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 11/06/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **36 meses**

Depto/Setor: **Microbiologia**

Origem: **Biotério Central FMUSP**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **8 a 10 semanas**

Linhagem: **BalB/c**

N amostral: 105

São Paulo, 06 de novembro de 2018



Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Uso de animais
para experimentação



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

Thayna Lopes Barreto

participou do Curso “Uso de Animais em Experimentação” com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 6 junho 2019
Comissão de Biotérios
ICB USP



Declaro, para os devidos fins, que

Thayna Lopes Barreto

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos",
realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 26 julho 2018
(Declaração válida por 5 anos)

Prof. Dra. Katiúcia Batista da Silva Paiva
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira
Diretor do ICB

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por guiar-me até aqui e me conceder a coragem e paciência durante essa trajetória.

Ao homem da minha vida, meu pai Adalberto Barreto, à mulher mais incrível do universo, minha mãe Célia Lopes, que apoiaram cada segundo dessa caminhada, mesmo de tão longe, e ao meu irmão Tarcísio Barreto que cuida tão bem de todos. Obrigada por serem minha estrutura, por cada vídeo chamada no final do dia para amenizar a saudade e dizer que tudo vai dar certo, e deu. Tudo isso é por vocês, sempre e pra sempre. Amo muito vocês.

A toda a minha família, em especial à minha segunda mãe Corderiana Barreto, Gilberto Freire, Murilo Barreto e Gabriely Barreto que me acolheram tão bem em SP e fizeram com que tudo fosse mais fácil, obrigada por todos os cuidados, amo vocês.

A minha orientadora Profa. Dra. Kelly Ishida, responsável pela minha formação nesses dois anos, tanto acadêmica/profissional quanto pessoal, obrigada por ter me acolhido no seu grupo, pela confiança depositada em mim, por todos os ensinamentos, motivação e por ser, sem dúvidas, uma inspiração diária.

A todos os professores responsáveis pela minha formação, principalmente ao Dr. Carlos P. Taborda e Dr. Nilton Lincopan que tive a oportunidade de trabalhar durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, onde descobri que o caminho da docência em microbiologia é realmente o que eu “quero ser quando crescer”.

A Profa. Dra. Luciana B. Lopes por permitir a utilização do seu espaço e equipamentos para realização desse projeto e pelas contribuições intelectuais na discussão de resultados e produção de artigos científicos.

Aos colegas do Laboratório de Quimioterapia Antifúngica que foram tão receptivos desde o início e que se tornou uma relação tão harmoniosa e sem dúvidas permitiu com que tudo fosse mais leve. Muito obrigada Vinícius de Moraes, Gaby Scheunemann, Bruna Nakanishi (parceiros de bandeirão e de rolês), Amanda Paiva, Luíza de Martino, Aline Freitas, Camila Prada, Daniel de Jesus e Daniëlle Lima pela convivência agradável e todas as risadas. À Cristina Spadari meu especial agradecimento por todo o auxílio com os experimentos e discussão científica com tanta paciência, além de todos momentos de descontração e por me ajudar a desbravar SP.

A todos os funcionários que ajudaram de alguma forma, principalmente à Zita Gregório e Marcela Gonçalves por toda colaboração e dedicação, além do cuidado e carinho pessoal em todos os momentos, muito obrigada.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Microbiologia, Gisele Santana e Renato de Oliveira, pelo auxílio com muita dedicação, e ao Marco Alves do Biotério de Experimentação por auxiliar nos experimentos animais, sempre muito solícito.

Aos amigos que trago da Bahia no meu coração, em especial àqueles que sempre estiveram presentes e dispostos a ouvir meus áudios de 10 min: Emily Bronze que enfrentou junto comigo todas as nuances da missão pós-graduação longe de casa, obrigada por ser minha alma gêmea; Thomas Vieira e Bianca Lopes que sempre me confortam sabendo exatamente o que dizer em cada momento, e que estiveram tão presentes diariamente celebrando cada conquista por menor que fosse, vocês são parte de mim. A todos os outros membros do pipoco: Julyanna Castro, Mariana Campêlo, Geiseane Amaral, Rebeca Quinto, Jemile Viana e Carla Araújo, obrigada pela amizade tão sincera, única e por, mesmo distante, continuarmos unidos, como sempre foi e sempre será. Amo vocês.

A minha amiga Maria Júlia Rosseto, que bom que nossos caminhos se encontraram aqui na USP, obrigada pelas conversas tão maravilhosas e pela amizade tão linda que construímos, amo você. E a todos os amigos e colegas que SP me deu, e fizeram dessa experiência a melhor que poderia ser, obrigada.

Aos amigos que a quarentena me presenteou: Ananda de Oliveira, Vinícius Sass, Itamony Barros, Carolina dos Santos, Vanessa Cândido e Luiz Felipe, obrigada pela convivência tão agradável, por estarem comigo nesse período, pelos almoços de domingo e sempre aparecer com uma comidinha gostosa depois de um dia cansativo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (Processo 2018/03708-8) permitindo a realização desse trabalho, a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro institucional e financiamento para apresentação de trabalho em evento científico, ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) pela utilização da infraestrutura laboratorial.

Meus agradecimentos a todos aqueles que colaboraram de alguma forma (direta ou indireta) para minha formação e para esse trabalho.

“Hey you, don’t tell me there’s no hope at all. Together we stand, divided we fall.”
Hey you – Pink Floyd (1979)

BARRETO TL. **Eficácia antifúngica *in vitro* e *in vivo* da miltefosina em nanocarreador de alginato no tratamento da aspergilose e candidíase sistêmica.** 2020, 104 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Resumo

As infecções fúngicas invasivas são consideradas grande problema de saúde pois acometem principalmente indivíduos imunocomprometidos e possuem espectro de tratamento muito limitado. Desse modo, a estratégia de reposicionamento se torna relevante e propõe-se a miltefosina (MFS) como potencial alternativa antifúngica pois apresenta amplo espectro de ação fungicida, porém a alta toxicidade pode dificultar o uso na micologia clínica. A utilização de sistemas nanoestruturados para liberação controlada e sustentada é uma maneira de reduzir a toxicidade e manter a atividade antifúngica e diante disso, a miltefosina encapsulada em nanopartículas de alginato (MFS-NA) se torna uma estratégia promissora na terapia de infecções fúngicas invasivas. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade da MFS livre e MFS-NA sobre *Aspergillus fumigatus* (n=10), *Aspergillus flavus* (n=9) e *Candida auris* (n=2) em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* usando modelo larvário de *Galleria mellonella*. Os isolados de *A. fumigatus* testados foram considerados sensíveis para os antifúngicos padrão (anfotericina B – AMB e voriconazol - VRC), enquanto as cepas de *A. flavus* exibiram um perfil mais tolerante. Utilizamos dois isolados de *C. auris*: CBS 10913 foi sensível a todos os antifúngicos convencionais e CBS 12766 apresentou resistência ao fluconazol. A MFS livre inibiu o crescimento fúngico em concentrações de 0,5 a 16 µg/mL; foi fungicida para a maioria das cepas de *A. fumigatus* e *C. auris* (1 a 32 µg/mL), e fungistático para *A. flavus*. A MFS-NA inibiu o crescimento de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *C. auris* CBS 10913 em 18,7-600 µg/mL, enquanto *C. auris* CBS 12766 foi a mais tolerante (Concentração Inibitória Mínima – CIM > 600 µg/mL). Foi identificado efeito sinérgico da MFS com VRC para o isolado 1220 de *A. fumigatus*, com redução da CIM em 8 vezes para ambos fármacos em combinação. Em modelo de *G. mellonella*, MFS (10 e 20 mg/kg) e da MFS-NA (100 mg/kg) reduziram a taxa de mortalidade e melhoraram o índice de saúde das larvas infectadas com *A. fumigatus*, além de reduzir a disseminação fúngica no tecido larval com o aumento da quantidade de granulomas de contenção da infecção. A combinação da MFS + VRC reduziu a carga fúngica e se mostrou melhor do que o tratamento apenas com VRC. Para infecção com *A. flavus* observou-se que quando combinado MFS-NA + VRC houve a melhora na taxa de sobrevivência além da diminuição da carga fúngica comparado com VRC, apontando que os tratamentos em combinação foram melhores que quando utilizados sozinhos. O perfil de sobrevivência em modelo de *G. mellonella* da cepa considerada muito virulenta de *C. auris* (CBS 12766) permaneceu o mesmo com os tratamentos, contudo, observou-se a diminuição da disseminação tecidual principalmente nos grupos tratados com MFS (40 mg/kg) e MFS-NA. Em contraste, MFS livre e MFS-NA foram efetivos contra a infecção por *C. auris* CBS 10913 levando ao aumento da sobrevivência larvária e redução da carga fúngica. A MFS livre e MFS-NA apresentam potencial relevante para a terapia antifúngica das aspergiloses e candidíases invasivas, e em combinação com VRC pode ser uma estratégia de melhoria do desempenho farmacológico nas terapias contra infecções fúngicas invasivas graves.

Palavras-chave: miltefosina, nanocarreador de alginato, aspergilose, *Candida auris*

BARRETO TL. **Antifungal efficacy *in vitro* e *in vivo* of miltefosine encapsulated in alginate nanoparticles on treatment of aspergillosis and systemic candidiasis.** 2020. 104 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Abstract

Invasive fungal infections are considered a major health problem because they affect mainly immunocompromised patients and have a very limited spectrum of treatment. Thus, the repositioning strategy becomes relevant and miltefosine (MFS) is purposed as a potential antifungal alternative because presents broad spectrum of action fungicide, but the high toxicity may difficult the use in clinical mycology. The use of nanostructured systems for controlled and sustained release is a way to reduce toxicity and maintain antifungal activity and miltefosine encapsulated in alginate nanoparticles (MFS-AN) is a promising strategy in the therapy of invasive fungal infections. Therefore, this work aimed to evaluate the activity of free MFS and MFS-AN on *Aspergillus fumigatus* (n=10), *Aspergillus flavus* (n=9) and *Candida auris* (n=2) in experimental models *in vitro* and *in vivo* using larval model of *Galleria mellonella*. The isolates of *A. fumigatus* tested were considered sensitive to standard antifungals (amphotericin B - AMB and voriconazole - VRC) while the strains of *A. flavus* showed a more tolerant profile. We used two isolates of *C. auris*: CBS 10913 was sensitive to all conventional antifungals and CBS 12766 was resistant to fluconazole. Free MFS inhibited the fungal growth in concentrations from 0.5 to 16 µg/mL; it was fungicidal for most strains of *A. fumigatus* and *C. auris* (1 to 32 µg/mL), and fungistatic for *A. flavus*. MFS-NA inhibited the growth of *A. fumigatus*, *A. flavus* and *C. auris* CBS 10913 at 18.7-600 µg/mL, while *C. auris* CBS 12766 was the most tolerant (Minimum Inhibitory Concentration – MIC > 600 µg/mL). The synergistic effect of MFS with VRC was identified for the isolate 1220 of *A. fumigatus*, with a reduction of MIC by 8 times for both drugs in combination. In the *G. mellonella* model, MFS (20 and 40 mg/kg) and MFS-NA (100 mg/kg) reduced the mortality rate and increased the health index of larvae infected with *A. fumigatus*, also reducing the fungal dissemination through the larval tissue with increase of the number of granulomas of the infection control. The combination of MFS + VRC reduced the fungal burden and showed to be better than treatment with VRC alone. For infection with *A. flavus* it was observed that when combined MFS-NA + VRC there was an increase of larvae survival, besides the reduction of fungal burden in comparison with VRC, indicating that the treatments in combination were better than when used alone. The survival profile in *G. mellonella* model of the strain considered to be more virulent (CBS 12766) remained the same with the treatments, nevertheless decreased tissue dissemination was observed mainly in the groups treated with MFS (40 mg/kg) and MFS-AN. In contrast, free MFS and MFS-AN were effective against infection with *C. auris* CBS 10913 leading to increase of larval survival and reduction of fungal burden. Free MFS and MFS-AN presents relevant potential for antifungal therapy of aspergillosis and invasive candidiasis, and in combination with VRC may be a strategy for improving pharmacological performance in therapy against several invasive fungal infections.

Key words: miltefosine, alginate nanocarrier, aspergillosis, *Candida auris*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efeito da miltefosina encapsulada em nanopartículas de alginato (MFS-NA) sobre as hifas do isolado clínico 1220 de <i>Aspergillus fumigatus</i>	56
Figura 2 – Alterações morfológicas das hifas do isolado clínico 998 de <i>Aspergillus flavus</i> expostas a diferentes compostos.	57
Figura 3 – Ensaio de checkerboard e isobogramas das combinações de voriconazol e miltefosina contra isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp.	61
Figura 4 – Virulência dos isolados clínicos <i>Aspergillus fumigatus</i> 1220 e <i>A. flavus</i> 998 em modelo larvário de <i>Galleria mellonella</i>	62
Figura 5 – Curvas de sobrevivência e morbidade das larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com isolado clínico 1220 de <i>Aspergillus fumigatus</i>	64
Figura 6 – Curvas de sobrevivência e morbidade das larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com isolado clínico 998 de <i>Aspergillus flavus</i>	65
Figura 7 – Curvas de sobrevivência e morbidade das larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp.	66
Figura 8 – Carga fúngica em larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp.	68
Figura 9 – Análise histopatológica do tecido larval de <i>Galleria mellonella</i> infectado com <i>Aspergillus fumigatus</i> 1220.	70
Figura 10 – Análise histopatológica do tecido larval de <i>Galleria mellonella</i> infectado com <i>Aspergillus flavus</i> 998.	71
Figura 11 – Virulência de isolados clínicos de <i>Candida auris</i> em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	72
Figura 12 – Curvas de sobrevivência e morbidade das larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com <i>Candida auris</i> CBS 10913.	74
Figura 13 – Curvas de sobrevivência e morbidade das larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com <i>Candida auris</i> CBS 12766.	75
Figura 14 – Carga fúngica em larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com <i>Candida auris</i>	77
Figura 15 – Análise histopatológica do tecido larval de <i>Galleria mellonella</i> infectado com <i>Candida auris</i>	78
Figura 16 – Curva de contagem de leucócitos após a imunossupressão dos camundongos com ciclofosfamida.	80

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Interpretação dos valores de ponto de corte utilizados nos testes de sensibilidade aos antifúngicos padrão.48
- Tabela 2** – Sistema de pontuação do índice de saúde em modelo de *Galleria mellonella* (de BASTIANI, 2018 adaptado de LOH et al., 2013).52
- Tabela 3** – Critérios para análise semi-quantitativa da carga fúngica nas secções histológicas de larvas de *Galleria mellonella* (baseado em QUINTELLA et al., 2011 e adaptado de de BASTIANI, 2018).53
- Tabela 4** – Susceptibilidade de isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus* a anfotericina B (AMB), voriconazol (VRC), miltefosina livre (MFS) e encapsulada em nanopartículas de alginato (MFS-NA). Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Efetiva Mínima (CEM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL. *efeito fungicida.58
- Tabela 5** – Susceptibilidade de isolados clínicos de *Aspergillus flavus* a anfotericina B (AMB), voriconazol (VRC), miltefosina livre (MFS) e encapsulada em nanopartículas de alginato (MFS-NA). Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Efetiva Mínima (CEM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL. *efeito fungicida.59
- Tabela 6** – Susceptibilidade de *Candida auris* aos antifúngicos padrão, miltefosina livre (MFS) e em nanopartículas de alginato (MFS-NA). Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL.60
- Tabela 7** – Análise semi-quantitativa da carga fúngica e presença de estruturas de reprodução em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Aspergillus fumigatus* ou *Aspergillus flavus* não tratadas e tratadas com anfotericina B (AMB), voriconazol (VRC), miltefosina livre (MFS) ou em nanopartículas de alginato (MFS-NA).69
- Tabela 8** – Análise semi-quantitativa da carga fúngica, disseminação e formação de granuloma em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida auris* (CBS 10913 e CBS 12766) não tratadas e tratadas com anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), miltefosina livre (MFS) ou em nanopartículas de alginato (MFS-NA).77
- Tabela 9** – Contagem de leucócitos após a imunossupressão dos camundongos com ciclofosfamida.79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC	5-Flucitosina
ABC	<i>ATP Binding Cassete</i>
ABPA	Aspergilose Broncopulmonar Alérgica
ALT	Alanina Aminotransferase
AMB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de Variância
APAC	Aspergilose Pulmonar Associada a COVID-19
APC	Aspergilose Pulmonar Crônica
API	Aspergilose Pulmonar Invasiva
AST	Aspartato Aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BDA	Batata Dextrose Ágar
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BID	Duas Vezes Por Dia
CAS	Caspofungina
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEM	Concentração Efetiva Mínima
CEUA	Comissão De Ética no Uso de Animais
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COVID-19	Coronavírus 2019
CYP450	Citocromo P450
DLS	<i>Dynamic Light-Scattering</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
Dz	Diâmetro Médio
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FLC	Fluconazol

FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G	α -L-gulurônico
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
ICB	Instituto De Ciências Biomédicas
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IFN γ	Interferon Gama
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-17	Interleucina 17
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ITC	Itraconazol
LEMI	Laboratório de Micologia Especial
LUDSGs	Lipossomos Ultradeformáveis De Segunda Geração
M	Ácido β -D-manurônico
MALDI-TOF <i>Spectrometry</i>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MFG	Micafungina
MFS	Miltefosina
MFS-NA	Miltefosina em Nanocarreador de Alginato
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)propane sulfonic acid</i>
NCLs	Nanocápsulas Lipídicas
NCLQs	Nanocarreadores Lipídicos Modificados Com Quitosana Catiônica
NLRP3	<i>NOD-like receptor protein 3</i>
NLRP10	<i>NOD-like receptor protein 10</i>
NPs	Nanopartículas
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDI	Polidispersão
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLGA-PEG	Poli (Ácido Lático-co-Ácido Glicólico–Polietilenoglicol)

POS	Posaconazol
PZQ	Praziquantel
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RRPs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RPM	Rotações Por Minuto
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SDA	Sabouraud Dextose Ágar
SPAN 80	Polisorbato 80
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
Th	T _{helper}
TID	Três Vezes por Dia
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TRB	Terbinafina
UDPG	Uridina Difosfato Glucose
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
ζ	Potencial Zeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 <i>Aspergillus</i> sp.	20
1.2 <i>Candida auris</i>	25
1.3 Tratamento das aspergiloses e candidíases	28
1.4 Combinação de fármacos como estratégia no tratamento de doenças fúngicas	32
1.5 Alternativas para o tratamento de doenças fúngicas	33
1.6 Miltefosina	35
1.7 Carreadores de fármacos	38
1.8 Modelos animais para avaliação da eficácia terapêutica	41
2 OBJETIVOS	44
Objetivo Geral	44
Objetivos específicos	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Micro-organismos	44
3.2 Antifúngicos	45
3.3 Produção da miltefosina encapsulada em nanopartículas de alginato (MFS-NA)	45
3.4 Teste de susceptibilidade aos antifúngicos	46
3.4.1 <i>Aspergillus</i> spp.	46
3.4.2 <i>Candida auris</i>	47
3.4.3 Interpretação dos resultados de CIM e CFM	47
3.4.4 Ensaio de checkerboard: combinação de fármacos	48
3.5 Modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i>	49
3.5.1 Avaliação da virulência em modelo larvário de <i>Galleria mellonella</i>	49
3.5.1.1 <i>Aspergillus</i> spp.	50
3.5.1.2 <i>Candida auris</i>	50
3.5.2 Análise da eficácia antifúngica da miltefosina livre e incorporada em nanopartículas de alginato em modelo de aspergilose em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	50
3.5.3 Análise da combinação da miltefosina livre e incorporada em nanopartículas de alginato com voriconazol em modelo de aspergilose em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	51
3.5.4 Análise da eficácia antifúngica da miltefosina livre e incorporada em nanopartículas de alginato em modelo de candidíase sistêmica em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	51
3.5.5 Avaliação da sobrevivência e da morbidade de larvas de <i>Galleria mellonella</i>	52
3.5.6 Determinação da carga fúngica em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	52
3.5.7 Análise histopatológica	53
3.6 Padronização da imunossupressão em modelo murino	53
3.6.1 Animais	53
3.6.2 Padronização da imunossupressão	54
3.7 Análise estatística	54
4 RESULTADOS	55
4.1 Produção da miltefosina encapsulada em nanopartículas de alginato (MFS-NA)	55

4.2 Teste de susceptibilidade aos antifúngicos	55
4.2.1 <i>Aspergillus</i> spp.....	55
4.2.2 <i>Candida auris</i>	60
4.3 Modelo invertebrado de <i>Galleria mellonella</i>	62
4.3.1 Virulência de <i>Aspergillus</i> spp.	62
4.3.2 Análise da eficácia antifúngica da miltefosina livre e incorporada em nanopartículas de alginato em modelo de aspergilose em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	63
4.3.3 Análise da combinação entre miltefosina livre e incorporada em nanopartículas de alginato com voriconazol em modelo de aspergilose em larvas de <i>Galleria mellonella</i> .	65
4.3.4 Determinação da carga fúngica e análise histopatológica em larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com isolados clínicos de <i>Aspergillus</i> spp.	67
4.3.5 Virulência de <i>Candida auris</i>	72
4.3.5 Análise da eficácia antifúngica da miltefosina livre e encapsulada em nanopartículas de alginato em modelo de candidíase sistêmica em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	73
4.3.6 Determinação da carga fúngica e análise histopatológica em larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com isolados clínicos de <i>Candida auris</i>	75
4.4 Padronização da imunossupressão em modelo murino	79
5 DISCUSSÃO	80
6 CONCLUSÕES	89
7 PERSPECTIVAS	89
REFERÊNCIAS	90
Anexo	105

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas tem grande relevância sobre animais e plantas e sabe-se o impacto dos fungos na segurança alimentar e em distúrbios no ecossistema (FISCHER et al., 2012). Mas a influência dos fungos patogênicos humanos não é tão reconhecida, apesar das taxas de mortalidade por infecções fúngicas invasivas exceder 50 % (BROWN et al., 2012). Infecções superficiais são as mais comuns em humanos e atingem cerca de 1,7 bilhões de pessoas no mundo todo (BONGOMIN et al., 2017). As infecções de mucosas orais e genitais também são frequentes, dado que 50 a 75 % das mulheres em idade fértil sofrem pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal na vida (SOBEL, 2007). Já as infecções fúngicas invasivas são menos incidentes quando comparado com as cutâneas e mucocutâneas, mas estão associadas a altas taxas de mortalidade e morbidade e atingem cerca de meio milhão de pessoas por ano (BROWN et al., 2012). Os principais patógenos fúngicos relacionados com infecções invasivas são: *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum* e Mucormycetes (BONGOMIN et al., 2017).

A alta taxa de mortalidade associada a aspergiloses e candidemias e o aumento de isolados resistentes aos agentes antifúngicos frequentemente utilizados têm incentivado a busca por alternativas e estratégias para o tratamento eficaz dessas condições clínicas. Assim sendo, o presente projeto visa avaliar a eficácia antifúngica *in vitro* e *in vivo* da miltefosina em sistema nanocarreador de alginato no tratamento das aspergiloses e da candidíase sistêmica por *Candida auris*.

1.1 *Aspergillus* sp.

Aspergillus caracteriza-se por fungos filamentosos, saprófitos e anemófilos encontrados mundialmente, que utilizam matéria orgânica presente no solo, vegetais e materiais em decomposição para a sua manutenção, sendo extremamente importantes para a reciclagem de carbono e nitrogênio (GUGNANI, 2003). Existem cerca de 340 espécies descritas (SHISHODIA; TIWARI; SHANKAR, 2019) e algumas delas possuem grande importância econômica principalmente em processos biotecnológicos, tais como produção de antibióticos, ácidos orgânicos, fármacos,

enzimas e pelo seu papel de fermentador na indústria alimentícia (SAMSON et al., 2014).

Por apresentarem ciclo biológico simples e alta capacidade esporulante, os fungos desse gênero são capazes de produzir e liberar uma alta concentração de conídios no ar (1–100 por m³), fazendo com que essas estruturas, amplamente dispersas, sejam continuamente inaladas por humanos e animais (LATGE, 2001). Apesar do constante contato dos seres humanos com conídios de *Aspergillus* spp., é importante destacar que em indivíduos saudáveis geralmente não causam um quadro infeccioso, por conta da capacidade do sistema imune inato em eliminar eficientemente as estruturas fúngicas inaladas (PARK & MEHRAD, 2009).

O epitélio das vias aéreas fornece uma barreira física que é a primeira linha de defesa para os conídios inalados, assim como tem papel fundamental no recrutamento de células do sistema imune inato e na mediação de uma resposta imune adaptativa (LABRAM et al., 2019). Dentre os mecanismos da imunidade inata presentes no epitélio do pulmão, podemos citar a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8, GM-CSF e TNF- α , fator estimulador de granulócitos, complexos de pentraxina-3-ficolina, β -defensinas e lectinas do tipo C que podem reconhecer os componentes fúngicos e irão gerar resposta inflamatória e estimular a fagocitose dos conídios na tentativa de eliminá-los (NAMVAR et al., 2015). Além disso, a inalação de estruturas de *Aspergillus* spp. provoca respostas inflamatórias e remodeladoras das vias aéreas por meio da liberação de produtos fúngicos secretados, incluindo alérgenos com atividade de protease (NAMVAR et al., 2015). Caso os conídios superem esses mecanismos, eles germinam e produzem um micélio vegetativo capaz de invadir os tecidos pulmonares (LATGE, 2001; SUGUI et al., 2014). Uma vez que a germinação acontece, a parede celular de *Aspergillus* é alterada e o β -1,3-glucano é exposto, resultando na sinalização pela proteína dectina-1, seguido da fagocitose pelos macrófagos alveolares. Entretanto, se ocorrer falha nesse mecanismo a infecção é instalada e o fungo continua a se desenvolver no hospedeiro (PARKER & PRINCE, 2011).

Assim como outros patógenos oportunistas, o estabelecimento da infecção depende da interação de fatores do hospedeiro e do patógeno. As espécies desse gênero são frequentemente associadas a infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos devido ao câncer, infecção por HIV (*Human Immunodeficiency*

Virus), transplante de órgãos, doenças autoimunes, terapia com antibióticos de amplo espectro e doenças pulmonares prévias (KOUSHA; TADI; SOUBANI, 2011). Apesar de existirem cerca de 340 espécies nesse gênero, apenas aproximadamente 40 foram identificadas como importantes patógenos humanos, dentre elas *Aspergillus fumigatus* é a mais comum, sendo identificada em cerca de 90 % dos casos, seguida por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus terreus* (PAULUSSEN et al., 2017; SHISHODIA; TIWARI; SHANKAR, 2019).

A infecção por *Aspergillus* spp. inclui diferentes manifestações, que variam entre doenças alérgicas, semi-invasivas e invasivas (AMORIM et al., 2004). Em indivíduos portadores de asma e fibrose cística, a infecção por espécies desse gênero pode causar um quadro de hipersensibilidade denominado Aspergilose Broncopulmonar Alérgica (ABPA), caracterizado pela ativação imune crônica. Pacientes que já tiveram doenças pulmonares, tais como tuberculose e sarcoidose, e possuem cavitações pulmonares pré-existentes, podem desenvolver a Aspergilose Pulmonar Crônica (APC), quadro semi-invasivo caracterizado pela presença de bolas fúngicas (aspergilomas). Aspergilose Pulmonar Invasiva (API), doença extremamente grave que afeta anualmente 10 % dos pacientes com imunidade reduzida e possui taxa de mortalidade entre 50 e 95 %, é caracterizada pela invasão do tecido pulmonar, inflamação e possível disseminação para outros órgãos (AMORIM et al., 2004; DAGENAIS; KELLER, 2009; CHOWDHARY et al., 2013; PAULUSSEN et al., 2017). Além dessas, a aspergilose pode se apresentar como extrapulmonar, como Aspergilose Sinusal que se manifesta com a presença de bolas fúngicas na cavidade sinusal em pacientes imunocomprometidos; Aspergilose Ocular pode ser adquirida com o agravamento do quadro de aspergilose sinusal; Osteomielite por *Aspergillus* é uma condição rara que pode ocorrer após trauma ou complicações cirúrgicas principalmente em indivíduos altamente imunossuprimidos; Aspergilose do Sistema Nervoso Central pode ser derivada do agravamento do quadro de API ou Sinusal, caracterizada como uma lesão cerebral que afeta pacientes com leucopenia; ou ainda Aspergilose Cardíaca, embora rara, está relacionada principalmente com cirurgias cardíacas, através de enxertos ou suturas contaminadas ou dispersão intra-operatória de conídios (PASQUALOTTO & DENNING, 2006; THOMPSON & PATTERSON, 2012; PRAJNA et al., 2013; GABRIELLI et al., 2014; CADENA; THOMPSON; PATTERSON, 2016; RUDRAMURTHY et al., 2019).

Dentre os principais fatores de patogenicidade, podemos incluir o pequeno tamanho e hidrofobicidade dos conídios de *A. fumigatus* (2–3,5 µm de diâmetro), que facilita o alcance aos alvéolos pulmonares (PASQUALOTTO, 2009). A termotolerância também é uma característica importante na patogenicidade desses fungos, que possuem temperatura ótima de crescimento em 37 °C, podendo suportar até 48 °C (KRIJGSHELD et al., 2012). A temperatura e a presença de proteínas no soro humano, especificamente albumina, estão relacionadas com a promoção da germinação de conídios no tecido pulmonar e o aumento do crescimento micelial (RODRIGUES; ARAUJO; PINA-VAZ, 2005; DAGENAIS & KELLER, 2009). *A. fumigatus* pode tolerar alterações de pH, sendo capaz de crescer em ambientes com pH muito baixos (~3,5) mas também em pH muito alcalino (LATGÉ & CHAMILOS, 2020) e essa capacidade é essencial na interação com o sistema imune do hospedeiro, uma vez que o pH dos fagolisossomos (estruturas responsáveis pela fagocitose celular) é em torno de 5 (CANTON et al., 2014; LATGÉ & CHAMILOS, 2020). Além disso, *A. fumigatus* possui outras características capazes de driblar o mecanismo de defesa do hospedeiro como a inibição da ativação do sistema complemento (DAGENAIS & KELLER, 2009), secreção de enzimas como a elastase que tem papel importante na aspergilose invasiva pois degrada a elastina, constituinte de cerca de 28 % do tecido pulmonar (PASQUALOTTO, 2009); enzimas de neutralização de espécies reativas de oxigênio (catalases, superóxido dismutases) (LATGÉ & CHAMILOS, 2020); nucleases, oxidases, fosfatases, peptidases e proteases para degradar macromoléculas e fornecer nutrientes para o fungo (PASQUALOTTO, 2009); além da produção de toxinas como gliotoxinas, capacidade de adesão ao endotélio e epitélio e formação de biofilme que auxiliam no desenvolvimento de aspergilomas e aumentam a resistência aos antifúngicos (AMORIM et al., 2004; BARNES; MARR, 2006).

