



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**EFEITO INIBITÓRIO DE DROGAS ANTITUBERCULOSE
FRENTE À *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* E *Cryptococcus* spp.:
SÍNTESE DE ANÁLOGOS QUÍMICOS, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN*
VITRO E MECANISMO DE AÇÃO**

FRANCISCA JAKELYNE DE FARIAS MARQUES

Fortaleza/CE

2013

FRANCISCA JAKELYNE DE FARIAS MARQUES

EFEITO INIBITÓRIO DE DROGAS ANTITUBERCULOSE FRENTE À *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* E *Cryptococcus* spp.: SÍNTESE DE ANÁLOGOS QUÍMICOS, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E MECANISMO DE AÇÃO

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia Médica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rossana de Aguiar Cordeiro

Fortaleza/CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

M317e Marques, Francisca Jakelyne de Farias.
Efeito inibitório de drogas antituberculose frente à *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *Cryptococcus* spp.: síntese de análogos químicos, atividade antifúngica *in vitro* e mecanismo de ação / Francisca Jakelyne de Farias Marques. – 2014.
114 f.: il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2014.

Área de concentração: Ciências Biológicas III.

Orientação: Profa Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.

1. Testes de Sensibilidade Microbiana. 2. Histoplasma. 3. Isoniazida. 4. Hidrazonas I. Título.

CDD 616.9297

FRANCISCA JAKELYNE DE FARIAS MARQUES

Efeito inibitório de drogas antituberculose frente à *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *Cryptococcus* spp.: síntese de análogos químicos, atividade antifúngica *in vitro* e mecanismo de ação.

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia Médica.

Aprovada em: 12 / 12 / 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim
Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará

Profª. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho
Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará

Profª. Dra. Camila Gomes Virginio Coelho
Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral

DEDICATÓRIA

*Ao meu esposo, companheiro e amigo Luiz Antonio Telles
por todos os momentos ao meu lado e
pela parceria incondicional nas fases mais difíceis.
Aos meus pais, Hinterland e Catarina Marques,
pelo exemplo de fé e trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, pela oportunidade concedida, pela constante orientação e apoio, competência, amizade, por cada um dos ensinamentos, por todo esse período de convivência e, principalmente, por ter confiado em meu potencial.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela coorientação exemplar, incentivo e apoio, participação como membro da banca, e pelas considerações e sugestões que com certeza contribuirão na qualidade deste trabalho.

À Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pela dedicação, compromisso e disponibilidade no cotidiano do laboratório.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pelos ensinamentos e contribuições à minha formação científica e acadêmica.

À Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho, pelos primeiros ensinamentos em Microbiologia Médica, por todas as palavras de incentivo, carinho e por aceitar participar dessa banca examinadora.

À Profa. Dra. Camila Gomes Virginio Coelho, pela disponibilidade em participar dessa banca examinadora, pelas considerações e sugestões que contribuirão para o texto final deste trabalho.

Às Professoras Dra. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira e Dra. Ana Karoline da Costa Ribeiro pela participação na banca de qualificação deste trabalho.

A todos os professores e alunos do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, que contribuíram para minha formação acadêmica e científica.

Ao Prof. Dr. Jair Mafezoli e à Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira do Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) da Universidade Federal do Ceará, pela orientação, colaboração e acolhida em seu laboratório.

À Profa. Karyna de Farias Marques, pela correção gramatical e ortográfica desta tese.

Às minhas companheiras de bancada Angela Donato Maia Malaquias, Charlline Vlândia Silva de Melo, Erica Pacheco Caetano e Rosana Serpa pela colaboração essencial para a conclusão deste trabalho, e, acima de tudo, pela nossa amizade e carinho.

Ao doutorando Marcos Reinaldo da Silva do Laboratório de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração essencial nas sínteses químicas e pela sincera amizade.

Aos alunos Jonathas Sales de Oliveira, Natalya Fachine Silva, Rebecca de Aguiar Cordeiro, Máyra Dias Thé, Valquíria Ferreira Mota, Rita Amanda Chaves de Lima, Heuziwanne Tavares Leite Andrade e muitos outros que passaram pelo laboratório durante meu mestrado e doutorado pelo apoio quando necessário e amizade.

A todos os alunos do Centro Especializado em Micologia Médica pelo apoio e colaboração neste trabalho.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, em especial à Carolinda Vilma Soares de Oliveira, Daniel Teixeira Lima e Terezinha de Jesus Santos Rodrigues, pelo carinho, atenção e boa vontade sempre.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos meus pais e minha família, que sempre me ensinaram a permanecer com o coração bom e sincero e trabalhar com dedicação, procurando fazer sempre o melhor.

A Deus, fonte de todo o bem e todas as Graças realizadas em minha vida.

*“Ser feliz, não é ter um céu sem tempestade, caminhos sem acidentes,
trabalhos sem fadigas, relacionamento sem decepção (...)
Ser feliz não é ter a vida perfeita, mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância,
usar as falhas para esculpir a serenidade.
É usar a dor para lapidar o aprendizado,
e usar os obstáculos para abrir as janelas da sabedoria”.*

Trecho do livro “Direito de Sonhar” de Vanda Farias

RESUMO

Nos últimos anos, os avanços na terapia imunossupressora, a melhoria dos métodos de diagnóstico e o crescimento do número de pacientes com HIV/aids têm contribuído para o aumento de casos de doenças oportunistas, principalmente aquelas relacionadas a infecções fúngicas sistêmicas. A histoplasmose clássica e a criptococose são micoses profundas de caráter oportunista, potencialmente fatais em pacientes imunodeprimidos, que podem mimetizar a tuberculose quanto aos aspectos clínicos e radiológicos em pacientes com acometimento pulmonar. Embora haja terapêutica disponível para o tratamento dessas infecções, casos de histoplasmose e criptococose refratárias às drogas antifúngicas convencionais estão sendo descritos, o que vêm estimulando a busca de novos compostos com potencial antifúngico para a terapia dessas micoses. O objetivo deste trabalho foi sintetizar hidrazonas derivadas da droga antituberculose isoniazida (INH) e determinar o efeito inibitório, *in vitro*, desses compostos isolados e em combinação com anfotericina B (AMB) contra cepas de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (n=25) na forma planctônica e biofilme. Além disso, buscou-se avaliar o potencial antifúngico *in vitro* das drogas INH e etionamida (ETH) sozinhas e em associação com os derivados azólicos frente a espécies de *Cryptococcus*. Este estudo também buscou investigar os mecanismos de ação envolvidos na atividade antifúngica das drogas sobre as células dos referidos fungos e sobre a taxa de morte intracelular de *H. capsulatum* mediada por macrófagos. A síntese dos compostos foi realizada a partir da reação entre INH e várias cetonas em radiação de micro-ondas, sendo o efeito citotóxico dos análogos verificado em culturas de células humanas. Todas as drogas foram analisadas pela técnica de microdiluição em caldo, documento M27-A3 preconizado pelo CLSI. A extração dos esteróis e a permeabilidade da membrana fúngica foram averiguadas, respectivamente, por saponificação com aquecimento e por meio da leitura do sobrenadante da suspensão fúngica em comprimento de onda de 260 e 280 nm. Foram sintetizadas nove hidrazonas as quais não mostraram toxicidade frente a células tumorais humanas. Todos os compostos inibiram o crescimento *in vitro* das cepas de *H. capsulatum* nas fases filamentosa e leveduriforme; dentre os quais, N'-(1-feniletilden)isonicotinahidrazida – {N'-(1-fenil)} apresentou menores valores de concentração inibitória mínima, que variaram de 7,8 a 250 µg/mL, sendo observado também efeito sinérgico com AMB contra células planctônicas, biofilme maduro de *H. capsulatum* e células leveduriformes fagocitadas por macrófagos. Ademais, as drogas INH e ETH apresentaram efeito inibitório *in vitro* contra *C. neoformans* (n=17) e *C. gattii* (n=12) na forma planctônica e biofilme maduro, além de reduzir a biomassa fúngica do biofilme em formação em ambas as espécies. INH e ETH também apresentaram sinergismo quando combinadas com os derivados azólicos fluconazol e itraconazol frente a cepas de *Cryptococcus*. O estudo mostrou ainda que N'-(1-fenil) e as drogas antituberculose testadas de forma isolada foram capazes de reduzir o teor de ergosterol total das células planctônicas e alterar a permeabilidade da membrana nos fungos testados, o que demonstra a capacidade dessas drogas em permeabilizar e desestabilizar a membrana celular fúngica. Os resultados abrem novas perspectivas para a busca de potenciais drogas antifúngicas e a descoberta de alvos moleculares importantes contra células planctônicas e biofilme de *H. capsulatum* e espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Palavras-chave: Testes de Sensibilidade Microbiana, *Histoplasma*, Isoniazida, Hidrazonas, Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*

