

VINÍCIUS DE MORAIS BARROSO

**Atividade antifúngica de derivados 2-ariloxazolinás e miltefosina sobre
Candida spp. e inibição dos fatores de virulência de *Candida albicans***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2023

VINÍCIUS DE MORAIS BARROSO

Atividade antifúngica de derivados 2-ariloxazolinas e miltefosina sobre *Candida* spp. e inibição dos fatores de virulência de *Candida albicans*

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Profa. Dra. Kelly Ishida

Versão corrigida

São Paulo
2023

DADOS DE 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)

Barroso, Vinícius de Moraes.

Atividade antifúngica de derivados 2-ariloxazolinás e miltefosina sobre *Candida* spp. e inibição dos fatores de virulência de *Candida albicans*./ Vinícius de Moraes Barroso; orientadora: Prof^a Dra. Kelly Ishida – São Paulo -2023.

114 p.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia.

1. 2-ariloxazolinás. 2. Antifúngicos. 3. Miltefosina. 4. *Candida albicans*. 5. fatores de virulência. 6. Morfogênese. I. Ishida, Kelly, orientadora. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Kelly Ishida, pela orientação, amizade, respeito e exemplo de dedicação ao ensino. Obrigado pela oportunidade e por contribuir com meu crescimento profissional.

À Universidade de São Paulo e aos professores do Departamento de Microbiologia, pelos valiosos ensinamentos.

À Tatiana Alves dos Reis, pela amizade, compreensão e apoio técnico, obrigado pelos ensinamentos que foram importantes para o meu trabalho.

Às técnicas do laboratório de Quimioterapia Antifúngica (LQA), Zita Maria e Marcela Gonçalves, pela dedicação ao laboratório, contribuindo com a organização e rotina do LQA. Agradeço a amizade.

Aos companheiros do Laboratório de Quimioterapia Antifúngica, pelas conversas e parceria durante o trabalho.

A todos aqueles que tenham contribuído direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº: 2018/11612-0, pelo apoio financeiro durante o período de doutorado, sem este suporte, o projeto não aconteceria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, bolsa nº 88882.333058/2019-01, pelo suporte financeiro na forma de bolsa de estudo durante os 4 primeiros meses de doutorado, por conta disso, a realização desse trabalho foi possível.

A Deus, por tudo.

RESUMO

BARROSO, V. M. **Atividade antifúngica de derivados 2-ariloxazolinás e miltefosina sobre *Candida* spp. e inibição dos fatores de virulência de *Candida albicans*.** 2023, 114 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Novas moléculas antifúngicas estão sendo pesquisadas, abordando novos alvos e mecanismos de ação. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica, os efeitos morfofisiológicos e moleculares dos derivados de 2-ariloxazolinás (4i e 9i) e miltefosina (MFS) sobre *Candida* spp. O crescimento de 73 isolados de *Candida* spp. foi inibido pelos compostos 4i e 9i em concentrações inibitórias mínimas (CIM) $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ acumulando leveduras em brotamento. Embora esses compostos não tenham inibido a atividade metabólica em *Candida* spp., eles conseguiram inibir até 50% da biomassa total dos biofilmes de *Candida albicans* nas primeiras 12h. Além disso, 4i e 9i inibiram a atividade da proteinase e fosfolipase de *C. albicans*. No ensaio *in vivo* no modelo *Galleria mellonella*, 4i (100 mg/kg) não demonstrou toxicidade, contudo não apresentou efeito antifúngico nas doses testadas (20-40 mg/kg). Interessantemente, os compostos 4i e 9i reduziram a formação de hifas em *C. albicans* e inibiram totalmente a filamentação de *C. tropicalis* em meio RPMI, Lee e Spider. No ensaio de expressão gênica, alguns genes foram regulados negativamente após o tratamento das leveduras com o composto 4i, principalmente as adesinas (*HWPI* e *ALS3*), candidalisina (*ECE1*), fatores de transcrição *TEC1* e *EFG1* e *CEK1*. Devido a regulação negativa dos alvos Efg1 e Tec1, pertencentes a via do cAMP e a regulação negativa do Cek1, pertencente da via MAPK, nas células tratadas, sugerimos que o composto 4i está inibindo a morfogênese pela inibição destas duas vias resultando na redução da expressão dos genes expressos durante a filamentação. A MFS inibiu o crescimento de todos os isolados de *C. albicans*, incluindo as cepas resistentes ao fluconazol (CIM=1-2 mg/kg), e também apresentou efeito fungicida. Em valores de CIM e 2xCIM a MFS inibe significativamente a adesão de até 50%. A MFS inibiu o crescimento fúngica e a formação de hifas em todos os meios indutores utilizados (RPMI, Spider (sólido e líquido), Lee e SM-GlcNAc). Além disso, todos os isolados tiveram os seus biofilmes inibidos em ambas as fases de desenvolvimento, na formação dos biofilmes (4-8 $\mu\text{g/mL}$) e no biofilme maduro (16-32 $\mu\text{g/mL}$). Na expressão dos genes de virulência em *C. albicans*, observamos a regulação negativa dos genes da via cAMP (*RAS1*, *CYR1*, *EFG1* e *TEC1*) e na MAPK (*CEK1*), além da regulação negativa nos genes para as adesinas (*HWPI* e *ALS3*) e candidalisina (*ECE1*). Concluímos que a os derivados 2-ariloxazolinás (4i e 9i) e a MFS tem forte potencial como agentes antifúngicos contra *C. albicans* e outras espécies. Além disso, estes compostos inibem a morfogênese de *C. albicans* e/ou *C. tropicalis* resultando na inibição de outros fatores de virulência associado ao processo de filamentação, regulando negativamente as vias cAMP e MAPK.

Palavras-chave: 2-ariloxazolina, miltefosina, fatores de virulência, morfogênese, hifa, *Candida* spp., *Candida albicans*, expressão gênica

ABSTRACT

BARROSO, V. M. **Antifungal activity of 2-aryloxazoline derivatives and miltefosine on *Candida* spp. and inhibition of *Candida albicans* virulence factors.** 2023, 114 p. Tese (Doctorate in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

New antifungal molecules are being researched, addressing new targets and mechanisms of action. Therefore, the present study aims to evaluate the antifungal activity, the morphophysiological and molecular effects of 2-aryloxazoline derivatives (4i and 9i), and miltefosine (MFS) on *Candida* spp. The growth of 73 *Candida* spp. was inhibited by compounds 4i and 9i at minimum inhibitory concentrations (MIC) $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ accumulating budding yeast. Although these compounds did not inhibit the metabolic activity in *Candida* spp., they could inhibit up to 50% of the total biomass of *Candida albicans* biofilms in the first 12h. Furthermore, 4i and 9i inhibited *C. albicans* proteinase and phospholipase activity. In the *in vivo* assay on the *Galleria mellonella* model, 4i (100 mg/kg) did not demonstrate toxicity, however, it did not show antifungal effect at the doses tested (20-40 mg/kg). Interestingly, compounds 4i and 9i reduced hyphal formation in *C. albicans* and completely inhibited filamentation in *C. tropicalis* in RPMI, Lee and Spider medium. In the gene expression assay, some genes were downregulated after treatment of yeast with compound 4i, mainly adhesins (*HWP1* and *ALS3*), candidalysin (*ECE1*), transcription factors *TEC1* and *EFG1* and *CEK1*. Due to the downregulation of *Efg1* and *Tec1* targets, belonging to the cAMP pathway and the downregulation of *Cek1*, belonging to the MAPK pathway, in treated cells, we suggest that compound 4i is inhibiting morphogenesis by inhibiting these two pathways resulting in reduced expression of genes expressed during filamentation. MFS inhibited the growth of all *C. albicans* isolates, including strains resistant to fluconazole (MIC=1-2 mg/kg), and also showed a fungicidal effect. At MIC and 2xMIC values, MFS significantly inhibits adherence up to 50%. MFS inhibited fungal growth and hyphal formation in all inducing media used (RPMI, Spider (solid and liquid), Lee and SM-GlcNAc). Furthermore, all isolates had their biofilms inhibited in both stages of development, in the formation of biofilms (4-8 $\mu\text{g/mL}$) and in the mature biofilm (16-32 $\mu\text{g/mL}$). In the expression of virulence genes in *C. albicans*, we observed downregulation of genes in the cAMP pathway (*RAS1*, *CYR1*, *EFG1* and *TEC1*) and in MAPK (*CEK1*), in addition to downregulation in genes for adhesins (*HWP1* and *ALS3*) and candidalysin (*ECE1*). We conclude that the 2-aryloxazoline derivatives (4i and 9i) and MFS have strong potential as antifungal agents against *C. albicans* and other species. Furthermore, these compounds inhibit the morphogenesis of *C. albicans* and/or *C. tropicalis* resulting in the inhibition of other virulence factors associated with the filamentation process, negatively regulating the cAMP and MAPK pathways.

Keywords: 2-aryloxazoline, miltefosine, gene expression, *Candida* spp.

1. INTRODUÇÃO

As espécies de *Candida* estão entre os patógenos fúngicos humanos mais comuns e responsáveis por infecções superficiais (mucosa e cutânea) e sistêmicas. Aproximadamente 8% das infecções nosocomiais da corrente sanguínea são causadas por espécies de *Candida* ocupando a quarta colocação dentre essas infecções (TURNER; BUTLER, 2014; SANGLAR, 2016; DOI et al., 2016). As candidemias são responsáveis por altas taxas de mortalidade, podendo variar de 40% a 70%, dependendo da gravidade do paciente e mesmo com tratamento com antifúngicos. A grande contribuição para essa elevada taxa de mortalidade é devido ao aumento de isolados clínicos resistentes aos antifúngicos convencionais e, recentemente, a emergência de espécies de *Candida* consideradas multirresistentes (definido como resistente a pelo menos 2 classes de antifúngicos) como espécies do complexo *Candida haemulonii* e *C. auris* (RAMOS et al., 2015; ARENDRUP, PATTERSON, 2017; COLOMBO, JUNIOR, GUINEA, 2017; SEARS, SCHWARTZ, 2017).

Dessa forma, faz-se necessário a busca de novas estratégias terapêuticas para solucionar a falta de opção e, também, as limitações farmacocinéticas dos atuais antifúngicos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) um agente é considerado inovador quando cumpre alguns critérios como a ausência de resistência cruzada ao antimicrobiano existente, nova classe química, novo alvo na célula microbiana ou novo mecanismo de ação (WHO, 2017). As oxazolininas são compostos contendo um anel heterocíclico de 5 membros e na sua estrutura há um grupo endo-imino éter (-N=C-O-) podendo ser de origem natural ou sintética. Os compostos derivados das oxazolininas, por exemplo, 2-ariloxazolininas apresentaram diversas atividades farmacológicas, como antiviral, antibacteriano, antifúngico, antiparasitário, antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral e neuroprotetor (FAN et al, 2007; WASCHINSKI et al., 2008; KHANUM et al., 2008; MARTINS et al., 2015; LI et al, 2016; WILSON et al., 2017; MADIA et al., 2019).