Entretanto, apesar da maior prevalência global da espécie *A. fumigatus* estar relacionada com a facilidade de invasão e germinação dos conídios nos alvéolos pulmonares devido ao pequeno tamanho dos conídios, existe um crescente aumento dos números de casos clínicos de aspergiloses por *A. flavus* (RUDRAMURTHY et al., 2019). Os conídios produzidos por *A. flavus* possuem 3-6 µm de diâmetro (comparado com 2-3 µm em *A. fumigatus*), o que pode explicar o predomínio das formas pulmonares de aspergilose por *A. fumigatus*, enquanto *A. flavus* é mais encontrado nas formas alérgicas que atingem o trato respiratório superior (PASQUALOTTO,

2009). As diferenças entre as espécies incluem principalmente a distribuição geográfica, o potencial patogênico e o perfil de resistência aos antifúngicos (PASQUALOTTO, 2009). Há predominância de isolados clínicos de *A. flavus* na Índia, Oriente Médio, África e México provavelmente devido à melhor capacidade de suportar climas quentes e áridos, comparado com outras espécies de *Aspergillus* (RUDRAMURTHY et al., 2019). No Brasil, *A. flavus* está muito relacionado com seu potencial toxigênico pela produção de aflatoxinas em grãos, micotoxinas carcinogênicas que causam sérios problemas nas culturas agrícolas em todo mundo (AQUINO et al., 2005). O consumo de alimentos contaminados com aflatoxinas pode causar graves doenças em humanos e animais como aflatoxicose, câncer de fígado e necrose hepática (TIWARI & SHANKAR, 2018). Além disso, *A. flavus* é a segunda espécie mais comum no Brasil, com prevalência de 22 % dos isolados clínicos reportados no trabalho de Negri e colaboradores (2014), que é consideravelmente maior que o índice global (10 %) representado por mais de 700 amostras clínicas de *Aspergillus* coletadas de 62 centros médicos em diversos países (PFALLER et al., 2008).

Atualmente existe a preocupação acerca da propensão de pacientes infectados com SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), também possam estar propensos a desenvolver aspergilose invasiva em casos graves da doença respiratória pelo coronavírus (COVID-19) (WIEDERHOLD & VERWEIJ, 2020). Cerca de 5 % dos pacientes com COVID-19 precisam de cuidados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e apresentam risco de desenvolver infecções secundárias, incluindo API, aumentando ainda mais as taxas de mortalidade (ALANIO et al., 2020; KOELER et al., 2020). Várias séries de casos de Aspergilose Pulmonar Associada a COVID-19 (APAC) foram publicadas, inclusive em pacientes imunocompetentes (VAN ARKEL et al., 2020; KOEHLER et al., 2020; LESCURE et al., 2020; ALANIO et al., 2020; BLAIZE et al., 2020; VERWEIJ et al., 2020; PRATTES et al., 2020; MEIJER et al., 2020; SANTANA et al., 2020), uma vez que a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) desencadeada por infecção viral é um fator de risco para API, mesmo na ausência de imunodeficiência prévia (KOEHLER et al., 2020). A APAC tem sido descrita em diversos países, e até 10 de junho de 2020, foram relatados 68 casos na China (prevalência de aproximadamente 23 %) e 35 casos na Europa (prevalência entre 20 a 35 %) (revisado por ARASTEHFAR et al., 2020) com altos índices de

mortalidade (cerca de 63 %) (ARASTEHFAR et al., 2020) e prevalência do isolamento da espécie *A. fumigatus* entre as amostras respiratórias com cultura positiva (90 %), seguido por *A. flavus* (7 %) (ARASTEHFAR et al., 2020).

No Brasil foi reportada uma análise *post mortem* que confirmou a API em um paciente com COVID-19 grave através da testagem de antígeno de galactomanana positivo e histopatologia com presença de estruturas claramente definidas como *Aspergillus*, incluindo hifas e conidióforos com fiáides e conídios, com isolamento de *Aspergillus penicillioides* e confirmado por sequenciamento nucleotídico (SANTANA et al., 2020). Além disso, um caso de APAC causada por *A. fumigatus* resistente a azóis foi relatado (MEIJER et al., 2020). O paciente diagnosticado com APAC por *A. fumigatus* sensível [Concentração Inibitória Mínima (CIM) para voriconazol (VRC) = 0,25 mg/L], recebeu dose terapêutica de VRC 200 mg/kg duas vezes por dia; após 7 dias com persistência dos sintomas, a cepa foi isolada com a CIM 8 vezes maior para VRC (2 mg/L), então o tratamento foi alterado para anfotericina B (AMB) lipossomal (200 mg/dia), com posterior sequenciamento indicando mutação TR₃₄/L98H no gene *cyp51A*, provavelmente responsável pela resistência ao VRC observada; o paciente veio à óbito 16 dias após o diagnóstico de APAC (MEIJER et al., 2020). O rápido desenvolvimento de APAC (de 3 a 28 dias após admissão na UTI, com média de 6 dias) é preocupante (ARASTEHFAR et al., 2020) e, portanto, o teste para a presença de *Aspergillus* em secreções respiratórias inferiores e galactomanana em amostras de soro de pacientes da UTI com COVID-19 deve ser considerado para administração correta da terapêutica antifúngica e redução das taxas de mortalidades associadas (KOEHLER et al., 2020).

1.2 *Candida auris*

Candida compreende fungos leveduriformes e possui mais de 150 espécies conhecidas. Dessas, algumas são encontradas na microbiota humana, mas apenas uma minoria é capaz de causar alguma patologia (CALDERONE, 2002). São considerados fungos oportunistas, uma vez que acometem indivíduos debilitados ou imunocomprometidos. Esses fungos podem causar variados tipos de micoses, podendo ser superficial (como cutânea ou mucosas) ou sistêmicas, quando atinge os sítios estéreis do corpo (DOUGLAS, 2003). As espécies de *Candida* são associadas

com muitas infecções fúngicas adquiridas no ambiente hospitalar e são responsáveis pela alta taxa de mortalidade associada a infecções sistêmicas nosocomiais - cerca de 25 % nos Estados Unidos (CDC, 2020a) e excedendo 50 % no Brasil (COLOMBO et al., 2014; DOI et al., 2016), sendo as espécies mais frequentes: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (PFALLER et al., 2019).

Assim como para outras espécies de *Candida*, *C. auris* pode causar infecções invasivas graves ou apenas colonizar pacientes sem causar infecção (FORSEBERG et al., 2019). Entretanto, *C. auris* tem sido isolada principalmente dos sítios estéreis do corpo, como sangue, líquido cefalorraquidiano e ossos, indicando que a maioria dos casos são de infecções invasivas (BORMAN; SZEKELY; JOHNSON, 2017). Além disso, *C. auris* também é encontrada no fluido biliar, urina, secreção vaginal, trato respiratório, ouvido e feridas, sendo que alguns desses locais representam apenas a colonização de forma assintomática (FORSEBERG et al., 2019). Essa colonização ou infecção está relacionada com os mesmos fatores de risco ligados a outras espécies de *Candida*, como aplicação de cateter venoso urinário ou central, alimentação parenteral, administração de antibióticos, pós-cirúrgico e admissão na UTI (SEARS & SCHWARTZ, 2017; IGUCHI et al., 2019).

O estabelecimento da candidemia depende da interação do patógeno com o sistema imunológico comprometido desses pacientes, sendo caracterizados como fungos oportunistas. Inicialmente ocorre o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de leveduras ou hifas invasoras de *Candida* spp. pelas várias famílias de receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) ligados à parede celular (GOW et al., 2011; NETEA et al., 2015; PAPPAS et al., 2018). A detecção de *Candida* spp. por RRP inicia cascatas de sinalização que medeiam o recrutamento de células do sistema imune, geração de espécies reativas de oxigênio, fagocitose e modula a ativação de células Th (T_{helper}) (NETEA et al., 2015; ERWIG & GOW, 2016; PAPPAS et al., 2018). Também são ativados os inflamassomas NLRP3 e NLRP10 (complexos intracelulares multiproteicos) que desencadeiam respostas inflamatórias e resultam na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IFN γ e IL-17 (GROSS et al., 2009; JOLY et al., 2012; PAPPAS et al., 2018). Neutrófilos também são essenciais para a imunidade efetiva durante a candidíase invasiva e a neutropenia do hospedeiro é fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento

da infecção disseminada e consequente mortalidade em humanos (NETEA et al., 2015; PAPPAS et al., 2018).

Candida auris é uma espécie emergente relacionada com surtos de infecções invasivas em todo o mundo que apresenta alta taxa de mortalidade (entre 30-60 %) e resistência aos antifúngicos disponíveis (90 % resistente a pelo menos um antifúngico e 30 % dos isolados são considerados multirresistentes) e se enquadra na lista de ameaças urgentes quanto à multirresistência (resistência a duas ou mais classes de antifúngicos) (CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017; CDC, 2019). Além da resistência aos antifúngicos convencionais, essa espécie apresenta algumas características peculiares que podem estar ligadas com sua facilidade de disseminação no ambiente hospitalar como a alta tolerância à salinidade e temperatura (capaz de suportar até 42 °C) (FORSBERG et al., 2019) e a capacidade de formar biofilmes - população de células que se desenvolvem em uma superfície biótica ou abiótica envolvidas por uma matriz extracelular polissacarídica (LEWIS, 2001) - o que favorece sua aderência em superfícies e dispositivos médicos, apesar de ser menos robusto quando comparado com o biofilme de *C. albicans*, provavelmente por conta da rara presença de pseudohifas (LARKIN et al., 2017). Além disso, algumas cepas formam agregados, outro mecanismo que confere maior tolerância, principalmente à desinfecção no ambiente hospitalar (BORMAN; SZEKELY; JOHNSON, 2017). Outros fatores de virulência também foram descritos nessa espécie como a produção de fosfolipases, proteinases, presença de transportadores de oligopeptídeos e manosiltransferases que participam do processo de invasão e colonização do hospedeiro (CHATTERJEE et al., 2015; LARKIN et al., 2017).

O primeiro relato de *C. auris* foi em 2009 com o isolamento a partir do canal auditivo externo de uma paciente no Japão (SATO et al., 2009). Posteriormente, foram reportados 15 casos na Coreia do Sul em 2011 (OH et al., 2011) e desde então já foram descritos casos de candidemia em 41 países, sendo múltiplos casos reportados em: Japão, Coreia do Sul, Índia, Israel, China, Paquistão, Bangladesh, Rússia, Arábia Saudita, Malásia, Cingapura, Austrália, França, Alemanha, Espanha, Reino Unido, Países Baixos, Sudão, Quênia, Kuwait, Oman, África do Sul, Canadá, Estados Unidos, Panamá, Venezuela e Colômbia. Casos únicos foram relatados em outros 14 países até o final de maio de 2020 sendo eles: Irã, Taiwan, Tailândia, Egito, Emirados Árabes, Grécia, Polônia, Áustria, Bélgica, Noruega, Suíça, Itália, Costa Rica

e Chile (CDC, 2020b). Entretanto, em razão da dificuldade de identificação dos isolados, pois *C. auris* é diferenciado de outras espécies filogeneticamente próximas somente por biologia molecular ou MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*) (KORDALEWSKA & PERLIN, 2019), *C. auris* pode estar presente em outros países e não ter sido detectado. No Brasil, até o presente momento nenhum caso clínico foi reportado.

Com a atual pandemia de COVID-19 existe a discussão das ameaças associadas a possibilidade de coinfeção com SARS-CoV-2 e *C. auris* no ambiente hospitalar por conta das características em comum dessas infecções tais quais a gravidade a qual estão relacionadas, complexidade de identificação, aumento da prevalência mundial e populações de risco semelhantes, desse modo, ambos os organismos devem ser monitorados como potenciais de coinfeções nosocomiais (SCHWARTZ & KAPILA, 2020).

1.3 Tratamento das aspergiloses e candidíases

Os medicamentos antifúngicos utilizados para tratamento sistêmico na clínica médica humana e veterinária atualmente pertencem a quatro classes químicas que possuem como alvo diferentes partes da célula fúngica (CARMONA & LIMPER, 2017; HOUŠT'; SPÍŽEK; HAVLÍCEK, 2020). A classe dos polienos inclui a AMB e possui como mecanismo de ação a interação com o ergosterol, principal esterol da membrana celular dos fungos. Atua com a incorporação de várias moléculas de AMB na bicamada lipídica fúngica complexando-se ao ergosterol, com a consequente formação de poros e liberação de íons (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Cl^-) e glicose eletrolítica, o que resulta na morte celular do fungo (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012; HOUŠT'; SPÍŽEK; HAVLÍCEK, 2020). A AMB possui amplo espectro de ação e é fungicida contra leveduras, fungos filamentosos e dimórficos (VAN-DAELE et al., 2019).

A classe dos agentes azólicos (principalmente VRC, fluconazol, itraconazol, posaconazol, isavuconazol) agem bloqueando a biossíntese do ergosterol da membrana celular fúngica (VAN-DAELE et al., 2019). O mecanismo de ação dos azóis baseia-se na inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase [complexo enzimático dependente da monooxigenase do citocromo P450 microsomal (CYP450)], responsável pela catalisação da reação de demetilação do lanosterol para formação

do ergosterol que constituirá a membrana celular do fungo (BUCKNER & URBINA, 2012; MERCALDI, 2016). A combinação do acúmulo de 14- α -metil-esteróis tóxicos e a redução da síntese do ergosterol resulta no efeito antifúngico (BUCKNER & URBINA, 2012; MERCALDI, 2016).

As equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) tem como alvo a biossíntese da parede celular dos fungos (VAN-DAELE et al., 2019). Essas moléculas ligam-se de forma não competitiva ao complexo enzimático 1,3- β -d-glucana sintase e a reação de conversão da uridina difosfato glucose (UDPG) em 1,3- β -d-glucana é bloqueada e a parede celular fúngica torna-se altamente permeável, o que resulta na alteração osmótica e lise celular (LIU & BALASUBRAMANIAN, 2001; VAN-DAELE et al., 2019; HOUŠT'; SPÍŽEK; HAVLÍCEK, 2020). Possuem atividade fungicida contra leveduras como *Candida* spp. e fungistática contra *Aspergillus* spp. (PATIL & MAJUMDAR, 2017).

A 5-flucitosina (5-FC) é um análogo sintético da citosina que interfere na síntese de ácidos nucleicos (VAN-DAELE et al., 2019). 5-FC é absorvida pela citosina permease e desaminada em 5-fluorouracil pela citosina deaminase no citoplasma fúngico. O 5-fluorouracil é então convertido em trifosfato de 5-fluorouridina e incorpora-se ao ácido ribonucleico fúngico (RNA), resultando na inibição da síntese de proteínas (PARKER, 2009; HOUŠT'; SPÍŽEK; HAVLÍCEK, 2020). Além disso, o 5-fluorouracil pode ser metabolizado no monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina que inibe a timidilato sintetase - fonte primária de timidina na biossíntese de DNA - devido à incapacidade da enzima de remover o átomo de flúor (PARKER, 2009; ISHIDA & BARROSO, 2020).

As principais classes de antifúngicos utilizadas no tratamento da forma pulmonar invasiva causada por *Aspergillus* spp. são: triazóis (VRC, itraconazol, posaconazol e isavuconazol), poliênicos (AMB desoxicolato e formulações lipídicas) e as equinocandinas, sendo o VRC o agente recomendado como padrão ouro na prática clínica (VAN DER LINDEN et al., 2013; MICELI & KAUFFMAN, 2015; PATTERSON et al., 2016).

Apesar da eficácia no tratamento com o uso dos azóis, o número de isolados resistentes a essa classe de antifúngicos tem aumentado nos últimos anos. Os principais tipos de mecanismos de resistência a medicamentos incluem: alterações ou superexpressão do alvo molecular devido a mutações, aumento no efluxo, sequestro

das drogas antifúngicas ou ativação de mecanismos compensatórios que anulam a ação do medicamento (SANGLARD, 2016; SHISHODIA; TIWARI; SHANKAR, 2019). Entretanto, existem outros padrões de resistência sendo observados como a resistência intrínseca em *Aspergillus* spp. e o surgimento de resistência simultânea a várias classes de antifúngicos (SHISHODIA; TIWARI; SHANKAR, 2019). O uso extensivo de fungicidas azólicos na agricultura e a terapia prolongada de medicamentos azólicos estão estritamente relacionados com a evolução da resistência cruzada aos azóis em cepas ambientais e clínicas (SNELDERS et al. 2012; SHISHODIA; TIWARI; SHANKAR, 2019).

Esse padrão tem sido encontrado principalmente na espécie mais frequentemente isolada da clínica *A. fumigatus* (HOLLOMON, 2017), que apresenta uma taxa global de resistência aos azóis entre 6,6 e 28 % (SHISHODIA; TIWARI; SHANKAR, 2019). Os isolados de *A. fumigatus* resistentes aos agentes azólicos apresentam mutações pontuais ou superexpressão do gene *cyp51A*, que codifica a enzima lanosterol 14- α -demetilase, alvo principal dos azóis (SHISHODIA; TIWARI; SHANKAR, 2019). Além disso, cepas de *A. fumigatus* resistentes as equinocandinas possuem a substituição de S678P em Fsk1p, principal subunidade da 1,3- β -d-glucana sintase (ROCHA et al., 2007), sugerindo que modificações nos alvos moleculares são a principal estratégia de resistência aos antifúngicos em *Aspergillus* spp. (SHISHODIA; TIWARI; SHANKAR, 2019). Enquanto *A. flavus* apresenta um perfil de tolerância aos antifúngicos, com valores de ponto de corte epidemiológicos maiores que para *A. fumigatus*. Além disso, apresenta valores elevados de CIM para AMB, mas o mecanismo de resistência a essa classe de antifúngicos ainda não está elucidado (RUDRAMURTHY et al., 2019).

A maioria dos isolados de *C. auris* são resistentes ao fluconazol – FLC (antifúngico disponível mais utilizado para candidíases) e a outros antifúngicos triazóis; portanto, o tratamento recomendado para infecções invasivas são as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) (FORSBERG et al., 2019; CDC, 2020c). A alteração do tratamento para AMB lipossomal pode ser considerada no caso do paciente não responder clinicamente ao tratamento com equinocandina ou se a candidemia persistir por mais de 5 dias (CDC, 2020c).

A ampla resistência dos isolados clínicos de *C. auris* aos agentes azólicos tem sido descrita e alguns mecanismos foram reportados como a presença de genes que

codificam bombas de efluxo do tipo MFS (*Major Facilitator Superfamily*) (SHARMA et al., 2016) e maior atividade de bombas de efluxo do tipo ABC (*ATP Binding Cassete*) (BEM-AMI et al., 2017); presença do gene homólogo ao *CDR1* – que codifica uma bomba de efluxo ABC conhecida por atuar na resistência aos azóis (CHOWDHARY et al., 2018); mutações pontuais no gene *cyp51A* (Y132F e K143R) (HEALEY et al., 2018); também foram encontradas três mutações do tipo de substituição de aminoácido que reduziram a sensibilidade às equinocandinas: S639P, S639Y e S639F (RHODES et al., 2018; KORDALEWSKA et al. 2018). Observou-se também que a resistência de uma cepa a 5-FC está associada a mutação do tipo de substituição de aminoácido (F211I) no gene *FUR1*, que está envolvido no metabolismo de 5-FC (RHODES et al., 2018); e apesar de vários isolados de *C. auris* apresentarem resistência a AMB, ainda não foram encontrados mecanismos relacionados a esse fenômeno (CHAABANE et al., 2019).

Apesar de se não ter elucidado o mecanismo de resistência a agentes poliênicos, foram identificadas 4 novas mutações em *C. auris* associadas com a resistência a AMB localizadas em diferentes *loci* no genoma, onde destaca-se a mutação *utg5_821828* (C/T) que resulta na alteração do aminoácido serina para asparagina no gene que codifica um fator de transcrição similar ao FLO8, um ativador transcricional de genes relacionados a formação de biofilme e que tem sido associado a resistência a AMB em *C. albicans* (REYNOLDS & FINK, 2001; LAPRADE et al., 2016; ESCANDÓN et al., 2019). Já a mutação *utg4_968953* (T/C) causa a mudança do aminoácido hidrofóbico isoleucina para o polar treonina no gene que codifica um transportador de membrana, entretanto o papel desses transportadores de membrana nos mecanismos de resistência a AMB ainda não foi demonstrado (ESCANDÓN et al., 2019).

De modo geral, os antifúngicos convencionais são fármacos que possuem um espectro de ação limitado, são tóxicos para o hospedeiro, apresentam interação medicamentosa, possuem baixa estabilidade química, poucos podem ser administrados por via oral e alguns antifúngicos são indisponíveis em muitos países (PATTERSON et al., 2016; GAFFI, 2020). O uso clínico do polieno AMB é prejudicado principalmente pela toxicidade aguda e nefrotoxicidade devido à interação com o colesterol presente nas membranas celulares humanas; e embora estejam disponíveis formulações lipídicas de AMB que diminuem os efeitos colaterais nefrotóxicos, esses

não são totalmente eliminados (SAFDAR et al., 2010; VAN-DAELE et al., 2019). Embora os azóis sejam considerados fármacos de escolha em muitos casos clínicos (por exemplo, terapia de primeira linha de aspergilose invasiva ou prevenção de infecções fúngicas invasivas em pacientes neutropênicos prolongados), e estarem disponíveis como formulações orais e intravenosas, essa classe possui várias limitações incluindo: interações medicamentosas, baixa absorção, farmacocinética não linear e saturável com necessidade de monitoramento ao longo da terapia (no caso do VRC), eventos adversos agudos (por exemplo, alucinações e reações de fotossensibilidade), bem como toxicidades associadas ao uso prolongado (como cardiotoxicidade, neuropatia, carcinoma de células escamosas) além do crescente surgimento de resistência em espécies de *Aspergillus* e *Candida* (VAN-DAELE et al., 2019). Em contraste, as equinocandinas têm poucas interações medicamentosas e apresentam perfil de tolerância e toxicidade favorável. Entretanto, esses fármacos estão disponíveis apenas como terapia intravenosa uma vez ao dia e possuem alto custo para tratamento, além de não estarem disponíveis facilmente em todos os países, principalmente aqueles com recursos limitados (BRITZ & GOVENDER, 2016; VAN-DAELE et al., 2019). Por fim, ainda que a 5-FC esteja bem estabelecida quanto ao mecanismo de ação na célula fúngica, não é rotineiramente usada em monoterapia por conta da alta propensão ao desenvolvimento de resistência. É utilizada principalmente em combinação com AMB no tratamento da meningite criptocócica e apresenta como efeito colateral importante a supressão da medula óssea (PERFECT, 2017; VAN-DAELE et al., 2019). Tais limitações acarretam altas taxas de falhas terapêuticas (BORMAN; SZEKELY; JOHNSON, 2017) e, à vista disso, faz-se necessária a busca de estratégias e alternativas terapêuticas de uso corrente no tratamento das infecções fúngicas.

1.4 Combinação de fármacos como estratégia no tratamento de doenças fúngicas

A combinação de agentes antifúngicos é um método que apresenta vantagens principalmente na terapia de isolados resistentes pois reduz o risco de falha na monoterapia, e permite a diminuição das doses administradas reduzindo significativamente os efeitos colaterais associados e o potencial de atividade sinérgica pode reduzir o tempo de tratamento (JOHNSON et al., 2004; LIVENGOOD; DREW;

PERFECT, 2020). Estudos sugerem o sinergismo na utilização de agentes azólicos com equinocandinas através do duplo mecanismo de ação na célula fúngica (síntese de ergosterol e de 1,3- β -d-glucana, respectivamente) e já foi demonstrada redução da carga fúngica e aumento da sobrevivência em modelo animal com a utilização de isavuconazol e micafungina (PETRAITIS et al., 2017). Atualmente a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (*Infectious Diseases Society of America* – IDSA) recomenda considerar a terapia combinada de VRC e equinocandinas em pacientes com aspergilose pulmonar invasiva (PATTERSON et al., 2016; LIVENGOOD; DREW; PERFECT, 2020). No caso de candidíase invasiva envolvendo o sistema nervoso central a combinação de AMB e 5-FC é recomendada pela IDSA (PAPPAS et al., 2016; LIVENGOOD; DREW; PERFECT, 2020).

1.5 Alternativas para o tratamento de doenças fúngicas

O problema cada vez maior de emergência de isolados resistentes aos antifúngicos utilizados na clínica e as poucas opções de tratamento de fungos multirresistentes e de formulações de uso oral são as principais limitações que geram a necessidade urgente da pesquisa de novos fármacos para tratamento de doenças fúngicas invasivas (WIEDERHOLD & PATTERSON, 2015; SANGUINETTI et al., 2019). Para o desenvolvimento de novos medicamentos espera-se que possuam outras características desejáveis além da ação sobre fungos resistentes, como perfil farmacocinético e farmacodinâmico favorável, poucas interações medicamentosas (facilitando a possibilidade de combinações) e administráveis tanto por via oral quanto intravenosa (McCARTHY et al., 2017; SANGUINETTI et al., 2019).

Atualmente existem várias classes de agentes antifúngicos em fase de testes clínicos, com atividades contra a parede celular fúngica, vias metabólicas da membrana celular ou direcionados às vias de sinalização celular (SANGUINETTI et al., 2019). Além da identificação de novas moléculas, novas combinações e formulações de medicamentos existentes como em nanopartículas também são estratégias interessantes, e ainda, novas abordagens de tratamento como imunoterapia e manipulação do microbioma são essenciais no aperfeiçoamento dos esquemas terapêuticos das doenças fúngicas invasivas (SANGUINETTI et al., 2019).

A molécula F901318 (olorofilm, F2G Inc., Manchester, UK), um inibidor da enzima diidroorotato desidrogenase (importante para a síntese da pirimidina fúngica)

possui atividade contra *Aspergillus* (incluindo isolados resistentes por mutações da *CYP51A*), *Scedosporium* e *Lomentospora* mas não tem ação contra leveduras (OLIVER et al., 2016), e está disponível em formulações orais e intravenosas; atualmente está na fase 2 de estudo clínico como profilático em pacientes com leucemia mieloide aguda e no tratamento de casos refratários de aspergilose invasiva por isolados resistentes de *Aspergillus* spp. (CLINICAL TRIALS, 2020a; SANGUINETTI et al., 2019).

VL2397 (Vical Pharmaceuticals, San Diego, CA, EUA) complexa o alumínio através da via de transporte de sideróforos na célula fúngica, mas ainda não se conhece seu mecanismo de ação precisamente; tem ação sobre *Aspergillus* (incluindo resistentes aos azóis), *Candida* (também aos isolados resistentes), *Cryptococcus* e *Trichosporon* e está na fase 2 de estudo clínico para tratamento da aspergilose invasiva (CLINICAL TRIALS, 2020b; SANGUINETTI et al., 2019).

Os novos agentes azólicos VT-1161, VT-1129 e VT-1598 (Viamet Pharmaceuticals Inc., Durham, NC, EUA) inibem o gene *CYP51* fúngico e possuem atividade contra fungos dimórficos, *Cryptococcus* e *Candida* incluindo *C. auris*. O VT-1598 também tem ação contra *Aspergillus* spp. e outros fungos endêmicos; estão disponíveis em formulações orais ou tópicas e o VT-1598 está em fase 1 para coccidiomicose, enquanto que o VT-1161 está em fase 2 de estudo em pacientes com candidíase vaginal recorrente (CLINICAL TRIALS, 2020c,d; SANGUINETTI et al., 2019).

O Fosmanogepix (APX-001 - Amlyx Pharmaceuticals, San Diego, CA, EUA) é um inibidor do glicosilfosfatidilinositol e age bloqueando o ancoramento de proteínas que atuam como adesinas, impedindo a fixação dos micro-organismos às superfícies mucosas antes da colonização e replicação; possui amplo espectro, incluindo *Candida* spp., como *C. auris*, isolados resistentes às equinocandinas, *Aspergillus* spp. (e isolados resistentes aos azóis), *Fusarium* spp. e *Scedosporium* spp.; disponível em formulações oral e intravenosa, e está em fase 1 de estudo (CLINICAL TRIALS, 2020e; SANGUINETTI et al., 2019).

O Ibrexafungerp (SCY-078 - Synexis Inc., Jersey City, NJ, EUA) inibe a 1,3- β -d-glucana sintase (responsável pela síntese do 1,3- β -d-glucana, componente da parede celular fúngica), possui ação contra espécies de *Candida* incluindo *C. auris*, também tem boa atividade sobre *Aspergillus* spp. (e isolados resistentes aos azólicos);

a formulação oral disponível está em fase 2 de estudo em pacientes com candidíase invasiva e vulvovaginal e em fase 3 em casos refratários de candidíases invasiva e vulvovaginal (CLINICAL TRIALS, 2020f; SANGUINETTI et al., 2019).

A rezafungina (CD101 – Cidara Therapeutics, San Diego, CA, EUA) também é um inibidor da 1,3-β-d-glucana sintase fúngica e possui formulações tópicas e intravenosas, com atividade contra *Candida* spp. (também sobre *C. auris*) e mutantes com resistência às equinocandinas, além de atividade contra isolados resistentes de *Aspergillus* spp.; atualmente está em fase 2 em pacientes com candidíase invasiva e vulvovaginal e também como profilático em pacientes transplantados (CLINICAL TRIALS, 2020g,h; SANGUINETTI et al., 2019).