ABSTRACT

In recent years, advances in immunosuppressive therapy, improved diagnostic methods and the growing number of patients with HIV/AIDS have contributed to the increase in cases of opportunistic diseases, especially systemic fungal infections. Classical histoplasmosis and cryptococcosis are opportunistic deep mycoses that are potentially fatal in immunocompromised patients. These diseases can mimic tuberculosis for their clinical and radiological aspects in patients with pulmonary involvement. Although there is an available treatment for these infections, cases of histoplasmosis and cryptococcosis refractory to conventional antifungal drugs have been described, which have stimulated the search for new compounds with antifungal activity for treating these mycoses. The aim of this work was to synthesize hydrazones derived from antituberculosis drug isoniazid (INH) and determine the *in vitro* inhibitory effect of these compounds alone and in combination with amphotericin B (AMB) against strains of *H. capsulatum* var. *capsulatum* (n=25) in planktonic form and biofilm. Furthermore, we sought to evaluate the *in vitro* antifungal potential of the drugs INH and ethionamide (ETH) alone and in combination with azoles against *Cryptococcus* species. This study also sought to investigate the mechanisms involved in the antifungal activity of these drugs on fungal cells and on the rate of macrophage-mediated intracellular killing of *H. capsulatum*. Compound synthesis was performed by the reaction between INH and various ketones under microwave radiation. Afterwards, the cytotoxic effect of the analogs on human cell cultures was evaluated. All drugs were analyzed by broth microdilution technique, as recommended by CLSI, document M27-A3. The extraction of sterols and fungal membrane permeability were investigated, respectively, by saponification with heating and by reading the supernatant of the fungal suspension at wavelength of 260 to 280 nm. Nine hydrazones were synthesized and none of them showed toxicity against human tumor cells. All compounds inhibited the *in vitro* growth of *H. capsulatum* strains in yeast and filamentous phases, out of which N'-(1-phenylethylidene)isonicotinahydrazide - {N'-(1-phenyl)} presented lower minimum inhibitory concentrations, ranging from 7.8 to 250 µg/mL. In addition, this compound also presented synergistic interaction with AMB against planktonic cells, mature biofilm and yeast cells of *H. capsulatum* within macrophages. Moreover, the drugs INH and ETH exhibited *in vitro* inhibitory effect against *C. neoformans* (n=17) and *C. gattii* (n=12) in planktonic form and in mature biofilm and reduced the fungal biomass during the process of biofilm formation by both species. INH and ETH also interacted synergistically with azoles itraconazole and fluconazole against strains of *Cryptococcus*. The study also showed that N'-(1-phenyl) and antituberculosis drugs alone reduce the total ergosterol content of planktonic cells and alter membrane permeability in the tested fungi, which demonstrates the ability of these drugs to permeabilize and destabilize the fungal cell membrane. These results bring new perspectives for the search of potential antifungal drugs and the discovery of important molecular targets against planktonic and biofilm cells of *H. capsulatum* and strains of *C. neoformans* and *C. gattii*.

Keywords: Antimicrobial Susceptibility Tests, *Histoplasma*, Isoniazid, Hydrazones, *Cryptococcus neoformans* Complex / *C. gattii*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Evolução histórica das principais drogas antifúngicas empregadas na terapia das micoses sistêmicas e seus respectivos anos de aprovação pelo <i>Food and Drug Administration</i> (FDA, USA).....	21
Figura 2	Mecanismo de ação dos principais fármacos antifúngicos atuais com seus respectivos alvos moleculares na célula fúngica.....	22
Figura 3	A) Estrutura química da droga antifúngica Anfotericina B e B) mecanismo de ação da anfotericina B: formação de poro pela interação entre a droga e o ergosterol da membrana celular dos fungos.....	26
Figura 4	A) Estrutura química geral dos derivados azólicos imidazólicos; B) estrutura química geral dos derivados azólicos triazólicos e C) Interferência na síntese do ergosterol por efeito dos derivados azólicos, bloqueio da atividade das enzimas oxidativas do citocromo P-450, a lanosterol 14- α -demetilase, provocando o excesso de compostos metilesteróis, levando a formação de uma membrana com propriedades físicas alteradas.....	31
Figura 5	Principais mecanismos de resistência dos derivados azólicos A) superexpressão de genes que codificam as proteínas de efluxo de drogas; B) alterações na enzima-alvo lanosterol-14- α -demetilase mediada pelos genes <i>ERG11</i> e C) mutações de perda de função do gene <i>ERG3</i> , responsável pela biossíntese do ergosterol.....	36
Figura 6	Estrutura química das equinocandinas A) caspofungina; B) micafungina e C) anidulafungina.....	38
Figura 7	Mecanismo de ação das equinocandinas: inibição da biossíntese do β -(1,3)-D-glucano.....	39
Figura 8	Estrutura química das drogas antituberculose A) isoniazida; B) etionamida e C) esquema simplificado da membrana citoplasmática de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , demonstrando os sítios alvos das drogas isoniazida e etionamida.....	47
Figura 9	Reação de formação entre uma cetona e uma hidrazida, catalisada pela presença de uma base com a desidratação do intermediário tetraédrico, desprotonação do nitrogênio com a eliminação do íon hidroxônio (H ₃ O ⁺).....	48
Figura 10	Cultura de <i>H. capsulatum</i> na A) fase filamentosa obtida (da esquerda para a	

- direita) em ágar BHI, ágar batata dextrose, ágar lactrimel e ágar malte a 2% à temperatura de 25 °C; B) fase leveduriforme obtida em ágar BHI suplementado com 10% de sangue de carneiro à 37 °C; C) Aspecto micromorfológico de *H. capsulatum* na fase filamentosa obtida em preparação de lâmina-lamínula com lactofenol azul-algodão e D) Aspecto micromorfológico de *H. capsulatum* na fase leveduriforme obtida em preparação de lâmina-lamínula com lactofenol azul-algodão..... 53
- Figura 11 Aspectos morfofisiológicos de espécies de *Cryptococcus* A) cultura de *Cryptococcus* spp. obtida em ágar batata dextrose à temperatura de 25°C; B) cultura de *Cryptococcus* spp. obtida em ágar Semente de Níger com colônias acastanhadas; C) microscopia de *C. neoformans* com presença de cápsula polissacarídica obtida em preparação com tinta da China observadas em microscópio óptico em objetiva de 100x e D) microscopia de *C. neoformans* com presença de cápsula polissacarídica obtida em preparação com tinta da China observadas em microscópio óptico em objetiva de 100x..... 55
- Figura 12 Conteúdo total de ergosterol em cepas de *H. capsulatum* na fase leveduriforme cultivadas em meio RPMI sem antimicrobianos como controle (C) ou suplementado com N'-(1-fenil) ou itraconazol (ITC) em concentrações equivalentes a 2xCIM , CIM e CIM/2. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm SEM (n = 8) . Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles ($p < 0,05$)..... 75
- Figura 13 Conteúdo total de ergosterol em cepas de *Cryptococcus* spp. cultivadas em meio RPMI sem antimicrobianos como controle (C) ou suplementado com isoniazida (INH), etionamida (ETH) e itraconazol (ITC) em concentrações equivalentes a CIM e CIM/2. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm SEM. Os (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p < 0,05$) e (¥) indica diferenças estatisticamente significativas em relação ao ITC ($p < 0,05$). A) conteúdo de ergosterol nas células de *C. neoformans* (n=7) e B) conteúdo de ergosterol nas células de *C. gattii* (n=7)..... 75
- Figura 14 Absorbâncias do conteúdo extracelular de *H. capsulatum* após contato com N'-(1-fenil), isoniazida (INH) e anfotericina B (AMB), testadas

- isoladamente. As cepas foram incubadas em meio RPMI 1640 sem antimicrobianos como controle e em concentrações equivalentes a CIM/2. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm SEM (n=6). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles ($p < 0,05$). Absorvância do conteúdo extracelular de *H. capsulatum* a A) 260 nm e B) 280 nm..... 76
- Figura 15 As cepas de *Cryptococcus* spp. foram incubadas em meio RPMI 1640, sem antimicrobianos como controle (C), anfotericina B (AMB), isoniazida (INH) e etionamida (ETH) em concentrações equivalentes ao CIM e CIM/2. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm SEM (n=7). Os (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles ($p < 0,05$) Absorvância de conteúdo extracelular de *C. neoformans* A) a 260 nm; B) a 280 nm; Absorvância de conteúdo extracelular de células *C. gattii* C) a 260 nm e D) a 280 nm..... 77
- Figura 16 Atividade metabólica de *H. capsulatum* na forma de biofilme maduro. As cepas foram cultivadas em meio BHI caldo durante 72 horas para a formação de biofilme e tratado com diferentes concentrações de N¹-(1-fenil) e anfotericina B (AMB), isoladamente ou em combinação. Os poços de controles (C) foram incubados em meio RPMI sem antimicrobianos. Os resultados estão representados como percentagem de redução em comparação com os controles . Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm SEM (n=6). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles ($p < 0,05$)..... 78
- Figura 17 Cepas de *Cryptococcus* spp. foram cultivadas em meio RPMI durante 48 horas para permitir a formação de biofilme sem adição de antimicrobianos (C) e tratados com diferentes concentrações de INH e ETH. Os resultados estão representados em percentagem de redução em comparação aos controles livres de droga. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm SEM (n = 8). Os (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles ($p < 0,05$) e (¥) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação a AMB ($p < 0,05$). Atividade metabólica de *Cryptococcus* spp. na formação de biofilmes tratados A) com INH; B) com ETH; Atividade metabólica de