Outra estratégia para o desenvolvimento de um antifúngico é pelo reposicionamento de fármacos, os quais já possuem características farmacológicas e toxicológicas em humanos estabelecidas, levando a vantagens em termos de custo e tempo de desenvolvimento de um agente antifúngico. A miltefosina é um fármaco atualmente utilizado no tratamento de câncer de mama e de leishmaniose (RYBCZYNSKA et al, 2001; DORLO et al, 2012, WARE et al, 2021). Estudos prévios demonstraram a ação

antifúngica *in vitro* e *in vivo*, podendo ser observado tanto em leveduras (*Candida* spp. (incluindo *C. auris*) e *Cryptococcus* spp.), dermatófitos, fungos dimórficos (*Sporothrix* spp., *Paracoccidioides* spp. e *Histoplasma capsulatum*), como em fungos filamentosos (*Aspergillus* spp., *Fusarium oxysporum*, *Scedosporium* spp.) (WIDMER et al., 2006; BORBA-SANTOS et al., 2015; VILA et al., 2015; VILA, QUINTANILHA, ROZENTAL, 2015; ROSSI et al., 2017; SPADARI et al., 2018; SPADARI et al., 2019; BARRETO et al., 2020; DE BASTIANI et al., 2020; WU et al., 2020; HAGJANI et al., 2023).

Diante do exposto acima, a ação antifúngica dos compostos de 2-ariloxazolinias e da miltefosina sobre *Candida* spp. e a inibição dos fatores de virulência de *Candida albicans* são características importantes para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

2. OBJETIVO

Avaliar a atividade antifúngica de derivados 2-ariloxazolinias e miltefosina sobre *Candida* spp. e a inibição dos fatores de virulência de *Candida albicans*.

Com o intuito de facilitar o entendimento dos dados obtidos durante o doutorado, essa tese foi escrita em dois capítulos. O primeiro aborda a ação antifúngica dos derivados de 2-ariloxazolinias sobre isolados clínicos de *Candida* spp. e os efeitos sobre os fatores de virulência de *C. albicans*, e o segundo, avalia a atividade antifúngica de miltefosina em células planctônicas e de biofilmes de *C. albicans* e explora mecanismos moleculares envolvidos na morfogênese.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Candidíase

3.1.1 Agente etiológico

O gênero *Candida* pertence à classe Saccharomycetes e a ordem Saccharomycetales; existem mais de 300 espécies descritas, sendo que há aproximadamente 10 espécies classificadas como patogênicas, incluindo *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. auris*. O aumento do número de espécies de *Candida* classificadas como patogênicas foi atribuído à recente reclassificação das espécies dentro deste gênero à medida da atualização taxonômica e também devido ao aumento na diversidade de espécies que acometem hospedeiros imunocomprometidos (TAKASHIMA, SUGITA, 2022).

As espécies de *Candida*, normalmente, são encontradas como comensais em indivíduos saudáveis, localizados no tecido cutâneo, no trato gastrointestinal e nas mucosas oral e geniturinário (ODDS, 1988; MURRAY, 2009). Entretanto, nas últimas décadas, *Candida* spp. têm emergido como uma das principais causas de doenças infecciosas em humanos, tornando-se um problema de saúde no Brasil e no mundo, afetando pacientes hospitalizados debilitados ou imunocomprometidos (PFALLER et al, 2019).

3.1.2. Epidemiologia

As infecções fúngicas acometem cerca de 1 bilhão de pessoas/ano mundialmente, sendo que aproximadamente 150 milhões desenvolvem doenças fúngicas graves, destas 1,5 milhões levam ao óbito. Estima-se que as espécies de *Candida* são responsáveis por 700.000 casos de infecções da corrente sanguínea por ano, mundialmente (BONGOMIN et al, 2017).

Candida spp. são responsáveis tanto por infecções superficiais atingindo as mucosas e tecidos cutâneos quanto por infecções sistêmicas. As infecções superficiais geralmente são corriqueiras e frequentes e, normalmente, sem muitas complicações

durante o tratamento evoluindo para cura, enquanto as infecções invasivas possuem uma menor incidência, mas levando a altas taxas de mortalidade e morbidade (KIM, 2016).

Em mulheres a causa mais frequente da doença é candidíase vulvovaginal (CVV), que atinge em torno de 75% das pacientes, sendo o principal agente etiológico *C. albicans*, responsável por mais de 85% dos casos (SOBEL, 2007; GONÇALVES et al., 2015). Quando há mais de 3 casos ao ano, a paciente é diagnosticada com candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR) e, frequentemente, estão relacionados a isolados resistentes aos tratamentos convencionais (GONÇALVES et al., 2015).

Em infecções nosocomiais, *Candida* spp. é considerada a quarta causa mais comum de infecções da corrente sanguínea, depois de patógenos bacterianos (SANGLAR, 2016). Tratamento com imunossupressores, neutropenia, terapia com antibacterianos de amplo espectro, cirurgias com complicações, uso prolongado de cateter venoso central e a administração de nutrição parenteral total, pacientes com HIV/AIDS, doenças autoimunes, pacientes transplantados e passando por tratamentos quimioterápicos são alguns dos fatores de risco que podem evoluir para candidemia (LIU et al., 2018).

As taxas de mortalidade em pacientes com candidemia são altas e podem variar de 40% a 70%, dependendo da gravidade do paciente e mesmo com tratamento com antifúngicos (YAP et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2017; SALCI et al., 2018). Cerca de 8% das infecções sanguíneas nosocomiais são causadas por espécies de *Candida*, sendo este considerado o patógeno fúngico mais comum encontrado em humanos. Entretanto, essas infecções são consideradas difíceis de serem diagnosticadas, levando a hospitalização prolongada dos pacientes, refletindo em aumento dos custos para o hospital, além de apresentar elevadas taxas de mortalidade, de aproximadamente 50% (TURNER; BUTLER, 2014; DOI et al., 2016). *Candida albicans* é a principal espécie relacionada com candidemia, contudo nas últimas décadas outras espécies de *Candida* não-*albicans* estão aumentando, como: *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. auris*, sendo esta última considerada multirresistente (RAMOS et al., 2015; SEARS & SCHWARTZ, 2017; BONGOMIN et al., 2017; PFALLER et al., 2019). A capacidade de *C. albicans* e outras espécies mais frequentes de causar infecções é largamente atribuída a vários fatores de virulência (MOTAUNG et al., 2015).

De acordo com a lista de patógenos fúngicos publicados pela OMS, em 2022, os patógenos fúngicos que podem causar infecções fúngicas sistêmicas agudas e invasivas

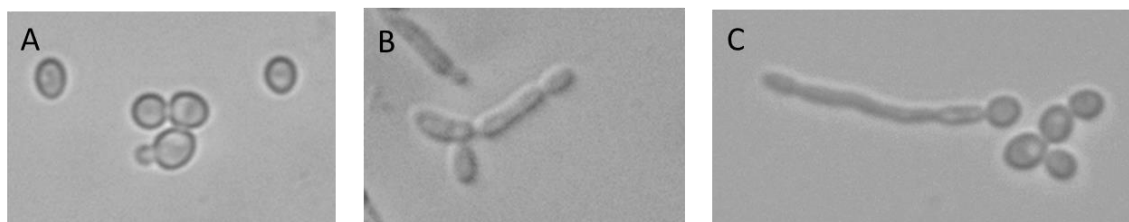
para as quais existem resistência a medicamentos ou outros desafios de tratamento e gerenciamento foram classificadas e categorizadas em grupos prioritários (crítico, alto e médio). As espécies de *C. albicans*, *C. auris*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* foram classificadas como críticas; já outras espécies de *Candida* como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram classificadas como espécies de prioridade alta e *C. krusei*, como média (WHO, 2022).

3.1.3. Fatores de virulência

Candida spp. possui vários mecanismos responsáveis pela sua patogenicidade, permitindo invadir e colonizar os hospedeiros, dentre estes estão: múltiplas vias transcricionais podendo resultar em mudanças morfológicas (morfogênese) e fenotípicas (*phenotypic switching*) em *C. albicans* e *C. tropicalis*, formação de biofilme, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, flexibilidade metabólica, plasticidade do genoma, adaptação à flutuação do pH ambiental, sistema robusto de aquisição de nutrientes, aderência e invasão tecidual (mediadas por adesinas e invasinas), proteínas de choque térmico (HSPs) e proteínas citolíticas como a candidalisina (MBA, NWEZE, 2020).

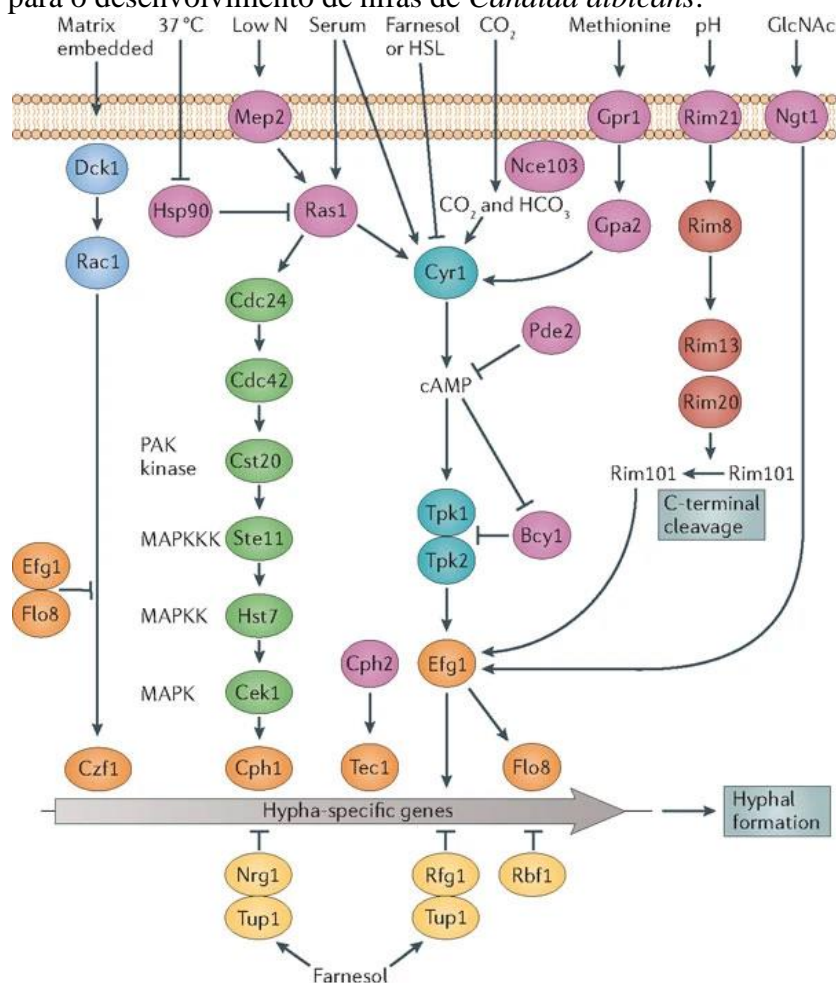
A morfogênese de algumas espécies de *Candida* é significativa como fator de virulência, sendo a forma de levedura muito importante para a adesão e disseminação, enquanto o estado de filamentação (pseudohifa/hifa), é responsável por causar danos físicos aos tecidos, sistêmica, invasão e evasão imunológica (Fig. 1). A morfogênese é um processo multifatorial, influenciado pela composição de nutrientes, temperatura, tensão de oxigênio, pH e quantidade de CO₂. Estas condições podem desencadear uma ou mais vias de sinalização na expressão/inibição de genes relacionadas ao desenvolvimento de pseudohifa/hifa (Fig. 2) (SUDBERY, 2011).