O alto custo e longo período necessários para o desenvolvimento de novos fármacos são as principais limitações que tornam a estratégia de reposicionamento de fármacos atrativa. A possibilidade de utilização de compostos que já foram testados quanto à segurança e aprovados para uso humano no tratamento de outras condições médicas aceleram significativamente a pesquisa e disponibilidade de alternativas terapêuticas (SCHEIN, 2020). Estudos têm mostrado que fármacos como tamoxifeno (anticancerígeno), sertralina (antidepressivo) e auranofina (antirreumático) possuem atividade antifúngica e podem ser uma alternativa no tratamento de infecções fúngicas e (exceto auranofina) estão em fase 2 de estudo clínico em pacientes com meningite criptocócica (ZHAI et al., 2012; BUTTS et al., 2015; WIEDERHOLD et al., 2017; SANGUINETTI et al., 2019). Embora existam inúmeras vantagens do reposicionamento de fármacos, algumas precauções devem ser consideradas na pesquisa como as propriedades físico-químicas que podem ser desfavoráveis, efeitos colaterais significativos e dosagem adequada em pacientes graves (SCHEIN, 2020).

1.6 Miltefosina

A miltefosina (MFS), hexadecilfosfocolina, foi desenvolvida inicialmente com o intuito de tratar pacientes com câncer, e atualmente este fármaco em formulação tópica é utilizado para o tratamento de metástases cutâneas em pacientes com câncer de mama e a formulação oral para leishmanioses em diversos países (WIDMER et al., 2006; DORLO et al., 2012); no Brasil foi licenciada em 2016 para uso em animais com leishmaniose visceral (MAPA, 2016). Adicionalmente, trabalhos prévios também têm

demonstrado outras atividades farmacológicas da MFS como antiprotozoário, anti-helmíntica, antibacteriana, antiviral e antifúngica (revisado por DORLO et al., 2012).

Os estudos mostram que a MFS possui um amplo espectro de ação contra diversos gêneros de fungos, em concentrações entre 2 e 8 µg/mL, para leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. (VILA et al., 2013; WIDMER et al., 2006; SPADARI et al., 2018; SPADARI et al., 2019); fungos filamentosos: *Aspergillus* spp., *Fusarium solani*, *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium* spp. e *Pythium* spp. (KESSON et al., 2009; IMBERT et al., 2014; QUAESAET et al., 2018; LORETO et al., 2018); fungos dimórficos: *Sporothrix* spp; *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides* spp. (BORBA-SANTOS et al., 2015; BRILHANTE et al., 2014; BRILHANTE et al., 2015; ROSSI et al., 2017); e dermatófitos: *Trichophyton* spp. e *Microsporum* spp. (TONG et al., 2007). Recentemente, Wu e colaboradores (2020) mostraram a atividade *in vitro* da MFS sobre doze isolados de *C. auris*. Vila e colaboradores (2013, 2015, 2016) apontam que a MFS foi ativa contra biofilmes de *C. albicans* e *C. non-albicans* em modelos *in vitro* sobre a superfície de cateteres venoso central e sobre unhas.

O sinergismo da MFS com antifúngicos padrão também tem sido demonstrado utilizando ensaios *in vitro*. Imbert e colaboradores (2014) mostraram efeito sinérgico entre MFS e VRC sobre cepas de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. ustus*; Compain e colaboradores (2015) descreveram o sinergismo da MFS com VRC/AMB sobre *Scedosporium* spp., enquanto Biswas e colaboradores (2013) mostraram sinergismo da MFS com VRC/posaconazol sobre fungos causadores de mucormicose; Wu e colaboradores (2020) relataram efeito sinérgico da MFS com AMB para 3 dos 12 isolados de *C. auris* e redução da CIM em 8 e 4 vezes (para 3 e 5 isolados, respectivamente).

Em modelos *in vivo* a MFS tem demonstrado atividade inibitória em modelo murino de criptococose disseminada causada por *Cryptococcus neoformans* em doses efetivas de 7,2 e 3,6 mg/kg/dia, exibindo aumento da sobrevivência e redução da carga fúngica no cérebro e nos pulmões dos animais quando comparado com grupo controle infectado não tratado (WIDMER et al., 2006). Vila e colaboradores (2015) demonstraram que uma solução de MFS de 2 mg/mL conseguiu prevenir o quadro de candidíase oral em camundongos. A MFS apresentou eficácia na terapia de resgate em dois casos reportados de osteomielite humana por *Scedosporium*

prolificans multirresistente em combinação com VRC e terbinafina (KESSON et al., 2009; QUAESAET et al., 2017). Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a MFS livre em modelo invertebrado de *Galleria mellonella* reduziu significativamente a mortalidade das larvas infectadas com *Candida albicans* SC5314 (cepa FLC-sensível, nas doses 10, 20 e 40 mg/kg), *C. albicans* IAL-40 (FLC-resistente, nas doses de 20 e 40 mg/kg) e *Cryptococcus gattii* ATCC 56990 (doses de 20 e 40 mg/kg), além da redução significativa da carga fúngica no tecido larval (SPADARI et al., 2019).

Os mecanismos de ação da MFS em fungos ainda são desconhecidos, mas sabe-se que há inibição da fosfolipase B1 em *C. neoformans*, que é um importante fator de virulência (WIDMER et al., 2006). Pesquisas realizadas com *S. cerevisiae* demonstraram fragmentação do DNA e ativação de caspases celulares quando tratadas com MFS, sinais típicos de apoptose em leveduras, além da provável interação com a Cox9p na membrana mitocondrial, levando ao desequilíbrio do potencial de membrana e interrupção da cadeia transportadora de elétrons e consequente indução da morte celular por apoptose (ZUO et al., 2011; BISWAS et al., 2014).

Além disso, Borba-Santos e colaboradores (2015) e Brilhante e colaboradores (2015) observaram alteração na permeabilidade de membrana plasmática em fungos dimórficos (*S. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *C. posadasii*); e presença de grânulos de melanina em leveduras de *S. brasiliensis* tratadas com MFS, sugerindo interferência no metabolismo da melanina. Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a MFS possui ação fungicida sobre leveduras de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*; e concentrações sub-letais induzem a produção de melanina (ROSSI et al., 2017). Sobre leveduras de *C. neoformans* e *C. gattii*, a MFS provoca morte celular através do aumento da permeabilidade de membrana celular via interação com o ergosterol, e reduz o potencial de membrana mitocondrial induzindo o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) resultando na fragmentação do DNA e condensação da cromatina (SPADARI, 2018). Desse modo, sugere-se que os efeitos fisiológicos da MFS na célula fúngica sejam multifatoriais e tem sido atribuído principalmente às propriedades detergentes que afetam as membranas e a capacidade de indução de apoptose (DORLO et al., 2012; SPADARI et al., 2018).

Embora a MFS seja um fármaco de escolha para alguns casos de leishmanioses e câncer de mama, tenha apresentado atividade fungicida e amplo espectro de ação contra os fungos de interesse médico, esse fármaco apresenta elevada toxicidade, o que pode dificultar a sua utilização na micologia médica. Os principais efeitos colaterais são os gastrointestinais (náuseas, vômito, diarreia) que estão relacionados com as propriedades detergentes da molécula que afetam a mucosa gastrointestinal através da administração da formulação oral; renais e hepáticos, alterando níveis séricos de creatinina e das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Adicionalmente, observa-se efeito teratogênico e elevada atividade hemolítica (similar a AMB desoxicolato) (revisado por DORLO et al., 2012).

Com intuito de reduzir os efeitos colaterais da MFS, algumas estratégias tem sido aplicadas como a síntese de análogos (CALOGEROPOULOU et al., 2008; VILA et al., 2013); a incorporação do fármaco em sistemas carreadores baseados em lipídeos (EISSA et al., 2015; BITERCOURT et al., 2016; NAJAFIAN et al., 2016; KAVIAN et al., 2019; DAR et al., 2020), em polímero sintético PLGA-PEG (KUMAR et al., 2016), micelas poliméricas de Plurônico F127 (VALENZUELA-OSES et al., 2017), em nanocarreadores lipídicos modificados com quitosana (TRIPATHI et al., 2017) e em nanopartículas de alginato (SPADARI et al., 2019).

1.7 Carreadores de fármacos

Nanopartículas (NPs) são partículas coloidais sólidas que variam em tamanho de 10 a 1000 nm (KREUTER, 2007). Nos últimos anos, houve um aumento significativo nas pesquisas em torno do uso desses nanossistemas em diferentes aplicações biomédicas, como hipertermia, bioimageamento e biossensores (McNAMARA & TOFAIL, 2017). Além dessas, as NPs se tornam interessantes por conta da capacidade de administração direcionada de medicamentos na faixa ideal de dosagem, muitas vezes resultando em maior eficiência terapêutica dos medicamentos, efeitos colaterais reduzidos e melhor adesão do paciente ao tratamento (ALEXIS et al., 2008; KHAN; SAEED; KHAN, 2019), e tem sido cada vez mais utilizada no desenvolvimento de novas opções terapêuticas para infecções microbianas.

O encapsulamento da MFS tem sido utilizado para melhorar sua distribuição e reduzir os efeitos colaterais associados. A formulação de MFS em nanopartículas

lipídicas reduziram a irritação epitelial no trato gastrointestinal de camundongos Balb/c, além da diminuição da ação hemolítica e citotóxica em macrófagos *in vitro* e manutenção da atividade frente a formas promastigota e amastigota de *Leishmania chagasi* (da GAMA BITENCOURT et al., 2016). Eissa e colaboradores (2015) demonstraram a eficácia da MFS em nanocápsulas lipídicas (NCLs) em dose única (20 mg/kg) no tratamento de esquistossomose em modelo murino (redução de 42 a 88 % da carga parasitária), enquanto o tratamento com a MFS livre não teve atividade, indicando que está relacionada com a melhora da interação do fármaco com a membrana da bicamada lipídica do tegumento de *S. mansoni*. A combinação entre praziquantel (PZQ - anti-helmíntico) e MFS em nanocápsulas lipídicas (250 mg/kg PZQ + 20 mg/kg MFS) melhoraram a atividade sobre as formas adultas de *S. mansoni*, quando comparado com a MFS-NCLs (EISSA et al., 2020). A formulação nanolipossomal tópica de MFS desenvolvida para o tratamento de leishmaniose cutânea se mostrou eficaz na redução da proliferação *in vitro* de amastigotas de *Leishmania major* (NAJAFIAN et al., 2016). Lipossomos contendo MFS a 2 e 4 % (tópico) foram capazes de atenuar significativamente o tamanho das lesões cutâneas causadas por promastigotas de *L. major* em modelo murino, além de diminuir a carga parasitária no baço mesmo 12 semanas após a administração do tratamento (KAVIAN et al., 2019). A combinação de AMB e MFS em sistemas nanoestruturados tem sido estudada a fim de melhorar o efeito antiparasitário – AMB e MFS em nanocarreadores lipídicos modificados com quitosana catiônica (NCLQs) ampliou a atividade antileishmania em macrófagos infectados com *L. donovani* (TRIPATHI et al., 2017). Lipossomos ultradeformáveis de segunda geração (LUDSGs) - estruturas de bicamada fosfolipídica com uma cadeia surfactante que confere flexibilidade à vesícula contendo fármacos com propriedades anfifílicas e atividade terapêutica - foram utilizados na combinação de AMB e MFS mostrando eficácia na redução do tamanho da lesão cutânea por *L. mexicana* com metade da dose em comparação com os outros grupos e além disso, ao final do tratamento a lesão foi completamente eliminada e não havia sinal de cicatrização no local da lesão com redução da carga parasitária 16 vezes maior do que com AMB em gel (DAR et al., 2020).

Os polímeros em formulações nanoestruturadas vem sendo uma ótima opção para controlar a liberação do fármaco para o organismo, melhorar a distribuição, oferecendo muitos benefícios tais como: distribuição contínua dos fármacos para os

tecidos, ação em um sítio específico, proteção das moléculas, que encapsuladas são estáveis e protegidas contra a ação de algumas enzimas e efeito do pH quando administradas via oral, principalmente, reduzindo os efeitos colaterais (JIAO et al., 2002). MFS encapsulada em micelas poliméricas de Plurônico F127 (VALENZUELA-OSES et al., 2017) vem sendo desenvolvidas e apresentam redução da citotoxicidade e atividade hemolítica (VALENZUELA-OSES et al., 2017). Estudos *in vivo* mostraram a eficácia da MFS em carreadores poliméricos PLGA-PEG (poli (ácido lático-co-ácido glicólico–polietilenoglicol) na redução de 93,67 % da carga parasitária no baço de hamsters infectados com *Leishmania donovani* (KUMAR et al., 2016).

O alginato é um polímero natural aniônico, produzido por algas e bactérias (PAQUES et al., 2014), constituído por resíduos de α -L-gulurônico (G) e ácido β -D-manurônico (M), e linearmente conectado por ligações 1,4-glicosídicas. A composição e a sequência dos resíduos G e M dependem da fonte de algas utilizada, pois isto pode influenciar as propriedades do alginato (PAQUES et al., 2014). Possui muitas vantagens por ser atóxico, biodegradável, biocompatível, de baixo custo, mucoadesivo e não-imunogênico (PAQUES et al., 2014). As aplicações do alginato são várias dentro da área das ciências biomédicas (CHENG et al., 2012), incluindo o desenvolvimento de carreadores contendo antifúngicos (azóis e poliênicos) nas formas de emulsões, géis, filmes, micropartículas e nanopartículas (revisado por SPADARI et al., 2017).

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado no desenvolvimento de uma formulação da MFS em sistema nanocarreador do polímero alginato (MFS-NA) para liberação sustentada do fármaco, obtendo como resultado principal a redução da toxicidade e manutenção da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* sobre *Candida* e *Cryptococcus* (ISHIDA et al., 2017; SPADARI et al., 2019; de BASTIANI et al., 2020). Em modelo invertebrado de *G. mellonella* a MFS-NA reduziu a carga fúngica no tecido de larvas infectadas com *Candida albicans* SC5314 (cepa FLC-sensível), *C. albicans* IAL-40 (FLC-resistente), *C. neoformans* H99 e *C. gattii* ATCC 56990 na dose de 200 mg/kg, além da redução significativa da mortalidade (SPADARI et al., 2019). Ademais, em modelo murino de candidíase vaginal a MFS-NA dose única (~0,64 mg de MFS) reduziu significativamente a carga fúngica e se manteve no canal vaginal até 7 dias após a aplicação da formulação, evidenciando as propriedades mucoadesivas e de liberação sustentada da formulação (de BASTIANI et al., 2020).

1.8 Modelos animais para avaliação da eficácia terapêutica

A pesquisa em torno do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e a compreensão da relação de patógenos emergentes com os hospedeiros tem sido prioridade no campo da medicina na atualidade (TREVIJANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2019). Para isso, o uso de modelos animais é essencial uma vez que permite conhecer os mecanismos de patogenicidade durante a infecção microbiana e avaliar a eficácia de moléculas frente a essas doenças, além do papel fundamental na análise da segurança na utilização de fármacos e seus possíveis efeitos colaterais (TREVIJANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2019). O modelo murino é um dos mais utilizados nas pesquisas com infecções microbianas e é bastante versátil principalmente por permitir a caracterização da resposta imune durante a infecção, além de ser muito bem estabelecido. Entretanto o uso de camundongos está associado a problemas éticos e logísticos como o desconforto e dor que podem ser gerados ao longo do estudo e o alto custo de manutenção dos animais, e por isso tem tido uma tendência a aplicação do princípio de bioética dos “3Rs” (do inglês *Replacement, Reduction and Refinement*) criado em 1959 com a finalidade de reduzir o número de animais utilizados nos estudos, refinar os protocolos para melhorar o bem estar animal e substituir, quando possível, para outros modelos que não tenham problemas bioéticos associados (TREVIJANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2019).

Em vista disso, os estudos vêm buscando modelos animais alternativos para a avaliação da patogênese e de novas moléculas antimicrobianas (TREVIJANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2019). A mariposa *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) pertencente à ordem de insetos Lepidoptera tem sido amplamente utilizada como modelo invertebrado na investigação de fatores de virulência e eficácia de compostos antimicrobianos. O ciclo de vida rápido é uma das maiores vantagens desse modelo, que leva aproximadamente 40 dias, mas atingem o tamanho ideal para experimentação (larvas adultas medindo entre 2-2,5 cm) entre 25-35 dias em condições ambientais ótimas (28-32 °C) e suprimento de alimentos (pólen e cera de abelha) (JORJÃO et al., 2018). A estrutura morfológica é simples, consiste em um tubo digestivo, um tubo neural que estão cercados por hemolinfa (TREVIJANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2019).

A resposta imune inata em *G. mellonella* depende tanto das barreiras físico-químicas externas quanto das respostas celulares e humoral. A resposta imune celular

é mediada por diversos tipos de hemócitos capazes de fagocitar os patógenos e produzir compostos antimicrobianos, além de participarem em processos como coagulação, nodulação, encapsulamento e melanização. Já a resposta imune humoral baseia-se em elementos como enzimas líticas, peptídeos antimicrobianos e melanina. A melanina desempenha um importante papel durante infecção uma vez que produz um acúmulo de nódulos capazes de conter a replicação do micro-organismo (TREVIJANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2019).

Uma das principais vantagens da utilização de modelos invertebrados são as semelhanças estruturais e funcionais da resposta imune inata comparáveis com os mamíferos (como a fagocitose, produção de compostos antimicrobianos e coagulação) (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013). Além disso, o baixo custo e a facilidade de manutenção permitem a realização de muitas repetições e produzir resultados estatisticamente significativos. A possibilidade de incubação das larvas a 37 °C também é importante, pois é quando são ativados muitos fatores de virulência dos patógenos humanos; outra vantagem é a facilidade de inoculação, que pode ser por injeção na hemocele ou alimentação forçada e a avaliação da resposta a infecção pode ser observada por parâmetros como a mortalidade, morbidade, alteração na carga microbiana ou na densidade e função dos hemócitos (KAVANAGH & SHEEHAN, 2018).

A resposta das infecções em *G. mellonella* apresenta expressiva correlação com os resultados obtidos em modelos animais mamíferos. Alterações na densidade celular e aumento na quantidade de peptídeos antimicrobianos foram semelhantes tanto nas larvas quanto em camundongos infectados com *C. albicans* (SHEEHAN & KAVANAGH, 2018); enquanto que em larvas infectadas com *A. fumigatus* ocorre a formação de nódulos contendo micélios similares aos granulomas fúngicos encontrados na aspergilose sistêmica em mamíferos (SHEEHAN; CLARKE; KAVANAGH, 2018). A combinação de tetraciclina e FLC reduziu em quatro vezes a carga fúngica nas larvas infectadas com *C. albicans* resistente aos azóis em doses equivalentes a utilizadas em humanos (GU et al., 2018); bem como a combinação de pedalitina e AMB que atuou sinergicamente aumentando a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* e camundongos BALB/c infectados por *C. neoformans* (SANGALLI-LEITE et al., 2016).

O potencial de novas estratégias terapêuticas antifúngicas pode ser avaliado de forma rápida em larvas de *G. mellonella* como uma forma de triagem antes de prosseguir para o modelo murino (KAVANAGH & SHEEHAN, 2018). Larvas e camundongos infectados com *C. albicans* e tratados com peptídeos antimicrobianos (DsS3 1-16) em combinação com caspofungina tiveram expressiva concordância entre os resultados de redução da mortalidade (MacCALLUM; DESBOIS; COOTE, 2013); FLC e VRC melhoraram a sobrevivência de larvas e camundongos imunossuprimidos infectados com *Trichosporon asahii*, *T. asteroides* e *T. inkin* (MARINÉ et al., 2015). O ciclo de vida curto permite obter resultados mais rapidamente como no caso da infecção por *Paracoccidioides* spp., onde em 7 dias os resultados de redução da carga fúngica em larvas de *G. mellonella* tratadas com AMB ou itraconazol foram obtidos, comparado com a média de 60 dias em estudos utilizando murinos (de LACORTE SINGULANI et al., 2016). A toxicidade de agentes antimicrobianos também apresenta uma correlação como visto em mamíferos: o estudo da toxicidade de complexos de fenantrolina mostrou que o composto e dose mais tóxicos nas larvas também foram os mais tóxicos nos camundongos, demonstrando o potencial de identificação da toxicidade previamente nas larvas, antes de aplicar em modelos mais complexos (McCANN et al., 2012).

Estudos com larvas de *G. mellonella* também mostram uma correlação das doses eficazes com as utilizadas em humanos. O aumento da sobrevivência e diminuição da melanização em larvas infectadas com *C. albicans* ocorreu com a administração de AMB (1 mg/kg), dose comparável aos níveis alcançados na prática clínica (máximo de 1,5 mg/kg/dia); do mesmo modo, doses comparáveis aos utilizados em humanos de AMB e caspofungina (2,4 mg/kg) preservaram a sobrevivência *in vivo* quando infectadas com *C. tropicalis*, assim como FLC (3, 6 e 12 mg/kg) e AMB reduziram a carga fúngica e a formação de nódulos melanizados no tecido larval (KAVANAGH & SHEEHAN, 2018).

Essas evidências reforçam o potencial da utilização do modelo larvário de *G. mellonella* na avaliação da relação patógeno-hospedeiro, toxicidade e da eficácia da terapia antifúngica de novas moléculas e de formulações farmacêuticas, empregando parâmetros como taxa de sobrevivência e redução dos sintomas associados ao estabelecimento da infecção (KAVANAGH & SHEEHAN, 2018).

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a eficácia antifúngica da miltefosina em nanocarreador de alginato sobre *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Candida auris*.

Objetivos específicos

1. Produzir a miltefosina em sistema nanocarreador de alginato;
2. Determinar a susceptibilidade à miltefosina livre e encapsulada em nanocarreador de alginato de cepas padrão e isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Candida auris*;
3. Avaliar a atividade anti-*Aspergillus* e anti-*Candida auris* da miltefosina livre e em sistema nanocarreador de alginato em modelo larvário de *Galleria mellonella*;
4. Avaliar a combinação de voriconazol com miltefosina livre e encapsulada em nanocarreador de alginato sobre *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* usando ensaios *in vitro* e o modelo larvário de *Galleria mellonella*;
5. Padronizar a imunossupressão em modelo murino.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

Isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus* (n= 10), *Aspergillus flavus* (n= 9) e *Candida auris* (n= 2) foram utilizados neste trabalho. A cepa *A. fumigatus* ATCC 16913 (*American Type Culture Collection*) foi cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz (INCQS, Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, Brasil); *C. auris* CBS 10913 e CBS 12766 foram cedidas pelo Laboratório de Micologia Médica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil), e todos os isolados clínicos de *Aspergillus* foram cedidos gentilmente pelo Dr. Arnaldo L. Colombo (Laboratório de Micologia Especial – LEMI, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil). Os fungos estão estocados a -80 °C em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) com 20 % de glicerol e foram recuperados em ágar batata dextrose (BDA, para *Aspergillus* spp.) ou ágar Sabouraud dextrose (SDA, para *C. auris*). As cepas foram subcultivadas, mantidas no mesmo meio

durante as experimentações e cultivadas por 7 dias (*Aspergillus* spp.) ou 24 h (*C. auris*) a 35 °C antes dos experimentos.

3.2 Antifúngicos

Anfotericina B desoxicolato (AMB), voriconazol (VRC), fluconazol (FLC), caspofungina (CAS) e micafungina (MFG) (todos Sigma Aldrich Co., MO, USA) foram utilizados como antifúngicos padrão e miltefosina (MFS, Cayman Chemical Company, MI, USA) utilizada em todas as avaliações realizadas. Todos os antifúngicos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO); exceto MFS dissolvida em água destilada estéril, para obtenção de soluções estoque 100 vezes concentradas a -20 °C durante os ensaios.

3.3 Produção da miltefosina encapsulada em nanopartículas de alginato (MFS-NA)

As nanopartículas de alginato foram preparadas pelo método de emulsificação/gelificação externa, no qual misturou-se alginato de sódio 1 % (m/v) com tensoativo polisorbato 80 (SPAN 80) a 3 % (m/v) em óleo de girassol. Essa mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 min (30s *on*/ 30s *off*/ 30s *on*) e sonicada por 10 min (50 *on*/ 10 *off*). Em seguida, gotejou-se 1 mL da solução de CaCl₂ 0,22 M com 0,5 % de polaxamer sobre a emulsão sob agitação constante. Posteriormente, a amostra foi sonicada por 5 min (50 *on*/ 10 *off*), agitada por 30 min e centrifugada por 5 min a 5000 RPM; descartou-se o sobrenadante e o *pellet* ressuspenso em isopropanol para remoção dos resíduos, centrifugou-se novamente por 5 min a 5000 RPM e ressuspenso em trealose 10 % para liofilização. A incorporação da MFS (3 mg) é realizada pela adição da molécula na suspensão de alginato. As nanopartículas de alginato com miltefosina (MFS-NA) foram liofilizadas e o pó armazenado a -20 °C (SPADARI et al., 2019).

Como controle de qualidade da produção da miltefosina encapsulada em nanopartículas de alginato, parâmetros como o diâmetro médio (Dz), distribuição de tamanhos ou polidispersão (Pdi) e potencial zeta (ζ) foram monitorados pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons no equipamento ZetaPals-Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY), equipado com um

laser de 677 nm e *dynamic light-scattering* (DLS) a 90°. Outros parâmetros como eficiência de incorporação da miltefosina, ensaio de liberação da miltefosina em meio aquoso, estabilidade química em diferentes pH e após armazenamento a -20 °C por até 3 meses já foram estabelecidos pelo nosso grupo de pesquisa (ISHIDA et al., 2017).

Para a utilização nos testes, ressuspendeu-se a MFS-NA liofilizada em PBS (*Phosphate Buffer Saline*, pH 7,4) estéril até atingir a concentração de trabalho da MFS para realizar os testes.

3.4 Teste de susceptibilidade aos antifúngicos

3.4.1 *Aspergillus* spp.

A susceptibilidade de *Aspergillus* spp. aos antifúngicos padrão e a miltefosina livre (MFS) e incorporada em nanopartículas de alginato (MFS-NA) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo como descrito no documento M38-A2 (CLSI, 2008). Diluições seriadas dos antifúngicos e MFS-NA foram feitas no meio RPMI 1640, com tampão ácido 3-morfolinopropanossulfônico (MOPS) 0.16 M, pH 7.0 (ambos da Sigma Chemical Co., Missouri, USA) em microplacas de 96 poços de fundo chato para obter concentrações de 0,03 a 16 µg/mL dos antifúngicos padrão (AMB e VRC); 0,12 a 64 µg/mL de MFS e 1,17 a 600 µg/mL de MFS-NA. Posteriormente, adicionou-se a suspensão de conídios padronizada a 5×10^4 UFC/mL em cada poço e as microplacas foram incubadas a 35 °C por 48 h.

A concentração inibitória mínima (CIM) para todos os compostos foi definida visualmente como a menor concentração dos compostos que inibe 50 % do crescimento fúngico, exceto para a AMB, em que CIM foi definida como a menor concentração que inibe 90 % do crescimento fúngico (CLSI, 2008). A concentração efetiva mínima (CEM) foi determinada como a menor concentração capaz de causar alterações morfológicas da hifa (espessura, comprimento e/ou mudança no padrão de ramificação das hifas). A morfologia das hifas foi visualizada utilizando o microscópio óptico invertido (aumento de 200x) e a análise feita pela comparação dos poços tratados com o grupo sem tratamento (controle). Após a leitura da CIM e CEM, determinou-se a concentração fungicida mínima (CFM) a partir do subcultivo de todas

as amostras em que houve inibição de crescimento fúngico em placas contendo BDA livre de antifúngico. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h e então determinada a menor concentração do composto capaz de inviabilizar aproximadamente 99 % do crescimento fúngico.

3.4.2 *Candida auris*

A susceptibilidade de *Candida auris* aos antifúngicos padrão, MFS e MFS-NA foi caracterizada de acordo com o método de microdiluição em caldo como descrito no documento E. Def 7.3.1 (EUCAST, 2017). Diluições seriadas feitas no meio RPMI 1640 (suplementado com 2 % de glicose), com tampão MOPS 0.16 M, pH 7.0 (ambos da Sigma Chemical Co., Missouri, USA) em microplacas de 96 poços de fundo chato para obter concentrações de 0,03 a 16 µg/mL dos antifúngicos padrão (AMB, VRC, CAS e MFG); 0,12 a 64 µg/mL de MFS ou FLC; e 1,17 a 600 µg/mL de MFS-NA. Posteriormente, adicionou-se a suspensão celular ajustada na concentração de 1×10^5 UFC/mL em cada poço e as microplacas incubadas a 35 °C por 24 h.

A concentração inibitória mínima (CIM) para todos os compostos foi definida após a leitura da absorbância do crescimento fúngico, no comprimento de onda de 530 nm, como a menor concentração que inibe 50 % do crescimento fúngico para todos os antifúngicos, exceto AMB, definida como a menor concentração que inibe 90 % do crescimento (EUCAST, 2017). Além disso, determinou-se a concentração fungicida mínima (CFM) pelo subcultivo de todas as amostras em que houve inibição de crescimento fúngico. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h e então estabelecida a menor concentração do composto capaz inibir aproximadamente 99 % do crescimento das leveduras.

3.4.3 *Interpretação dos resultados de CIM e CFM*

A sensibilidade dos isolados clínicos aos antifúngicos padrão (AMB, VRC, FLC, MFG e CAS) foi determinada pelos valores de ponto de corte definidos pelo protocolo M38-A2 do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) e discutido por Espinel-Ingroff e colaboradores (2010, 2011) para as cepas *Aspergillus* spp.; enquanto para *C. auris*, apesar de não ter definidos os valores de ponto de corte clínicos,

utilizamos os valores recomendados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC, baseado nos dados atuais para a espécie e nos estabelecidos para espécies de *Candida* intimamente relacionadas (CDC, 2020) como descritos na Tabela 1.

O efeito fungicida é definido como a capacidade de um agente inviabilizar 99,9 % das células fúngicas *in vitro*, enquanto o efeito fungistático demonstra potencial de inibição do crescimento microbiano na presença do composto, mas que esse crescimento é retomado quando removido (LEWIS & GRAYBILL, 2008). As moléculas foram consideradas fungicidas quando os valores de CFM eram iguais ou até 4 vezes maiores que o valor encontrado de CIM ($CFM \leq 4 \times CIM$), caso contrário foram definidas como fungistáticos (LUIZ et al., 2015).

Tabela 1 - Interpretação dos valores de ponto de corte utilizados nos testes de sensibilidade aos antifúngicos padrão.