Cryptococcus spp. em biofilmes maduros tratados C) com INH e D) com
ETH.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de Concentração Inibitória Média (CI ₅₀) com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, feitos em duplicata em três linhagens tumorais humanas testadas na dose máxima de 250 µg/mL.....	68
Tabela 2	Identificação das hidrazonas sintetizadas de acordo com as cetonas utilizadas nas reações de síntese; valores de CIM para cada composto frente a cinco cepas de <i>H. capsulatum</i> na fase leveduriforme e filamentosa.....	70
Tabela 3	Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) dos análogos químicos da isoniazida (µg/mL) frente a cinco cepas de <i>H. capsulatum</i> na fase leveduriforme e filamentosa.....	71
Tabela 4	Atividade sinérgica <i>in vitro</i> de N'-(1-feniletilideno)isonicotinohidrazide [N'-(1-fenil)], combinada com anfotericina B (AMB) contra <i>Histoplasma capsulatum</i> na formas leveduriforme (L) e filamentosa (F) (n = 24).....	72
Tabela 5	Concentração inibitória mínima (CIM) de <i>in vitro</i> de cepas de <i>Cryptococcus</i> spp. na forma planctônica, de origem ambiental e clínica e cepas de referência para as drogas antituberculosas e antifúngicas.....	73
Tabela 6	Interações sinérgicas <i>in vitro</i> entre as drogas antituberculosas isoniazida (INH) e etionamida (ETH) combinada com os derivados azólicos itraconazol (ITC) e fluconazol (FLC) contra <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> na forma planctônica.....	74
Tabela 7	Número de células viáveis em cada amostra submetida ao tratamento com N'-(1-fenil), AMB, e N'-(1-fenil) mais AMB frente à PMφ contendo células leveduriformes de <i>H. capsulatum</i>	80
Tabela 8	Identificação, origem, ano de isolamento e procedência das cepas de <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> utilizadas na pesquisa.....	106
Tabela 9	Identificação, espécie, sorotipo e origem de isolamento das cepas do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> utilizadas na pesquisa.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5FC	5-flucitosina
5-LO	Enzima 5-Lipo-oxigenase
AFR	<i>Antifungal Resistance</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AMB	Anfotericina B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CDC	<i>Centers For Disease Control And Prevention</i>
CDR	<i>Candida drug resistance</i>
CEMM	Centro Especializado Em Micologia Médica
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COX	Enzima ciclo-oxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EMB	Etambutol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIC	<i>Fractional Inhibitory Concentration</i>
FICI	<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>
FLC	Fluconazol
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
INH	Isoniazida
ITC	Itraconazol
KatG	Enzima catalase/peroxidase
KOH	Hidróxido de Potássio
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico

pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteínas cinase C
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TB	Tuberculose
UFC	Unidade formadora de colônia
VRZ	Voriconazol

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Drogas antimicrobianas: origem e resumo histórico.....	17
1.2	Drogas antifúngicas: panorama atual.....	21
1.2.1	Anfotericina B.....	24
1.2.2	Derivados azólicos.....	29
1.2.3	Equinocandinas.....	36
1.2.4	Mecanismo de resistência em biofilmes fúngicos.....	41
1.3	Potencial antifúngico de drogas antibacterianas.....	44
1.3.1	Isoniazida e Etionamida.....	44
1.3.2	Hidrazonas.....	47
1.4	Micoses sistêmicas: contexto atual de histoplasmosse e criptococose.....	51
2	PERGUNTAS DE PARTIDA.....	57
3	HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	57
4	OBJETIVOS.....	58
4.1	Objetivo geral.....	58
4.2	Objetivos específicos.....	58
5	MATERIAS E MÉTODOS.....	59
6	RESULTADOS.....	68
7	DISCUSSÃO.....	81
8	CONCLUSÕES.....	84
9	PERSPECTIVA.....	85
	BIBLIOGRAFIA.....	86
	APÊNDICES.....	105
	Apêndice A.....	106
	Apêndice B.....	107
	Apêndice C.....	108
	ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 DROGAS ANTIMICROBIANAS: ORIGEM E RESUMO HISTÓRICO

Os primeiros relatos sobre o uso de compostos com propriedades antimicrobianas datam de aproximadamente 1.000 a.C., quando médicos chineses utilizavam bolores para tratar tumores e feridas infeccionadas (BEKAI, 2010). Ainda na antiguidade, outros registros citam a utilização, pelos reis persas, de vasos de cobre e prata para armazenar água e alimentos, a fim de preservá-los. As propriedades antimicrobianas dos metais também eram conhecidas pelos fenícios, gregos, romanos e egípcios que os utilizavam para esta mesma prática. No mesmo período, o uso do cobre como antisséptico foi relatado pelos antigos egípcios no primeiro tratado de procedimentos cirúrgico conhecido (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013). Mais tarde, 1.500 d.C. outras civilizações, como a indiana e a maia, também descreveram a ingestão de mofo de pão para o tratamento de disenterias, feridas, úlceras e infecções intestinais (RODRIGUES et al., 2007).

Apesar da percepção do homem sobre compostos com propriedades antimicrobianas ser um fato muito antigo, somente no século XIX, com o aprimoramento da alquimia e a descoberta da origem infecciosa de muitas doenças, que as drogas antimicrobianas começaram a ser produzidas por técnicas laboratoriais (MEIRELES, 2008). A primeira substância com ação antimicrobiana isolada em laboratório foi um alcaloide denominado quinina, em 1820, extraído a partir do pó obtido das raízes de uma árvore do gênero *Cinchona*, existente no Peru, e de ação eficaz no tratamento da malária (OLIVEIRA; SZCZERBOWSKI, 2009).

Desde então, a pesquisa por substâncias específicas para o combate de micro-organismos patogênicos foi sendo cada vez mais estudada, possibilitando em 1910, a produção dos primeiros quimioterápicos de ação sistêmica como o salvarsan, desenvolvido pelo bacteriologista alemão Paul Ehrlich, para a terapêutica da sífilis e da febre recorrente (MEIRELES, 2008). Na década seguinte, a descoberta da atividade antimicrobiana da penicilina por Alexander Fleming, tornou-se o grande marco para o estabelecimento de uma nova era na moderna quimioterapia (RODRIGUES et al., 2007). Apesar de seu surgimento em 1928, a penicilina só foi purificada e concentrada a partir de 1940, com a eclosão da Segunda Guerra Mundial, sendo utilizada para fins terapêuticos pela primeira vez em 1941, considerada o primeiro tipo de antibiótico existente (CARNEIRO, 2009).

Uma vez estabelecidos os métodos laboratoriais para a produção dos fármacos em escala comercial, as pesquisas nessa área aumentaram significativamente a partir de 1940, surgindo várias classes de antibacterianos como os nitrofuranos e as primeiras penicilinas de uso clínico. Com isso, a procura por novas substâncias antinfeciosas de origem microbiana foi intensificada, permitindo uma completa alteração no cenário da indústria farmacêutica mundial (BURHALDE, 2008). Essas pesquisas possibilitaram a descoberta de muitos antibióticos naturais, obtidos de bactérias e fungos do meio ambiente como a estreptomicina, cefalosporina C, eritromicina, tetraciclina, cloromicetina, dentre outros (MEIRELES, 2008).

O termo antibiótico só foi introduzido pela primeira vez em 1942, por Selman Waksman, conhecido pelo título “Father of Antibiotics”, ganhou o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina pela descoberta da estreptomicina, o primeiro antibiótico eficaz contra a tuberculose (KRESGE; SIMONI; HILL, 2004). Segundo o conceito original, os antibióticos são substâncias químicas produzidas pelo metabolismo de bactérias e fungos, que em baixas concentrações são capazes de inibir o crescimento de outros micro-organismos. Essa inibição pode ser de forma definitiva, quando a substância mata a célula microbiana, sendo designada pelos termos “bactericida” e “fungicida”, ou uma inibição reversível, agindo somente no período em que a molécula-alvo está ligada ao antibiótico, impedindo o crescimento e reprodução dos micro-organismos. Nesse caso são utilizados os termos “bacteriostático” e “fungistático” para defini-la (CARNEIRO, 2009; BEKAI, 2010).