Figura 1. Morfogênese em *Candida albicans*. (A) levedura; (B) pseudohifa; (C) hifa verdadeira.



Fonte: Barroso, V.M. (não publicado).

Figura 2. Vias de transdução de sinal que levam à expressão/supressão de genes específicos para o desenvolvimento de hifas de *Candida albicans*.



Nature Reviews | Microbiology

Os fatores de proteína são codificados por cores da seguinte forma: via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (verde), via de cAMP (turquesa), fatores de transcrição (laranja), reguladores negativos (amarelo), via de detecção incorporada na matriz (azul claro), via de detecção do pH (marrom), outros fatores envolvidos na transdução de sinal (malva), C-terminal, carboxi-terminal; Cdc, controle da divisão celular; GlcNAc, N-acetil-D-glucosamina; Gpa2, subunidade α -2 da proteína de ligação ao nucleotídeo guanina; Gpr1, receptor 1 acoplado à proteína G; HSL, 3-oxo-homoserina lactona; Hsp90, proteína de choque térmico 90; MAPKK, MAPK quinase; MAPKKK; MAPKK quinase; PAK, quinase ativada por p21; Rbf1, proteína repressora-ativadora 1. **Fonte:** Sudbery, 2011.

Moléculas que inibem a morfogênese são interessantes na busca de novos fármacos, por exemplo: filastatina, pequena molécula que inibe a filamentação e formação do biofilme; e a beauvericina, composto natural que tem como alvo o efluxo de drogas e a sinalização TOR, responsável por reprimir a expressão de muitos genes específicos da filamentação, bloqueando a transição levedura-hifa (FAZLY et al, 2013; SHEKHAR-GUTURJA et al, 2016).

A patogenicidade de *Candida* spp. inicia com a colonização, quando as células fúngicas aderem às células epiteliais da pele ou mucosas, formando biofilmes e se multiplicando, ocasionando a infecção superficial, caso continue a infecção, as leveduras invadem as camadas mais profundas dos tecidos e começam a formar hifas. A invasão por hifas é um processo complexo que envolve interações com as células hospedeiras e a secreção de enzimas que degradam o tecido, posteriormente, com o tempo, há disseminação das leveduras de *C. albicans* podendo penetrar na corrente sanguínea e se disseminar para outros órgãos, causando infecções sistêmicas. Durante esse processo, o fungo pode ser transportado por células fagocitárias, como os neutrófilos, que normalmente ajudam a combater infecções, mas que podem, inadvertidamente, facilitar a sua disseminação (MBA, NWEZE, 2020; LOPES; LIONAKIS, 2021).

A adesão das leveduras às células epiteliais ocorre devido a presença das adesinas da família Als e Hwp1. As principais adesinas em *C. albicans* pertencem a família das ALS (sequência semelhante a aglutinina), composta por oito membros (Als1-Als7 e Als9). As Als permitem a adesão em superfícies bióticas e abióticas; dentre as superfícies bióticas o Als 3 adere fibronectina humana, laminina, colágeno, gp96, EGFR, HER2, N-caderina, E-caderina, fibrinogênio, caseína, ferritina equina, albumina de soro bovino (BSA) (HOYER; COTA, 2016). A Hwp1 é uma proteína de superfície celular de *C. albicans* bem descrita, expressa somente em hifas, responsável pela ligação às células epiteliais orais. Estudos indicam que a Hwp1 é a proteína de superfície celular necessária para a formação de biofilme (MARTIN et al, 2013; DE GROOT et al, 2013).

Os biofilmes microbianos são comunidades complexas de células fúngicas compostas por camadas densas e circundados por uma matriz de polímero extracelular aderidas a superfícies bióticas e abióticas. A sua formação é dividida em quatro fases: adesão, formação, maturação e dispersão. A adesão é mediada por proteínas da parede celular das leveduras a uma superfície; a formação consiste no crescimento das células de levedura aderidas em uma fina camada de células; já a maturação ocorre através do desenvolvimento de pseudohifas e hifas e excreção de material da matriz; e por fim, a dispersão das leveduras do biofilme colonizando locais distantes (GULATI, NOBILE, 2016; MATHÉ; VAN DJICK, 2013). Uma das principais características dos biofilmes de *C. albicans* é a sua alta resistência aos tratamentos antifúngicos, esta característica é devido a sua camada de matriz extracelular, a qual protege as células fúngicas da ação dos agentes antimicrobianos/desinfetantes e das células do sistema imune do hospedeiro; a heterogeneidade da população de micro-organismos contendo células com aspectos

fenotípicos diferentes às formas planctônicas; a taxa de crescimento mais lento das células dentro dos biofilmes e alterações na expressão gênica, como o aumento da expressão das bombas de efluxo (genes CDR1 e MDR1)(MATHÉ; VAN DJICK, 2013; DIJCK et al., 2018).

Além dos biofilmes, as enzimas hidrolíticas (proteínases, lipases e fosfolipases) são importantes para a colonização, invasão e proliferação fúngica no hospedeiro. A atividade proteolítica extracelular desempenha um papel central na patogenicidade de *C. albicans*, produzida por uma família de 10 aspartil proteínases (proteínas Sap). Os 10 genes *SAP* que compõem esta família podem ser divididos em subfamílias com base no alinhamento da sequência de aminoácidos (*SAP1* a *SAP3*, *SAP4* a *SAP6*, *SAP9* e *SAP10*). A complexidade do envolvimento das Saps na virulência de *C. albicans* é destacada pelo fato de que a produção de Sap está associada a vários outros atributos de virulência de *C. albicans*, incluindo formação de hifas, adesão e *phenotypic switching* (NAGLIK et al, 2003). A Sap 2 é conhecido por degradar muitas proteínas humanas, incluindo moléculas que protegem superfícies mucosas, como mucina e imunoglobulina A (IgA); a Sap1 e Sap3 são induzidas por *phenotypic switching*; Sap4, Sap5 e Sap6 são expressas na formação de hifas; e as Sap1-Sap6 bem como Sap9-Sap10 estão envolvidas na adesão às células hospedeiras (NAGLIK et al, 2003; GROPP et al, 2009).

As fosfolipases pertencem a uma família de enzimas responsáveis por metabolizar diferentes substratos no hospedeiro. As principais fosfolipase são fosfolipase A, fosfolipase B, fosfolipase C, fosfolipase D e lisofosfolipase transacilase. A função dessas enzimas consiste na metabolização de fosfolipídios, componentes importantes das membranas biológicas, como membranas celulares ou vesículas ligadas à membrana, e contribuindo para a estrutura e função das células. Em *C. albicans* são responsáveis pela patogenicidade em diferentes órgãos. A atividade da fosfolipase A tem a função de desempenhar um papel na invasão de tecidos celulares do hospedeiro em lesões de candidíase. A fosfolipase A no local de formação do broto sugere uma função no crescimento celular e possivelmente na formação do tubo germinativo pela hidrólise de fosfolipídios das membranas celulares e intracelulares (NIEWERTH; KORTING, 2002). A fosfolipase B pode ser identificada como a principal fosfolipase secretada por cepas patogênicas de *C. albicans*; já a fosfolipase C é presente em maior quantidade na fase filamentosa do que a leveduriforme; enquanto a fosfolipase D está presente somente em sua forma solúvel e associada a membrana, sendo estimulada durante a transição

dimórfica (IBRAHIM et al, 1995; BENNETT et al, 1998; NIEWERTH; KORTING, 2002).

3.1.4. Antifúngicos no tratamento da candidíase

Na prática clínica, é recomendado a utilização de antifúngicos poliênicos, agentes azólicos e equinocandinas no tratamento das candidíases, sendo a forma invasiva a de maior restrição na terapêutica antifúngica (anfotericina B, fluconazol, voriconazol, isavuconazol, caspofungina, anidulafungina e micafungina) (PAPPAS et al., 2015).

Os poliênos (anfotericina B e nistatina) são macrolídeos que formam um complexo com o ergosterol, perturbando a membrana plasmática fúngica resultando no extravasamento do conteúdo citoplasmático, e consequente morte celular (MORIO et al., 2017). Devido aos seus efeitos fungicidas poucos estudos descreveram isolados de *Candida* spp. resistentes; entretanto *Candida lusitanae* e *Candida haemulonii* exibem resistência intrínseca à anfotericina B, assim como em alguns isolados clínicos de outras espécies de *Candida* foi constatada a resistência devido a alterações na via do ergosterol envolvendo mutações nos genes *ERG2*, *ERG3*, *ERG11* e *ERG5* (MORIO et al., 2017). Apesar do amplo espectro de ação e efeito fungicida, o uso da anfotericina B no tratamento das infecções invasivas tem sido limitado devido ao alto grau de toxicidade relacionados aos efeitos agudos durante a infusão (febre, vômito, dor de cabeça, hemólise) e os efeitos crônicos (hepatotoxicidade e nefrotoxicidade). Durante o tratamento com anfoterecina B, aproximadamente 80% dos pacientes tiveram vários efeitos colaterais agudos e 30% apresentam disfunção renal (PAPPAS et al., 2015; OSTROSKY-ZEICHNER et al. 2003; LEMKE et al, 2005).