Valores de corte epidemiológico (ESPINEL-INGROFF et al., 2010, 2011) ($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Aspergillus flavus</i>	
	S \leq	R >	S \leq	R >
Anfotericina B	2	2	4	4
Voriconazol	1	1	1	1

Tentativa de valores de corte clínico <i>Candida auris</i> (CDC, 2020) ($\mu\text{g/mL}$)		
	S <	R \geq
Anfotericina B	32	32
Voriconazol	ND	ND
Fluconazol	2	2
Caspofungina	2	2
Micafungina	4	4

S: sensível; R: resistente; ND: não definido

3.4.4 Ensaio de checkerboard: combinação de fármacos

Para analisar a combinação de VRC com MFS livre sobre os dois isolados clínicos de *Aspergillus* spp. representativos (*A. fumigatus* 1220 e *A. flavus* 998) foi utilizado o ensaio de *checkerboard* através da microdiluição em caldo segundo o protocolo descrito previamente (PHILIP et al., 2005). VRC e MFS foram diluídos

seriadamente 1:2 para obter concentrações finais de 0,25xCIM a 8xCIM, em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,165 M, nos poços de A → G (para VRC) e nos poços de 8 → 2 (para MFS) da microplaca de 96 poços. Os poços da linha H e da coluna 1 contém as respectivas concentrações de VRC e MFS sozinhos. Posteriormente, foram dispensados 100 µL da suspensão de conídios padronizada previamente para 5×10^4 UFC/mL em todos os poços. O controle de crescimento (fungo+meio) foi feito na coluna 9 e o controle de esterilidade (meio) na coluna 10. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h e realizadas as leituras visual e espectrofotométrica a 492 nm.

A interpretação das combinações de VRC com MFS foi realizada pela determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), o qual se deve a somatória da Concentração Inibitória Fracionada (CIF) do VRC (CIM combinado/CIM sozinho) com a CIF da MFS (CIM combinado/CIM sozinho). O $ICIF \leq 0,5$ indica um efeito sinérgico; $ICIF > 0,5$ e < 4 corresponde à indiferença e o $ICIF \geq 4$ indica antagonismo (PHILIP et al., 2005).

3.5 Modelo experimental de *Galleria mellonella*

As larvas de *Galleria mellonella* foram cultivadas e mantidas no Laboratório de Quimioterapia Antifúngica (Departamento de Microbiologia, USP), sendo incubadas a 30 °C e alimentadas com pólen e cera de abelha. Para realização dos ensaios experimentais, foram utilizadas larvas adultas no fim do estágio de desenvolvimento, momento em que medem 2 a 2,5 cm de comprimento e pesam 150 a 200 mg (SPADARI et al., 2019).

3.5.1 Avaliação da virulência em modelo larvário de *Galleria mellonella*

Após a formação de um grupo controle (sem infecção) e um grupo infectado e não tratado, com 20 larvas cada, foi administrado no grupo infectado, utilizando seringa Hamilton®, 10 µL da suspensão celular na última *pro-leg* e 10 µL de PBS estéril no grupo controle (não infectado). Os grupos foram incubados a 37 °C em placas de Petri contendo pólen e cera de abelha e avaliados quanto à sobrevivência e à morbidade, diariamente, por 5 dias.

3.5.1.1 *Aspergillus* spp.

Os isolados clínicos 1220 e 998 de *A. fumigatus* e *A. flavus*, respectivamente, foram selecionados para os testes *in vivo* baseado nos ensaios prévios de susceptibilidade, sendo então cultivados em tubos de ensaio contendo ágar BDA e incubados a 35 °C durante 7 dias. Os conídios foram coletados utilizando solução salina estéril (cloreto de sódio 0,85 %; tween 80 0,1 %) e a concentração do inóculo foi ajustada para 1×10^7 conídios/mL com PBS.

3.5.1.2 *Candida auris*

Os isolados clínicos CBS 10913 e CBS 12766 de *Candida auris* foram utilizados após o cultivo em 5 mL de caldo Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 h. As células foram lavadas duas vezes com PBS por centrifugação (5000 RPM por 10 min) para retirada do meio de cultura e a concentração do inóculo ajustada para 5×10^7 UFC/mL.

3.5.2 Análise da eficácia antifúngica da miltefosina livre e incorporada em nanopartículas de alginato em modelo de aspergilose em larvas de *Galleria mellonella*

As suspensões de conídios dos isolados de *Aspergillus* spp. selecionados foram padronizadas para 1×10^7 conídios/mL. As larvas foram infectadas injetando, com auxílio de uma seringa Hamilton®, 10 µL da solução de conídios (1×10^5 conídios/larva) na última *pro-leg*. Após 30 min foram administrados 10 µL, em *pro-leg* diferente, dos tratamentos: AMB 20 ou 40 mg/kg (4 ou 8 µg/larva, respectivamente), VCR 10 ou 20 mg/kg (2 ou 4 µg/larva, respectivamente) e MFS 20 ou 40 mg/kg (4 ou 8 µg/larva, respectivamente). Para o tratamento com MFS-NA foram injetados 20 µL utilizando seringa de 1 mL BD® com agulha 0,3 x 13 mm, devido a viscosidade da formulação, na dose de 100 mg/kg (20 µg de MFS/larva). As doses foram determinadas baseadas em dados prévios utilizando este modelo invertebrado (SPADARI et al., 2019; SPADARI et al., 2020). Foram adicionados grupos controles: não infectado (grupo PBS) e infectado e não tratado (grupo não tratado) (MAURER et al., 2015). Os grupos (n= 20 larvas/grupo) foram incubados a 37 °C em placas de Petri

contendo pólen e cera de abelha e avaliados quanto à sobrevivência e à morbidade, diariamente, por 5 dias.

*3.5.3 Análise da combinação da miltefosina livre e incorporada em nanopartículas de alginato com voriconazol em modelo de aspergilose em larvas de *Galleria mellonella**

Para a avaliação da combinação entre MFS ou MFS-NA com VRC, as larvas foram infectadas com 1×10^5 conídios/larva como descrito no tópico anterior, e tratadas após 30 min com as combinações: MFS 20 mg/kg + VRC 10 mg/kg (4+2 µg/larva, respectivamente) ou MFS-NA 100 mg/kg + VRC 10 mg/kg (20+2 µg/larva, respectivamente). Foram incluídos os grupos controles não infectado (PBS) e infectado e não tratado (não tratado). Todos os grupos foram incubados a 37 °C em placas de Petri contendo pólen e cera de abelha e avaliados quanto à sobrevivência e à morbidade, diariamente, por 5 dias.

*3.5.4 Análise da eficácia antifúngica da miltefosina livre e incorporada em nanopartículas de alginato em modelo de candidíase sistêmica em larvas de *Galleria mellonella**

A suspensão celular de *Candida auris* (CBS 10913 ou CBS 12766), previamente cultivada em caldo Sabouraud por 24 h a 35 °C, foi ajustada para 5×10^7 UFC/mL. Infectou-se as larvas injetando 10 µL da suspensão celular (5×10^5 conídios/larva) na última *pro-leg*. Após 30 min injetou-se 10 µL, em *pro-leg* diferente, dos tratamentos: AMB 1, 10 ou 20 mg/kg (0,2, 2 ou 4 µg/larva, respectivamente), FLC 20 ou 40 mg/kg (4 ou 8 µg/larva, respectivamente), MFS 20 ou 40 mg/kg (4 ou 8 µg/larva, respectivamente) e MFS-NA 100 mg/kg (20 µg/larva). Foram feitos grupos controles não infectado (grupo PBS) e infectado não tratado (grupo não tratado) (SHERRY et al., 2017). Os grupos (n= 20 larvas/grupo) foram incubados a 37 °C em placas de Petri contendo pólen e cera de abelha e avaliados quanto à sobrevivência e à morbidade, diariamente, por 5 dias.

3.5.5 Avaliação da sobrevivência e da morbidade de larvas de *Galleria mellonella*

A cada 24 h durante 5 dias foi avaliado o número de larvas sobreviventes e o índice de saúde pela análise da mobilidade, formação de pupa e melanização como descrito na Tabela 2. A curva de morbidade foi realizada utilizando a soma destes parâmetros, onde a maior nota (10) representa a melhor condição de saúde da larva (LOH et al., 2013).

3.5.6 Determinação da carga fúngica em larvas de *Galleria mellonella*

A carga fúngica no tecido larval foi estabelecida 24 h após a infecção e tratamentos para *A. fumigatus*, *A. flavus* e *C. auris* CBS 12766 devido à alta virulência das cepas, e 48 h após infecção para *C. auris* CBS 10913 (4 larvas por grupo). As larvas foram pesadas maceradas para a obtenção de um homogenato. Uma alíquota de 10 µL deste foi plaqueado em ágar (BDA para *Aspergillus* ou SDA para *C. auris*) com 50 mg/L de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 35 °C e a contagem de colônias realizada depois de 24-48 h para determinar o número de unidades formadoras de colônia por grama de larva (UFC/g) e, posteriormente, calculados os valores de Log UFC/g (SPADARI et al., 2019).

Tabela 2 - Sistema de pontuação do índice de saúde em modelo de *Galleria mellonella* (de BASTIANI, 2018 adaptado de LOH et al., 2013)

Categoria	Descrição	Nota
Atividade	Sem movimento	0
	Movimento mínimo ao estímulo	1
	Movimento quando estimulada	2
	Movimento sem estímulo	3
Formação de casulo	Sem casulo	0
	Casulo parcial	0,5
	Casulo total	1
Melanização	Larva preta	0
	Larva marrom com pontos pretos	1
	≥3 pontos pretos em larva bege	2
	<3 pontos pretos em larva bege	3
	Sem melanização	4
Sobrevivência	Morta	0
	Viva	2

3.5.7 Análise histopatológica

Para a avaliação histopatológica, 2 larvas de cada grupo experimental foram fixadas em solução de formaldeído 10 % em PBS, processadas e as secções histológicas sagitais foram coradas utilizando hematoxilina-eosina (HE). O serviço de processamento das lâminas foi realizado pelo laboratório HistoCell (Pinheiros, São Paulo, SP). As análises semi-quantitativas da carga fúngica, foram realizadas em microscópio óptico no aumento de 400x (DM750, Leica, São Paulo, Brasil) baseadas no protocolo descrito previamente (QUINTELLA et al., 2011) com modificações, utilizando como parâmetro a quantidade de elementos fúngicos visualizados por campo, segundo a classificação: 0) nenhum; +) limitado; ++) médio; +++ alto e ++++) muito alto (QUINTELLA et al., 2011; de BASTIANI, 2018) (Tabela 3). Adicionalmente, foram analisados critérios como a disseminação das estruturas fúngicas ao longo do tecido, a quantidade de granulomas contendo esses elementos, além da presença de estruturas de reprodução assexuada (conidióforos, fiálides e conídios).

Tabela 3 – Critérios para análise semi-quantitativa da carga fúngica nas secções histológicas de larvas de *Galleria mellonella* (baseado em QUINTELLA et al., 2011 e adaptado de de BASTIANI, 2018).

Carga fúngica	Critérios
0	Sem fungos
+	Até 5 elementos por campo
++	De 6 a 20 elementos por campo
+++	De 20 a 50 elementos por campo
++++	Mais de 50 elementos por campo

Secções visualizadas no aumento de 400x em microscópio óptico.

3.6 Padronização da imunossupressão em modelo murino

3.6.1 Animais

O desenvolvimento desse projeto teve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA – ICB/USP) protocolada sob o número 5026060618. Os animais utilizados neste trabalho foram camundongos machos isogênicos da linhagem BALB/c originados do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, São Paulo/SP, Brasil, com idade de 6-8 semanas e pesando 20-25

g, mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Microbiologia (ICB/USP) e utilizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.6.2 Padronização da imunossupressão

Para o estabelecimento da aspergilose e candidíase invasiva em modelo murino é necessária a imunossupressão, segundo o protocolo previamente estabelecido (HAGER et al., 2018). Cinco animais foram submetidos a duas doses de ciclofosfamida (Sigma Aldrich Co., MO, USA) intraperitoneal, sendo uma no dia -3 (200 mg/kg) e uma no dia +1 (150 mg/kg). A contagem de leucócitos foi realizada a cada 48 h para acompanhar a leucopenia dos animais e validar o protocolo de imunossupressão.

Uma amostra de sangue (aproximadamente 50 μ L) foi colhida de cada camundongo, por meio da veia lateral caudal, em tubo de polipropileno contendo ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (4,2 mg/mL). O número total de leucócitos foi determinado utilizando 20 μ L de sangue total, acrescido de 400 μ L de solução de Türk (ácido acético glacial 1 %; violeta genciana 0,01 %) e a contagem realizada em câmara de Neubauer (adaptado de BJORNER & ZHU, 2019).

3.7 Análise estatística

Todas as análises estatísticas deste trabalho foram realizadas no programa Graphpad Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA). As curvas de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* e de carga fúngica no tecido larval foram avaliadas pelo método de Análise de Variância Unidirecional, seguido do teste de Dunnett (*One-way ANOVA, Dunnett's post-test*). As curvas de morbidade das larvas de *G. mellonella* foram avaliadas pelo método de Análise de Variância Bidirecional (*Two-way ANOVA*). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Produção da miltefosina encapsulada em nanopartículas de alginato (MFS-NA)

O encapsulamento da miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS-NA) foi realizado pela técnica de emulsificação e gelificação externa de acordo com o protocolo previamente estabelecido (ISHIDA et al., 2017; SPADARI et al., 2019). Como controle de qualidade da metodologia de obtenção das nanopartículas, parâmetros como tamanho médio, polidispersão e potencial zeta foram determinados: tamanho médio das partículas de $261,2 \pm 38,5$ nm, distribuição de tamanhos (polidispersão - Pdi) de $0,39 \pm 0,12$ e potencial zeta de $-27,8$ mV, corroborando com Spadari (2018) e Ishida e colaboradores (2017), confirmando a reprodutibilidade do método.

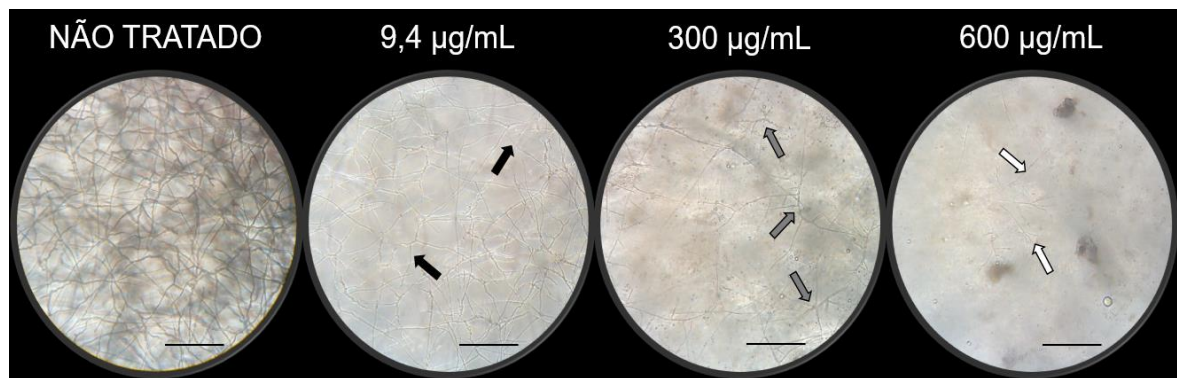
4.2 Teste de susceptibilidade aos antifúngicos

4.2.1 *Aspergillus* spp.

A susceptibilidade dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. aos antifúngicos padrão e a MFS livre e encapsulada em nanopartículas de alginato (MFS-NA) foi determinada mediante o método de microdiluição em caldo como descrito no documento M38-A2 (CLSI, 2008). A concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados de *A. fumigatus* variou de 0,06 a 0,5 µg/mL para AMB, de 0,12 a 0,5 µg/mL para VRC, de 0,5 a 2 µg/mL para MFS e de 18,7 a 600 µg/mL para MFS-NA. Todos os isolados testados foram considerados sensíveis para os antifúngicos padrão segundo os valores de ponte de corte definidos pelo protocolo (CLSI, 2008; ESPINEL-INGROFF et al., 2010).

Também foi verificada a alteração morfológica das hifas determinando-se a concentração efetiva mínima (CEM). Os valores de CEM variaram de 0,06 a 0,25 µg/mL para AMB (exceto para a cepa 1232); 0,5 a 2 µg/mL para VRC; 0,5 a 2 para MFS (exceto para a cepa 1232); e 4,7 a 37,5 µg/mL para MFS-NA. Pôde-se notar que a MFS-NA causou diminuição na espessura e comprimento das hifas, quando comparado com o controle não tratado (Figura 1). Além disso, foi observado o efeito fungicida de AMB, VRC e MFS frente a todos os isolados testados (Tabela 4).

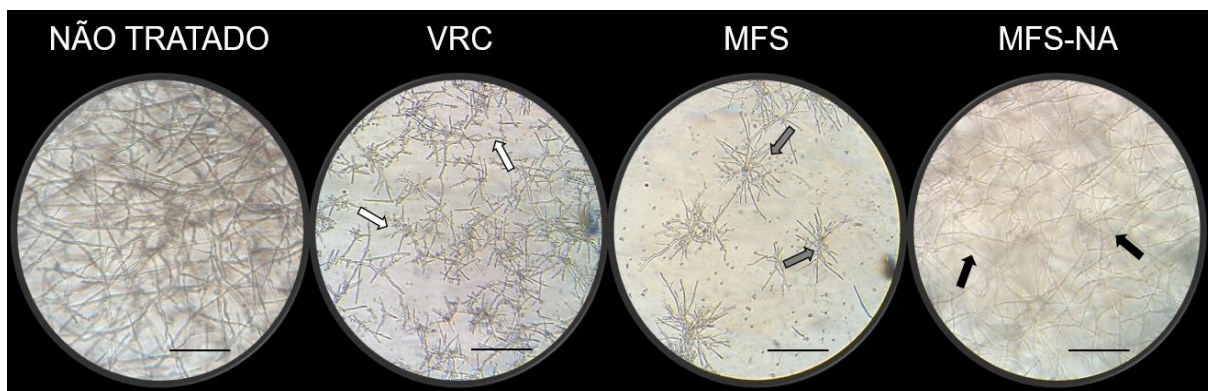
Figura 1 – Efeito da miltefosina encapsulada em nanopartículas de alginato (MFS-NA) sobre as hifas do isolado clínico 1220 de *Aspergillus fumigatus*.



Alterações morfológicas foram visualizadas em microscópio óptico invertido no aumento de 200x. Os conídios (5×10^4 conídios/mL) foram expostos a diferentes concentrações de MFS-NA por 48 h a 35 °C. NÃO TRATADO – sem adição da MFS-NA. As setas indicam as alterações observadas: pretas - espessura das hifas (mais finas); cinzas - padrão de ramificação; brancas – tamanho das hifas (mais curtas). Barras: 25 μ m.

Isolados de *A. flavus* exibiram um perfil mais tolerante a todos os antifúngicos testados quando comparado aos isolados de *A. fumigatus*. Verificou-se valores de CIM de 0,12 a 1 μ g/mL para AMB; 0,06 a 0,25 μ g/mL para VRC; 2 a 16 μ g/mL para MFS; e 300 a 600 μ g/mL para MFS-NA. Apesar de mais tolerante, os isolados de *A. flavus* testados foram sensíveis para os antifúngicos convencionais segundo o documento do CLSI (CLSI, 2008). Foi determinado a CEM, que variou de 0,12 a 2 μ g/mL para AMB; 0,5 a 2 μ g/mL para VRC; 0,5 a 16 μ g/mL para MFS; e 18,7 a 300 μ g/mL para MFS-NA. Observou-se que a MFS, assim como o VRC, promoveu alteração no padrão de ramificação, além de interferir no comprimento e espessura das hifas. Já o efeito da MFS-NA foi similar ao encontrado com as cepas de *A. fumigatus* (Figura 2). Adicionalmente, pôde-se caracterizar a MFS como fungistática para a maioria dos isolados de *A. flavus* testados, como mostrado na Tabela 5.

Figura 2 – Alterações morfológicas das hifas do isolado clínico 998 de *Aspergillus flavus* expostas a diferentes compostos.



As hifas foram visualizadas em microscópio óptico invertido no aumento de 200x. O inóculo fúngico de 5×10^4 conídios/mL foi incubado com os compostos a 35 °C por 48 h. NÃO TRATADO – sem adição de drogas; VRC – voriconazol 1 $\mu\text{g/mL}$; MFS – miltefosina 0,5 $\mu\text{g/mL}$; MFS-NA – miltefosina em nanopartículas de alginato 18,7 $\mu\text{g/mL}$. As setas indicam as alterações observadas: brancas – tamanho das hifas (mais curtas); cinzas - padrão de ramificação; pretas - espessura das hifas (mais finas). Barras: 25 μm .

Tabela 4 - Susceptibilidade de isolados clínicos de *Aspergillus fumigatus* a anfotericina B (AMB), voriconazol (VRC), miltefosina livre (MFS) e encapsulada em nanopartículas de alginato (MFS-NA). Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Efetiva Mínima (CEM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL. *efeito fungicida.

<i>Aspergillus fumigatus</i>	AMB			VRC			MFS			MFS-NA	
	CIM	CEM	CFM	CIM	CEM	CFM	CIM	CEM	CFM	CIM	CEM
1213	0,06	0,12	1	0,12	1	0,25*	2	2	2*	600	18,7
1220	0,12	0,12	1	0,50	1	1*	2	2	2*	300	9,4
1228	0,06	0,12	1	0,12	2	0,50*	2	2	2*	600	37,5
1232	0,25	>16	0,50*	0,25	0,50	0,50*	2	>64	8*	600	9,4
1238	0,12	0,06	0,50*	0,50	2	1*	2	2	2*	600	4,7
1304	0,06	0,12	0,25*	0,12	0,50	0,50*	2	2	2*	300	18,7
1341	0,12	0,25	0,50*	0,25	1	0,50*	0,50	0,50	1*	18,7	18,7
1343	0,12	0,12	1	0,12	2	1	2	2	8*	600	9,4
1359	0,06	0,06	0,50	0,25	1	0,25*	2	0,50	2*	600	18,7
1392	0,12	0,12	1	0,25	2	0,25*	2	2	2*	600	18,7
ATCC 16913	0,12	0,12	0,50*	0,25	1	0,25*	2	2	2*	600	37,5

Tabela 5 - Susceptibilidade de isolados clínicos de *Aspergillus flavus* a anfotericina B (AMB), voriconazol (VRC), miltefosina livre (MFS) e encapsulada em nanopartículas de alginato (MFS-NA). Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Efetiva Mínima (CEM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL. *efeito fungicida.

<i>Aspergillus flavus</i>	AMB			VRC			MFS			MFS-NA	
	CIM	CEM	CFM	CIM	CEM	CFM	CIM	CEM	CFM	CIM	CEM
805	1	0,50	16	0,25	2	4	16	4	>64	600	150
846	1	1	>16	0,25	1	2	2	0,50	>64	600	18,7
882	1	1	2*	0,12	0,50	2	2	1	>64	600	37,5
901	1	0,50	8	0,25	2	16	2	1	>64	600	300
953	1	1	16	0,12	1	>16	16	16	>64	300	150
981	1	0,50	2*	0,25	2	4	2	0,50	>64	600	37,5
998	0,12	0,12	0,25*	0,06	1	16	2	0,50	>64	600	18,7
1007	1	2	8	0,25	2	8	16	16	16*	600	150
1043	1	2	16	0,12	2	4	16	4	32*	600	300
1048	0,50	1	1*	0,25	2	4	2	1	>64	600	300

4.2.2 *Candida auris*

A susceptibilidade de duas cepas de *Candida auris* aos antifúngicos padrão, MFS e MFS-NA foi caracterizada de acordo com o método de microdiluição em caldo como descrito no documento E. Def 7.3.1 (EUCAST, 2017). Os isolados foram caracterizados como sensíveis aos antifúngicos padrão; exceto para FLC que apresentou CIM >64 µg/mL para CBS 12766, segundo os valores de ponto de corte definidos pelo CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2020). A MFS apresentou efeito inibitório em concentrações de 0,5 e 2 µg/mL e fungicida em 1 e 2 µg/mL para os isolados CBS 10913 e CBS 12766, respectivamente. Identificou-se a CIM da MFS-NA de 37,5 µg/mL e o efeito fungicida em 125 µg/mL frente ao isolado CBS 10913. Não foi observada atividade inibitória da MFS-NA em nenhuma concentração testada com a cepa CBS 12766 (Tabela 6).

Tabela 6 - Susceptibilidade de *Candida auris* aos antifúngicos padrão, miltefosina livre (MFS) e em nanopartículas de alginato (MFS-NA). Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos em µg/mL.

	CBS 10913		CBS 12766	
	CIM	CFM	CIM	CFM
Anfotericina B	0,06	0,50	0,25	0,50
Voriconazol	≤0,03	16	0,50	>16
Fluconazol	2	>64	>64 ^R	>64
Caspofungina	≤0,03	2	0,25	>16
Micafungina	≤0,03	8	0,06	16
Miltefosina	0,50	1	2	2
MFS-NA	37,5	125	>600	>600

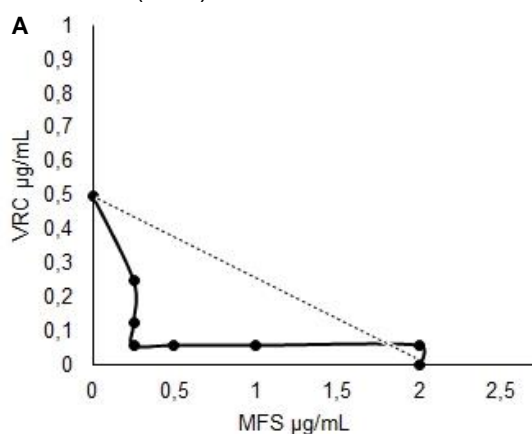
^RResistente

4.4.3 Combinação de fármacos

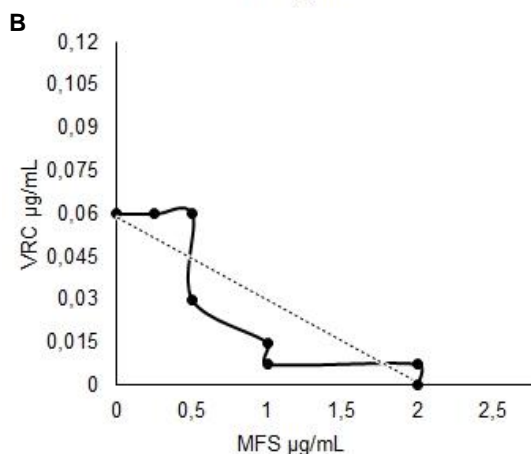
Para avaliar o possível efeito sinérgico da combinação entre VRC e MFS livre sobre os isolados representativos de *Aspergillus* spp. utilizamos a técnica de *checkerboard* que permite testar a combinação de 7 diferentes concentrações a partir dos valores de CIM conhecidos para *A. fumigatus* (VRC = 0,5 µg/mL; MFS = 2 µg/mL)

e para *A. flavus* (VRC = 0,06 µg/mL; MFS = 2 µg/mL). Das combinações testadas determinaram-se as menores concentrações combinadas que levaram a inibição de 50 % do crescimento, e somente 3 combinações foram consideradas sinérgicas para *A. fumigatus* 1220: 0,12 µg/mL VRC + 0,25 µg/mL MFS (ICIF = 0,37); 0,06 µg/mL VRC + 0,25 µg/mL MFS (ICIF = 0,24); 0,06 µg/mL VRC + 0,5 µg/mL MFS (ICIF = 0,37) (Figura 3A). Entretanto, nenhuma combinação foi considerada sinérgica para o isolado 998 de *A. flavus*, como destacado no isoblograma, em que indica todas as combinações com inibição do crescimento e a curva próxima à linha de intersecção dos valores de CIM sozinhas (Figura 3B), em contraste com a curva mais acentuada do isoblograma das combinações sobre *A. fumigatus* (Figura 3A).

Figura 3 – Ensaio de checkerboard e isoblogramas das combinações de voriconazol (VRC) e miltefosina (MFS) contra isolados clínicos de *Aspergillus* spp.



<i>Aspergillus fumigatus</i> 1220			
CIM (µg/mL)		ICIF	RESULTADO
VRC	MFS		
0,50	0	1	INDIFERENTE
0,25	0,25	0,62	INDIFERENTE
0,12	0,25	0,37	SINERGISMO
0,06	0,25	0,24	SINERGISMO
0,06	0,50	0,37	SINERGISMO
0,06	1	0,62	INDIFERENTE
0,06	2	1,12	INDIFERENTE
0	2	1	INDIFERENTE



<i>Aspergillus flavus</i> 998			
CIM (µg/mL)		ICIF	RESULTADO
VRC	MFS		
0,06	0	1	INDIFERENTE
0,06	0,25	1,12	INDIFERENTE
0,06	0,50	1,25	INDIFERENTE
0,03	0,50	0,75	INDIFERENTE
0,015	1	0,75	INDIFERENTE
0,007	1	0,62	INDIFERENTE
0,007	2	1,12	INDIFERENTE
0	2	1	INDIFERENTE

A: isoblograma de *Aspergillus fumigatus* 1220; B: isoblograma de *Aspergillus flavus* 998. VRC: voriconazol; MFS: miltefosina; CIM: concentração inibitória mínima; ICIF: índice de concentração inibitória fracionada. ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF > 0,5 e < 4: indiferente; ICIF ≥ 4: antagonismo. A linha tracejada indica os valores de CIM relacionados com a indiferença.

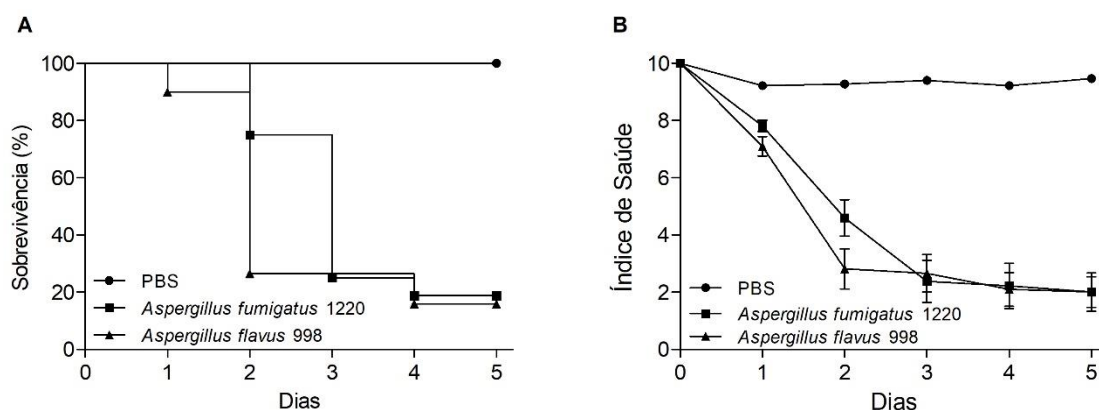
4.3 Modelo invertebrado de *Galleria mellonella*

4.3.1 Virulência de *Aspergillus* spp.

A virulência dos isolados 1220 e 998 de *A. fumigatus* e *A. flavus*, respectivamente, foi estabelecida utilizando 20 larvas infectadas com 1×10^5 conídios/larva e o grupo controle com injeção de PBS. A infecção por *A. fumigatus* levou a 25 % de sobrevivência das larvas após o terceiro dia de infecção, com redução do percentual de sobrevivência para 18,75 % no último dia de observação (Figura 4A). Apesar de 75 % das larvas estarem vivas no segundo dia ocorreu uma queda drástica no índice de saúde, que se mantém até o 5º dia (Figura 4B).