Já no final da década de 1940 surgiram os primeiros casos de resistência bacteriana, associados principalmente às sulfonamidas e bactérias do grupo dos estreptococos e estafilococos resistentes à penicilina (TAVARES, 2000). Tal fato desencadeou uma corrida acelerada pela busca de novas substâncias antimicrobianas que começou no final do século XX e permanece até os dias atuais. O período que subsistiu entre 1940 e 1960 foi denominado “era de ouro dos antibióticos”, durante o qual se desenvolveram pesquisas que culminaram com o isolamento de vários produtos naturais com atividade biológica e a produção de antimicrobianos semi-sintéticos. Grande parte das drogas antimicrobianas atualmente conhecidas na medicina foi caracterizada nesse período, inclusive algumas drogas antifúngicas (CLARDY et al., 2006; AMINOV, 2010). Contudo, a utilização de iodeto de potássio como única forma de tratamento para a esporotricose humana e veterinária foi relatado bem antes, em 1903. Medicamento usado até hoje, o iodeto de potássio é considerado de grande importância na micologia médica (LACAZ et al., 2002). Durante este período (1940-1970) também foram introduzidas, no mercado farmacêutico, as drogas utilizadas na

terapêutica da tuberculose - pirazinamida; isoniazida (1952); rifampicina e etambutol (1966), que compõem até hoje o esquema de tratamento da referida doença (ARBEX et al., 2010a).

Ainda na década de 1940, as sulfonamidas inauguraram a terapia para doentes com micoses sistêmicas, como a paracoccidiodomicose (OLIVEIRA, 2012). Na década seguinte, foi disponibilizada a anfotericina B, primeira droga antifúngica a ser aprovada pela *U.S. Food and Drug Administration* – FDA, cujo espectro e eficácia a colocaram na posição, ainda mantida, de droga de referência no controle de infecções disseminadas (FILIPPIN; SOUZA, 2006). A 5-flucitosina é a única droga antifúngica que atua como antimetabólito; pouco útil em uso isolado, tem sido relatada por diversos autores como droga sinérgica da anfotericina B, sendo normalmente indicada para o tratamento de criptococose e candidíase (STEVENS, 2012).

O grupo de drogas azólicas teve seu uso clínico iniciado em meados da década de 1970, causando grande impacto na terapia antifúngica, pelo largo espectro de ação e, a partir do cetoconazol, pela facilidade da administração oral. Nos anos 90, aos imidazólicos juntaram-se os triazólicos - fluconazol e itraconazol – que apresentaram melhor biodisponibilidade e atividade antifúngica mais intensa. Em 2002, foi liberado para uso clínico o voriconazol, um triazólico sintético de segunda geração que combina amplo espectro de ação e melhor biodisponibilidade (LARRU; ZAOUTIS 2013). O posaconazol, triazólico oral de segunda geração, foi aprovado para a profilaxia antifúngica pela FDA em 2006, indicado para pacientes com idade igual ou maior que 13 anos com leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásica com alto risco de desenvolver infecções invasivas provocadas por *Aspergillus* e *Candida*, devido à sua condição de imunossupressão (FDA, 2010).

Atualmente, encontra-se em desenvolvimento três novos triazólicos de segunda geração, ravuconazol, isavuconazol e albaconazol, os quais apresentam largo espectro de atividade antifúngica contra patógenos resistentes e emergentes, quando comparado com fluconazol e itraconazol, além de farmacocinética e biodisponibilidade diferenciada (LARRU; ZAOUTIS, 2013; GUILLON et al., 2013).

Nos últimos anos, também foram desenvolvidas as formulações lipídicas de anfotericina B - lipossomal, dispersão coloidal e complexo lipídico (FILIPPIN; SOUZA, 2006) e duas novas classes de antifúngicos: as alilaminas e as equinocandinas. As alilaminas, representada pela droga sintética terbinafina, são utilizadas principalmente no tratamento de infecções causadas por dermatófitos, como micoses de pele e unha (SHEPPARD; LAMPIRIS, 2010), e as equinocandinas cujo principal representante é a caspofungina;

considerada a equinocandina mais utilizada no Brasil, teve sua aprovação pela FDA em 2001 (LAUTERT et al., 2011).

Mesmo com o desenvolvimento de vários medicamentos nas últimas décadas, a resistência aos antimicrobianos, entre os micro-organismos patogênicos, propagou-se rapidamente, ocasionada principalmente pelo uso indiscriminado de antibióticos. Esse fato tornou ineficazes muitos dos medicamentos disponíveis para o tratamento das doenças infecciosas (BEKAI, 2010; PIERCE et al., 2013). Dessa forma, micro-organismos outrora sensíveis a certos medicamentos, no início de 1980, agora provocam doenças reemergentes, de difícil tratamento, mesmo com o uso de antimicrobianos de última geração. É o caso de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, *Enterococcus* sp. resistentes à vancomicina, *Micobacterium tuberculosis* multi-resistentes e de *Candida* sp. e *Cryptococcus* spp. resistentes aos azólicos (BEKAI, 2010; PIERCE et al., 2013).

Assim, com o advento do uso clínico dos antibióticos, pode-se verificar que a resistência bacteriana às drogas antimicrobianas poderia ser uma característica natural das espécies ou ser adquirida por cepas individuais dentro de uma mesma população (TAVARES, 2000). A resistência é considerada um fenômeno genético, associado à existência de genes contidos nos micro-organismos que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas (COWEN; STEINBACH, 2008). A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem nos micro-organismos durante seu processo reprodutivo – como, por exemplo, erros nas sequências de bases que formam o DNA cromossômico ou pela importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível que se faz por meio de mecanismos como transdução, transformação e conjugação e, que nas bactérias, frequentemente, envolve genes situados em plasmídios e transposons (GUMBO, 2001).

Hoje, sabe-se que o uso dos compostos antimicrobianos é considerado por alguns autores um dos recursos mais bem sucedidos na história da quimioterapia e da medicina, apesar do aumento da resistência microbiana em detrimento do ritmo estagnado de descoberta de novos fármacos, que não vêm acompanhando a evolução dos micro-organismos patogênicos (AMINOV, 2010). A partir de 2000, poucas drogas antimicrobianas foram desenvolvidas, quando se compara ao período da “era de ouro dos antibióticos”. Este cenário tem preocupado a comunidade médica e científica ao que designaram “era pós-antibiótica” (GUIMARÃES et al., 2010; OMS, 2012).

1.2 DROGAS ANTIFÚNGICAS: PANORAMA ATUAL

Até a década de 1970, o tratamento das micoses profundas e oportunistas limitava-se principalmente às drogas 5-flucitosina e anfotericina B, cujas características baseiam-se no baixo espectro de ação e alta toxicidade, respectivamente (COWEN; STEINBACH, 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Com o advento dos derivados azólicos e as equinocandinas, uma melhora significativa na terapia dessas infecções foi observada nas décadas seguintes (LARRU; ZAOUTIS, 2013), devido à elevada eficácia *in vivo* e a baixa toxicidade desses compostos (Figura 1) (PASQUALOTTO; DENNING, 2008).

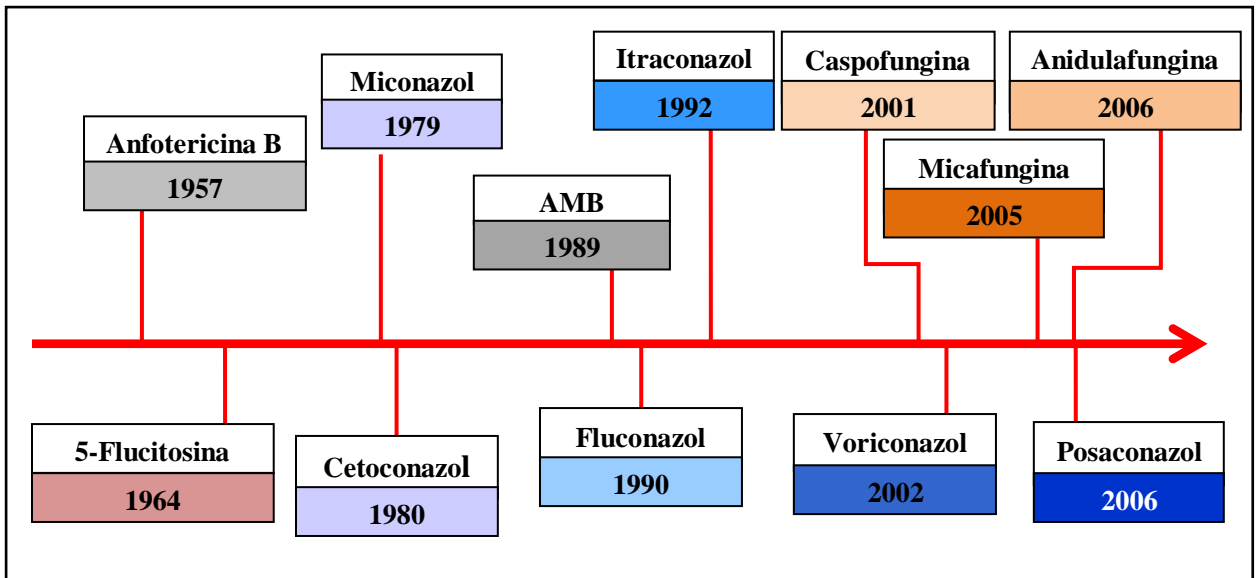


Figura 1 - Evolução histórica das principais drogas antifúngicas empregadas na terapia das micoses sistêmicas e seus respectivos anos de aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA, USA). Fonte: Adaptado de CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008.