Os agentes azólicos (imidazóis e triazóis) são compostos sintéticos, que inibem a enzima C14-alfa lanosterol demetilase, essencial na via de síntese de ergosterol, principal esterol das membranas fúngicas. Esta enzima pertence ao complexo P450 do citocromo fúngico, e em consequência, os agentes azólicos também inibe o complexo P450 do citocromo humano, levando a interações medicamentosas e relevantes efeitos colaterais hepáticos (CHARLIER et al., 2006). O grande representante dos triazóis, fluconazol, é indicado no tratamento das infecções invasivas causadas por *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., entretanto algumas espécies de *Candida* possuem resistência intrínseca (*C. krusei*) ou são menos susceptíveis (*C. glabrata*). Interessantemente, com as

modificações estruturais da molécula do fluconazol, foram originadas o voriconazol e o isavuconazol (MAERTENS, 2004), ambas licenciadas e usadas em alguns países, incluindo o Brasil. Outras modificações estruturais foram realizadas dando origem ao ravuzonazol e albaconazol (MAERTENS, 2004; PEYTON et al, 2015; YAMAGUCHI, 2016; DONG et al, 2021), ambas em fase clínica II/III (www.clinicaltrials.gov; www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov; data de acesso: 13/03/2023). Todas essas modificações fizeram com que essa nova geração de compostos triazólicos apresentassem maior eficácia antifúngica e redução de efeitos hepatotóxicos (PASQUALOTTO et al, 2010; PEYTON et al, 2015; YAMAGUCHI, 2016; DONG et al, 2021). Por outro lado, os triazóis atuam no mesmo alvo fúngico.

A resistência de *Candida* aos azóis pode surgir devido a uma modificação na enzima alvo, redução do acesso do fármaco ao alvo, ou a combinação desses mecanismos. Mutações pontuais no gene *ERG11* (codifica a enzima C14-alfa lanosterol demetilase), leva a alteração da enzima alvo, diminuindo a afinidade pelo antifúngico. A superexpressão do gene *ERG11*, a célula consegue produzir elevadas concentrações da enzima alvo, ocasionando uma necessidade de elevadas concentrações intracelular do fármaco para inibir as enzimas presentes na célula (PFALLER et al., 2010). Outras modificações podem ocorrer, como a superexpressão de bombas de efluxo (transportadores ABC e MDR), que leva a diminuição da concentração intracelular dos azóis (XU et al., 2015; PERLIN et al., 2017).

O perfil de resistência ao fluconazol nas espécies mais comuns de *Candida* variou de 0,3% em *C. albicans* a 8,1% de resistência em *C. glabrata*. A baixa taxa de resistência ao fluconazol entre isolados de *C. albicans* é consistente na literatura, mostrando pouca mudança de 0,2% em 1997-2001 para 0,1% em 2015–2016. A resistência ao fluconazol para *C. glabrata* mostrou aumento de 8,6% para 10,1% referentes ao ano 1997 e 2014, já *C. tropicalis* teve um aumento de 2,5% para 4,9% entre 2015-2016 (PFALLER et al, 2019).

Além dos triazóis, novos azóis foram desenvolvidos, como os tetrazóis, compostos orgânicos heterocíclicos com um anel de cinco membros contendo quatro átomos de nitrogênio e um átomo de carbono. O tetrazol e seus derivados foram estudados quanto ao seu potencial como agentes anticancerígenos, anti-inflamatórios e antimicrobianos. Dentre estes, os compostos VT-1129 e VT-1598, mostraram inibição *in vitro* para *Cryptococcus* spp. e *Candia auris* (LOCKHART et al, 2016; WIEDERHOLD et al, 2019). Além destes, o composto acetato (\pm)-1-[5-(2-clorofenil)-2H - tetrazol-2-

il]propan-2-il (E5) provou ser inibidor eficaz no crescimento fúngico de *C. albicans* e com menor citotoxicidade para células epiteliais vero (BONDARYK ET AL, 2015).

As equinocandinas são lipopetideos semissintéticos que inibem a síntese de 1,3- β -D-glucose, um importante componente da parede celular fúngica, pela inibição da 1,3- β -D glucana sintase, resultando na ação fungicida em *Candida* spp. e fungistática em *Aspergillus* spp. (LEWIS, 2011). As equinocandinas atualmente utilizadas são a caspofungina, micafungina e anidulafungina, enquanto a rezafungina está em fase clínica 3 (THOMPSON III et al, 2021, NCT04368559 e NCT03667690). Apesar do uso das equinocandinas ser a mais recente na prática médica, estudos tem relatado o aumento da frequência de isolados de *Candida* spp. resistentes nos Estados Unidos; em 2014 estudos relatam uma alta taxa de resistência, principalmente *C. glabrata*, ultrapassando a 10%; e os mecanismos de resistência relatados são mutações pontuais na subunidade *fkp1p* da enzima 1,3 β -D glucana sintase e superexpressão de bombas de efluxo (PERLIN et al., 2017). A resistência à micafungina foi mais proeminente entre os isolados de *C. glabrata* na América do Norte (2,8%), enquanto nenhum dos isolados de *C. glabrata* apresentaram resistência na América Latina e 0,6% na Europa, dados levantados pelo programa SENTRY 2006-2016 (PFALLER et al, 2019).

Embora esses antifúngicos supracitados serem utilizados na prática clínica das candidíases, eles possuem algumas limitações, dentre elas o aumento de isolados clínicos resistentes às 3 principais classes de antifúngicos, espectro de ação limitado, alta toxicidade, baixa estabilidade química, baixa solubilidade em água, pouca absorção pelo sistema gastrointestinal, financeiramente não são acessíveis e são disponíveis poucas opções medicamentosas de uso oral (www.gaffii.org; PAPPAS et al., 2016; PERLIN et al., 2017). Dessa forma, faz-se necessário a busca de novas estratégias terapêuticas para solucionar a falta de opção e, também, os problemas farmacocinéticos dos atuais antifúngicos.

Um agente é considerado inovador quando cumpre alguns critérios como a ausência de resistência cruzada ao antimicrobiano existente, nova classe química, novo alvo na célula microbiana; ou novo mecanismo de ação (WHO, 2017). Vários grupos de pesquisa têm trabalhado por este viés com o intuito de desenvolver novas classes de antifúngicos além daqueles cujo alvos celulares são a parede celular ou membrana plasmática (PERFECT, 2017; LIU et al., 2018). Outras estratégias promissoras são através do desenvolvimento de inibidores dos fatores de virulência de *Candida* spp., responsáveis pela invasão, proliferação e resistência no hospedeiro, estes fatores

compreendem: adesinas, fosfolipases, proteinases, morfogênese (mudança de levedura para pseudohifa/hifa), biofilme e *switching* (CALDERONE, FONZI, 2001). Assim, neste projeto iremos investigar a atividade antifúngica de moléculas sintéticas de uma nova classe química (oxazolinás) e uma molécula de reposicionamento (miltefosina).

3.2.Oxazolinás

As oxazolinás são compostos contendo um anel heterocíclico de 5 membros e na sua estrutura há um grupo endo-imino éter (-N=C-O-) podendo ser de origem natural ou sintética (TILVI; SINGH, 2016). A primeira oxazolína foi sintetizada por Andreasch e colaboradores (1884), eles criaram um composto com uma nova estrutura cíclica, mas não conseguiram deduzir a fórmula correta. Gabriel e Heymann (1889) foram o primeiro grupo que conseguiram sintetizar em laboratório uma síntese bem-sucedida de oxazolinás, obtido 2-fenil- Δ^2 -oxazolína a partir de β -bromoetil benzamida, e álcali. A Δ^2 -oxazolína é incolor, seu odor é adocicado e um pouco semelhante à piridina, miscível em água, etanol e éter (WENKER, 1938). Existem três isômeros estruturais: 2-oxazolína, 3-oxazolína e 4-oxazolína. As 2-oxazolinás são amplamente utilizadas como ligantes em catálise, especialmente em reações assimétricas. Elas são também utilizadas como blocos de construção na síntese de compostos orgânicos complexos, como produtos naturais e fármacos, podem ser encontradas naturalmente em algumas plantas e organismos marinhos, sendo as mais comuns, conhecidas e extensivamente estudadas (WILEY; BENNETT, 1949).

As oxazolinás são obtidas por síntese química e podem estar presentes em organismos marinhos e terrestres como as esponjas marinhas *Actinoplanes* spp., bactérias *Vibrio fluvialis* e *Vibrio cholerae*, e ascídias marinhas *Lissoclinum bistratum* (TILVI, SINGH, 2016). As ascídias marinhas do gênero *Lissoclinum* produzem peptídeos cíclicos. Entre elas, a *L. patella* sintetiza duas classes de peptídeos cíclicos, cada uma contendo aminoácidos tiazol e oxazolína em sua composição. (DAVIDSON, 1993).

As 2-oxazolinás e compostos derivados podem ter uma ampla gama de atividades farmacológicas, como antibacteriano, antiviral, antiparasitário, antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral, antifúngico e neuroprotetor (WASCHINSKI et al., 2008; MADIA et al., 2019; KHANUM et al., 2008; FAN et al., 2007; MARTINS et al., 2015; LI et al, 2016; WILSON et al., 2017). Essas moléculas também podem ser usadas como nanocarreadores de fármacos quando estão no estado polimérico, devido a sua

estabilidade, mantendo os recursos necessários de biocompatibilidade e baixa dispersão. As excelentes propriedades dos polímeros Poli (2-alkil/aryl-2-oxazolina)s (PAOx) permitem seu uso em uma ampla variedade de diferentes aplicações biomédicas, desde a administração de fármacos em locais direcionados até formulação de drogas (De LA ROSA, 2013). Além disso, as oxazolininas têm sido aplicadas na química para a preparação de diversos materiais, como surfactantes, revestimentos, aditivos de gasolina, estabilizadores de espuma, películas protetoras, reagentes, adesivos, ligantes e reagentes agrícolas (MAKINO; KOBAYASHI, 2010).