A. flavus apresentou maior virulência, com redução de 73,5 % da sobrevivência dois dias após a infecção, seguido da curva similar à de *A. fumigatus* até o final do período experimental (Figura 4A). Apesar dessa diferença de um dia na sobrevivência entre as cepas analisadas, a curva de morbidade mostra uma queda brusca no índice de saúde, que permanece até o quinto dia (Figura 4B). A partir desses resultados foi determinada que essa concentração de inóculo (1×10^5 conídios/larva) é adequada para realização dos ensaios de tratamento e foi definido um dia após a infecção para avaliar a carga fúngica de *A. flavus* e *A. fumigatus* no tecido larvário de grupos tratados com antifúngicos e não tratados.

Figura 4 – Virulência dos isolados clínicos *Aspergillus fumigatus* 1220 e *A. flavus* 998 em modelo larvário de *Galleria mellonella*.



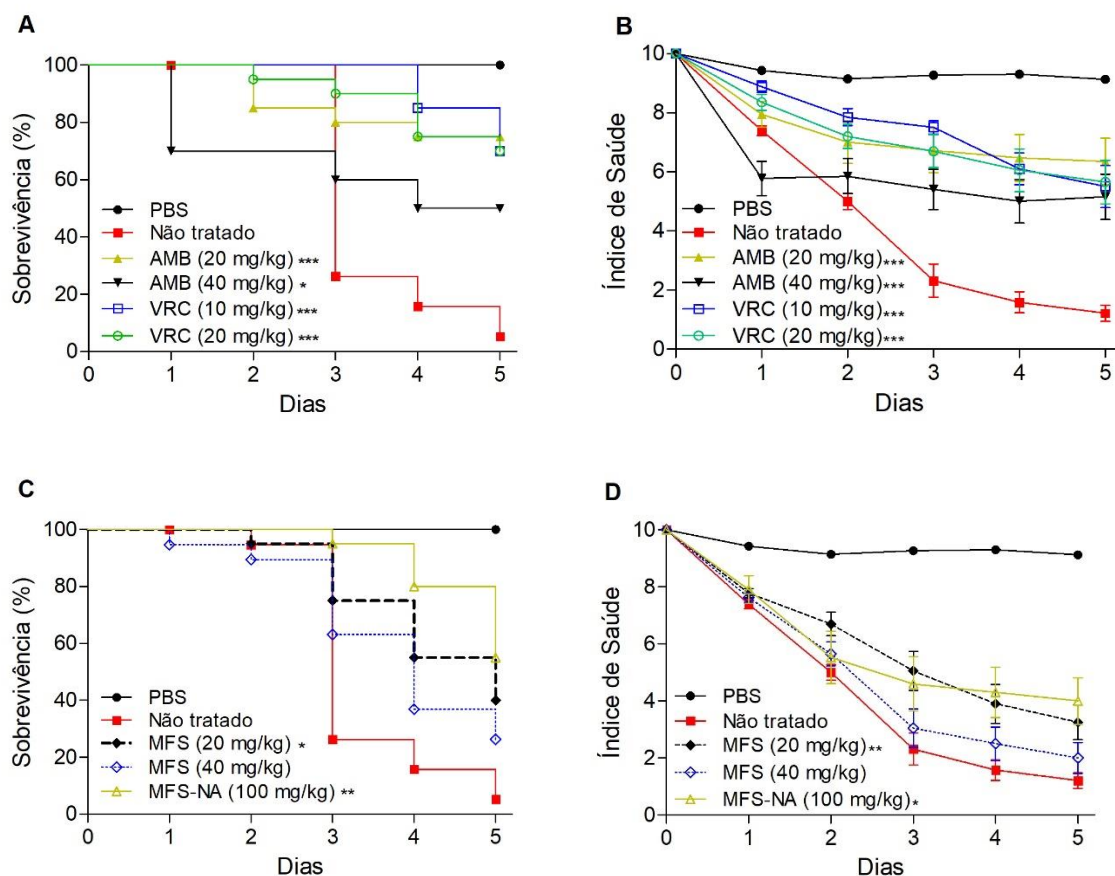
Larvas de *Galleria mellonella* infectadas com 1×10^5 conídios/larva, incubadas a 35 °C e analisadas a cada 24 h por 5 dias para a construção das curvas de sobrevivência (A) e índice de saúde (B). Os resultados foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo não infectado (PBS).

4.3.2 Análise da eficácia antifúngica da miltefosina livre e incorporada em nanopartículas de alginato em modelo de aspergilose em larvas de *Galleria mellonella*

O tratamento com os antifúngicos padrão foram eficientes contra a infecção com *A. fumigatus*. Observou-se que ambas as doses de VRC utilizadas preservaram 70 % de sobrevivência até o quinto dia de infecção. A mesma eficiência foi observada para o tratamento com AMB 20 mg/kg, onde 75 % das larvas se mantiveram vivas após o período de análise (Figura 5A). AMB na dose de 40 mg/kg foi considerada tóxica devido à queda de 50 % sobrevivência, menor índice de saúde, além disso, pela apresentação de alterações nas características físicas das larvas como redução de tamanho e peso, tecido com coloração amarelada, mudança no padrão de mobilidade e presença de secreções. Todos os tratamentos com AMB e VRC foram estatisticamente significantes em relação ao grupo controle infectado e não tratado ($p < 0,05$).

A MFS apresentou melhor resultado na dose de 20 mg/kg, mantendo 40 % de sobrevivência das larvas até o quinto dia de infecção em contraste com 26 % de sobrevivência quando utilizados 40 mg/kg (Figura 5C). Quanto à MFS-NA, foi possível observar sobrevivência em 55 % das larvas no 5º dia pós infecção quando tratadas com 100 mg/kg, semelhante com o encontrado para MFS (20 mg/kg). Ambos foram significativamente diferentes quando comparado ao grupo não tratado ($p < 0,05$). Adicionalmente, o índice de saúde das larvas corrobora com os dados de sobrevivência, em que houve diferença estatística nos grupos tratados com AMB e VRC nas duas doses ($p < 0,001$); MFS em 20 mg/kg ($p < 0,01$) e MFS-NA 100 mg/kg ($p < 0,05$), como exposto nas Figuras 5B e 5D.

Figura 5 – Curvas de sobrevivência e morbidade das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com isolado clínico 1220 de *Aspergillus fumigatus*.

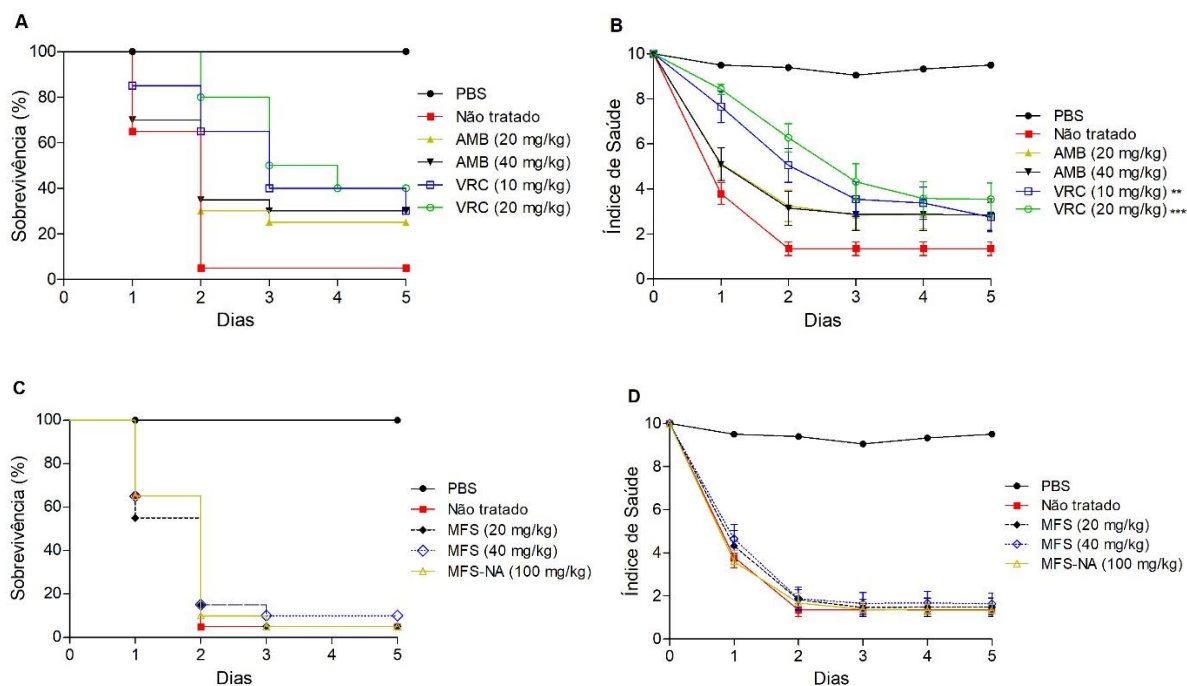


As larvas foram infectadas com 1×10^5 conídios/larva e tratadas após 30 min com diferentes doses de anfotericina B (AMB), voriconazol (VRC), miltefosina livre (MFS) ou em nanopartículas de alginato (MFS-NA). A sobrevivência (A e C) e morbidade (B e D) foram avaliadas a cada 24 h durante 5 dias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo não tratado (Sobrevivência: *One-way ANOVA*, *Dunnett's post-test*; Morbidade: *Two-way ANOVA*).

A. flavus demonstrou maior tolerância a todos os tratamentos testados. VRC foi mais eficiente em 20 mg/kg, com a taxa de sobrevivência de 80 % no segundo dia pós-infecção, entretanto, a porcentagem de sobrevivência se equipara com a do grupo tratado com VRC 10 mg/kg ao final do experimento, com 30 % e 40 % de sobrevivência, respectivamente. Os grupos tratados com AMB, em ambas as doses, apresentaram o mesmo perfil de tolerância, preservando em torno de 30 % de sobrevivência das larvas após o quinto dia de infecção (Figura 6A). Apesar do aumento da porcentagem de sobrevivência, nenhum tratamento foi estatisticamente diferente do grupo não tratado. A curva de morbidade corrobora com os dados da sobrevivência e o índice de saúde dos grupos tratados com VRC apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparado ao não tratado (Figura 6B). As curvas de sobrevivência e morbidade dos

grupos tratados com MFS e MFS-NA foram similares ao grupo não tratado, mostrando que não houve eficácia em nenhuma dose utilizada (Figuras 6C e 6D).

Figura 6 - Curvas de sobrevivência e morbidade das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com isolado clínico 998 de *Aspergillus flavus*.



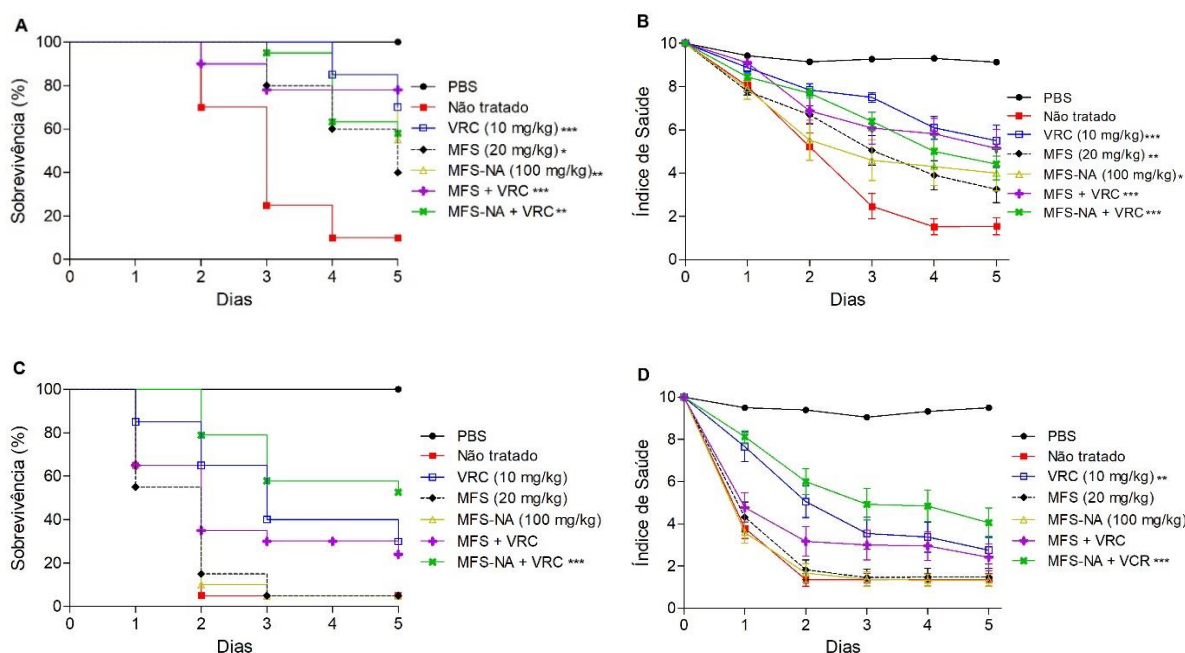
As larvas foram infectadas com 1×10^5 conídios/larva e tratadas após 30 min com diferentes doses de anfotericina B (AMB), voriconazol (VRC), miltefosina livre (MFS) ou em nanopartículas de alginato (MFS-NA). A sobrevivência (A e C) e morbidade (B e D) foram avaliadas a cada 24 h durante 5 dias. **p < 0,01, ***p < 0,001 quando comparado com o grupo não tratado (Sobrevivência: *One-way ANOVA*, *Dunnnett's post-test*; Morbidade: *Two-way ANOVA*).

4.3.3 Análise da combinação entre miltefosina livre e incorporada em nanopartículas de alginato com voriconazol em modelo de aspergilose em larvas de *Galleria mellonella*

A partir dos resultados de sobrevivência e de morbidade em larvas de *G. mellonella*, escolhemos as menores doses de VRC, MFS livre e MFS-NA que apresentaram resultados significantes para avaliar a combinação. Todos os tratamentos aumentaram a sobrevivência (p < 0,05, Figura 7A) e melhoraram significativamente a saúde das larvas infectadas com *A. fumigatus* (p < 0,05, Figura 7B). A combinação de MFS + VRC (20 + 10 mg/kg, respectivamente) aumentou a taxa de sobrevivência das larvas infectadas com *A. fumigatus* 1220 para 78 % após o terceiro dia de infecção e se manteve até o final do experimento, quando comparado

com o grupo tratado apenas com MFS 20 mg/kg (40 % no 5º dia), e teve o perfil similar ao grupo tratado com VRC 10 mg/kg (70 % no 5º dia), com diferença estatística entre MFS + VRC e VRC 10 mg/kg ($p < 0,05$). Já o tratamento com a combinação de MFS-NA + VRC (100 + 10 mg/kg, respectivamente) apresentou o mesmo perfil de sobrevivência do grupo tratado com MFS-NA sozinha, com 58 % sobrevivência ao final do período de avaliação, comparado com 70 % de sobrevivência após o tratamento com VRC.

Figura 7 - Curvas de sobrevivência e morbidade das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com isolados clínicos de *Aspergillus* spp.



As larvas foram infectadas com 1×10^5 conídios/larva de (A e B) *Aspergillus fumigatus* 1220 ou (C e D) *Aspergillus flavus* 998 e tratadas após 30 min com voriconazol 10 mg/kg (VRC), miltefosina 20 mg/kg (MFS), miltefosina em nanopartículas de alginato 100 mg/kg (MFS-NA) ou as combinações MFS + VRC (20 + 10 mg/kg, respectivamente) ou MFS-NA + VRC (100 mg/kg + 10 mg/kg, respectivamente). A sobrevivência (A e C) e morbidade (B e D) foram avaliadas a cada 24 h durante 5 dias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo não tratado (Sobrevivência: *One-way ANOVA*, *Dunnett's post-test*; Morbidade: *Two-way ANOVA*).

As larvas infectadas com *A. flavus* 998 e tratadas com a combinação MFS + VRC também tiveram a taxa de sobrevivência aumentada com 24 % de sobrevivência após o quinto dia de infecção contra apenas 5 % de sobrevivência do grupo tratado com MFS livre sozinha. Ademais, a curva da combinação se assemelha ao observado para quando tratadas com VRC sozinho (30 % no 5º dia). Em contraste, observou-se que a combinação de MFS-NA + VRC foi eficiente no aumento significativo ($p < 0,001$) da sobrevivência das larvas, apresentando uma taxa de 53 % de sobrevivência ao final do

experimento, maior que ambos tratamentos separadamente (Figura 7C). Essa combinação também melhorou significativamente ($p < 0,001$) a morbidade das larvas (Figura 7D).

4.3.4 Determinação da carga fúngica e análise histopatológica em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

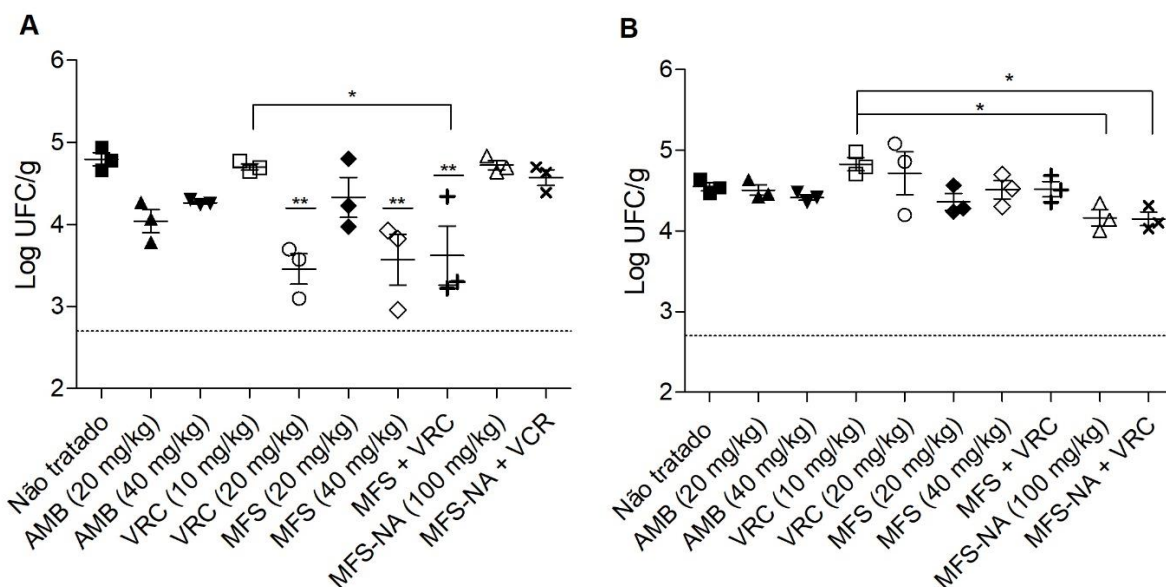
A carga fúngica no tecido larval de *G. mellonella* foi determinada 24 h após a infecção com conídios de *Aspergillus* spp. O tratamento com ambas doses de AMB reduziu a carga fúngica dos grupos de larvas infectadas com *A. fumigatus* em cerca de 1 Log, apesar dessa redução não ter sido estatisticamente significante; enquanto VRC, somente na maior dose (20 mg/kg), foi capaz de reduzir a carga fúngica significativamente ($p < 0,01$). O tratamento com MFS livre também reduziu a carga fúngica nas larvas, sendo a ligeira diminuição pela dose de 20 mg/kg de aproximadamente 0,5 Log e uma redução significativa ($p < 0,01$) quando tratadas com 40 mg/kg de MFS (Figura 8A).

Na combinação de MFS + VRC (20 + 10 mg/kg, respectivamente) houve uma diminuição significativa ($p < 0,01$) na carga fúngica, indicando que a combinação melhorou o desempenho dos fármacos frente à infecção. Adicionalmente, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo tratado com VRC 10 mg/kg e MFS + VRC, sugerindo que a combinação foi mais eficaz que a monoterapia. Em contrapartida, não foi observada redução da carga fúngica nos grupos tratados com MFS-NA ou a combinação de MFS-NA + VRC (100 + 10 mg/kg, respectivamente), apesar do aumento da taxa de sobrevivência e melhora no índice de saúde das larvas (Figura 8A).

Nenhum tratamento testado foi eficaz na redução significativa da carga fúngica no tecido larval infectado com *A. flavus*, mesmo quando utilizados os antifúngicos convencionais, ou quando combinados, provavelmente devido ao perfil de virulência e maior tolerância da cepa selecionada (Figura 8B). Contudo, apesar de não haver diferença estatística dos tratamentos em relação ao grupo não tratado, observou-se uma ligeira redução da contagem fúngica nos grupos tratados com MFS-NA ou MFS-NA + VRC e a análise estatística apontou uma redução significativa quando comparado tanto MFS-NA quanto a combinação MFS-NA + VRC com VRC 10 mg/kg

sozinho ($p < 0,05$), denotando a maior eficácia do tratamento em combinação (Figura 8B).

Figura 8 – Carga fúngica em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com isolados clínicos de *Aspergillus* spp.



As larvas foram infectadas com 1×10^5 conídios/larva e tratadas após 30 min com diferentes doses de anfotericina B (AMB), voriconazol (VRC), miltefosina livre (MFS) ou em nanopartículas de alginato (MFS-NA) ou as combinações MFS + VRC (20 + 10 mg/kg, respectivamente) ou MFS-NA + VRC (100 mg/kg + 10 mg/kg, respectivamente). A determinação da carga fúngica foi realizada 24 h após a infecção. A: *Aspergillus fumigatus* 1220; B: *Aspergillus flavus* 998. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (One-way ANOVA, *Dunnett's post-test*) comparado com o grupo não tratado. As linhas na horizontal indicam a análise estatística entre os tratamentos. A linha tracejada representa o limite de detecção da técnica ($\pm 2,7$ Log UFC/g).

A análise semi-quantitativa histopatológica da carga fúngica no tecido larval infectado com *A. fumigatus* e tratado com os antifúngicos padrão corrobora com a contagem de UFC, onde as maiores doses testadas (AMB 40 mg/kg ou VRC 20 mg/kg) foram mais eficientes na redução da contagem fúngica tecidual. Destaca-se a evidente redução da carga fúngica nos grupos tratados com MFS, ambas as doses, e MFS-NA (100 mg/kg) quando comparado com o grupo infectado e não tratado (Tabela 7, Figura 9). O perfil de contagem de elementos fúngicos se manteve com as combinações testadas (MFS + VRC e MFS-NA + VRC) quando comparado com os tratamentos sozinhos, apesar de haver uma redução na quantidade de granulomas (Figura 9E e 9F). Observou-se também a presença de estruturas de reprodução assexuada no tecido larval, onde foi possível contar 12 estruturas no grupo infectado não tratado (Figura 9A), e essa contagem foi reduzida em todos os grupos tratados sendo que AMB foi mais eficiente (contagem de 0 e 1, nos grupos 20 e 40 mg/kg,

respectivamente); identificou-se 3 e 5 conidióforos nos grupos tratados com VRC 10 e 20 mg/kg, respectivamente. MFS foi tão eficaz quanto AMB na redução de estruturas de reprodução no tecido larval, sendo observada 1 na menor dose (20 mg/kg, Figura 9C) e ausentes nos grupos tratados com MFS (40 mg/kg), MFS-NA (100 mg/kg), também nas combinações MFS + VRC e MFS-NA + VRC (Tabela 7).

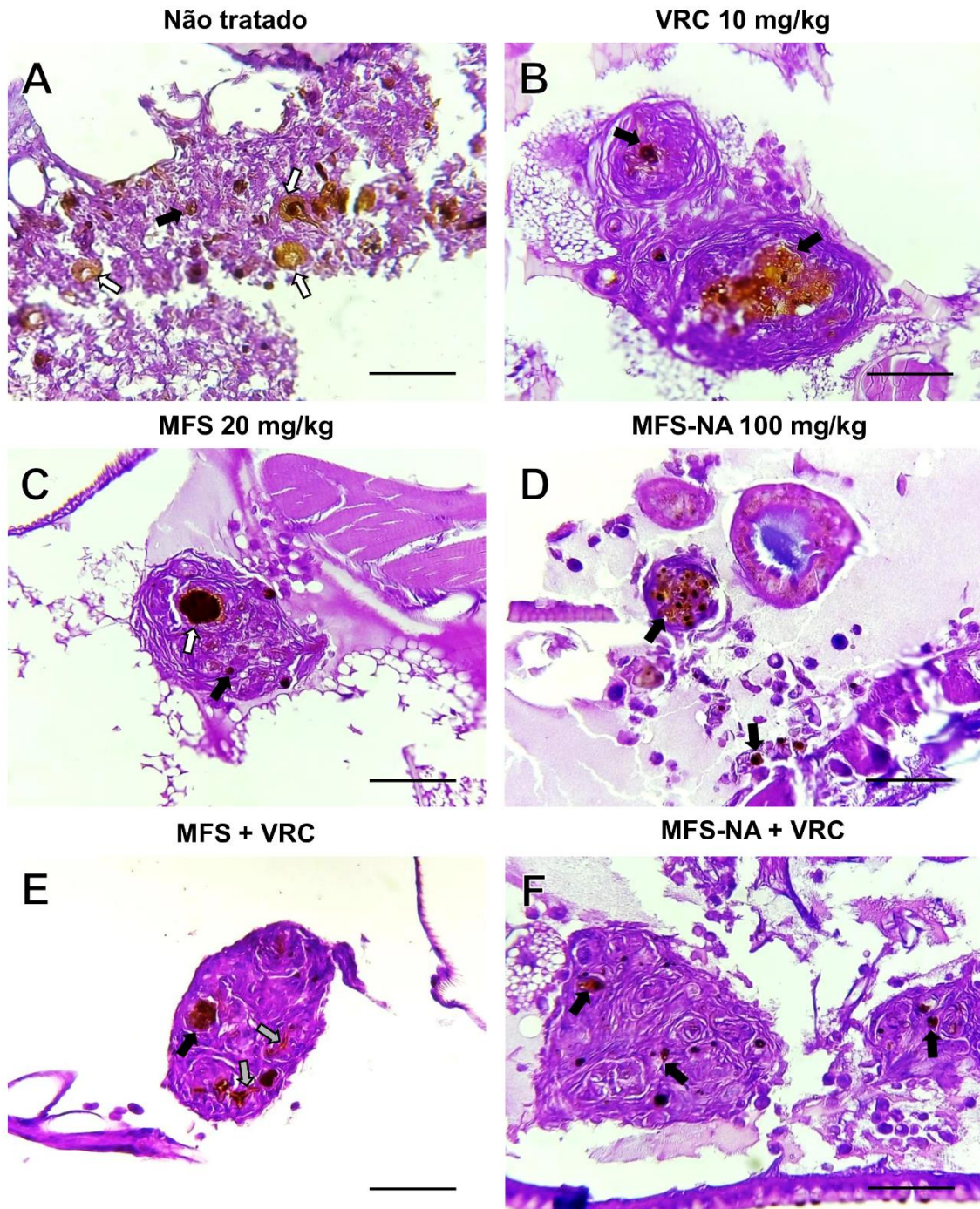
Houve uma ligeira redução na contagem de elementos fúngicos de *A. flavus* no tecido larval apenas nos grupos tratados com MFS-NA (100 mg/kg) e na combinação de MFS + VRC quando comparado com o grupo infectado e não tratado, o que corroborou com a contagem de UFC (Tabela 7, Figura 8B, Figura 10). Em contraste com o que foi observado para *A. fumigatus*, não foram identificadas estruturas de reprodução assexuada nos tecidos infectados com *A. flavus*.

Tabela 7 – Análise semi-quantitativa da carga fúngica e presença de estruturas de reprodução em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Aspergillus fumigatus* ou *Aspergillus flavus* não tratadas e tratadas com anfotericina B (AMB), voriconazol (VRC), miltefosina livre (MFS) ou em nanopartículas de alginato (MFS-NA).