Apesar do aumento no número de fármacos antifúngicos, a produção de novos medicamentos ainda é considerada insuficiente (GONZÁLEZ, 2009). A terapia atual para o tratamento das infecções fúngicas compreende poucas classes de drogas, que se diferenciam principalmente quanto aos seus mecanismos de ação (Figura 2): anfotericina B - alteração na permeabilidade da membrana plasmática (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009); 5-flucitosina - inibição da síntese de DNA ou RNA; griseofulvina - inibição da mitose (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009); derivados azólicos e alilaminas - inibição da síntese do ergosterol da membrana plasmática (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002); e equinocandinas - inibição da síntese de glucanos da parede celular fúngica (EMRI et al.,

2013). Dentre tais drogas, a anfotericina B, os derivados azólicos e as equinocandinas têm sido os principais fármacos utilizados na terapia clínica para o tratamento das micoses profundas e oportunistas nos últimos anos (FIANCHI et al., 2007; PETRIKKOS; SKIADA, 2007).

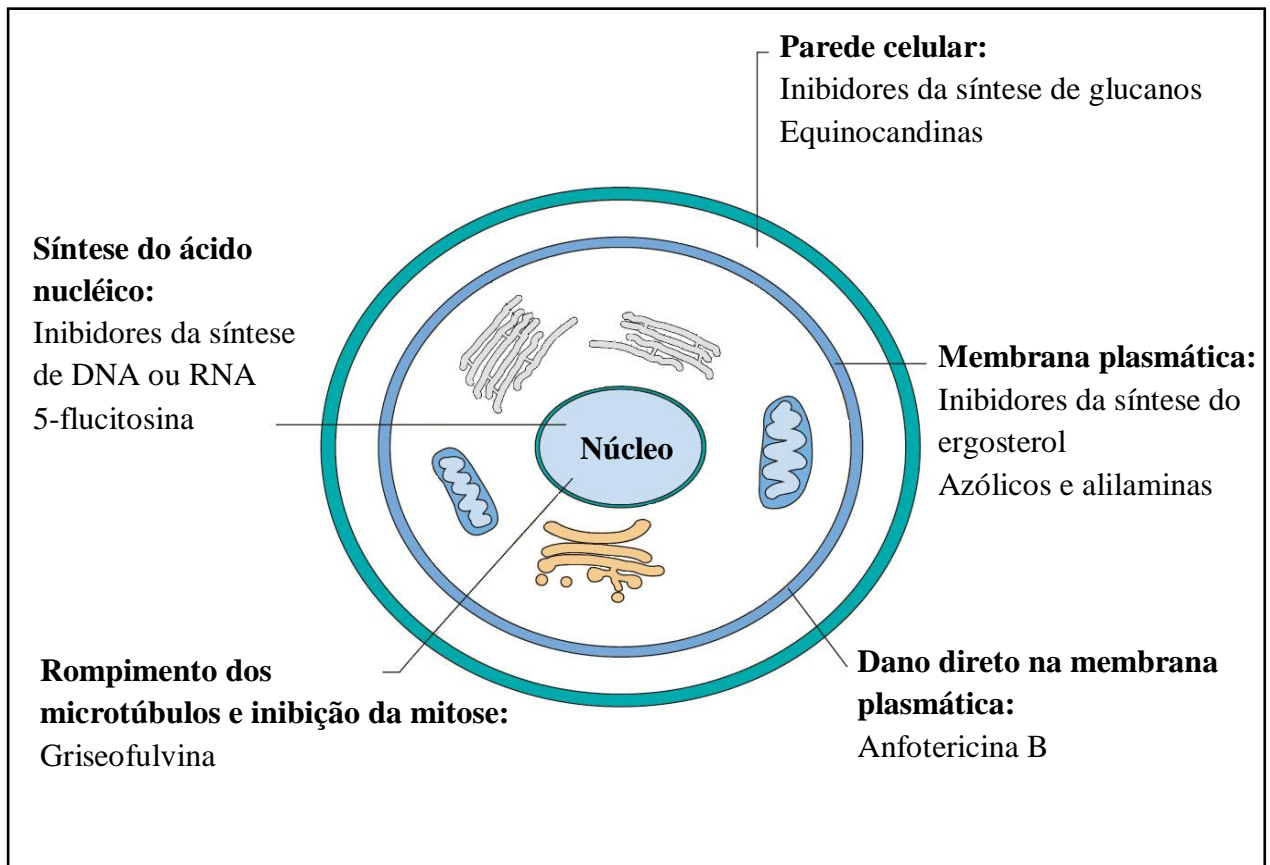


Figura 2 – Mecanismo de ação dos principais fármacos antifúngicos atuais com seus respectivos alvos moleculares na célula fúngica. Fonte: Adaptada de MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009.

Além do arsenal limitado, o óbice ao sucesso terapêutico antifúngico está relacionado principalmente aos efeitos adversos, baixo espectro de atividade antifúngica e surgimento de resistência intrínseca de espécies patogênicas às drogas de uso clínico, que tem sido verificada com maior frequência em *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e espécies do Complexo *Cryptococcus neoformans* (COWEN; STEINBACH, 2008). Em adição, dados experimentais demonstram que algumas dessas drogas, como o itraconazol e o fluconazol, podem induzir ao rápido desenvolvimento de resistência *in vivo*, por meio da administração de baixas dosagens do fármaco, induzindo a seleção de linhagens resistentes, contribuindo assim, para a persistência da infecção fúngica no paciente (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002). Alguns autores discutem que a refratariedade ao tratamento pode estar correlacionada à

grande adaptação do patógeno fúngico ao hospedeiro, o que se reflete na sua capacidade de burlar a ação da droga (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Quando comparados aos antibacterianos, as drogas antifúngicas apresentam menor eficácia *in vivo*, seja pelos seus mecanismos de ação, geralmente fungistáticos; pela pouca penetração em certos tecidos, como o sistema nervoso central e o trato gastrointestinal; pelos efeitos colaterais indesejáveis ou, ainda, pelo caráter lento da infecção (SHEPPARD; LAMPIRIS, 2010; MÜLLER; KARA-JOSÉ; CASTRO, 2013). Apesar da introdução de novos fármacos antifúngicos nos últimos anos, a resposta à terapia, principalmente em pacientes imunocomprometidos, permanece insatisfatória, visto que a frequência das infecções fúngicas sistêmicas e os casos de resistência antifúngica tem aumentado rapidamente (PIERCE et al., 2013). Atualmente, a aplicação mais importante para os testes de sensibilidade *in vitro* tem sido identificar a presença ou não de resistência, embora muitas vezes sejam utilizados para selecionar compostos antimicrobianos que possuem atividade contra determinados micro-organismos (PFALLER, 2012).

A resistência antifúngica abrange um conceito amplo com diferentes definições, mas que basicamente consiste na falha da terapêutica em combater uma infecção fúngica (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002). A resistência pode ser classificada como resistência microbiológica, também denominada resistência *in vitro* ou resistência clínica. A resistência microbiológica refere-se à inibição do crescimento do fungo em contato com uma concentração da droga maior que o intervalo observado para aquelas cepas tipo selvagem. A resistência microbiológica pode ser primária/intrínseca, quando é encontrada naturalmente nos fungos sem exposição prévia aos antifúngicos; ou secundária/adquirida, isto é, que se desenvolve após a exposição aos fármacos antifúngicos devido a alterações genotípicas estáveis ou transitórias (ALCAZAR-FUOLI; RODRÍGUEZ-TUDELA; MELLADO, 2008). Espécies que apresentam resistência primária incluem *Candida krusei* ao fluconazol e *Cryptococcus neoformans* às equinocandinas, bem como cepas de *C. albicans* e *C. neoformans* resistentes ao fluconazol com resistência secundária (KANAFANI; PERFECT, 2008).

A resistência clínica é definida pela incapacidade de combater uma infecção, mesmo após administração de doses do fármaco antimicrobiano em concentrações equivalentes à sua atividade antifúngica *in vitro*, o que representa uma elevada probabilidade de falha terapêutica. Essas falhas podem estar atribuídas a uma série de fatores que envolvem o sistema imunológico do hospedeiro, a própria droga antifúngica e o micro-organismo patogênico. Embora a resistência clínica não possa sempre ser prevista, destaca-se a

importância de estratégias específicas de tratamento com base na situação clínica do paciente (KANAFANI; PERFECT, 2008). A resistência clínica é geralmente observada em populações de imunocomprometidos, como por exemplo, pacientes com aids, neutropênicos ou portadores de cateteres intravenosos (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002).

Dados epidemiológicos mundiais mostram emergência das infecções fúngicas e um número crescente de patógenos oportunistas. Os avanços na terapia imunossupressora, a melhoria dos métodos de diagnóstico, o desenvolvimento de técnicas de transplantes de órgãos, o aumento da incidência de neoplasias com o envelhecimento populacional e o crescimento do número de casos de aids (AYATI et al., 2012) têm contribuído nos últimos anos para a propagação de doenças oportunistas, principalmente as relacionadas a micoses profundas, causadas pelos patógenos fúngicos: *Candida* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides* spp., *Coccidioides* spp. e *Cryptococcus* spp. (BERKES et al. 2012; GAMALETSSOU et al. 2012). Esse cenário tem impulsionado a prospecção de novas drogas com baixa toxicidade *in vivo* (AFELTRA; VERWEIJ, 2003), bem como, a pesquisa por novos alvos moleculares nas células microbianas (ALI et al., 2012).