As atividades antimicrobianas apresentadas pelas oxazolininas foram demonstradas Martins e colaboradores (2015), cujo verificaram a atividade antimicrobiana de poli(oxazolinina)s nas cepas de *Aerococcus* spp., *Candida* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Os polímeros oxazolinínicos têm potencial como poderosos agentes biocidas contra leveduras e bactérias, provavelmente relacionados à ação na parede celular de ambos os grupos de microrganismos. Padmavathi et al (2009) sintetizaram bis heterociclos a partir do éster metílico do ácido aroileno-sulfonilacético explorando a porção éster usando complexos de lantanídeo 2-aminoalcóxido para obter 2-oxazolininas e a porção olefina, esses compostos foram testados quanto à atividade antimicrobiana *in vitro* e apresentaram ação para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Fusarium solani*, *Curvularia lunata* e *Aspergillus niger*. Além disso, os derivados de oxazolininas como, indolyloxazolininas e derivado coumarin[8,7-e][1,3]oxazina, mostraram atividade antineoplásica e antifúngica (*Botrytis cinerea*, *Colletotrichum capsici*, *Alternaria solani*, *Gibberella zeae*, *Rhizoctonia solani*, e *Alternaria mali*), respectivamente (Li et al, 2002; ZHANG et al, 2016).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que moléculas sintéticas derivadas de 2-arylloxazolininas (26 derivados), principalmente os compostos 4i e 9i, inibiram o crescimento de 10 isolados de *Candida* spp. (2 *C. albicans*, 2 *C. parapsilosis*, 2 *C. tropicalis*, 2 *C. glabrata* e 2 *C. krusei*) na faixa de <0,03 a 2 µg/mL sem apresentar efeito hemolítico nem mesmo na maior concentração testada (128 µg/mL) e baixa citotoxicidade sobre células hepáticas HepG2 refletindo em um alto índice de seletividade (100 - > 3000) (ARGOMEDO et al., 2020). Levando em consideração ao efeito antifúngico dos derivados sintéticos 2-arylloxazolininas inéditos, resolvemos dar continuidade na avaliação do efeito antifúngico e o estudo dos efeitos celulares e moleculares dos compostos sobre *Candida* spp., especialmente, sobre os atributos de virulência de *C. albicans*.

3.3. Miltefosina

Miltefosina (MFS, hexadecilfosfocolina) é um fármaco pertencente à família dos alquilfosfolípidios e da classe das alquifosfocolinas. São ésteres de fosfocolina de álcoois alifáticos de cadeia longa, possui o peso molecular de 407,57 g/mol e fórmula molecular $C_{21}H_{46}NO_4P$ e estão relacionados estruturalmente ao grupo dos alquil-lisofosfolipídios (CASTANYS-MUÑOZ et al, 2007; DORLO et al, 2012).

A sua descoberta ocorreu no início de 1980 na Alemanha pelo grupo de Ebil e Unger (1990), como um potencial fármaco no tratamento antineoplásico. A atividade antitumoral da MFS foi comprovada em uma variedade de modelos *in vitro* e *in vivo*, incluindo modelos de tumores autóctones, como no tratamento por hexadecilfosfocolina em carcinoma mamário em ratos (HILGARD et al., 1988).

A MFS foi selecionada para o tratamento clínico oral contra tumores sólidos e tratamentos tópicos de metástases em câncer de mama. Na década de 90 foi aprovada com o nome comercial Miltex® (Baxter, UK) para tratamentos tópicos em vários países da Europa (CROFT, ENGEL, 2006). A formulação oral foi descontinuada devido aos efeitos colaterais gastrointestinais limitantes da dose nestes pacientes (DORLO et al, 2012).

Na Inglaterra, a MFS e uma série de compostos análogos de fator de agregação de plaquetas (PAF) foram selecionados para ação contra a *Leishmania* spp. e tripanossomos, demonstrando ação contra amastigotas e promastigotas de *L. donovani*. Outras pesquisas apresentaram resultados promissores para *L. donovani* e *L. infantum*, levando a aprovação do uso oral da MFS (Impravido™) no tratamento de Leishmaniose visceral (LV) na Índia em 2002 (CROFT, ENGEL, 2006).

Atualmente, a MFS foi aprovada e indicada para o tratamento de Leishmaniose visceral (LV) e cutânea (LC) em diversos países de todos os continentes. Tanto na Europa como nos EUA a MFS foi considerada como droga órfão no tratamento da LV e também foi incluída pela OMS na lista modelo de medicamentos essenciais (DORLO et al, 2012, WHO, 2021). Somente em 2014 a MFS foi aprovada pelo FDA para o tratamento da LV (WARE et al, 2021). No Brasil, em 2016, foi liberado a utilização da MFS (Milteforan®) no tratamento LV canina e em 2018 a MFS (Impravido™) foi aprovada no tratamento da leishmaniose tegumentar pelo SUS (Portaria nº 56/2018- Ministério da Saúde).

Além da atividade anti-*Leishmania*, estudos *in vitro* tem mostrado efeitos para outros protozoários, como: *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Trichomonas vaginalis*; e amebas, p.ex. *Acanthamoeba keratitis*, *Naegleria fowleri*, *Amebic*

encephalitis e *Balamuthia mandrillaris* (EISSA et al., 2011; SARAIVA et al, 2002; PANCHIONI et al, 2013; HIRABAYASHI et al, 2019; ALLI et al, 2021). Estudos *in vitro* da ação de MFS em micro-organismos estão sendo realizados, demonstrando efeitos antivirais, antibacterianos e antifúngicos. No trabalho de Chugh et al (2007), a MFS reduziu drasticamente a formação de macrófagos infectados com HIV-1; já a ação deste fármaco nas bactérias em estudos *in vitro* mostraram resultados promissores para o tratamento de *Mycobacterium abscessus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (ALONSO et al, 2022; LLULL, RIVAS e GARCIA, 2007; MARTINEZ et al, 2019).

A ação *in vitro* antifúngica pode ser observado tanto em leveduras (*Candida* spp. (incluindo *C. auris*), *Cryptococcus* spp.), dermatófitos, fungos dimórficos (*Sporothrix* spp., *Paracoccidioides* spp. e *Histoplasma capsulatum*), como em fungos filamentosos (*Aspergillus* spp., *Fusarium oxysporum*, *Scedsoporium* spp.) (VILA et al, 2015, WIDMER et al., 2006; WU et al, 2020; SPADARI et al, 2018; BARBA-SANTOS et al, 2015; ROSSI et al, 2017; HAGJANI et al, 2023; VILA, QUINTANILHA, ROZENTAL, 2015; BARRETO et al., 2020). Entretanto, há poucos estudos *in vivo* avaliando a eficácia da MFS em modelos murinos de candidíase e criptococose (WIDMER, 2006; WIEDERHOLD et al, 2013; VILA et al., 2015; DE BASTIANI et al., 2020, SPADARI et al., 2019; SPADARI et al., 2023). Em modelo de invertebrado de *Galleria mellonella*, MFS nas doses de 20 mg/kg e 40 mg/kg reduziram a taxa de mortalidade de larvas infectadas com *C. albicans* ou *C. auris* assim como houve uma diminuição significativa da carga fúngica no tecido larvário (SPADARI et al., 2019; BARRETO et al, 2020). Em modelos murinos de candidíase mucocutânea (oral e vaginal) por *C. albicans*, a MFS demonstrou eficácia em reduzir a carga fúngica tecidual após o tratamento diário (VILA et al., 2015; DE BASTIANI et al., 2020). Por outro lado, em modelo murino de candidíase sistêmica por *C. albicans* a MFS nas doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg não apresentou eficácia antifúngica (RAVU et al, 2013).

Recentemente, o FDA designou a MFS como uma droga órfã para ser utilizada no tratamento de candidíases, devido ao aumento de casos de candidemia na população americana, ocasionando um aumento na internação e óbitos, além do aparecimento de espécies de *Candida* multirresistentes, como *C. auris*. Portanto, o FDA permitiu a utilização do ImpravidoTM (Profunda Inc) no tratamento dos casos de candidemia (FDA, 2021).

O mecanismo de ação da MFS nas células cancerígenas e em *Leishmania* spp. não estão totalmente esclarecidos, as hipóteses mais prováveis estão relacionadas a membrana celular, devido a semelhança com os fosfolipídios endógenos. Estruturalmente, são correspondentes aos surfactantes clássicos, podendo ocasionar lise celular em altas concentrações. Ao se inserir na bicamada lipídica, ocasiona um distúrbio biofísico das membranas celulares, interferindo com o metabolismo fosfolipídico, proliferação e vias de sinalização de sobrevivência celular, ativando várias vias de estresse que promovem a apoptose (PACHIONI et al, 2013).

Os possíveis mecanismos para a ativação de apoptose pela MFS estão relacionados a inibição da biossíntese de fosfocolina, induzindo um estresse do fator de transcrição pró-apoptótico CHPOD/GADD153, desencadeando uma mudança no equilíbrio geral de sinais apoptóticos e de sobrevivência. Outra sinalização apoptótica está relacionada na homeostase de colesterol e na auto-acumulação em microdomínios de membrana (lipídeos “rafts”); com o aumento de sua captação, levando à sinalização apoptótica (DORLO et al, 2012; PACHIONI et al, 2013).

Em geral, a MFS apresenta efeito fungicida em um amplo número de espécies fúngicas, contudo poucos estudos sobre mecanismos de ação têm sido realizados. No trabalho de Widmer et al (2006), a MFS inibiu em 25% a atividade citosólica da fosfolipase B1 (PLB1) em *C. neoformans*, inibindo as atividades de todos os três componentes do PLB1 criptocócico secretado e citosólico em altas concentrações (250 M). Spadari et al. (2018), sugeriu que a MFS aumenta a permeabilidade da membrana plasmática em *C. neoformans* por meio de uma interação com o ergosterol, ela também afeta a membrana mitocondrial, e o efeito fungicida relacionado ao evento de morte celular por apoptose. Em outras espécies de fungos a MFS induz a produção de melanina em concentração subinibitória (*Sporothrix* spp. e *Paracoccidioides* spp.), redução da presença de ergosterol da membrana de fungos dimórficos (*C. posadasii* e *H. capsulatum*) e altera a permeabilidade da membrana citoplasmática de *C. posadasii*, *H. capsulatum* e *S. brasiliensis* (ROSSI et al, 2017; BRILHANTE et al, 2015; VILLA et al, 2015). Recentemente, verificou que a MFS exerce o seu efeito fungicida em *C. krusei* por ligação ao ergosterol na membrana celular e a diminuição na viabilidade e condensação da cromatina induzindo a apoptose (WU et al., 2020).

Com o surgimento de novas cepas resistentes e tolerantes em *Candida* spp. aos fármacos atuais somados a designação da MFS como droga órfã pelo FDA no tratamento da candidíase, conhecer o seu mecanismo de ação torna-se fundamental para o tratamento

antifúngico. No trabalho de Barreto e colaboradores (2020), a MFS apresentou efeitos inibitórios *in vitro* em *C. auris*, com o CIM variando entre 1 e 4 µg/mL e atividade fungicida, além da atividade antibiofilme durante o biofilme em formação (0,25–4 µg/mL). Em 2013 e 2016, Vila e colaboradores, demonstraram resultados promissores de atividade antifúngica, cujo MFS apresentou boa atividade inibitória contra células planctônicas de *Candida* spp., com valores de CIM variando de 0,5 a >16 µg/mL e a presença de atividade fungicida e atividade antibiofilme em concentrações 4-64 µg/mL. Embora Vila et al. (2013 e 2016) tenham observado atividade antibiofilme e redução da filamentação de *C. albicans* por microscopia ótica e eletrônica de varredura, até o presente momento não há trabalhos publicados elucidando os mecanismos moleculares para a inibição desses eventos celulares.