Cepas	Carga fúngica	Estruturas de reprodução	Granulomas
<i>Aspergillus fumigatus</i> 1220			
PBS	0	0	0
Não tratado	+4	12	0
AMB 20 mg/kg	+2	0	+1
AMB 40 mg/kg	+1	1	+1
VRC 10 mg/kg	+3	3	+4
VRC 20 mg/kg	+2	5	+3
MFS 20 mg/kg	+2	1	+3
MFS 40 mg/kg	+2	0	+2
MFS + VRC	+2/+3	0	+1
MFS-NA 100 mg/kg	+2/+3	0	+4
MFS-NA + VRC	+3	0	+1
<i>Aspergillus flavus</i> 998			
PBS	0	0	0
Não tratado	+3	0	0
AMB 20 mg/kg	+3	0	+2
AMB 40 mg/kg	+3	0	+1
VRC 10 mg/kg	+3	0	+2
VRC 20 mg/kg	+3	0	+1
MFS 20 mg/kg	+3	0	+1
MFS 40 mg/kg	+3	0	+1
MFS + VRC	+2/+3	0	0
MFS-NA 100 mg/kg	+2/+3	0	0
MFS-NA + VRC	+3	0	+1

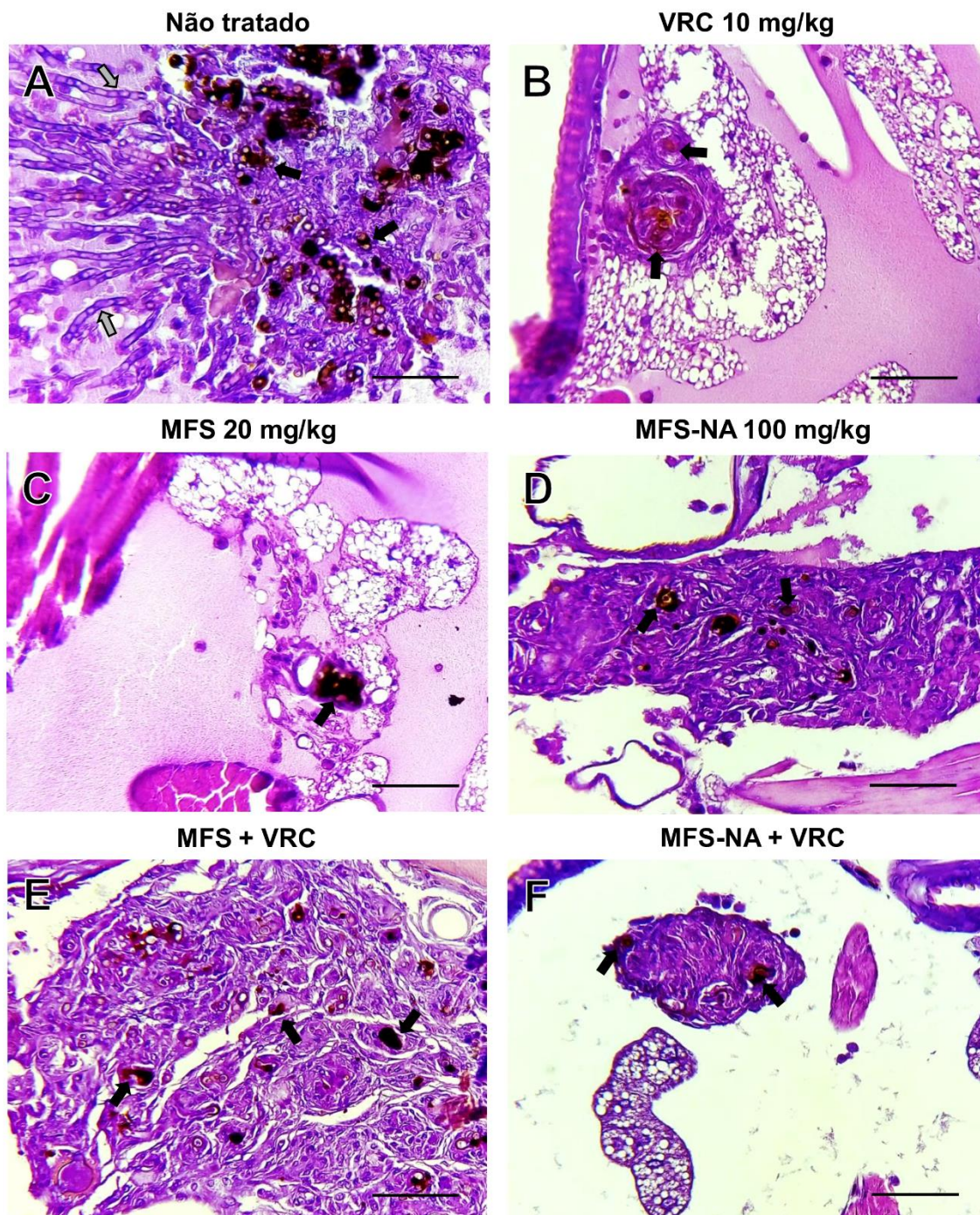
0: sem fungos; +1: até 5 elementos fúngicos por campo; +2: de 6 a 20 elementos fúngicos por campo; +3: de 20 a 50 elementos fúngicos por campo; +4: mais de 50 elementos fúngicos por campo. Lâminas visualizadas por microscopia óptica no aumento de 400x.

Figura 9 – Análise histopatológica do tecido larval de *Galleria mellonella* infectado com *Aspergillus fumigatus* 1220.



Secções histológicas do tecido larval de *G. mellonella* infectado com *Aspergillus fumigatus* 1220 (1×10^5 UFC/larva) visualizadas em microscópio óptico no aumento de 400x. **A:** grupo não tratado; **B:** grupo VRC (10 mg/kg); **C:** grupo MFS (20 mg/kg); **D:** grupo MFS-NA (100 mg/kg); **E:** grupo MFS + VRC (20 + 10 mg/kg, respectivamente); **F:** grupo MFS-NA + VRC (100 + 10 mg/kg, respectivamente). Setas pretas indicam conídios; setas brancas indicam estruturas de reprodução assexuada (conidióforos); setas cinzas indicam hifas. Barras: 50 μm .

Figura 10 – Análise histopatológica do tecido larval de *Galleria mellonella* infectado com *Aspergillus flavus* 998.

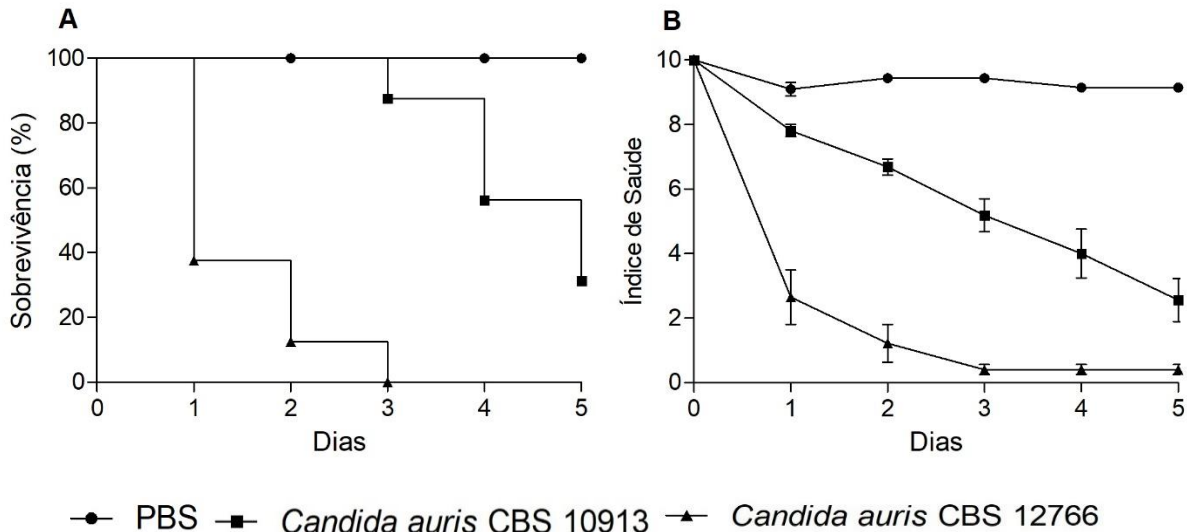


Secções histológicas do tecido larval de *G. mellonella* infectado com *Aspergillus flavus* 998 (1×10^5 UFC/larva) visualizadas em microscópio óptico no aumento de 400x. **A:** grupo não tratado; **B:** grupo VRC (10 mg/kg); **C:** grupo MFS (20 mg/kg); **D:** grupo MFS-NA (100 mg/kg); **E:** grupo MFS + VRC (20 + 10 mg/kg, respectivamente); **F:** grupo MFS-NA + VRC (100 + 10 mg/kg, respectivamente). Setas pretas indicam conídios; setas cinzas indicam hifas. Barras: 50 μ m.

4.3.5 Virulência de *Candida auris*

A virulência dos isolados CBS 10913 e CBS 12766 de *Candida auris* foi determinada utilizando 20 larvas de *G. mellonella* por grupo, infectadas com 5×10^5 UFC/larva, e um grupo controle não infectado (PBS). A cepa CBS 12766 foi caracterizada como altamente virulenta, pois as larvas apresentaram apenas 37,5 % de sobrevivência no primeiro dia pós-infecção, alcançando 100 % de mortalidade no terceiro dia. Em contraste, a cepa CBS 10913 levou a 12,5 % de mortalidade três dias após a infecção, seguido por declínio ao longo do período de avaliação, finalizando o quinto dia com somente 31,25 % de sobrevivência (Figura 11A). Apesar desse perfil de sobrevivência, notou-se que o índice de saúde das larvas infectadas com CBS 10913 decaiu consideravelmente (Figura 11B). Com esses dados foi definida a concentração de inóculo (5×10^5 UFC/larva) e os dias 1 e 2 após a infecção (CBS 12766 e CBS 10913 respectivamente) para avaliação da carga fúngica nas larvas.

Figura 11 – Virulência de isolados clínicos de *Candida auris* em modelo de *Galleria mellonella*.



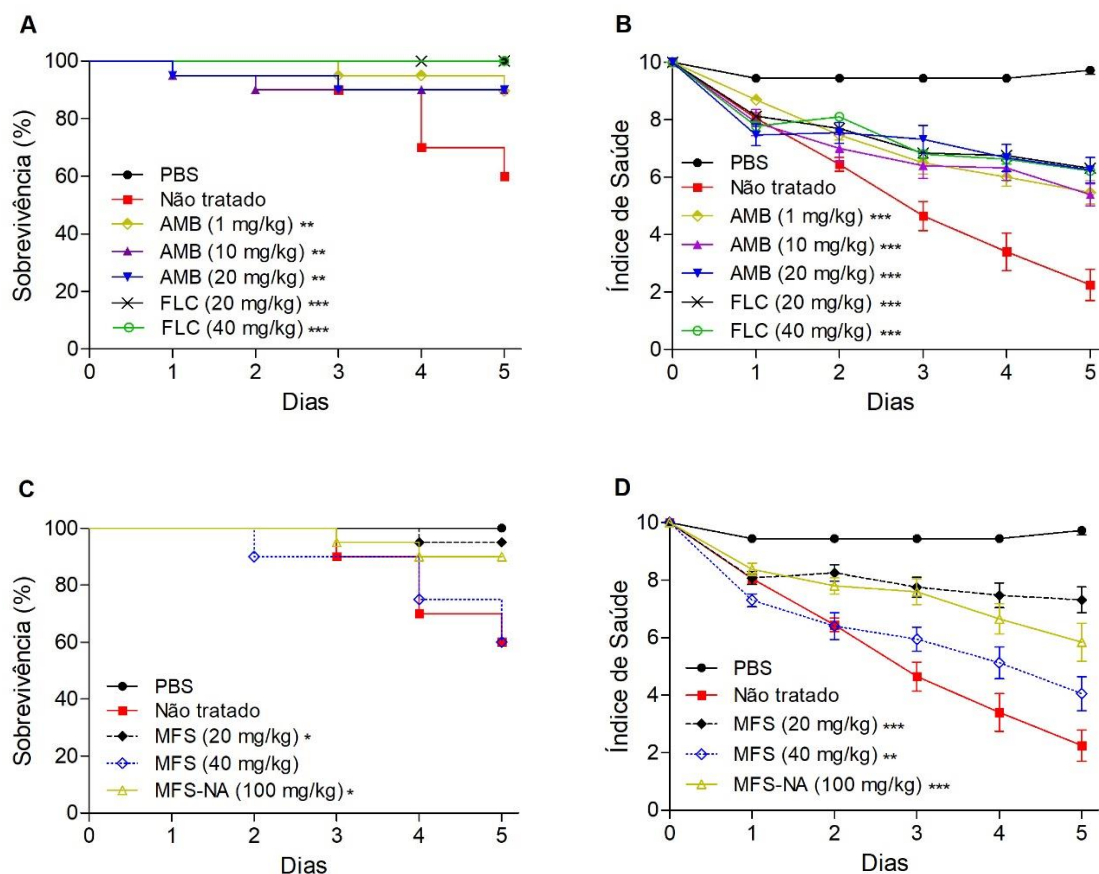
Larvas de *Galleria mellonella* infectadas com 5×10^5 UFC/larva, incubadas a 35 °C e analisadas a cada 24 h por 5 dias para a construção das curvas de sobrevivência (A) e índice de saúde (B). Os resultados foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo não infectado (PBS).

*4.3.5 Análise da eficácia antifúngica da miltefosina livre e encapsulada em nanopartículas de alginato em modelo de candidíase sistêmica em larvas de *Galleria mellonella**

Os tratamentos com os antifúngicos padrão foram eficientes contra a infecção pelo isolado CBS 10913, reduzindo significativamente a taxa de mortalidade e melhorando o índice de saúde das larvas ($p < 0,01$). FLC, em ambas as doses, foi o melhor tratamento, pois manteve 100 % de sobrevivência até o quinto dia de infecção. AMB, nas doses de 1, 10 e 20 mg/kg, manteve 100 % e 90 % de sobrevivência das larvas no último dia de análise, respectivamente (Figura 12A). Observou-se também a efetividade dos tratamentos com MFS livre ou MFS-NA, sendo que 20 mg/kg de MFS foi capaz de preservar 95 % das larvas até o quinto dia da infecção e MFS-NA (100 mg/kg) apresentou 90 % de sobrevivência ao final da análise ($p < 0,05$ para ambos, Figura 12C). Importante destacar também a melhora significativa do índice de saúde das larvas em todos os grupos tratados (Figuras 12B e 12D).

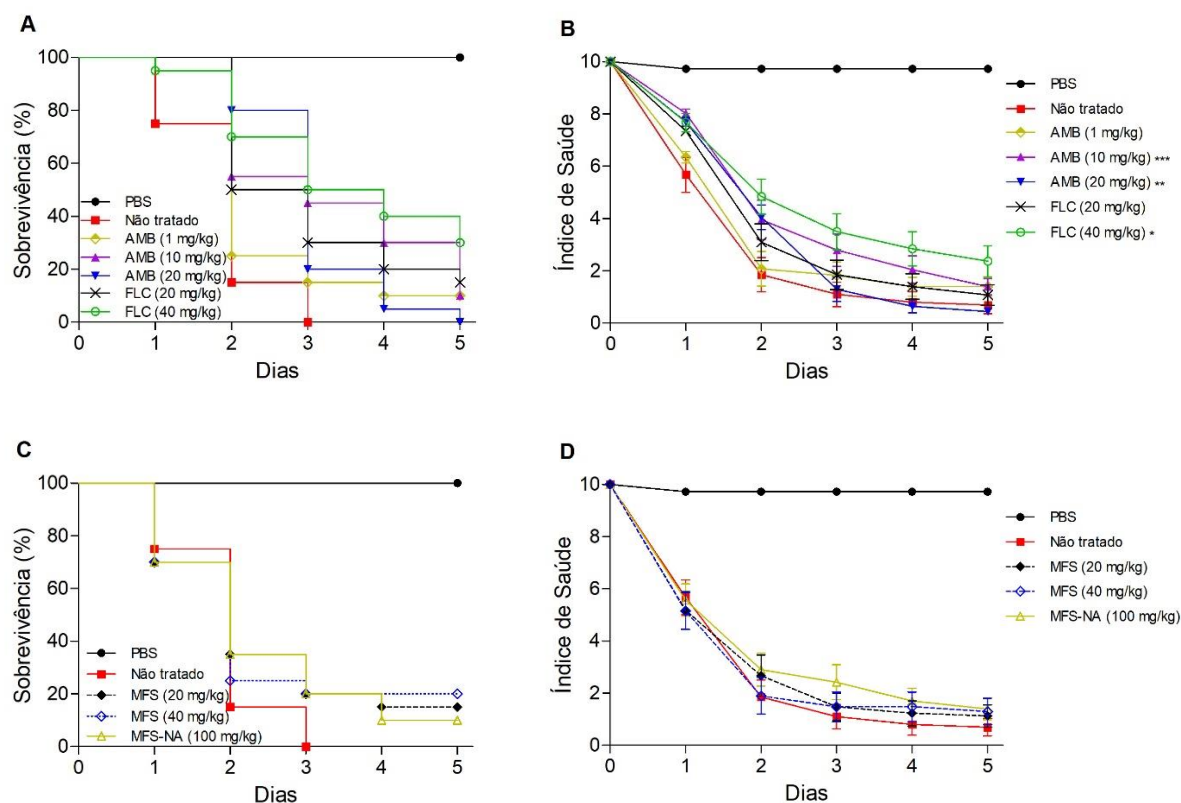
O perfil de sobrevivência da cepa considerada muito virulenta (CBS 12766) se manteve mesmo com os tratamentos, apesar de uma ligeira melhora na taxa de mortalidade de todos os grupos tratados até o quinto dia pós infecção, não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo infectado e não tratado (Figura 13A). Por outro lado, observou-se uma melhora significativa na morbidade das larvas quando tratadas com AMB (10 mg/kg e 20 mg/kg, $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente) ou FLC 40 mg/kg ($p < 0,05$) (Figura 13B). O tratamento com MFS prolongou a sobrevivência das larvas a 20 %, mas não foi estatisticamente significativo; um comportamento similar foi observado quando tratadas com MFS-NA (Figuras 13C e 13D)

Figura 12 – Curvas de sobrevivência e morbidade das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida auris* CBS 10913.



As larvas foram infectadas com 5×10^5 UFC/larva e tratadas após 30 minutos com diferentes doses de anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), miltefosina livre (MFS) ou em nanopartículas de alginato (MFS-NA). A sobrevivência (A e C) e morbidade (B e D) foram avaliadas a cada 24 h durante 5 dias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo não tratado (Sobrevivência: *One-way ANOVA*, *Dunnett's post-test*; Morbidade: *Two-way ANOVA*).

Figura 13 – Curvas de sobrevivência e morbidade das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida auris* CBS 12766.



As larvas foram infectadas com 5×10^5 UFC/larva e tratadas após 30 minutos com diferentes doses de anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), miltefosina livre (MFS) ou em nanopartículas de alginato (MFS-NA). A sobrevivência (A e C) e morbidade (B e D) foram avaliadas a cada 24 h durante 5 dias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo não tratado (Sobrevivência: *One-way ANOVA*, *Dunnnett's post-test*; Morbidade: *Two-way ANOVA*).

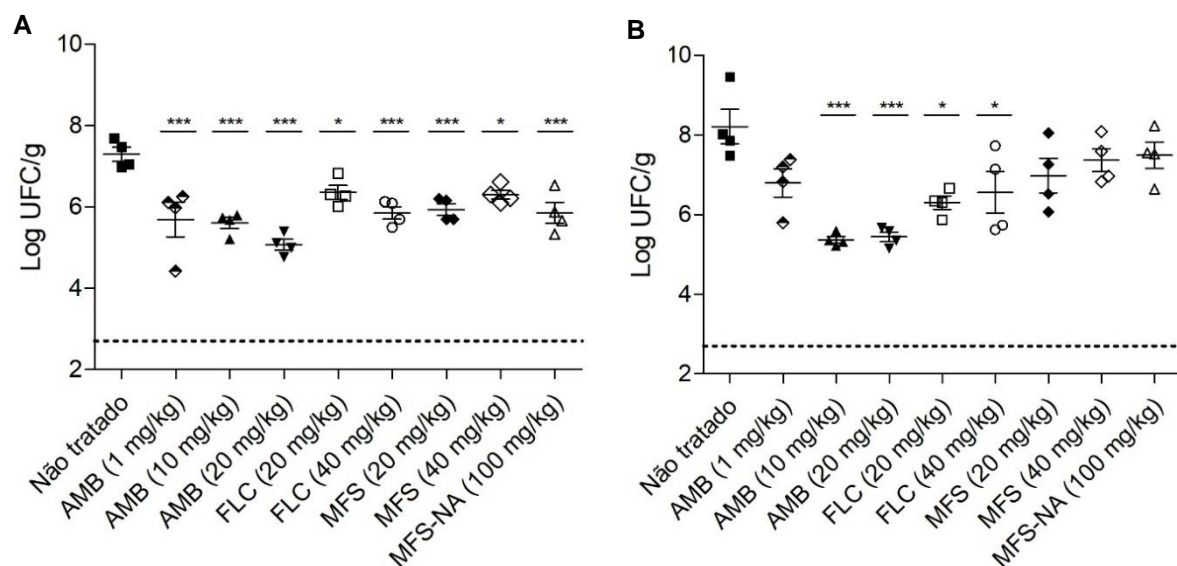
4.3.6 Determinação da carga fúngica e análise histopatológica em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com isolados clínicos de *Candida auris*

Houve redução significativa ($p < 0,05$) da carga fúngica nas larvas infectadas com o isolado sensível CBS 10913, em todos os tratamentos utilizados (Figura 14A). Ambas as doses de MFS livre testadas conseguiram reduzir significativamente 2 Logs da carga fúngica ($p < 0,05$) assim como MFS-NA (100 mg/kg) ($p < 0,001$) em larvas infectadas com CBS 10913 (Figura 14A). Os antifúngicos convencionais também reduziram a carga fúngica significativamente ($p < 0,05$) nas larvas infectadas com CBS 12766, exceto a menor dose de AMB (1 mg/kg). Observou-se uma redução de 0,5-1 Log UFC/g após infecção com CBS 12766 tratadas com MFS (20 e 40 mg/kg) e MFS-NA (100 mg/kg), apesar de não ter sido estatisticamente significativa (Figura 14B).

A análise histopatológica da carga fúngica no tecido larval infectado com o isolado CBS 10913 evidencia a eficácia dos tratamentos tanto com os antifúngicos padrão quanto com a MFS e MFS-NA, sendo que AMB (10 e 20 mg/kg) foi o tratamento mais eficiente na redução da carga fúngica e na redução da disseminação no tecido (Figura 15C); a redução foi similar nos grupos tratados com AMB (1 mg/kg), FLC e MFS nas doses testadas (Figuras 15E e 15G). O tratamento com MFS-NA também reduziu a carga fúngica e a disseminação no tecido larval de *G. mellonella* em comparação ao grupo não tratado, o que corrobora com os dados de contagem de UFC (Tabela 8, Figura 15I).

Os resultados da histopatologia das larvas infectadas com CBS 12766 mostraram uma maior redução da carga fúngica e disseminação nos grupos tratados com AMB (10 mg/kg), FLC (ambas doses) e MFS (20 mg/kg) (Figuras 15D, 15F e 15H) e, apesar de não ser significativo na contagem de UFC, houve uma ligeira redução nos grupos tratados com AMB (1 mg/kg), MFS (40 mg/kg) e MFS-NA (100 mg/kg) (Tabela 8, Figura 15J). Adicionalmente, a análise do tecido larval permitiu a visualização do aumento da quantidade de granulomas em alguns grupos, possivelmente relacionado com a virulência da cepa e a capacidade de contenção da infecção auxiliada pelo tratamento aplicado. Nos grupos infectados com CBS 10913 (menos virulenta), os tratamentos mais eficientes apresentaram menor quantidade de granulomas, enquanto nos grupos infectados com CBS 12766 (mais virulenta) houveram mais granulomas nos melhores tratamentos (Tabela 8, Figuras 15C-E e 15G-I).

Figura 14 – Carga fúngica em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida auris*.



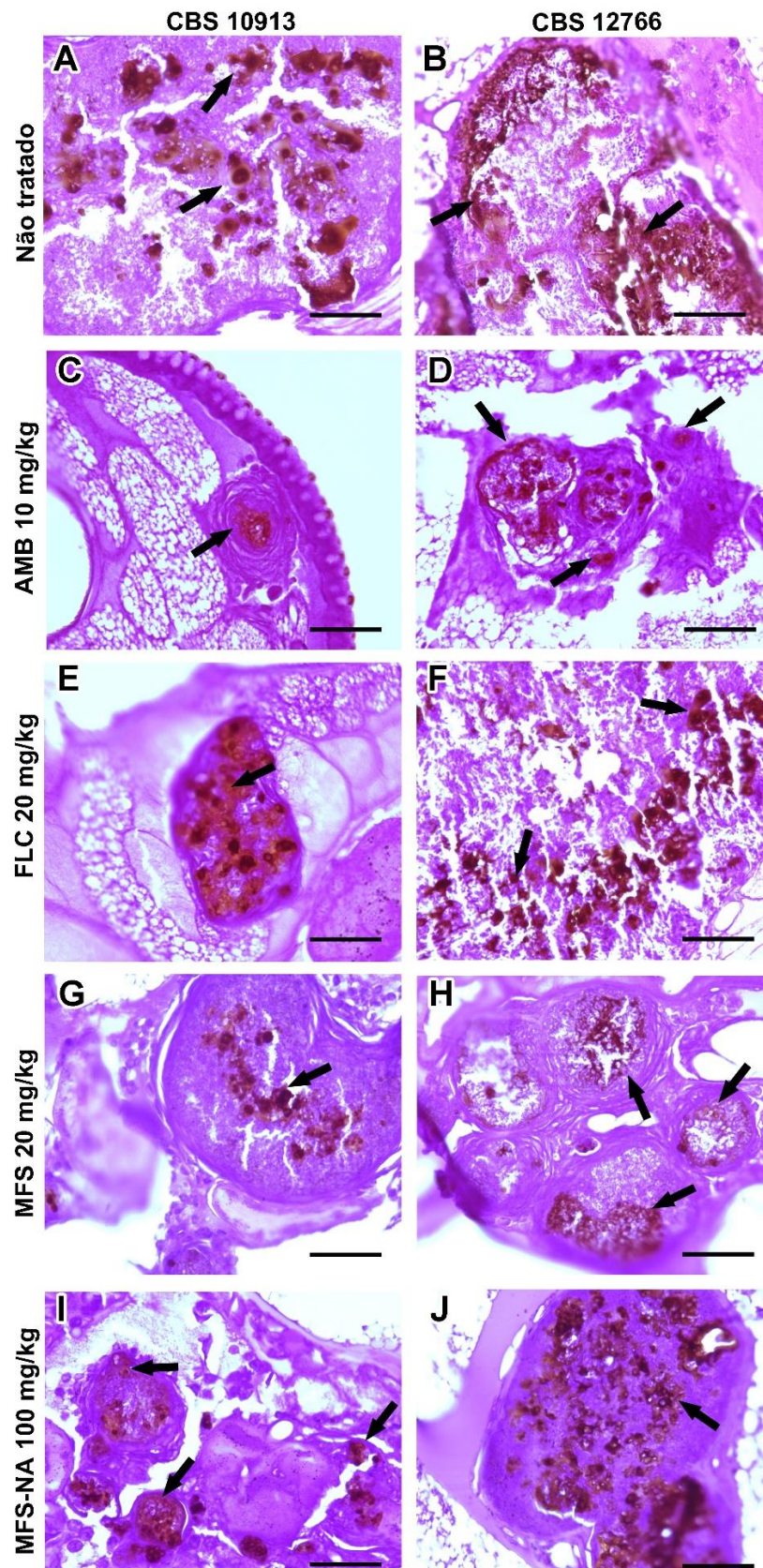
Carga fúngica do tecido larval de *Galleria mellonella* infectado com *Candida auris* 5×10^5 UFC/larva (**A**: CBS 10913 ou **B**: CBS 12766) e tratado após 30 min com anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), miltefosina livre (MFS) ou em nanopartículas de alginato (MFS-NA). Os dados de carga fúngica estão representados pela média \pm desvio padrão. A linha tracejada representa o limite de detecção da técnica ($\pm 2,7$ log UFC/g). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo não tratado.

Tabela 8 – Análise semi-quantitativa da carga fúngica, disseminação e formação de granuloma em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida auris* (CBS 10913 e CBS 12766) não tratadas e tratadas com anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), miltefosina livre (MFS) ou em nanopartículas de alginato (MFS-NA).

Cepas	Carga fúngica	Disseminação	Granuloma
<i>Candida auris</i> CBS 10913			
PBS	0	0	0
Não tratado	+4	+4	+4
AMB 1 mg/kg	+1/+2	+1/+2	+2
AMB 10 mg/kg	+1	+1	+1/+2
AMB 20 mg/kg	+1	+1	+1/+2
FLC 20 mg/kg	+1/+2	+1/+2	+3
FLC 40 mg/kg	+1/+2	+1/+2	+3
MFS 20 mg/kg	+1/+2	+1/+2	+4
MFS 40 mg/kg	+1/+2	+1/+2	+4
MFS-NA 100 mg/kg	+2/+3	+2/+3	+4
<i>Candida auris</i> CBS 12766			
PBS	0	0	0
Não tratado	+4	+4	+1
AMB 1 mg/kg	+3/+4	+3/+4	+2
AMB 10 mg/kg	+1/+2	+1/+2	+2
AMB 20 mg/kg	+2	+2	+2
FLC 20 mg/kg	+1/+2	+1/+2	+1
FLC 40 mg/kg	+1/+2	+1/+2	+2
MFS 20 mg/kg	+1/+2	+1/+2	+2
MFS 40 mg/kg	+3/+4	+3/+4	+4
MFS-NA 100 mg/kg	+3	+3	+4

0: sem fungos; +1: até 5 elementos fúngicos por campo; +2: de 6 a 20 elementos fúngicos por campo; +3: de 20 a 50 elementos fúngicos por campo; +4: mais de 50 elementos fúngicos por campo. Lâminas visualizadas por microscopia óptica no aumento de 400x.

Figura 15 – Análise histopatológica do tecido larval de *Galleria mellonella* infectado com *Candida auris*.



Secções histológicas do tecido larval de *G. mellonella* infectado com *Candida auris* 5×10^5 UFC/larva (isolados CBS 10913 ou CBS 12766) visualizadas em microscópio óptico no aumento de 400x. **A e B:** grupo não tratado; **C e D:** grupo AMB (10 mg/kg); **E e F:** grupo FLC (20 mg/kg); **G e H:** grupo MFS (20 mg/kg); **I e J:** grupo MFS-NA (100 mg/kg). Setas pretas indicam leveduras. Barras: 50 μ m.

4.4 Padronização da imunossupressão em modelo murino

A leucopenia dos animais foi acompanhada após a administração de ciclofosfamida através da contagem do número de leucócitos totais. Inicialmente realizou-se a contagem dos leucócitos em um indivíduo saudável, antes da administração do imunossupressor, que indicou 11.408 leucócitos/mm³, o que corroborou com os valores de referência para camundongos Balb/c adultos (SANTOS et al., 2016). No dia 0 (simulando o dia da infecção), observou-se que houve uma queda de aproximadamente 10 vezes o número de leucócitos, com uma média de 1237 leucócitos/mm³. Após a segunda dose de ciclofosfamida administrada no dia +1, houve maior redução dos leucócitos para média de 623 leucócitos/mm³ no dia +2. Observou-se a manutenção da leucopenia até o oitavo dia pós imunossupressão, com média de 413 leucócitos/mm³ no dia +4; 3.354 leucócitos/mm³ no dia +6 e o retorno aos valores normais no dia +8 com média de 11.232 leucócitos/mm³ (Tabela 9 e Figura 16).