Na atualidade, as infecções fúngicas sistêmicas e oportunistas são um grande desafio para a comunidade médica e científica, principalmente pelo fato de estarem entre as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos ou gravemente doentes. Acredita-se que nas próximas décadas, a resistência seja fator determinante ao insucesso terapêutico antifúngico, contexto que tem preocupado os especialistas (LARRU; ZAOUTIS, 2013; PING et al., 2013).

1.2.1 Anfotericina B

A anfotericina B (AMB) é um derivado poliênico produzido pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Foi isolada pela primeira vez em 1955, e desde então é o fármaco mais utilizado para a terapia das micoses sistêmicas (FILIPPIN; SOUZA, 2006). Apesar da sua elevada toxicidade e do surgimento de outros fármacos antifúngicos de amplo espectro, AMB e suas formulações lipídicas continuam sendo consideradas o “padrão ouro” dos fármacos antimicóticos disponíveis para uso clínico (LARRU; ZAOUTIS, 2013).

AMB é caracterizada por uma estrutura química macrocíclica formada por 37 átomos de carbono, sete ligações duplas conjugadas e uma micosamina (3-amino-3,6-didesoximanose) ligada ao anel principal. Seu comportamento anfotérico provém da presença

de um grupo carboxila no anel principal e de um grupo amino primário na micosamina, que conferem hidrossolubilidade à molécula em valores extremos de pH (Figura 2a) (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

O mecanismo de ação da AMB está relacionado à interação entre sua molécula e esteroides da membrana plasmática dos fungos, principalmente o ergosterol (FILIPPIN; SOUZA, 2006). Como consequência desta afinidade, poros são formados ao longo de toda a membrana, alterando a permeabilidade da célula para íons como potássio (K^+), fosfatos (PO_4^{3-}) e pequenas moléculas, como nucleotídeos e algumas proteínas de baixo peso molecular, levando, por conseguinte, à morte celular do micro-organismo (Figura 2b) (CATALÁN; MONTEJO, 2006). No entanto, o ergosterol das células fúngicas e o colesterol presente nas células dos mamíferos possuem estruturas moleculares muito semelhantes, o que resulta em uma precária capacidade da droga em diferenciá-los (HUANG et al., 2002; FILIPPIN; SOUZA, 2006). Dessarte, muitos efeitos tóxicos atribuídos a AMB resultam da sua capacidade em ligar-se ao colesterol e outros componentes da membrana celular dos mamíferos (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008).

A atividade antifúngica *in vitro* de AMB está associada a uma grande variedade de espécies patogênicas, que inclui os fungos dimórficos *H. capsulatum*, *Coccidioides* spp. e *Blastomyces dermatitidis*, assim como as espécies dos gêneros *Candida*, *Aspergillus* e o complexo *C. neoformans* (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008; MÍMICA et al., 2009). Quanto à atividade antifúngica *in vivo*, a AMB possui comportamento ora fungistático ora fungicida, dependendo da sensibilidade do fungo ou da concentração encontrada no sítio da infecção (CATALÁN; MONTEJO, 2006). A droga apresenta uso terapêutico em infecções causadas por: *H. capsulatum*, *Paracoccidioides* spp., *Coccidioides* spp., *B. dermatitidis*, complexo *Cryptococcus neoformans* e *Candida* spp. (MARTINEZ, 2006). No entanto, algumas espécies como *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *C. tropicalis*, *Pseudallescheria boydii*, e algumas cepas de *Fusarium* spp. e *Trichosporon* spp. possuem resistência clínica a AMB (LUMBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003). O uso terapêutico desta droga está associado à nefrotoxicidade e reações adversas como febre, náuseas, dispneia, urticária, dores abdominais e no peito e hipoxemia (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009).

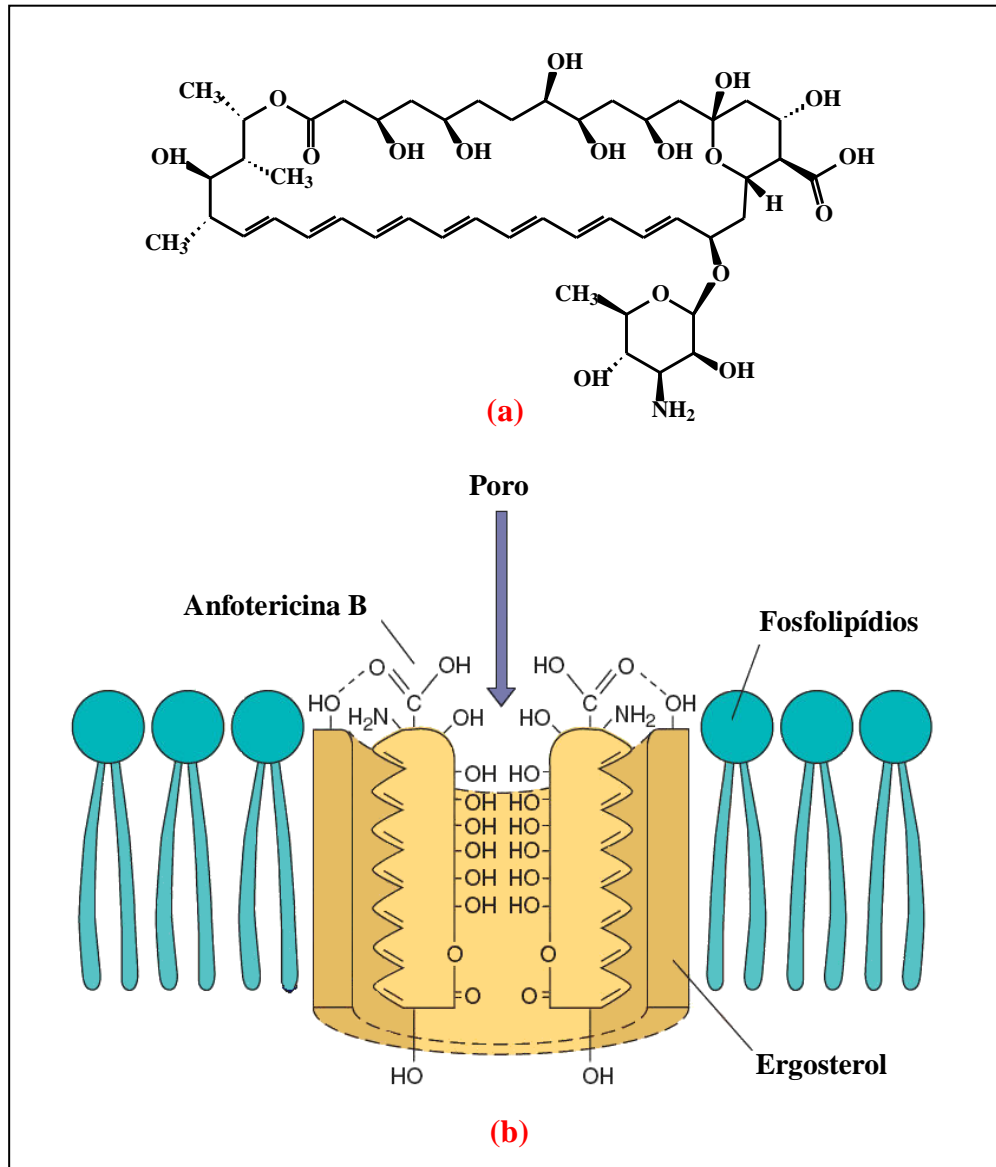


Figura 3 – (a) Estrutura química da droga antifúngica Anfotericina B (b) Mecanismo de ação da anfotericina B: formação de poro pela interação entre a droga e o ergosterol da membrana celular dos fungos. Fonte: Adaptada de MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009.

Apesar do seu amplo espectro de ação, caráter fungicida e limitada resistência intrínseca e adquirida, AMB possui uso restrito em virtude de sua alta toxicidade e da inexistência de uma formulação oral para a terapia sistêmica (ABADIO et al., 2011). Estudos com pacientes imunocomprometidos que apresentavam histoplasmoze disseminada progressiva e faziam tratamento com AMB, revelaram taxas de mortalidade de aproximadamente 50% decorrentes principalmente dos efeitos adversos da droga. Na maioria dos casos, a insuficiência renal é o principal motivo da redução das doses de AMB ou abandono da terapia pelos pacientes (WHEAT et al., 2009). No entanto, AMB continua sendo

a droga de escolha para o tratamento das principais micoses profundas como histoplasmose (LEDTKE et al., 2012), criptococose (BUTTS et al., 2013) coccidioidomicose (WELSH et al., 2012), paracoccidioidomicose e blastomicose (LÓPEZ-MARTÍNEZ; MÉNDÉZ-TOVAR, 2012).