4. CAPÍTULO I

4.1. Objetivo geral

Investigar a eficácia antifúngica dos compostos 2-ariloxazolininas sobre os isolados clínicos *Candida* spp. e a inibição dos fatores de virulência de *Candida albicans*.

4.1.1. Objetivos específicos

- A. Avaliar a atividade inibitória e fungicida de 2-ariloxazolininas sobre isolados de *Candida* spp.
- B. Avaliar a combinação dos 2-ariloxazolininas com antifúngicos padrão.
- C. Induzir resistência/tolerância em *C. albicans* por exposição sucessiva aos derivados 2-ariloxazolininas.
- D. Avaliar o efeito antibiofilme de 2-ariloxazolininas sobre biofilmes de *Candida* spp.
- E. Avaliar o efeito inibitório de 2-ariloxazolininas sobre a atividade protease e fosfolipase de *Candida* spp.
- F. Avaliar os de 2-ariloxazolininas sobre a morfogênese de *C. albicans*.
- G. Avaliar o efeito dos compostos de 2-aryloxazolininas sobre a expressão dos genes de virulência em *C. albicans*.
- H. Avaliar a toxicidade de 2-ariloxazolininas no modelo larvário de *Galleria mellonella*.
- I. Avaliar a eficácia antifúngica de 2-ariloxazolininas no modelo larvário de *G. mellonella* infectado com *C. albicans*.

Este capítulo gerou o artigo: “Novel 2-Aryloxazoline compounds exhibit an inhibitory effect on *Candida* spp., including antifungal-resistant isolates” publicado na revista ACS Medicinal Chemistry Letter em 2020.

Autores: Luis M. Z. Argomedo, Vinicius M. Barroso, Cristiane S. Barreiro, Mariana P. Darbem, Kelly Ishida e Helio A. Stefani

4.3. Conclusões do Capítulo I

Os compostos 2-ariloxazolininas inibiram os isolados de *Candida* spp., incluindo os resistentes, além de inibir alguns fatores de virulência como a atividade de enzimas hidrolíticas proteinase e fosfolipase. Apesar dos compostos não inibirem a atividade metabólica na formação do biofilme em *Candida* spp, ocorreu a redução da biomassa em 50% nas primeiras 12h nas altas concentrações dos compostos de 2-ariloxazolininas em *C. albicans*, provavelmente, a inibição nas primeiras horas esteja relacionada com a redução na expressão das adesinas, dificultando a adesão da levedura e formação inicial do biofilme. A inibição parcial ou total de hifas de *C. albicans* e *C. tropicalis* nos diferentes meios indutores de filamentação e os resultados de expressão gênica sugerem que os compostos regularam negativamente as principais vias indutoras de filamentação, como cAMP e MAPK. Futuros estudos são necessários para elucidar os demais mecanismos de ação dos compostos 2-ariloxazolininas em espécies de *Candida* bem como a avaliação do efeito antifúngico destes compostos em outros modelos invertebrados e vertebrados

5. CAPÍTULO II

5.1. Objetivo geral

Investigar a eficácia antifúngica da miltefosina e os mecanismos moleculares envolvidos no efeito antibiofilme em *Candida albicans*.

5.1.1. Objetivos específicos

- A. Avaliar a atividade antifúngica da miltefosina em isolados clínicos de *Candida albicans*.
- B. Determinar o efeito antibiofilme da miltefosina nas etapas de formação de biofilmes de *Candida albicans*.
- C. Avaliar o efeito da miltefosina na morfogênese de *Candida albicans*.
- D. Quantificar componentes estruturais da parede celular de *Candida albicans*.
- E. Avaliar o efeito da miltefosina sobre a expressão dos genes de virulência em *Candida albicans*.

5.5. Conclusão do Capítulo II

A MFS tem potencial como agente antifúngico contra *C. albicans* devido ao seu potente efeito inibitório e fungicida. Além disso, a MFS foi eficaz na inibição das fases de desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans*: aderência, formação do biofilme e sobre biofilme maduro, reduzindo a biomassa e a viabilidade celular. Por fim, sugerimos que a inibição da transição levedura-hifa pela MFS ocorre pela inibição das vias cAMP e MAPK em *C. albicans* como possível mecanismo molecular.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Concluimos que a busca de novos agentes antifúngicos através de novas moléculas sintéticas (2-ariloxazolininas) e reposicionamento de fármacos (miltefosina) mostraram-se promissores. Os compostos 4i e 9i apresentaram atividade antifúngica nos isolados de *Candida* spp; além de inibir os fatores de virulência (morfogênese de hifas, enzimas hidrolíticas, adesinas e candidalisina). A miltefosina possui efeito antifúngico sobre *C. albicans* e também apresentou inibição para alguns fatores de virulência (biofilme, adesinas, candidalisina e morfogênese). Sugerimos que inibição da transição levedura-hifa pelos derivados 2-ariloxazolininas e a miltefosina ocorre pela interrupção das vias cAMP e MAPK, como possível mecanismo molecular. Entretanto, a MFS demonstrou ser mais promissor devido o seu efeito fungicida, a ação antibiofilme e inibir completamente a filamentação de *C. albicans* em baixas concentrações. Enquanto os derivados 2-ariloxazolinínicos precisam ser melhor investigados quanto a síntese de análogos mais efetivos e quanto aos mecanismos celulares e moleculares de ação sobre as células fúngicas. Por fim, futuros estudos são necessários para descobrir outros mecanismos de inibição produzido por estes fármacos.

REFERÊNCIAS*

- ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T.F. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216(3), p. 445-451, 2017.
- ALLI, A. et al. Miltefosine: A Miracle Drug for Meningoencephalitis Caused by Free-Living Amoebas. **Cureus**, v. 13(3), p. 1-11, 2021.
- ALONSO, G. C. et al. A quest to find good primers for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 147, p. 1-13, 2018.
- ALONSO, L. Mycobacterium abscessus cell wall and plasma membrane characterization by EPR spectroscopy and effects of amphotericin B, miltefosine and nerolidol. **BBA – Biomembranes**, v. 1864(5), 2022.
- ALVES, C. T. et al. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. **Journal of Infection**, v. 69(4), p. 396-407, 2014.
- AMES, L. et al. *Galleria mellonella* as a host model to study *Candida glabrata* virulence and antifungal efficacy. **Virulence**, v. 8(8), p. 1909-1917, 2017.
- AOKI, W. et al. Profiling of adhesive properties of the agglutinin-like sequence (ALS) protein family, a virulent attribute of *Candida albicans*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 65, p. 121–124, 2012.
- ARGOMEDO, L. et al. A. Novel 2-Aryloxazoline Compounds exhibit an inhibitory effect on *Candida* spp., including antifungal-resistant isolates. **ACS Med. Chem. Lett.**, v.11, p. 2470-2475, 2020.
- ARKOWITZ, R. A.; BASSILANA, M. Recent advances in understanding *Candida albicans* hyphal growth. **F1000Res**, v. 8, 2019.
- BAKER, L. G. Chitosan, the Deacetylated Form of Chitin, Is Necessary for Cell Wall Integrity in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 6 (5), 2007.
- BANVILLE, N. et al. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. **Virulence**, v. 3(6), p. 497-503, 2012.
- BARAKAT et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel pharmacophores incorporating imidazoline-oxazoline scaffold. **Bull Korean Chem. Soc.**, v. 35 (2), p. 562-568, 2014.
- BARRETO, T. L. et al. Miltefosine as an alternative strategy in the treatment of the emerging fungus *Candida auris*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 56, p. 1-8, 2020.
- BASTOS, R. et al. Environmental triazole induces cross-resistance to clinical drugs and affects morphophysiology and virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 62, 2017.

- BENNETT, D. E. et al. Genetic characterisation of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida species* other than *Candida albicans*, **Microbiology**, v. 144, p. 55–72, 1998.
- BERMAN, J.; KRYSAN, D. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature**, v. 18, p. 319-331, 2020.
- BONDARYK, M. et al. Tetrazole activity against *Candida albicans*. The role of KEX2 mutations in the sensitivity to (±)-1-[5-(2-chlorophenyl)-2H-tetrazol-2-yl]propan-2-yl acetate. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 25 (3), p. 2657-2663, 2015.
- BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **J. Fungi**, v. 3(57), p. 1-29, 2017.
- BORBA-SANTOS, L. P. Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with in vitro low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. **J. Med. Microbiol.**, v. 64, p. 415-422, 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. **J. Applied Microb.**, v. 119, p. 962-969, 2015.
- CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiol.**, v. 9(7), p. 327-335, 2001.
- CALDERONE, R. et al. Antifungal drug discovery: the process and outcomes. **Future Microbiol.**, v. 9 (6), p. 791-805. 2014.
- CAMPOS, L. A. et al. Nanotechnology-Based Approaches for Voriconazole Delivery Applied to Invasive Fungal Infections. **Pharmaceutics**, v. 15 (1), 2023.
- CANTÓN, E. et al. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida species*. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 45, p. 203-206, 2003.
- CASTANYS-MUÑOZ, E. et al. A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. **Mol. Microl.**, v. 64(5), p. 1141-1153, 2007.
- CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 5385–539, 2001.
- CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 5385–539, 2001.
- CHARLIER, C. et al. O. Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, p. 384–410, 2006.
- CHATTERJEE S. et al. Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. **BMC Genomics**, v. 16, p. 686, 2015.
- CHEN, H. et al. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 11(1), p. 337-348, 2020.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd ed. CLSI supplement M27M44S. **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2022.

COLOMBO, A. L.; JUNIOR, J. N. A.; GUINEA, J. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. **Curr Opin Infect Dis.**, v. 30 (6), p. 528-538, 2017.

COSTA, C. R. et al. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 52(3), p. 139-143, 2010.

CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine — discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100 (1), p. 4-8, 2006.

CSANK, C. et al. Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. **Infect Immun.**, v. 66 (6), p. 2713-2721, 1998.

DAVIDSON, B. S. Ascidiaceae: Producers of amino acid derived metabolites. **Chem. Rev.**, v. 93, p. 1771-1791, 1993.