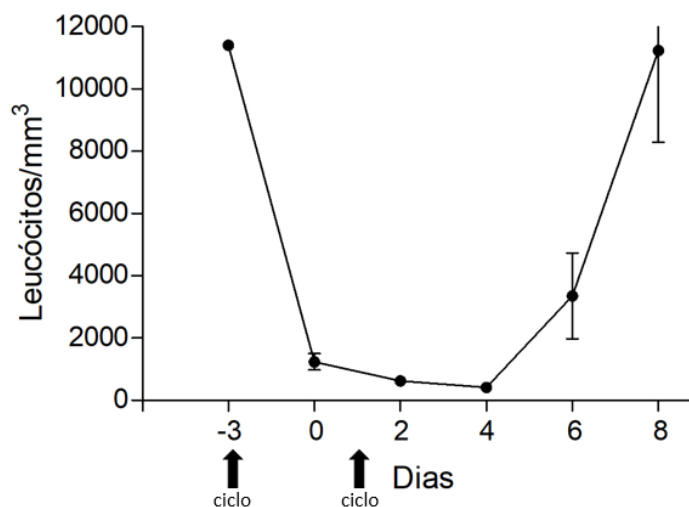
Entretanto, foram observadas características de fraqueza e estresse nos animais, que podem ter relação com os efeitos adversos da imunossupressão, visto também que todos os animais foram à óbito em até 10 dias após a administração do fármaco (Tabela 9). Assim, foi estabelecido que apenas uma dose do imunossupressor seja suficiente para promover a leucopenia nos animais, assim como 3 dias após a imunossupressão pode ser ideal para realizar a infecção com *C. auris* ou *Aspergillus*.

Tabela 9 – Contagem de leucócitos após a imunossupressão dos camundongos com ciclofosfamida.

Animal	Leucócitos/mm ³						
	Dia -3 (Ciclo1)	Dia 0	Dia 1 (Ciclo2)	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8
1		1960		1008	874	356	8295
2		344		-	500	5994	14170
3		1093		473	129	-	-
4	11408	1462	NR	469	135	5380	-
5		1325		540	425	1687	-
Média		1237		623	413	3354	11232

Ciclo1 – Administração de ciclofosfamida i.p. 200 mg/kg. Ciclo2 – Administração de ciclofosfamida i.p. 150 mg/kg. No dia 6 o animal 3 veio à óbito; no dia 7 os animais 4 e 5 vieram à óbito. NR – não realizado.

Figura 16 – Curva de contagem de leucócitos após a imunossupressão dos camundongos com ciclofosfamida.



Os camundongos (n=5) foram submetidos a duas doses de imunossupressão por ciclofosfamida sendo 200 mg/kg no dia -3 e 150 mg/kg no dia +1. As setas pretas indicam os dias de administração da ciclofosfamida.

5 DISCUSSÃO

A estratégia de reposicionamento de fármacos é interessante pela grande vantagem na redução do tempo e custo de desenvolvimento do tratamento e vem se tornando cada vez mais interessante aliado às técnicas de nanotecnologia com o objetivo de otimizar o esquema terapêutico, além de driblar o crescente aumento de isolados resistentes aos tratamentos convencionais. Desse modo, este trabalho destaca a atividade da MFS livre e em nanopartículas de alginato (MFS-NA) *in vitro* e *in vivo* frente a infecções fúngicas por *A. fumigatus*, *A. flavus* e *C. auris*.

O perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos de *Aspergillus* spp. foi determinado segundo o protocolo do CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), e todas as cepas foram consideradas sensíveis a AMB e ao VRC. MFS apresentou atividade inibitória *in vitro* contra *A. fumigatus* em concentrações similares à AMB (CIMs 0,5 a 2 µg/mL), enquanto contra *A. flavus* os valores de CIM foram maiores (CIMs 2 a 16 µg/mL). Esse efeito já foi descrito anteriormente, corroborando com os dados encontrados por Widmer e colaboradores (2006) que definiram a CIM de 2 µg/mL para dez cepas de *A. fumigatus* e entre 2 e 16 µg/mL para *A. flavus*. Essa faixa de CIM também foi definida para cepas de *Aspergillus* spp. por Biswas e colaboradores (2013). Além disso, o efeito fungicida em 2 µg/mL da MFS sobre a maioria as cepas de *A. fumigatus* foi esperado, visto que a literatura aponta efeito

fungicida em 4 µg/mL para essa espécie fúngica (WIDMER et al., 2006). Já a identificação do efeito antifúngico da MFS-NA sobre *Aspergillus* spp. foi inédita, com valores de CIM em torno de 600 µg/mL.

O uso de terapia de combinação apresenta vantagens que incluem redução da dose dos fármacos associados a efeitos colaterais consideráveis e atividade aditiva dos fármacos para aumentar a eficiência e reduzir a duração do tratamento (LIVENGOOD; DREW; PERFECT, 2020). A atividade de agentes antimicrobianos é considerada sinérgica quando, em combinação, ocorre a diminuição da concentração necessária de ambos fármacos para causar inibição do crescimento microbiano e pode ser determinada pelo método de *checkerboard* baseado na técnica de microdiluição que utiliza uma matriz bidimensional de concentrações de compostos-teste para definir as susceptibilidades (LEWIS & KONTOYIANNIS, 2005; LIVENGOOD; DREW; PERFECT, 2020). A combinação de MFS com VRC apresentou sinergismo frente à *A. fumigatus* em 3 concentrações testadas, com redução de 8 vezes a concentração mínima necessária para inibir 50 % do crescimento fúngico de ambos fármacos, comparado com a ação das drogas sozinhas. Combinações de MFS com agentes azólicos foram reportadas previamente por Biswas e colaboradores (2013) frente a 20 fungos filamentosos patogênicos, onde foi observado sinergismo da MFS com posaconazol (POS) sobre isolados de *Fusarium oxysporum*, *Lichtheimia corymbifera*, *Mucor indicus*, *Mucor racemosus* e *Rhizopus oryzae*; e da MFS com VRC sobre *Scedosporium prolificans*, *L. corymbifera*, *R. oryzae* e *Rhizomucor* sp. O trabalho de Imbert e colaboradores (2014) verificou a atividade sinérgica da combinação de MFS e VRC sobre isolados de *Aspergillus* spp. onde houve sinergismo para 5 dos 12 isolados testados de *A. fumigatus*, com CIM para VRC que variou entre 0,125-0,5 µg/mL e em combinação reduziu para 0,03-0,25 µg/mL e a CIM para MFS que variou entre 4-16 µg/mL e reduziu para 0,5-4 µg/mL. Além disso, foram testadas também sobre 3 isolados de *A. flavus* e apesar da diminuição expressiva dos valores de CIM para MFS de 16->32 µg/mL sozinha para 0,5-1 µg/mL em combinação, não houve redução da CIM para VRC (0,25-0,5 µg/mL sozinho e 0,125-0,25 µg/mL em combinação), portanto o resultado foi indiferente (IMBERT et al., 2014), semelhante ao encontrado no nosso trabalho para o isolado 998 de *A. flavus*. Para dar continuidade aos ensaios *in vivo*, o isolado de *A. fumigatus* 1220 e *A. flavus* 998 foram

escolhidos pelos seus perfis de susceptibilidade representar a maioria dos isolados clínicos testados.

Neste trabalho também foram utilizadas duas cepas representativas de *C. auris*, que apresentaram perfil de sensibilidade para a maioria dos antifúngicos padrão, exceto CBS 12766 que foi resistente ao FLC (CIM \geq 64 $\mu\text{g/mL}$), segundo os valores de ponto de corte para *C. auris* definidos pelo CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2020). Os resultados obtidos corroboram com os descritos por Larkin et al., (2017) que obteve as mesmas CIMs dos antifúngicos convencionais para estas cepas. Observou-se que, apesar do isolado CBS 12766 ser definido como sensível, apresentou um perfil mais tolerante a todos os antifúngicos testados, com exceção da MFG. Outros trabalhos também caracterizaram a maioria dos isolados de *C. auris* como resistentes ou tolerantes aos azóis, mas susceptíveis às equinocandinas (SATO et al., 2009; OH et al., 2011). Também foi visto que a AMB se apresentou menos efetiva contra cepas de *C. auris* quando comparado às outras espécies de *Candida* (BORMAN; SZEKELY; JOHNSON, 2016). O estudo da cinética de morte de *C. auris* demonstrou que a redução de 3 Logs de UFC/mL demorou de 3 a 4 vezes mais que para espécies sensíveis a AMB, mesmo em concentrações 4xCIMs, maior ainda do que o encontrado para *C. lusitanae* (PFALLER; SHEEHAN; REX, 2004) e *C. guilliermondii* (CANTON et al., 2006) (DUDIUK et al., 2019).

O modelo de *Galleria mellonella* foi escolhido para avaliar a eficácia da MFS livre e MFS-NA frente à aspergilose e candidíase sistêmica, considerando as vantagens já descritas desse modelo na triagem de novas drogas antimicrobianas (KAVANAGH & FALLON, 2010; TREVIJANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2019). O interesse cada vez mais crescente na utilização deste modelo evidencia-se na pesquisa bibliográfica reportada por Cutuli e colaboradores (2019) que destaca um aumento de mais de 42 % nas publicações de artigos científicos entre 2016 e 2018 contendo as palavras-chave “*Galleria mellonella*” e “*microbiologia*”, quando comparado com os publicados nos últimos 10 anos (CUTULI et al., 2019). Diversos trabalhos utilizam esse modelo invertebrado para triagem de toxicidade de novos compostos e de atividade antimicrobiana (CUTULI et al., 2019). Ademais, o estudo da virulência de patógenos é importante para entender a interação com o hospedeiro e, neste caso, usamos um modelo invertebrado que nos fornece algumas informações sobre o comportamento da infecção por *Aspergillus* spp. ou *C. auris* para prosseguir

com uma triagem e seleção de doses antes de aplicá-las em modelos de estudo mais complexos, como murino.

Observou-se a redução de cerca de 75 % da sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas com *A. fumigatus* três dias após a infecção e dois dias pós-infecção quando com *A. flavus*. Nossos dados são similares aos encontrados previamente para cepas padrão de *A. fumigatus* (RENWICK et al., 2006; JACKSON; HIGGINS; LIN, 2009; SLATER et al., 2011) e para 30 isolados de *A. flavus*, confirmando o perfil mais virulento dessa espécie (LEGER; SCREEN; SHAMSPIRZADEH, 2000; BINDER; MAURER; LASS-FLÖRL, 2016).

C. auris CBS 12766 foi considerada altamente virulenta devido a redução da sobrevivência a cerca de 60 % após 24 h de infecção, enquanto o isolado CBS 10913 atinge esse valor somente no quinto dia pós-infecção. A virulência de *C. auris* pode estar relacionada com capacidade de produção de fosfolipases e secreção de proteinases, uma vez que já foi demonstrada por Larkin et al. (2017) a presença da atividade de fosfolipases na cepa CBS 12766, a qual apresentou maior virulência, e ausência destas enzimas no isolado CBS 10913, que exibiu pouca virulência em modelo de *G. mellonella* visto neste trabalho. Entretanto, essa habilidade varia entre os isolados (LARKIN et al., 2017) e deve-se levar em consideração outros aspectos que conferem patogenicidade nesta espécie (BORMAN; SZEKELY; JOHNSON, 2016).

O tratamento com MFS livre (20 mg/kg) aumentou a taxa de sobrevivência e melhorou o índice de saúde das larvas de *G. mellonella* infectadas com *A. fumigatus* e ambos isolados de *C. auris*, e levou a uma redução na carga fúngica no tecido larval como observado pela contagem de UFC/g e nas análises histopatológicas, apesar de apresentar significância estatística apenas com o isolado CBS 10913 de *C. auris*. A maior dose de MFS (40 mg/kg) também promoveu uma ligeira melhora nos índices das larvas infectadas com *A. fumigatus* ou *C. auris* CBS 12766 e conseguiu reduzir a carga fúngica em 1,5 Log tanto no modelo de infecção de *A. fumigatus* quanto da cepa sensível de *C. auris* CBS 10913 mesmo apresentando queda nos índices de saúde com esse tratamento, que pode estar relacionado com a toxicidade da MFS, como já foi demonstrado seu efeito tóxico em larvas de *G. mellonella* em concentrações iguais ou maiores que 50 mg/kg (de BASTIANI, 2018; SPADARI et al., 2019), entretanto mais estudos de toxicidade dose-dependente devem ser executados para comprovar essa hipótese. Em contrapartida, nenhuma dose da MFS testada foi capaz de reduzir a

mortalidade e carga fúngica nas larvas infectadas por *A. flavus*, provavelmente em decorrência da maior tolerância da espécie ao composto, como visto nos dados *in vitro* deste trabalho e em outros previamente publicados (WIDMER et al., 2006; BISWAS et al., 2013; IMBERT et al., 2014).

O uso da combinação entre a MFS + VRC (20 e 10 mg/kg, respectivamente) melhorou significativamente o desempenho comparado com o tratamento só com MFS (20 mg/kg), além de apresentar diferença estatística entre a redução da carga fúngica na combinação comparado com o grupo VRC (10 mg/kg) nas larvas infectadas com *A. fumigatus*, apontando que o tratamento em combinação foi melhor que quando utilizados sozinhos, demonstrando pela primeira vez o efeito sinérgico desses fármacos *in vivo* em modelo invertebrado de *G. mellonella*. Para os grupos infectados com *A. flavus* houve uma melhora da combinação em relação ao tratamento com MFS (20 mg/kg), mas essa foi similar ao encontrado com VRC (10 mg/kg) sozinho, apesar de não causar redução na carga fúngica.

O desempenho do tratamento com MFS-NA (100 mg/kg) foi semelhante ao visto com MFS (20 mg/kg) para *Aspergillus* spp. Estudos prévios mostram que *A. fumigatus* possui diversos fatores de virulência descritos como menor tamanho de conídios (PASQUALOTTO, 2009), menor tempo de germinação (ARAUJO & RODRIGUES, 2004), maior termotolerância (ARAUJO & RODRIGUES, 2004), além da produção de enzimas extracelulares (SHIBUYA et al., 2006; MELLON; COTTY; DOWD, 2007) e toxinas (como aflatoxinas e gliotoxinas), alguns desses muitas vezes ausentes em *A. flavus* (KUPFAHL et al., 2007; PASQUALOTTO, 2009). Contudo, apesar de *A. fumigatus* apresentar tais características, foram descritos em trabalhos anteriores maior virulência de *A. flavus* em modelos animais (JOHNSON et al., 2000; MOSQUERA et al., 2001; PASQUALOTTO, 2009) incluindo em larvas de *G. mellonella*, com morte de todas as larvas no segundo dia pós-infecção (PASQUALOTTO, 2009), similar ao reportado neste trabalho. No modelo de infecção com *A. fumigatus* o tratamento com maior índice de sobrevivência foi utilizando MFS-NA (100 mg/kg), entretanto apesar da contagem de carga fúngica se manter próximo do grupo não tratado, foi observado um grande aumento na quantidade de granulomas ao longo do tecido larval. O processo de nodulação faz parte da imunidade celular de *G. mellonella* e ocorre com o reconhecimento dos patógenos, prendendo-os em agregados de hemócitos, enquanto a melanização ocorre dentro dos nódulos

(KAVANAGH & REEVES, 2004). A formação desses granulomas é realizada por células granulares e plasmócitos que se ligam ao micro-organismo e desencadeiam a união de plasmócitos que circundam o patógeno, formando uma cápsula multicelular onde o patógeno é morto pela liberação de moléculas antimicrobianas por essas células (TREVIJANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2019). Então, sugere-se que os agentes antifúngicos auxiliem nesse processo imunológico de contenção da infecção, resultando no aumento da taxa de sobrevivência larval.

Em contraste, a MFS-NA não foi eficaz contra a infecção por *A. flavus*, mesmo com uma redução de 0,5 Log na contagem de UFC. Contudo, quando utilizado em combinação com VRC observou-se uma melhora significativa nos índices, inclusive com diferença estatística entre a combinação e o tratamento com VRC sozinho, indicando o sinergismo *in vivo* neste modelo.

Esse mesmo comportamento foi observado para os tratamentos das larvas infectadas com *C. auris*, e nossos dados corroboram com resultados do tratamento de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans*, *C. neoformans* e *C. gattii* utilizando MFS livre e MFS-NA descritos anteriormente (SPADARI et al., 2019). Importante destacar que os tratamentos antifúngicos nas larvas infectadas com o isolado de *C. auris* menos virulento (CBS 10913) foi mais eficaz quando comparado com o isolado mais virulento (CBS 12766), que pode estar relacionado com maior expressão de fatores de virulência e menor tempo de crescimento fúngico, prejudicando a atividade inibitória dos compostos (LARKIN et al., 2017). Particularmente para MFS-NA, o efeito inibitório pode ter sido dificultado devido à característica de liberação sustentada das nanopartículas, em que atingem o pico de liberação 6 h após a administração (SPADARI et al., 2019) e, neste modelo, pode não atingir a concentração necessária para inibir a replicação fúngica antes de causar danos e/ou morte do hospedeiro.

A partir dos dados preliminares, consideramos que a MFS pode ser uma alternativa terapêutica em potencial para infecções fúngicas sistêmicas, incluindo para cepas resistentes e a formulação contendo MFS-NA também foi eficiente na manutenção da atividade antifúngica da MFS com a redução significativa da toxicidade como demonstrados em trabalhos prévios (ISHIDA et al., 2017; SPADARI et al., 2019; de BASTIANI et al., 2020).

As vantagens de usar as nanopartículas de alginato como nanocarreador da MFS incluem a possibilidade do aumento da dosagem do fármaco, redução da frequência de administração devido a liberação sustentada, mantendo assim a eficácia antimicrobiana e consequente redução dos efeitos tóxicos, como demonstrado no trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa (SPADARI et al., 2019).

Estudos com a MFS tem demonstrado eficiência antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, como visto que o uso da MFS reduziu a virulência de *Acinetobacter baumannii* em modelo de *G. mellonella* (FIESTER et al., 2018), e também como alternativa no tratamento de doenças fúngicas, mas apesar da sua eficácia, a toxicidade pode levar aos efeitos colaterais gastrointestinais como vômito e diarreia, efeitos hemolíticos e hepáticos (DORLO et al., 2012), que podem ser evitados ao utilizar sistemas nanoestruturados, como os nanocarreadores poliméricos e lipídicos de MFS produzidos por vários grupos de pesquisa (EISSA et al., 2015; DA GAMA BITENCOURT et al., 2016; KUMAR et al., 2016; NAJAFIAN et al., 2016; TRIPATHI et al., 2017; VALENZUELA-OSES et al., 2017; KAVIAN et al., 2019; EISSA et al., 2020; DAR et al., 2020). Além disso, os sistemas nanoestruturados permitem a administração de maiores doses e/ou redução da frequência de administração do fármaco. Nanopartículas poliméricas contendo MFS foram desenvolvidas utilizando Plurônico F127 (VALENZUELA-OSES et al., 2017), PLGA-PEG (KUMAR et al., 2016) ou alginato (SPADARI et al., 2017) e tem como características em comum a redução dos efeitos colaterais relacionados a ingestão, citotoxicidade e hemólise, e manutenção da atividade antiparasitária e antifúngica da MFS, reforçando o potencial relevante da formulação desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa na terapêutica dessas doenças.

Já foi demonstrado o efeito antifúngico da MFS-NA em modelo de *G. mellonella* frente a *C. albicans* onde as taxas de sobrevivência, morbidade e carga fúngica foram reduzidas tanto quanto o tratamento padrão com AMB (de BASTIANI et al., 2018; SPADARI et al., 2019). Adicionalmente, é conhecida a ação da MFS livre ou incorporada em nanopartículas de alginato em modelo *in vivo* de criptococose em *G. mellonella* (SPADARI et al., 2019). Em modelo murino, foi demonstrado que MFS-NA (2 % MFS) em dose única foi capaz de controlar a infecção fúngica em candidíase vaginal (de BASTIANI et al., 2020); e a redução da frequência da administração do

fármaco deve-se ao perfil de liberação sustentada promovida pelo nanocarreador e a da capacidade do alginato em aderir a mucosa vaginal (de BASTIANI et al., 2020).

A utilização do modelo de *G. mellonella* tem se tornado cada vez mais interessante pelas diversas vantagens associadas incluindo as similaridades das respostas imunológicas que podem ser comparáveis às observadas em mamíferos (BROWNE et al., 2013). Vem sendo reportados estudos demonstrando a considerável correlação dos resultados das infecções no modelo invertebrado de *G. mellonella* com os modelos animais mamíferos como descrita por MacCallum, Desbois e Coote (2013) a consonância dos dados de aumento de sobrevivência com tratamento de larvas e camundongos infectados com *C. albicans* e tratados com uma combinação entre caspofungina e peptídeos antimicrobianos (DsS3 1-16). Do mesmo modo, foi verificada a redução da mortalidade e melhora da saúde de larvas infectadas com *C. albicans* e tratadas com 1 mg/kg de AMB, comparável com o utilizado na terapia clínica (até 1,5 mg/kg/dia) (KAVANAGH & SHEEHAN, 2018), semelhante também ao encontrado no nosso trabalho, onde 1 mg/kg reduziu a mortalidade e carga fúngica em larvas infectadas com *C. auris* (sensível e resistente), salientando a relevância da utilização deste modelo na triagem de compostos e/ou doses terapêuticas.

Em infecção fúngica sistêmica utilizando modelo murino, Widmer e colaboradores (2006) observaram que a MFS livre de 3,6 mg/kg ou 7,2 mg/kg administrada via oral em camundongos diariamente por 5 dias não apenas controlou a infecção por *C. neoformans* nos pulmões e no cérebro, mas também reduziu a mortalidade de camundongos (WIDMER et al., 2006); e doses semelhantes são indicadas para o tratamento da leishmaniose (~ 2-5,5 mg/kg/dia) (DORLO et al., 2012). Além disso, o efeito inibitório da MFS *in vitro* sobre fungos, especialmente *C. auris* e *A. fumigatus*, é obtido em concentrações abaixo de 2 µg/mL, e até mesmo contra formas amastigotas de *Leishmania* spp. (EC50 de 1,3 a 15,2 µg/mL) (ESCOBAR et al., 2002). Para comparação, em 100-150 mg/dia, a MFS oral atinge uma concentração plasmática máxima em média de 30,8 µg/mL a 70 µg/mL em pacientes com leishmaniose (DORLO et al., 2012), uma faixa de concentração maior que os valores de CIM para *C. auris* e outros fungos, incluindo espécies intrinsecamente resistentes a vários antifúngicos como *F. oxysporum*, *F. solani*, *P. insidiosum*, *P. aphanidermatum*, *L. prolificans* e *S. prolificans* (KESSON et al., 2009; IMBERT et al., 2014; VILA et al., 2015; QUAESAET et al., 2018; LORETO et al., 2018).

Na prática clínica, a MFS foi utilizada em combinação com VRC no tratamento de encefalite amebiana granulomatosa causada por *Acanthamoeba* sp. em um paciente imunocompetente de 38 anos entre 2008 e 2009, onde após o diagnóstico de infecção por *Acanthamoeba* sp. foram administrados 100 mg de ambos fármacos oralmente duas vezes por dia (BID), durante 3 meses com total resolução do quadro, e os efeitos colaterais associados ao uso destes foram alterações nas funções renais, erupção cutânea e distúrbios gastrointestinais, os quais foram normalizados após o fim do tratamento (WEBSTER et al., 2012). Além desse, outros três casos já foram reportados utilizando MFS como terapia de resgate em infecções invasivas por *L. proliferans* (KESSON et al., 2009; TRUBIANO et al., 2014; QUAESAET et al., 2018).

O primeiro relato aponta o caso de uma paciente imunocompetente de 8 anos admitida com fratura exposta no osso pélvico que evoluiu para osteomielite com isolamento de *L. proliferans* resistente a AMB, 5-FC, FLC, VRC, itraconazol (ITC), cetoconazol e intermediário a terbinafina (TRB); foram administrados inicialmente VRC 4 mg/kg BID e TRB 125 mg/dia, entretanto não houve regresso do processo infeccioso e após 22 dias foi iniciada a combinação com MFS 2 mg/kg/dia e então a melhora seguiu lentamente; após 12 meses o tratamento foi cessado com sucesso associado a administração da MFS (KESSON et al., 2009). Posteriormente, foi relatada a utilização temporária da MFS como estratégia para driblar a interação medicamentosa e farmacogenética em um paciente de 67 anos diagnosticado com leucemia mieloide aguda e aspergilose invasiva em tratamento com AMB lipossomal e VRC, que após um mês desenvolveu endoftalmite por *L. proliferans* e logo disseminou-se para os pulmões e lobo temporal esquerdo; no entanto, foi identificada uma mutação no gene da citocromo P450 (CYP2C19) resultando num fenótipo de metabolização extensiva de VRC, e conseqüente dificuldade de alcançar a dose terapêutica de VRC, sendo então necessária a alteração do tratamento para MFS 50 mg, TRB 250 mg e POS 200 mg juntamente com um inibidor da CYP2C19 (cimetidina) com melhora do quadro após 6 meses de tratamento (TRUBIANO et al., 2014). E em 2018 foi publicado mais um relato de caso utilizando MFS em combinação no tratamento de osteomielite por *L. proliferans* multirresistente (resistente a VRC, MFG, CAS, AMB, ITC e POS) em um paciente imunocomprometido de 70 anos que foi administrado com VRC (200 mg BID) + TRB (500 mg BID), com o aumento da dosagem de VRC após 10 semanas para 800 mg BID; mesmo com a alta dosagem

de VRC não houve progresso do paciente, sem evidências significantes de interação médica ou de mutação de CYP2C19 e após 5 semanas iniciou-se a administração da MFS (50 mg três vezes por dia – TID) + VRC (800 mg BID) + TRB (500 mg BID) com relatos de efeitos colaterais como náuseas, fraqueza muscular e fototoxicidade, e a regressão dos sintomas e efeitos adversos foi observada após 6 meses de tratamento (QUAESAET et al., 2018). Esses relatos de casos indicam a utilidade da MFS para terapia de resgate frente a infecções fúngicas invasivas que têm poucas opções eficazes de medicamentos disponíveis, principalmente sobre espécies multirresistentes aos agentes utilizados na clínica. Assim, a MFS pode ser considerada uma alternativa importante para os antifúngicos convencionais no tratamento de micoses refratárias e nossos dados fornecem informações indispensáveis que podem apoiar estudos mais robustos.

6 CONCLUSÕES

A MFS livre e MFS-NA podem ser alternativas no tratamento de infecções fúngicas invasivas, como aquelas causadas por *Aspergillus* spp. e *Candida auris*, devido ao perfil fungicida da MFS e redução da sua toxicidade quando encapsulada em nanopartículas de alginato. Além disso, a combinação de MFS (livre ou encapsulada em nanopartículas de alginato) com o antifúngico VRC pode ser considerada como uma importante estratégia de melhoria do desempenho farmacológico na terapia de resgate contra infecções fúngicas invasivas graves. Vale ressaltar a importância da avaliação *in vivo* em modelo murino de aspergilose pulmonar e candidíase sistêmica para comprovar a manutenção da atividade antifúngica e redução da toxicidade relacionada ao tratamento com a miltefosina em nanopartículas de alginato.

7 PERSPECTIVAS

1. Padronizar o modelo murino de aspergilose pulmonar e avaliar a eficácia antifúngica da miltefosina em sistema nanocarreador de alginato;
2. Padronizar o modelo murino de candidíase sistêmica e analisar o efeito antifúngico da miltefosina em sistema nanocarreador de alginato.

REFERÊNCIAS

- ALANIO, A. et al. Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 6, p. E48-E49, 2020.
- ALEXIS, F. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, p. 505–515, 2008.
- AMORIM, D. S. DE et al. Infecções por *Aspergillus* spp: aspectos gerais. **Pulmão RJ**, v. 13, n. 2, p. 111–118, 2004.
- AQUINO, S. et al. Evaluation of viability of *Aspergillus flavus* and aflatoxins degradations in irradiated samples of maize. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 352-356, 2005.
- ARASTEHFAR, A. et al. COVID-19 Associated pulmonary aspergillosis (CAPA) - from immunology to treatment. **Journal of Fungi**, v. 6, p. 91, 2020.
- ARAUJO, R.; RODRIGUES, A. G. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 43354337, 2004.
- BARNES, P. D.; MARR, K. A. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 545–561, 2006.
- BEN-AMI, R. et al. Multidrug-resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, p. 195–203, 2017.
- BINDER, U.; MAURER, E.; LASS-FLÖRL, C. *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. **Fungal Biology**, v. 120, p. 288-295, 2016.
- BISWAS et al. *In vitro* activity of miltefosine as a single agent and in combination with voriconazole or posaconazole against uncommon filamentous fungal pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 2842-2846, 2013.
- BISWAS, C. et al. Functional disruption of yeast metacaspase, Mca1, leads to miltefosine resistance and inability to mediate miltefosine-induced apoptotic effects. **Fungal Genetics and Biology**, v. 67, p. 71–81, 2014.
- BITENCOURT, J. J. G. et al. Miltefosine-loaded lipid nanoparticles: Improving miltefosine stability and reducing its hemolytic potential toward erythrocytes and its cytotoxic effect on macrophages. **Biophysical Chemistry**, v. 217, p. 20–31, 2016.
- BJORNER, M.; ZHU, L. A minimally invasive, low stress method for serial blood collection in aging mice. **Pathobiology of Aging & Age-Related Diseases**, v. 9, p. 1647400, 2019.
- BLAIZE, M. et al. Fatal Invasive aspergillosis and coronavirus disease in an immunocompetent patient. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 7, p. 1636-1637, 2020.
- BONGOMIN, F. et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases – estimate precision. **Journal of Fungi**, v. 3, 57, 2017.
- BORMAN, A. M.; SZEKELY, A.; JOHNSON, E. M. Comparative pathogenicity of United Kingdom isolates of the emerging pathogen *Candida auris* and other key pathogenic *Candida* species. **mSphere**, v. 1, e00189-16, 2016.