Diferentes formulações de anfotericina B foram desenvolvidas nos últimos quinze anos, com o objetivo de diminuir a toxicidade sem alterar a eficácia da droga original. Realmente, tais compostos possuem menor afinidade ao colesterol do que a AMB convencional, além do mesmo mecanismo de ação eficiente (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). A primeira destas formulações foi o complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet®, The Liposome Company Inc., Princeton, NJ, Reino Unido) licenciada no Reino Unido e aprovada pela FDA em 1995. A segunda foi a anfotericina B em dispersão coloidal (Amphocil®, Sequuspharmaceuticals Inc., Menlo Park, CA, EUA), aprovada pela FDA em 1996 e, por fim, a anfotericina B lipossomal (AmBisome®, Fujisawa Healthcare Inc., Deerfield, IL, EUA), aprovada pela FDA em 1997 (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

A utilização das formulações lipídicas de AMB permitiu o aumento da dosagem diária do fármaco com menos efeitos colaterais associados (ABADIO et al., 2011), além de melhorar a distribuição da droga nos órgãos-alvo como pulmões, fígado e baço. Embora menos nefrotóxica que a AMB convencional, pacientes que receberam a formulação lipossomal apresentaram efeitos indesejáveis, como febre, calafrio, sonolência, disfunção renal e toxicidade cardiopulmonar, limitando o tratamento em comparação aos triazóis mais recentes e às equinocandinas (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008).

A associação entre AMB e 5-flucitosina tem sido relatada por diversos autores, apresentando interação sinérgica na maioria dos casos, sendo normalmente indicada para o tratamento de criptococose (STEVENS, 2012) e candidíase (ROGERS, 2002). Em contrapartida, a combinação de AMB e derivados azólicos geralmente não apresenta eficácia maior do que a da AMB utilizada sozinha (JOHNSON et al, 2004).

A interação entre AMB e drogas antibacterianas, como a rifampicina e a tetraciclina também vem sendo estudada em testes *in vitro* com a finalidade de aumentar a atividade do agente antifúngico contra leveduras e fungos filamentosos (WANKE et al., 1984). Estudos de El-azizi (2007) avaliaram a atividade *in vitro* de AMB combinada à rifampicina e à doxiciclina contra biofilmes de espécies de *Candida*, demonstrando a redução dos valores de CIM de AMB em duas e três vezes quando combinada com rifampicina e doxiciclina, respectivamente. Acredita-se que o efeito deva-se a ligações entre AMB e esteróis da membrana celular fúngica, aumentando sua permeabilidade e permitindo a entrada

das drogas com a subsequente interferência da síntese do RNA pela rifampicina e a síntese proteica pela doxiciclina (EL-AZIZI, 2007). Trabalho mais recente realizado por Cordeiro et al. (2009) demonstrou atividade sinérgica relevante entre AMB combinada com isoniazida ou etambutol contra 15 cepas de *Coccidioides posadasii*. No entanto, as interações farmacodinâmicas das combinações de drogas testadas não foram investigadas pelos autores.

Embora a AMB apresente eficácia contra a maioria das espécies fúngicas e a resistência ao fármaco seja considerada incomum, alguns micro-organismos são conhecidamente resistentes - resistência microbiológica intrínseca - como isolados de *Candida lusitanae*, *C. guilliermondi*, *Trichosporon beigelii*, *Scedosporium prolificans*, *Scedosporium apiospermum* (teleomorfo *Pseudallescheria boydii*), *Aspergillus terreus* e algumas espécies de *Fusarium* sp. (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002; KANAFANI; PERFECT, 2008). Os fungos filamentosos estão mais predispostos à ocorrência de resistência à AMB que as leveduras. Dentre as espécies de *Aspergillus*, a resistência é cada vez mais frequente em *A. flavus* e *A. fumigatus*, além das espécies raras, como *A. ustus* ou *A. lentulus*, que são consideradas relativamente resistentes à maioria dos medicamentos antifúngicos (ALCAZAR-FUOLI; RODRÍGUEZ-TUDELA; MELLADO, 2008).

A resistência primária *in vitro* à AMB é restrita a algumas espécies, que apresentam valores de concentração inibitória mínima (CIM) superiores a 1,0 µg/mL para isolados de *Candida* spp. e 2,0 µg/mL para fungos filamentosos como *Aspergillus terreus*, *Acremonium strictum*, *Scedosporium apiospermum* e *Scedosporium prolificans* (CLSI, 2008). Estudos *in vitro* têm demonstrado resistência a AMB em espécies de *Candida* não-*albicans* como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (PFALLER et al., 2002).

Outro aspecto importante da AMB é a possibilidade de seleção de cepas resistentes, que apesar de ocorrer em menor proporção quando comparada aos triazólicos de primeira geração, é uma das principais desvantagens da droga, simultaneamente a sua eventual toxicidade e o custo elevado de suas formulações lipossomais (ARNOLD et al., 2010). O mecanismo de resistência à AMB em leveduras está relacionado principalmente à mutação no gene *ERG3* que está ligado à biossíntese do ergosterol, ocasionando o excesso de outros esteróis na membrana fúngica com baixa afinidade à AMB (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009). Dessa forma, isolados de *Candida* e *Cryptococcus* resistentes a AMB possuem baixo teor de ergosterol, em comparação com os isolados sensíveis (ALCAZAR-FUOLI; RODRÍGUEZ-TUDELA; MELLADO, 2008). A ocorrência de resistência à AMB em *C. neoformans* ainda é considerada incomum, no entanto isolados resistentes oriundos de pacientes HIV/aids foram encontrados apresentando atividade defeituosa do esterol Δ 8-7

isomerase (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011). Outro mecanismo que também pode estar associado à resistência é o aumento da atividade da enzima catalase, com a consequente perda de sensibilidade ao dano oxidativo verificado em células de *C. albicans* (OKAMOTO; AOKI; MATAGA, 2004; KANAFANI; PERFECT, 2008).

1.2.2 Derivados Azólicos

No final da década de 1960, surgiu a primeira geração dos derivados azólicos denominados imidazólicos, que constituíram o segundo maior avanço no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006; CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). Os imidazólicos foram desenvolvidos a partir do estudo das propriedades antimicóticas do benzimidazol e são representados principalmente pelo miconazol e o cetoconazol (BENNETT, 2006). Tais fármacos são dotados de amplo espectro de atividade antimicrobiana, incluindo fungos, protozoários e bactérias (LACAZ, 2002). No entanto, o surgimento de limitações quanto ao espectro de ação, baixa biodisponibilidade e interações medicamentosas, restringiram a utilização desses fármacos no tratamento de micoses sistêmicas (LUMBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003).

O segundo subgrupo dos derivados azólicos é classificado por triazólicos de primeira geração - fluconazol e itraconazol - e triazólicos de segunda geração - voriconazol, posaconazol, ravuconazol e albaconazol. O subgrupo abrange fármacos sintéticos fungistáticos que surgiram a partir de 1980, escolhidos como medicamentos promissores para a terapia antifúngica humana (LARRU; ZAOUTIS, 2013).

Os derivados azólicos são caracterizados quimicamente por um anel pentagonal na sua estrutura molecular denominado anel azólico, sendo classificados de acordo com o número de nitrogênios do anel em: imidazólicos (Figura 4a) quando formado por dois átomos de nitrogênio e três átomos de carbono, e triazólicos (Figura 4b) quando formado por três átomos de nitrogênio e dois átomos de carbono. O anel azólico é unido ao restante da molécula através de uma ligação C-N (CATALÁN; MONTEJO, 2006). Qualquer mudança na estrutura química da molécula altera as propriedades físico-químicas e terapêuticas específicas de cada quimioterápico (LUMBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003). Por isso, modificações na estrutura molecular do fármaco fluconazol deram origem ao voriconazol, e alterações no itraconazol resultou nos fármacos ravuconazol e posaconazol (PETRIKKOS; SKIADA, 2007).

Assim como a anfotericina B, o mecanismo de ação dos derivados azólicos tem como alvo principal a molécula do ergosterol (CAZEDEY et al., 2007), um componente vital da membrana celular dos fungos, cuja função é regular a fluidez da membrana, conferindo-lhe estabilidade, assimetria e integridade (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). O modo de ação dessas drogas consiste no bloqueio da atividade das enzimas oxidativas do citocromo P-450, a lanosterol 14- α -demetilase, responsáveis pela demetilação de lanosterol e pela biossíntese do ergosterol (Figura 4c) (CATALÁN; MONTEJO, 2006). Esse fato provoca o excesso de compostos metilesteróis, levando a formação de uma membrana com propriedades físicas alteradas, não desempenhando as funções essenciais para o crescimento do fungo (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). Como maior consequência, há o aumento da permeabilidade da membrana celular, o que desencadeia várias alterações morfológicas, resultando em lise celular (CAZEDEY et al., 2007, CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). Outro mecanismo de ação que pode ser atribuído aos derivados azólicos é a produção excessiva e o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no citoplasma da célula, que leva a degeneração dos componentes estruturais das células fúngicas (MOREIRA, 2010).