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. **Front. Microbiol.**, v. 10, 2020.

DE FREITAS, A. L. D. et al. Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against *Candida* spp. isolates and for vaginal candidiasis treatment. **J. Ethnopharmacology**, v. 216, p. 184-190, 2018.

DE LA ROSA, V. R. Poly(2-oxazoline)s as materials for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, p. 1211-1225, 2013.

DE GROOT, P. W. J. et al Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. **Eukaryot Cell**, v. 12, p. 470–481, 2013.

DIJCK, P. V. et al. Methodologies for in vitro and in vivo evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilm agents and surface coatings against fungal biofilms. **Microb. Cell**, v. 5 (7), p. 300-326, 2018.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **Plos One**, v.11, 2016.

DONG, J. et al. In Vitro activity of ravuconazole against *Candida auris* and vaginal candida isolates. **Mycoses**, v. 64(6), p. 651-655, 2021.

DONOHUE, D. S. et al. The N-terminal part of Als1 protein from *Candida albicans* specifically binds fucose-containing glycans. **Mol. Microbiol.**, v. 80, p. 1667–1679, 2011.

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

EBIL, H.; UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. **Cancer Treat.**, v. 17, p. 233-242, 1990.

- EISMAN, B et al. The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamyospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Eukaryot Cell.**, v. 5 (2), p. 347–358, 2006.
- EISSA, M. M. et al. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. **Int J Parasitol**, v. 41, p. 235-242, 2011.
- ENJALBERT, B. et al. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Mol Biol Cell**, v. 17 (2), p. 1018-1032, 2006.
- ESPINEL-INGROFF, A. et al. Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* Species to Fluconazole, Posaconazole, and Voriconazole. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 58, p. 2006–2012, 2014.
- FAN, L.; LOBKOVSKY, E.; GANEM, B. Bioactive 2-oxazolines: a new approach via one-pot, four-component reaction. **Org. Lett.**, v. 9 (10), p. 2015-2017, 2007.
- FRAZLY, A. et al. Chemical screening identifies filastatin, a small molecule inhibitor of *Candida albicans* adhesion, morphogenesis, and pathogenesis. **PNAS**, v. 110 (33), p. 13594-13599, 2013.
- FRENKEL, M. et al. Pathogenicity of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal candidiasis assessed in mice and *Galleria mellonella*. **J. Mycol. Med.**, v. 26, p. 1-8, 2016.
- GONÇALVES, B.; FERREIRA, C.; ALVES, C. T.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; SILVA, S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 7828, p. 1-23, 2015.
- GROPP, K. et al. The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. **Mol Immunol.**, v. 47 (2-3), p. 465-475, 2009.
- G-DAYANANDAN, N. et al. Propargyl-linked antifolates are dual inhibitors of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **J. Med. Chem.**, v. 57, p. 2643-2656, 2014.
- GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes Infect.**, v. 18 (5), p. 310-321, 2016.
- HAGHANI, I. et al. Antifungal activity of miltefosine against both azole-susceptible and resistant *Aspergillus* strains. **Int J Antimicrob Agents**, v. 61 (3), 2023.
- HEINTZ-BUSCHART et al. Identification of inhibitors of yeast-to-hyphae transition in *Candida albicans* by a reporter screening assay. **J. Biotechnol.**, v. 164, p. 137-142, 2013.
- HILGARD, P. et al. Characterization of the antitumor activity of hexadecylphosphocholine (D 18506). **Eur J Cancer Clin Oncol.**, v. 24 (9), p. 1457-1461, 1988.
- HIRABAYASHI, K. E. Oral miltefosine for refractory *Acanthamoeba* keratitis. **Am J Ophthalmol Case Rep**, v. 16, 2019.
- HOFFMANN, J. A. Innate immunity of insects. **Cur. Opinion in Immunol.**, v. 7 (1), p. 4-10, 1995.

HOYER, L.L.; COTA, E. *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vinhetas: Uma Revisão da Estrutura e Função da Proteína Als. **Microbiol Frontal**; v. 7 (280), 2016.

IBRAHIM, A. S. et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1993–1998, 1995.

ISHIDA, K. et al. Influence of tannin from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **J. Antim. Chem.**, v. 58, p. 942-949, 2006.

KHANUM, S. A.; KHANUM, N. F.; SHASHIKANTH, M. Synthesis and anti-inflammatory activity of 2-aryloxy methyl oxazolines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 4597-4601, 2008.

KHUN, D. M. et al. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 1773–1780, 2002.

KIM, S. et al. Release of transcriptional repression through the HCR promoter region confers uniform expression of HWP1 on surfaces of *Candida albicans* germ tubes. **PLoS One**, v. 13 (2), 2018.

KÓVACKS, R; MAJOROS, L. Fungal Quorum-Sensing Molecules: A Review of Their Antifungal Effect against *Candida* Biofilms. **J Fungi (Basel)**, v. 6 (3), 2020.

LANE, S. et al. DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*. **J. Biol Chem.**, v. 276(52), p. 48988-48996, 2001.

LOCKHART, S.R. et al. The Investigational Fungal Cyp51 Inhibitor VT-1129 Demonstrates Potent In Vitro Activity against *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 60(4), p. 2528-2531, 2016.

LEE, K. K. et al. Elevated cell wall chitin in *Candida albicans* confers echinocandin resistance in vivo. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 56 (1), p. 208-217, 2012.

LEMKE, A. et al. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 151-162, 2005.

LI, D. D. et al. Using *Galleria mellonella*–*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal Agents. **Biol. Pharm. Bull**, v. 36, p. 1482-1487, 2013.

LI, Q. et al. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Indolyloxazolines as a New Class of Tubulin Polymerization Inhibitors. Discovery of A-289099 as an Orally Active Antitumor Agent. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 12 (3), p. 465-469, 2002.

LI, R. et al. *Candida albicans* Cek1 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Enhances Fungicidal Activity of Salivary Histatin 5. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 59 (6), p. 3460-3468, 2015.

LI, S. et al. Design, synthesis, fungicidal activity, and unexpected docking model of the first chiral boscalid analogues containing oxazolines. **J. Agric. Food Chem.**, v. 64, p. 8927-8934, 2016.

- LIONAKIS, M.S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v. 6, p. 521-527, 2011.
- LIU, N. et al. Emerging new targets for the treatment of resistant fungal infections. **J. Med. Chem.**, 2018.
- LLULL, D.; RIVAS, L.; GARCÍA, E. In vitro bactericidal activity of the antiprotozoal drug miltefosine against *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic streptococci. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 51, p. 1844–1848, 2007.
- LIONAKIS, M.S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v. 6, p. 521-527, 2011.
- LOCKHART, S.R. et al. The Investigational Fungal Cyp51 Inhibitor VT-1129 Demonstrates Potent In Vitro Activity against *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60 (4), p. 2528-2531, 2016.
- LOH, J. M. et al. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4 (5), p. 419-428, 2013.
- LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13 (1), 2022.
- LUIZ, R. L. F. et al. Effect of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Candida albicans* biofilm formation. **BMC Complement. Altern. Med.**, v.15, p. 68, 2015.
- MADIA, V. N. et al. In vitro antiviral activity of new oxazoline derivatives as potent poliovirus inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 62, p. 798-810, 2019.
- MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10 (1), p. 1-10, 2004.
- MAKINO, A.; KOBAYASHI, S. Chemistry of 2-oxazolines: a crossing of cationic ring-opening polymerization and enzymatic ring-opening polyaddition. **Polym. Chem.**, v. 48 (6), p. 1251-1270, 2010.
- MARAS, B. et al. Hyperexpression of CDRs and HWP1 genes negatively impacts on *Candida albicans* virulence. **PLoS One**, v. 16 (6), 2021.
- MARDEGAN, R. C. et al. Diversidade fenotípica e genotípica entre amostras de *Candida albicans* isoladas de crianças saudáveis cárie ativas e livre de cárie. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37 (1), p. 26-32, 2006.
- MARTIN, R et al. A core filamentation response network in *Candida albicans* is restricted to eight genes. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.
- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. **Infect Immun**, v. 73, p. 6350–6362, 2005.
- MARTÍNEZ, O. F. Recent advances in anti-virulence therapeutic strategies with a focus on dismantling bacterial membrane microdomains, toxin neutralization, Quorum-Sensing interference and biofilm inhibition. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 74, 2019.

- MARTINS, C. et al. Antimicrobial activity of new green-functionalized oxazoline-based oligomers against clinical isolates. **Springerplus**, v. 4 (382), p. 1-5, 2015.
- MATHÉ, L.; VAN DJICK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, p. 251-264, 2013.
- MBA, I. E.; NWEZE, E. I. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 1797-1819, 2020.
- MONGE, R. A. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 152 (4), p. 905-912, 2006.
- MORIO, F. et al. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. **Int. J. Antimicrob. Ag.**, v. 50 (5), p. 599-606, 2017.
- MOUTANG, T. E.; ALBERTYN, J.; KÖHLER, G. *Candida albicans* mutant construction and characterization of selected virulence determinants. **J. Microbiol. Methods**, v. 115, p. 153-165, 2015.
- MOYES, D. L. et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, v. 532, p. 64–68, 2016.
- MUKHERJEE, P. K. et al. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18 (1), p. 163–194, 2005.
- MUÑOZ, J. et al. Antifungal activity of the biphosphinic cyclopalladate C7a against *Candida albicans* yeast forms in vitro and in vivo. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 1-10, 2017.
- MUÑOZ, J. F. et al. Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. **Nature communications**, v. 9, 2018.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 6 th ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2009. 1072 p.
- NAGLIK, J. R. Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. *Curr Opin Microbiol*, 52, 100-109, 2019.
- NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. **J. Med. Microbiol**, v. 55 (10), p. 1323-1327, 2006.
- NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 67 (3), p. 400-428, 2003.
- NAVARRO-GARCIA, F. et al. The MAP kinase Mkc1p is activated under different tress conditions in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 151 (8), p. 2737-2749, 2005.
- NIEWERTH, M.; KORTHING, H. C. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 44 (9-10), p. 361-367, 2002.
- NOBILE, C. J. et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. **Cell**, v. 148, p. 126-138, 2012.
- NOBILE, C. J. et al. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. **Eukaryot Cell**, v. 5 (10), p. 1604-1610, 2006.