- BORMAN, A. M.; SZEKELY, A.; JOHNSON, E. M. Isolates of the emerging pathogen *Candida auris* present in the UK have several geographic origins. **Medical Mycology**, v. 55, p. 563-567, 2017.
- BORBA-SANTOS, L. P. et al. Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with *in vitro* low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. **Journal Medical Microbiology**, 2015.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. *In vitro* antifungal activity of miltefosine and levamisole: their impact on ergosterol biosynthesis and cell permeability of dimorphic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1-8, 2015.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. *In vitro* inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 320-325, 2014.
- BRITZ, E.; GOVENDER, N. P. Global emergence of a multi-drug resistant fungal pathogen, *Candida auris*. **South Africa Journal of Infectious Disease**, v. 31, p. 3–4, 2016.
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 165rv13, 2012.
- BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, p.597–603, 2013.
- BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 236–242, 2012.
- BUTTS, A. et al. Structure-activity relationships for the antifungal activity of selective estrogen receptor antagonists related to tamoxifen. **PLoS One**, v. 10, p. e0125927, 2015.
- CADENA, J.; THOMPSON, G. R.; PATTERSON, T. F. Invasive Aspergillosis: Current strategies for diagnosis and management. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, p. 125-142, 2016.
- CALDERONE, R. A. (2002) Introduction and historical perspectives. **Candida and Candidiasis** (Calderone R., ed), pp. 15–25. ASM Press, Washington, DC.
- CALOGEROPOULOU, T. et al. Design and synthesis of potent antileishmanial cycloalkylidene-substituted ether phospholipid derivatives. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 4, p. 897–908, 2008.
- CANTON, E. et al. Killing kinetics of caspofungin, micafungin, and amphotericin B against *Candida guilliermondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 2829–2832, 2006.
- CANTON, J. et al. Contrasting phagosome pH regulation and maturation in human M1 and M2 macrophages. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, p. 3330 –3341, 2014.
- CARMONA, E.M.; LIMPER, A.H. Overview of treatment approaches for fungal infections. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, p. 393–402, 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antifungal Susceptibility Testing and Interpretation. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>. Acesso em: 06 jun. 2020.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Invasive Candidiasis Statistics. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/invasive/statistics.html>. Acesso em: 10 jul. 2020a.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Biggest threats. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html#auris>. Acesso em: 10 ago. 2020.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Tracking *Candida auris*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html>. Acesso em: 06 jun. 2020b.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Treatment and management of infections and colonization. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-treatment.html>. Acesso em: 06 jun. 2020c.

CHAABANE, F. et al. Review on antifungal resistance mechanisms in the emerging pathogen *Candida auris*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2788, 2019.

CHATTERJEE, S. et al. Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. **BMC Genomics**, 16:686, 2015.

CHENG Y, et al. Alginic acid nanoparticles prepared through counterion complexation method as a drug delivery system. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 4, p. 5325-5332, 2012.

CHOWDHARY, A. et al. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003633, 2013.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, e1006290, 2017.

CHOWDHARY, A. et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. 891–899, 2018.

Clinical Trials. Study on safety and pharmacokinetics of intravenous F901318 for fungal prophylaxis in AML patients. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02856178>. Acesso em: 16 jul. 2020a.

Clinical Trials. VL-2397 Compared to standard first-line treatment for invasive aspergillosis (IA) in adults. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03327727?term=NCT03327727&draw=2&rank=1>. Acesso em: 16 jul. 2020b.

Clinical Trials. A study of oral VT-1161 for the treatment of acute vaginal candidiasis (yeast infection) in patients with recurrent vaginal candidiasis. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03840616?term=VT-1161&draw=2&rank=4>. Acesso em: 16 jul. 2020c.

Clinical Trials. Safety and pharmacokinetics of VT-1598. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04208321?term=VT-1598&draw=2&rank=1>. Acesso em: 16 jul. 2020d.

Clinical Trials. Safety, tolerability and pharmacokinetics of APX001 administered intravenously. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02956499?term=NCT02956499&draw=2&rank=1>. Acesso em: 16 jul. 2020e.

Clinical Trials. Oral Ibrexafungerp (SCY-078) vs standard-of-care following IV echinocandin in the treatment of invasive candidiasis. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02244606?term=NCT02244606&draw=2&rank=1>. Acesso em: 16 jul. 2020f.

Clinical Trials. CD101 compared to caspofungin followed by oral step down in subjects with candidemia and/or invasive candidiasis-bridging extension. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02734862?term=NCT02734862&draw=2&rank=1>. Acesso em: 16 jul. 2020g.

Clinical Trials. CD101 vs standard of care in subjects with acute vaginal yeast infections. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02733432?term=NCT02733432&draw=2&rank=1>. Acesso em: 16 jul. 2020h.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 28, n. 16, p. 1-13, 2008.

COLOMBO, A. L. et al. Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter centers sequentially conducted over a 9-year Period. **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 10, p. 1489–1498, 2014.

COMPAIN, F. et al. *In vitro* activity of miltefosine in combination with voriconazole or amphotericin B against clinical isolates of *Scedosporium* spp. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 309-311, 2015.

CUTULI, M. A. et al. *Galleria mellonella* as a consolidated *in vivo* model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 527-541, 2019.

da GAMA BITENCOURT, J. J. et al. Miltefosine-loaded lipid nanoparticles: improving miltefosine stability and reducing its hemolytic potential toward erythrocytes and its cytotoxic effect on macrophages. **Biophysical Chemistry**, v. 217, p. 20-31, 2016.

DAGENAIS, T. R. T.; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 3, p. 447–65, 2009.

DAR, M. J. et al. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis with novel amphotericin B-miltefosine co-incorporated second generation ultra-deformable liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 573, p. 118900, 2020.

de BASTIANI, F. W. M. S. **Sistemas de liberação para anfotericina B e miltefosina no tratamento das candidíases**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

de BASTIANI, F. W. M. S. et al. Nanocarriers provide sustained antifungal activity for amphotericin B and miltefosine in the topical treatment of murine vaginal candidiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2976, 2020.

de LACORTE SINGULANI, J. et al. Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella* model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, p. 292–297, 2016.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2576-2597, 2012.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 30-36, 2003.

DUDIUK, C. et al. Antifungal activity and killing kinetics of anidulafungin, caspofungin and amphotericin B against *C. auris*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, p. 2295-2302, 2019.

EISSA, M. M. et al. A single oral fixed-dose praziquantel-miltefosine nanocombination for effective control of experimental schistosomiasis mansoni. *In press*, **Research Square**, 2020.

EISSA, M. M. et al. Miltefosine lipid nanocapsules for single dose oral treatment of *Schistosomiasis mansoni*: A preclinical study. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0141788, 2015.

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

ESCANDÓN, P. et al. Molecular epidemiology of *Candida auris* in Colombia reveals a highly related, countrywide colonization with regional patterns in amphotericin B resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, p. 15-21, 2019.

ESCOBAR, P. et al. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, v. 81, p. 151–157, 2002.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3251-3257, 2010.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5150-5154, 2011.

EUCAST. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, p. 1–21, 2017.

FIESTER, S. E. et al. Miltefosine reduces the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. e01409-18, 2018.

FISHER, M. C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, p. 186–194, 2012.

FORSBERG, K. et al. *Candida auris*: The recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. **Medical Mycology**, v. 57, p. 1-12, 2019.

GABRIELLI, E. et al. Osteomyelitis caused by *Aspergillus* species: a review of 310 reported cases. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 6, p. 559-565, 2014.

Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI). Antifungal drug maps. Disponível em: <https://www.gaffi.org/antifungal-drug-maps/>. Acesso em: 06 jun. 2020.

GOW, N. A. et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 112–122, 2011.

GROSS, O. et al. Syk kinase signaling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. **Nature**, v. 459, p. 433-436, 2009.

GU, W. et al. *In vivo* activity of fluconazole/tetracycline combinations in *Galleria mellonella* with resistant *Candida albicans* infection. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 74–80, 2018.

GUGNANI, H.C. Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 8, p. s346-57, 2003.

HAGER, C. L. et al. Evaluation of the efficacy of rezafungin, a novel echinocandin, in the treatment of disseminated *Candida auris* infection using an immunocompromised mouse model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. 2085-2088, 2018.

HEALEY, K. R. et al. Limited ERG11 mutations identified in isolates of *Candida auris* directly contribute to reduced azole susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, p. e01427–18, 2018.

HOLLOMON, D. Does agricultural use of azole fungicides contribute to resistance in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*? **Pest Management Science**, v. 73, n. 10, p. 1987-1993, 2017.

HOUŠT, J.; SPÍŽEK, J.; HAVLÍČEK, V. Antifungal drugs. **Metabolites**, v. 10, p. 106, 2020.

IGUCHI, S. et al. *Candida auris*: A pathogen difficult to identify, treat, and eradicate and its characteristics in Japanese strains. **Journal of Infections and Chemotherapy**, v. 25, p. 743-749, 2019.

IMBERT S, et al. *In vitro* combination of voriconazole and miltefosine against clinically relevant molds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6996-6998, 2014.

ISHIDA et al. **Formulação farmacêutica, processo para preparação da formulação farmacêutica, e uso da mesma**. Depositante: Universidade de São Paulo. BR102017018011-5. Depósito: 23 ago. 2017.

ISHIDA, K.; BARROSO, V. M. Allylamines, morpholine derivatives, fluoropyrimidines, and griseofulvin. In: CASADEVALL, A.; ZARAGOZA, O.; NOSANCHUK, J. D. (Org.). **Encyclopedia of Mycology**. Reference Module in Life Sciences, 2ed.: Elsevier, 2020.

JACKSON, J. C.; HIGGINS, L. A.; LIN, X. Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e4224, 2009.

JIAO, Y. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. **Circulation**, v. 105, p. 230–235, 2002.

JOHNSON, M. D. et al. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693–715, 2004.

JOHNSON, E. M. et al. Lack of correlation of *in vitro* amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 8593, 2000.

JOLY, S. et al. Cutting edge: Nlrp10 is essential for protective antifungal adaptive immunity against *Candida albicans*. **Journal of Immunology**, v. 189, p. 4713–4717, 2012.

JORJÃO, A. L. et al. From moth to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383-389, 2018.

KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 101-112, 2004.

KAVANAGH, K.; FALLON, J. P. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, p. 79-83, 2010.

KAVANAGH, K.; SHEEHAN, G. The use of *Galleria mellonella* larvae to identify novel antimicrobial agents against fungal species of medical interest. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 113, 2018.

KAVIAN, Z. et al. Development of topical liposomes containing miltefosine for the treatment of *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. **Acta Tropica**, v. 196, p. 142-9, 2019.

KESSON, A. M. et al. *Scedesprium prolificans* osteomyelitis in an immunocompetent child treated with a novel agent, hexadecylphosphocholine (Miltefosine), in combination with terbinafine and voriconazole: A case report. **Clinical Infectious Disease**, v. 48, p. 1257-1261, 2009.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, p. 908-931, 2019.

KOEHLER, P. et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. **Mycoses**, v. 63, p. 528–534, 2020.

KORDALEWSKA, M. et al. Understanding echinocandin resistance in the emerging pathogen *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, p. e00238-18, 2018.

KORDALEWSKA, M.; PERLIN, D. S. Identification of drug resistant *Candida auris*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1918, 2019.

KOUSHA, M.; TADI, R.; SOUBANI, A. O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. **European Respiratory Review**, v. 20, n. 121, 2011.

KREUTER, J. Nanoparticles – a historical perspective. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 331, n. 1, p. 1-10, 2007.

- KRIJGSHELD, P. et al. Development in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 74, p. 1-29, 2012.
- KUMAR, R. et al. Development of PLGA–PEG encapsulated miltefosine based drug delivery system against visceral leishmaniasis. **Materials Science and Engineering**, v. 59, p. 748–753, 2016.
- KUPFAHL, C. et al. Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, p. 319327, 2007.
- LABRAM, B. et al. Endothelin- 1 mediates *Aspergillus fumigatus*- induced airway inflammation and remodeling, **Clinical and Experimental Allergy**, v. 49, p. 861-873, 2019.
- LAPRADE, D. J. et al. Filamentation protects *Candida albicans* from amphotericin B-induced programmed cell death via a mechanism involving the yeast metacaspase, MCA1. **Microbial Cell**, v. 3, p. 285–292, 2016.
- LATGE, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 382–389, 2001.
- LATGE, J. P.; CHAMILOS, G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. e00140-18, 2020.
- LARKIN, E. et al. The emerging pathogen *Candida auris*: growth phenotype, virulence factors, activity of antifungals, and effect of SCY-078, a novel glucan synthesis inhibitor, on growth morphology and biofilm formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, e02396-16, 2017.
- LEGER, R. J. ST.; SCREEN, S. E.; SHAMS-PIRZADEH, B. Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 320-324, 2000.
- LESCURE, F. X. et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, p. 697-706, 2020.
- LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.
- LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Micafungin in combination with voriconazole in *Aspergillus* species: a pharmacodynamic approach for detection of combined antifungal activity *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 887–92, 2005.
- LEWIS II, J. S.; GRAYBILL, J. R. Fungicidal versus fungistatic: what's in a word? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 6, p. 927-935, 2008.
- LIU, J.; BALASUBRAMANIAN, M.K. 1,3-beta-Glucan synthase: A useful target for antifungal drugs. **Current Drug Targets - Infectious Disorders**, v. 1, p. 159–169, 2001.
- LIVENGOOD, S. J.; DREW, R. H.; PERFECT, J. R. Combination therapy for invasive fungal infections. **Current Fungal Infection Reports**, v. 14, p. 40-49, 2020.
- LOH, J. M. et al. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419-428, 2013.

LORETO, E. S. et al. *In vitro* activities of miltefosine and antibacterial agents from the macrolide, oxazolidinone and pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 62, p. e01678-17, 2018.

LUIZ, R. L. F. et al. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 1-11, 2015.

MacCALLUM, D.M.; DESBOIS, A.P.; COOTE, P.J. Enhanced efficacy of synergistic combinations of antimicrobial peptides with caspofungin versus *Candida albicans* in insect and murine models of systemic infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, p. 1055–1062, 2013.

MAURER, E. et al. *Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B resistance. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 591–598, 2015.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, Processo Nº 21000.042544/2016-94, 2016.

MARINÉ, M. et al. The development of animal infection models and antifungal efficacy assays against clinical isolates of *Trichosporon asahii*, *T. asteroides* and *T. inkin*. **Virulence**, v. 6, p. 476–486, 2015.

McCANN, M. et al. *In vitro* and *in vivo* studies into the biological activities of 1,10-phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its copper(II) and silver(I) complexes. **Toxicological Research**, v. 1, p. 47–54, 2012.

McCARTHY, M. W. et al. Novel agents and drug targets to meet the challenges of resistant fungi. **The Journal of Infectious Diseases** v. 216, n. 3, p. S474–S483, 2017.

McNAMARA, K.; TOFAIL, S. A. M. Nanoparticles in biomedical applications. **Advances in Physics**, v. 2, n. 1, p. 54-88, 2017.

MEIJER, E. F. J. et al. Azole-resistant COVID-19 associated pulmonary aspergillosis in an immunocompetent host: a case report. **Journal of Fungi** v. 6, p. E79, 2020.

MELLON, J. E.; COTTY, P. J.; DOWD, M. K. *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 497504, 2007.

MERCALDI, G. F. **Glicose 6-fosfato desidrogenase como alvo molecular para desenvolvimento de fármacos: estudos estruturais e identificação de inibidores**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

MICELI, M. H.; KAUFFMAN, C. A. Isavuconazole: a new broad-spectrum triazole antifungal agent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 10, p. 1558–1565, 2015.

MOSQUERA J. et al. Susceptibility testing of *Aspergillus flavus*: inoculum dependence with itraconazole and lack of correlation between susceptibility to amphotericin B *in vitro* and outcome *in vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 14561462, 2001.

NAJAFIAN, H. R. et al. Nanoliposomal miltefosine for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER): The drug preparation and *in vitro* study. **International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences**, v. 5, n. 3, p. 97-107, 2016.

NAMVAR, S. et al., *Aspergillus fumigatus* proteases, Asp f 5 and Asp f 13, are essential for airway inflammation and remodelling in a murine inhalation model, **Clinical and Experimental Allergy**, v. 45, p. 982-993, 2015.

NEGRI, C. E. et al. Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: Prevalence in clinical samples and *in vitro* susceptibility to triazoles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 10, p. 3633-3640, 2014.

NETEA, M. G. et al. Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, p. 630–642, 2015.

OH, B. J. et al. Biofilm formation and genotyping of *Candida haemulonii*, *Candida pseudohaemulonii*, and a proposed new species (*Candida auris*) isolates from Korea. **Medical Mycology**, v. 49, p. 98-102, 2011.

OLIVER, J. D. et al. F901318 represents a novel class of antifungal drug that inhibits dihydroorotate dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, p. 12809–12814, 2016.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–50, 2016.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 18026, 2018.

PAQUES, J. P. et al. Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 163-171, 2014.

PARK, S. J.; MEHRAD, B. Innate immunity to *Aspergillus* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 535-551, 2009.

PARKER, W. B. Enzymology of Purine and Pyrimidine Antimetabolites Used in the Treatment of Cancer. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 2880–2893, 2009.

PARKER, D. & PRINCE, A. Innate immunity in the respiratory epithelium. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 45, p. 189-201, 2011.

PASQUALOTTO, A. C. Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. **Medical Mycology**, v. 47, p. S261–S270, 2009.

PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. Post-operative aspergillosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 1060–1076, 2006.

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

PATTERSON, T. F. et al., Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 4, p. e1-e60, 2016.

PAULUSSEN, C. et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 296–322, 2017.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, p. 603–616, 2017.

PETRAITIS, V. et al. Combination therapy with isavuconazole and micafungin for treatment of experimental invasive pulmonary *Aspergillosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 9, p. e00305-17, 2017.

PFALLER, M. A. et al. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: Results for *Candida* species from 1997-2016. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. S79-94, 2019.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 268–280, 2004.

PFALLER, M. A. et al. *In vitro* survey of triazole cross-resistance among more than 700 clinical isolates of *Aspergillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2568–2572, 2008.

PHILIP, A. et al. *In vitro* synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3572-3574, 2005.

PRAJNA, N. V. et al. The mycotic ulcer treatment trial: a randomized trial comparing natamycin vs voriconazole. **JAMA Ophthalmology**, v. 131, n. 4, p. 422-429, 2013.

PRATTES, J. et al. Invasive pulmonary aspergillosis complicating COVID-19 in the ICU - A case report. **Medical Mycology Case Reports**, In press, 2020.

QUAESAET, L. et al. Miltefosine-based regimen as salvage therapy in *Lomentospora prolificans* bone and joint infection. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 48, p. 63-65, 2018.

QUINTELLA, L. P. et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 38, p. 25-32, 2011.

RENWICK, J. et al. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. **Mycopathologia**, v. 161, p. 377-384, 2006.

REYNOLDS, T. B.; FINK, G. R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. **Science**, v. 291, p. 878–881, 2001.

RHODES, J. et al. Genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging human fungal pathogen *Candida auris*. **Emerging Microbes & Infection**, v. 7, p. 43, 2018.

ROCHA, E. M. F. et al. A Ser678Pro substitution in Fks1p confers resistance to echinocandin drugs in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 4174–4176, 2007.

RODRIGUES, A. G.; ARAUJO, R.; PINA-VAZ, C. Human albumin promotes germination, hyphal growth and antifungal resistance by *Aspergillus fumigatus*. **Medical Mycology**, v. 43, p. 711–717, 2005.

ROSSI, D. C. P. et al. Miltefosine is fungicidal to *Paracoccidioides* spp. yeast cells but sub-inhibitory concentrations induce melanization. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, p. 465-471, 2017.

RUDRAMURTHY, S. M. et al. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 55, 23p., 2019.

SAFDAR, A. et al. Drug-induced nephrotoxicity caused by amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B: a review and metaanalysis. **Medicine (Baltimore)**, v. 89, p. 236–244, 2010.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 141–73, 2014.

SANGALLI-LEITE, F. et al. Synergistic effect of pedalitin and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* by *in vitro* and *in vivo* evaluation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, p. 504–511, 2016.

SANGLARD, D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. **Frontiers in Medicine**, v. 3, p. 11, 2016.

SANGUINETTI, M. et al. Diagnosis and treatment of invasive fungal infections: looking ahead. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 2, p. ii27-ii37, 2019.

SANTANA, M. F. et al. Confirmed invasive pulmonary aspergillosis and COVID-19: the value of *postmortem* findings to support *antemortem* management. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 53, p. e20200401, 2020.

SANTOS, E. D. et al. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.

SATOH, K. et al. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and Immunology**, v. 53, p. 41-44, 2009.

SCHEIN, C. H. Repurposing approved drugs on the pathway to novel therapies. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, p. 586-605, 2020.

SCHWARTZ, R. A.; KAPILA, R. Cutaneous manifestations of a 21st century worldwide fungal epidemic possibly complicating the COVID-19 pandemic to jointly menace mankind. **Dermatologic Therapy**, e13481 In press, 2020.

SEARS, D.; SCHWARTZ, B. S. *Candida auris*: an emerging multidrug-resistant pathogen. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p. 95e8, 2017.

SHARMA, C. et al. Whole genome sequencing of emerging multidrug resistant *Candida auris* isolates in India demonstrates low genetic variation. **New Microbes and New Infections**, v. 13, p. 77–82, 2016.

- SHEEHAN, G.; CLARKE, G.; KAVANAGH, K. Characterization of the cellular and proteomic response of *Galleria mellonella* larvae to the development of invasive aspergillosis. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 63, 2018.
- SHEEHAN, G.; KAVANAGH, K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. **Virulence**, v. 9, p. 163–172, 2018.
- SHERRY, L. et al. Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 328-331, 2017.
- SHIBUYA, K. et al. Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 47, p. 249255, 2006.
- SHISHODIA, S. K.; TIWARI, S.; SHANKAR, J. Resistance mechanism and proteins in *Aspergillus* species against antifungal agents. **Mycology**, v. 10, n. 3, p. 151-165, 2019.
- SLATER, J. L. et al. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. **Medical Mycology**, v. 49, p. S107-S113, 2011.
- SNELDERS, E. et al. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e31801, 2012.
- SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, p. 1961–1971, 2007.
- SPADARI, C. C. et al. Potential use of alginate-based carriers as antifungal delivery system. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1-11, 2017.
- SPADARI, C. C. **Miltefosina como alternativa para o tratamento da criptococose: mecanismo de ação e nanopartículas de alginato como carreadores**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SPADARI, C. C. et al. Miltefosine has a postantifungal effect and induces apoptosis in *Cryptococcus* yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 6, p. e00312-18, 2018.
- SPADARI, C. C.; de BASTIANI, F. W. M. S.; LOPES, L. B.; ISHIDA, K. Alginate nanoparticles as non-toxic delivery system for miltefosine in the treatment of candidiasis and cryptococcosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, p. 5187-5199, 2019.
- SPADARI, C. C.; VILA, T.; BARROSO, V. M.; ISHIDA, K. New targets for the development of antifungal agents. In: CASADEVALL, A.; ZARAGOZA, O.; NOSANCHUK, J. D. (Org.). **Encyclopedia of Mycology**. Reference Module in Life Sciences, 2ed.: Elsevier, 2020.
- SPADARI, C. C. et al. Efficacy of voriconazol *in vitro* and in invertebrate model of cryptococcosis. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 773-784, 2020.
- SUGUI, J. A. et al. *Aspergillus fumigatus* and related species. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 2, p. a019786, 2014.
- THOMPSON, G. R. & PATTERSON, T. F. Fungal disease of the nose and paranasal sinuses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 2, p. 321-326, 2012.
- TIWARI, S.; SHANKAR, J. Integrated proteome and HPLC analysis revealed quercetin-mediated inhibition of aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, p. 47, 2018.

TONG, Z. et al. *In vitro* activities of miltefosine and two novel antifungal biscationic salts against a panel of 77 dermatophytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 2219–2222, 2007.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 3, 2019.

TRIPATHI, P. et al. Hexadecylphosphocholine (miltefosine) stabilized chitosan modified ampholipospheres as prototype co-delivery vehicle for enhanced killing of *L. donovani*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 625-637, 2017.

TRUBIANO, J. A. et al. Disseminated *Scedesporeium prolificans* infection in a ‘extensive metaboliser’: navigating the minefield of drug interactions and pharmacogenomics. **Mycoses**, v. 57, p. 572-576, 2014.

VALENZUELA-OSES, J. et al. Development and characterization of miltefosine-loaded polymeric micelles for cancer treatment. **Materials Science & Engineering C**, v. 81, p. 327-333, 2017.

VAN ARKEL, A. L. E. et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 202, n. 1, p. 132-135, 2020.

VAN-DAELE, R. et al. Antifungal drugs: what brings the future? **Medical Mycology**, v. 57, p. S328-S343, 2019.

VAN DER LINDEN, J. W. M. et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 4, p. 513–520, 2013.

VERWEIJ, P. E. et al. Diagnosing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis. **The Lancet Microbe**, v. 1, n. 2, p. E53-E55, 2020.

VILA, T. V. M. et al. Effect of alkylphospholipids on *Candida albicans* biofilm formation and maturation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 113-125, 2013.

VILA, T. V. M. et al. *In vitro* activity of miltefosine against *Candida albicans* under planktonic and biofilm growth conditions and *in vivo* efficacy in a murine model of oral candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, p. 7611-7620, 2015.

VILA, T. V. M. et al. Miltefosine inhibits *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* spp. biofilms and impairs the dispersion of infectious cells. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, p. 512-520, 2016.

WEBSTER, D. et al. Case report: Treatment of granulomatous amoebic encephalitis with voriconazole and miltefosine in a immunocompetent soldier. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 715-718, 2012.

WIDMER et al. Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 414-421, 2006.

WIEDERHOLD, N. P.; PATTERSON, T. F. What’s new in antifungals: an update on the *in vitro* activity and *in vivo* efficacy of new and investigational antifungal agents. **Current Opinion in Infectious Disease**, v. 28, p. 539–545, 2015.

WIEDERHOLD, N. P. et al. Repurposing auranofin as an antifungal: *in vitro* activity against a variety of medically important fungi. **Virulence**, v. 8, p. 138–142, 2017.

WIEDERHOLD, N. P.; VERWEIJ, P. E. *Aspergillus fumigatus* and pan-azole resistance: who should be concerned? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 33, n. 4, p. 290-297, 2020.

WU, Y. et al. *In vitro* antifungal susceptibility of miltefosine alone and in combination with amphotericin B against emerging multidrug resistant *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, p. e02063-19, 2020.

ZHAI, B. et al. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 3758–3766, 2012.

ZUO X, et al. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Cell Death in Yeast via Cox9p in Cytochrome c Oxidase. **Molecular Pharmacology**. v. 80, p. 476-485, 2011.

Anexo

Artigo publicado durante o mestrado

International Journal of Antimicrobial Agents 56 (2020) 106049



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag



Miltefosine as an alternative strategy in the treatment of the emerging fungus *Candida auris*



Thayná Lopes Barreto^a, Luana Rossato^b, Aline Luiza Duarte de Freitas^a, Jacques F. Meis^{c,d},
Luciana Biagini Lopes^e, Arnaldo Lopes Colombo^b, Kelly Ishida^{a,*}

^a Laboratory of Antifungal Chemotherapy, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Special Laboratory of Mycology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Canisius Wilhelmina Hospital (CWZ), Nijmegen, The Netherlands

^d Centre of Expertise in Mycology Radboudumc/CWZ, Nijmegen, The Netherlands

^e Laboratory of Nanomedicine and Drug Delivery Systems, Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 April 2020
Accepted 6 June 2020

Keywords:
Candida auris
Antifungal resistance
Miltefosine
Nanocarriers
Alginate nanoparticles
Galleria mellonella

ABSTRACT

Objectives: *Candida auris* (*C. auris*) is an emerging fungal species that is able to develop multidrug resistance and outbreaks of invasive infections worldwide with high mortality rates. To increase the treatment options for *C. auris* infection this study assessed the efficacy of miltefosine (MFS), that has demonstrated a broad-spectrum antifungal action in vitro. This study aimed to: (i) evaluate the in vitro antifungal activity of MFS against *C. auris* clinical isolates in the planktonic and biofilm lifestyles; and (ii) compare the activity of MFS in its free form and encapsulated in alginate nanoparticles (MFS-AN) in *Galleria mellonella* larvae infected by *C. auris*.

Methods: The antifungal susceptibility test was performed using broth microdilution method and the in vivo treatment in *Galleria mellonella* larval infection model.

Results: MFS exhibited in vitro inhibitory effects at MICs ranging 1–4 µg/mL and fungicidal activity against planktonic cells of *C. auris* clinical isolates. MFS antibiofilm activity was observed during biofilm formation (0.25–4 µg/mL) and on pre-formed biofilms (16–32 µg/mL). Moreover, the dispersed cells from *C. auris* biofilms had a similar susceptibility to those obtained for planktonic cells. Treatment with free MFS or MFS-AN resulted in significant improvements in the survival and morbidity rates of *Galleria mellonella* larvae infected by *C. auris*. In addition, reduction of fungal burden (0.5–1 log CFU/g) and granuloma formation were observed when compared with the untreated group.

Conclusions: The findings suggest that both the free MFS and MFS-AN have potential for the treatment of fungal infections caused by the emerging *C. auris*.

© 2020 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Candida auris (*C. auris*) is an emerging fungal species that is able to develop multidrug resistance and outbreaks of invasive infections worldwide with mortality rates ranging 30–60% [1]. *C. auris* infection was first reported in 2009 after its isolation from the external ear canal of a patient in Japan [2] and multiple episodes of candidaemia have been reported in over 40 countries so far [1].

Candida auris yeasts have some features that contribute to colonisation and invasion in the host tissues, such as: they produce hydrolytic enzymes as phospholipases and proteinases, tolerate high temperature and salinity, form aggregates and biofilms and others [3]. Moreover, previous studies using murine and *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) models have shown strain-dependent virulence of *C. auris* [4].

Candidiasis can be treated with amphotericin B, azoles and echinocandins [5]. However, most *C. auris* isolates are often resistant to fluconazole, the azole most commonly used for different forms of candidiasis, sometimes to amphotericin B and eventually to echinocandins, a phenomenon that may help to explain the high rates of therapeutic failures and mortality frequently documented with those infections worldwide [4]. New lanosterol

* Corresponding author. Laboratory of Antifungal Chemotherapy, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Prof. Lineu Prestes Avenue, 1374 – 05508-000, ICB II, Lab 150, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55(11)30917204.
E-mail address: ishidakelly@usp.br (K. Ishida).

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106049>

0924-8579/© 2020 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.