- O'MEARA, T. R. Global analysis of fungal morphology exposes mechanisms of host cell escape. **Nat Commun**, v. 6 (6741), 2015.
- ODDS, F.C. 1988. The ecology of *Candida* and epidemiology of Candidosis, pp. 68-92. *Candida and Candidosis: a review and bibliography*. Balliere Tindall, **London**, UK.
- OKADA, H.Ç OHYA, Y. Fluorescent labeling of yeast cell wall components. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 8, p. 699-702, 2016.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. Amphotericin B: time for a new “gold standard”. **Clin Infect Dis**, v. 37, p. 415–425, 2003.
- PACHIONI, J. D. A. Alkylphospholipids – A Promising Class of Chemotherapeutic Agents with a Broad Pharmacological Spectrum. **J Pharm Pharm Sci**, v. 16 (5), p. 742-759, 2013.
- PADMAVATHI, V. et al. Synthesis and biological activity of a new class of sulfone linked bis (heterocycles). **ARKIVOC**, v. 10, p. 195-208, 2009.
- PAPPAS, P.G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, p. 1-50, 2015.
- PARRA-ORTEGA, B. et al. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 (3), p. 505-512, 2009.
- PASQUALOTTO, A. C. et al. Novel triazole antifungal drugs: focus on isavuconazole, ravuconazole and albaconazole. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 11 (2), p. 165-174, 2010.
- PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 16 (9), p. 603-616, 2017.
- PERLIN, D. S. Echinocandin Resistance in *Candida*. **Clin Infect Dis.**, v. 61 (6), p. 612-617, 2015.
- PERLIN, D. S. et al. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **Lancet Infect. Dis.**, v.17 (12), p. 383-392, 2017.
- PEYTON et al, 2015. Triazole antifungals: a review. **Drugs Today**, v. 51 (12), p. 705-718, 2015.
- PFALLER, M. A et al. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **Drugs Resist. Updates**, v. 13, p. 180-195, 2010.
- PFALLER, M. et al. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997–2016. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6 (S1), p. 79-94, 2019.
- PIATEK, M. et al. Utilising *Galleria mellonella* larvae for studying in vivo activity of conventional and novel antimicrobial agents. **Pathogens and Disease**, v. 78 (8), 2020.
- POLVI, E. J. et al. Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 72, p. 2261-2287, 2015.

- RAMOS, L. S. et al. *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 70 (1), p. 111-115, 2015.
- RAVU, R. R. et al. Synthesis and antifungal activities of miltefosine analogs. **Bioorganic Med Chem Lett**, v. 23, p. 4828–4831, 2013.
- RICHARDSON, J. P. Candidalysins Are a New Family of Cytolytic Fungal Peptide Toxins. **ASM Journals**, v. 13 (1), 2022.
- RODRIGUEZ, L. et al. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. **PLoS One**, v. 12, 2017.
- ROMO, J. A. et al. Development of Anti-Virulence Approaches for Candidiasis via a Novel Series of Small-Molecule Inhibitors of *Candida albicans* Filamentation. **mBio**, v. 8 (6), 2017.
- ROSSI, D. C. P. et al. Miltefosine is fungicidal to *Paracoccidioides* spp. yeast cells but subinhibitory concentrations induce melanisation. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 49, p. 465-471, 2017.
- RYBCZYNSKA, M. et al. MDR1 causes resistance to the antitumour drug miltefosine. **British Journal of Cancer**, v. 84 (10), p. 1405-1411, 2001.
- SALCI, T. P. et al. Targeting *Candida* spp. To develop antifungal agents. **Drug Discov. Today**, v. 23 (4), p. 802-814, 2018.
- SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Front. Med.**, v.3, 1-10, 2016.
- SARAIVA, V. B. Proinflammatory and Cytotoxic Effects of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) against Drug-Resistant Strains of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46 (11), p. 3472-3477, 2002.
- SCHWEIZER, A. et al. The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. **Mol Microbiol**, v. 38 (3), p. 435-445, 2000.
- SEARS, D.; SCHWARTZ, B. S. *Candida auris*: An emerging multidrug-resistant pathogen. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 63, p. 95-98, 2017.
- SHEKHAR-GUTURJA, T. et al. Dual action antifungal small molecule modulates multidrug efflux and TOR signaling. **Nat. Chem. Biol.**; v. 12 (10), p. 867-75, 2016.
- SIKORA, M et al. Differences in proteolytic activity and gene profiles of fungal strains isolated from the total parenteral nutrition patients. **Folia Microbiol.**, v. 56, p. 143-148, 2011.
- SCORZONI, L. et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in nonconventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoSOne**, v. 8 (3), 2013.
- SEARS, D.; SCHWARTZ, B. S. *Candida auris*: An emerging multidrug-resistant pathogen. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 63, p. 95-98, 2017.

- SHEKHAR-GUTURJA, T. et al. Dual action antifungal small molecule modulates multidrug efflux and TOR signaling. **Nat. Chem. Biol.**; v. 12 (10), p. 867-75, 2016.
- SIKORA, M et al. Differences in proteolytic activity and gene profiles of fungal strains isolated from the total parenteral nutrition patients. **Folia Microbiol.**, v. 56, p. 143-148, 2011.
- SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, p. 1961-1971, 2007.
- SPADARI, C. C. et al. Miltefosine Has a Postantifungal Effect and Induces Apoptosis in *Cryptococcus* Yeasts. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 62 (8), 2018.
- SPADARI, C. C. et al. Alginate nanoparticles as non-toxic delivery system for miltefosine in the treatment of candidiasis and cryptococcosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 5187-5199, 2019.
- SPADARI, C. C. et al. Oral delivery of brain-targeted miltefosine-loaded alginate nanoparticles functionalized with polysorbate 80 for the treatment of cryptococcal meningitis. **J Antimicrob Chemother.**, 2023.
- SUDBERY, P.; KIM, J. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **J. Microbiol.**, v. 49 (2), p. 171-177, 2011.
- SUDBERY, P.E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews**, v. 9, p. 737-748, 2011.
- SYKES, J. E. et al. In vivo development of fluconazole resistance in serial *Cryptococcus gattii* isolates from a cat. **Med Mycol**, v. 55, p. 396-401, 2017.
- TAKASHIMA, M.; SUGITA, T. Taxonomy of pathogenic yeasts *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, and *Trichosporon*: current status, future perspectives, and proposal for transfer of six *Candida* species to the genus *Nakaseomyces*. **J. Med. Mycol.**, v. 63, p. 119-132, 2022.
- TAVANTI, A. et al. Differential expression of secretory aspartyl proteinase genes (SAP-10) in oral *Candida albicans* isolates with distinct karyotypes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 10, p. 4726-4734, 2004.
- THOMPSON III, G. R. et al. Rezafungin Versus Caspofungin in a Phase 2, Randomized, Double-blind Study for the Treatment of Candidemia and Invasive Candidiasis: The STRIVE Trial. **Clinical Infectious Diseases**, v.73, p. 3647-3655, 2021.
- TILVI, S.; SINGH, K. S. Synthesis of oxazole, oxazoline and isoxazoline derived marine natural products: A review. **Curr. Org. Chem.**, v. 20 (8), p. 898-929, 2016.
- TURNER, S. A., BUTLER, G. The *Candida* Pathogenic Species Complex. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 4, 1-18, 2014.
- VILA, T. et al. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. **Virulence**, v. 8 (2), p. 150-158, 2017.
- VILA, T. V. M. et al. Effect of alkylphospholipids on *Candida albicans* biofilm formation and maturation. **J Antimicrob Chemother**, 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. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 59 (12), 2015.

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

VILA, T. V. M.; QUINTANILHA, N. S.; ROZENTAL, S. Miltefosine is effective against *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* nail biofilms in vitro. **J Med Microb**, v. 64, p. 1436–1449, 2015.

VUPALLA, S. et al. Structure-based lead optimization to improve the antifungal potency of the tetrahydroimidazo pyridine inhibitors targeted to *Candida albicans* dihydrofolate reductase and lanosterol 14- α -demethylase. **Med. Chem. Res.**, v. 28 (10), p. 1674-1682, 2019.

WARE, J. M., et al. Efficacy and tolerability of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis.**, v. 73 (7), p. 2457-2462, 2021.

WASCHINSKI, C. J. et al. Insights in the antibacterial action of Poly(methyloxazoline)s with a biocidal end group and varying satellite groups. **Biomacr.**, v. 9, p. 1764-1771, 2008.

WIEDERHOLD, N. P. The Fungal Cyp51-Specific Inhibitor VT-1598 Demonstrates In Vitro and In Vivo Activity against *Candida auris*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 63 (3), 2019.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2017 Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2021. WHO model list of essential medicines - 22nd list, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02>. Acessado em: 15 de Março, 2023.

WIDMER, F. Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) Has Broad-Spectrum Fungicidal Activity and Is Efficacious in a Mouse Model of Cryptococcosis. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 50 (2), p. 414-421, 2006.

WIEDERHOLD, N. P. et al. Limited Activity of Miltefosine in Murine Models of Cryptococcal Meningoencephalitis and Disseminated Cryptococcosis. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 57 (2), p. 745-750, 2013.

WIEDERHOLD, N. P. The Fungal Cyp51-Specific Inhibitor VT-1598 Demonstrates In Vitro and In Vivo Activity against *Candida auris*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 63 (3), 2019.

WILEY, R. H.; BENNETT, L. L. The chemistry of the oxazolines. **Chem. Rev.**, v. 44, p. 447-476, 1949.

WILSON, P.; KE, P. C.; DAVIS, T. P.; KEMPE, K. Poly(2-oxazoline)-based micro and nanoparticles: A review. **Eur. Pol. J.**, v. 88, p. 486-515, 2017.

WU, Y. et al. Antifungal Activity and Mode of Action of Miltefosine Against Clinical Isolates of *Candida krusei*. **Front. Microbiol.**, v. 11, 2020.

XIE, J. L. et al. Signaling through Lrg1, Rho1 and Pkc1 Governs *Candida albicans* Morphogenesis in Response to Diverse Cues. **PLOS Genet.**, v. 12 (10), p. 1-22, 2016.

XU, Y.; SHENG, F.; ZHAO, J.; CHEN, L.; LI, C. ERG11 mutations and expression of resistance genes in fluconazole resistant *Candida albicans* isolates. **Arch. Microbiol.**, v. 197, p. 1087-1093, 2015.

YAMAGUCHI, H. Potential of Ravuconazole and its Prodrugs as the New Oral Therapeutics for Onychomycosis. **Med Mycol J.**, v. 57 (4), p. 93-110, 2016.

YAP, H.Y. et al. Epidemiology and outcome of *Candida* bloodstream infection in an intensive care unit in Hong Kong. **Hong Kong Med. J.**, v. 15, p. 255–261, 2009.

ZHANG, M. Z. Microwave-assisted Synthesis and antifungal activity of coumarin[8,7-e][1,3]oxazine derivatives. **Molecular Diversity**, v. 20, p. 611-618, 2016.