Os derivados azólicos exibem amplo espectro de ação *in vitro* frente às principais espécies de fungos patogênicos, incluindo leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* e os fungos filamentosos – *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Acremonium* spp., bem como isolados de *Fusarium* spp., *Scedosporium apiospermum*, dentre outros (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006). O triazólico fluconazol (FLC) possui atividade *in vitro* contra os principais fungos de micoses sistêmicas como *H. capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Coccidioides* spp., porém em geral sua ação parece ser inferior àquela obtida pelo itraconazol (GONZÁLEZ, 2009; MOREIRA, 2010). FLC apresenta atividade inibitória ineficiente contra *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium* spp., *Scedosporium* e *Penicillium* spp. e as espécies de *C. krusei* e *C. glabrata* (BLANCO et al., 2009).

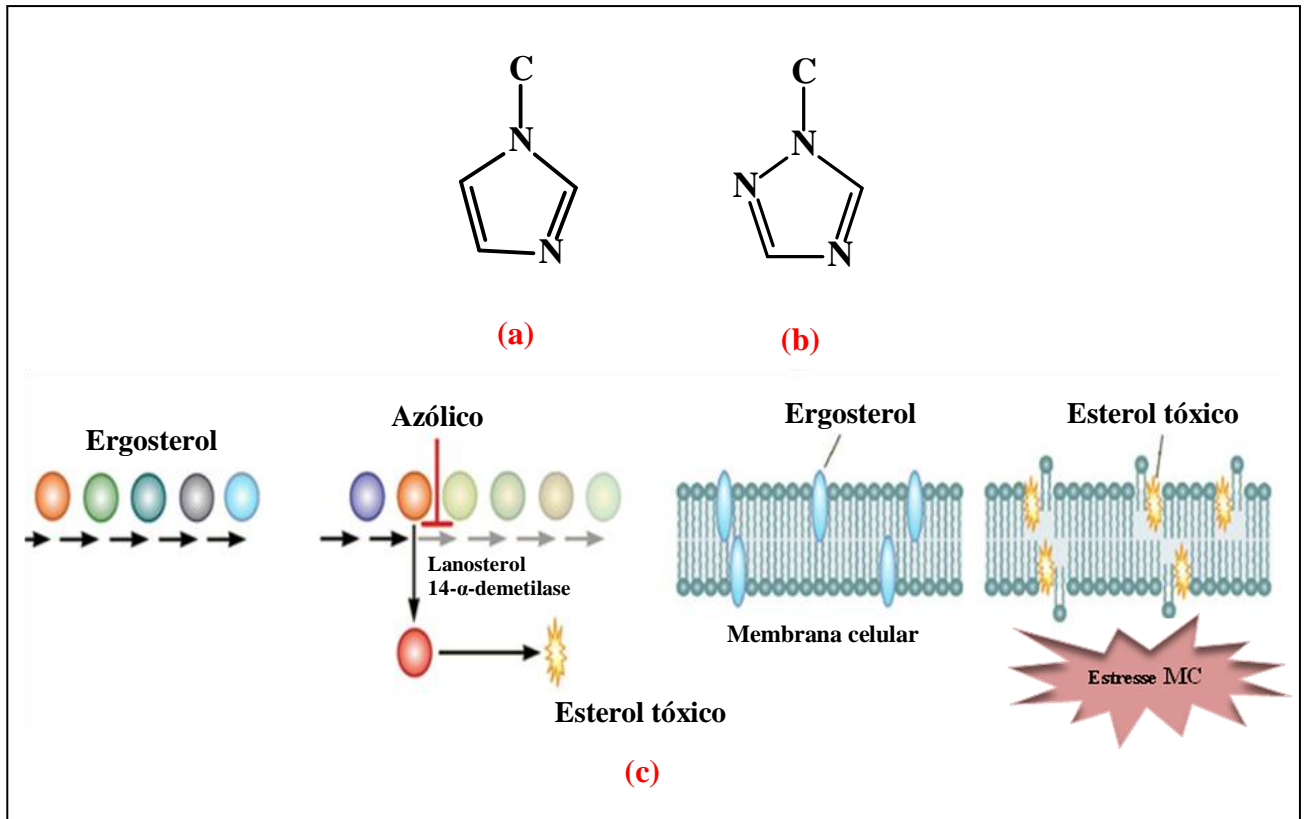


Figura 4 - (a) Estrutura química geral dos derivados azólicos imidazólicos; (b) Estrutura química geral dos derivados azólicos triazólicos; (c) Interferência na síntese do ergosterol por efeito dos derivados azólicos, bloqueio da atividade das enzimas oxidativas do citocromo P-450, a lanosterol 14- α -demetilase, provocando o excesso de compostos metilesteróis, levando a formação de uma membrana com propriedades físicas alteradas. MC: membrana citoplasmática. Fonte: Figura reduzida de SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011.

O itraconazol (ITC) possui atividade *in vitro* contra *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* (LUMBRERAS; LIZASOAIN; AGUADO, 2003), *C. posadasii* (CORDEIRO et al., 2006a), *B. dermatitidis* (GONZÁLEZ, 2009) e *H. capsulatum* (BRILHANTE et al., 2012) sendo relatada resistência à droga em cepas de *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. tropicalis* (GONZÁLEZ, 2009). Assim como o FLC, ITC também não exibe atividade contra *Fusarium* spp. (ESPINEL-INGROFF; BOYLE; SHEEHAN, 2001).

Os novos azólicos voriconazol, ravuconazol e posaconazol apresentam atividade *in vitro* contra *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., incluindo os isolados resistentes aos triazólicos de primeira geração (GREER, 2007), além das espécies filamentosas *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. terreus* e os fungos dimórficos *B. dermatitidis*, *Coccidioides* spp., e *H. capsulatum* (GONZÁLEZ, 2009). O posaconazol também é ativo contra os zigomicetos (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006).

Quanto à atividade *in vivo*, o cetoconazol pode ser empregado no tratamento de micoses sistêmicas como blastomicose, coccidioidomicose, histoplasmoses e paracoccidioidomicose, mas tem seu uso limitado a pacientes que apresentaram falha ou intolerância a outras terapias (FDA, 2013). O triazólico FLC é considerado o antifúngico de escolha para o tratamento e a profilaxia secundária de meningite criptocócica em países em desenvolvimento, cuja assistência médica é precária e inconstante (BUTTS et al., 2013). De fácil administração oral, FLC é atualmente fornecido gratuitamente em programas governamentais (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). O ITC é empregado no tratamento de aspergilose, cromomicose, esporotricose e micoses superficiais como candidíase oral, candidíase vulvovaginal, dermatofitoses, onicomicoses e pitiríase versicolor (CAZEDEY et al., 2007). Os triazóis são muito utilizados na terapia das micoses sistêmicas em razão de possuírem atividade contra diversas espécies fúngicas e não apresentam efeitos adversos graves como a anfotericina B (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). O espectro de ação dos triazólicos inclui os agentes das principais infecções fúngicas sistêmicas: *P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *C. immitis*, *B. dermatitidis*, *C. neoformans* e a maioria das espécies de *Candida*, sendo que *C. krusei* e *C. glabrata* são menos sensíveis (MARTINEZ, 2006).

Os demais triazólicos voriconazol e posaconazol representam uma alternativa aos antifúngicos convencionais para o tratamento de algumas micoses (FERA; LA CAMERA; DE SARRO, 2009). O voriconazol (VRZ) tem sido indicado para o tratamento de aspergilose pulmonar invasiva, fusariose, hialohifomicose em adultos e crianças e para o tratamento primário de candidemia invasiva em pacientes não neutropênicos (EMA, 2012). Na Europa, o uso de VRZ está licenciado para o tratamento de doenças invasivas originadas por espécies de *Candida* resistentes à FLC (EMA, 2012) e nos EUA para candidíase esofágica ou micoses disseminadas também acarretadas por *Candida* spp. Vale ressaltar que VRZ não possui atividade contra zigomicetos e tem sua ação limitada contra isolados de *C. glabrata* e *C. albicans* resistentes a FLC (HICHERI; COOK; CORDONNIER, 2012).

No que concerne ao posaconazol, a droga é indicada para pacientes adultos acometidos por infecções causadas por micro-organismos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* e para o tratamento de cromoblastomicose, micetoma e coccidioidomicose refratárias a outros medicamentos como AMB, ITC e FLC. Posaconazol também é utilizado como profilaxia no tratamento de candidíase orofaríngea em pacientes imunocomprometidos (EMA, 2011). Ao contrário de VRZ, posaconazol possui amplo espectro de ação contra fungos oportunistas, que inclui dermatófitos e zigomicetos dos gêneros *Mucor* e *Rhizopus* (LARRU; ZAOUTIS, 2013).

Atualmente, encontram-se em testes clínicos de fase III, os novos triazóis de segunda geração ravuconazol, isavuconazol e albaconazol. Essas drogas são caracterizadas por apresentar espectro de ação estendido, incluindo espécies de *Candida* e *Aspergillus* resistentes e emergentes a FLC e ITC, além de interações medicamentosas favoráveis e tolerância compatível. Albaconazol é o único azólico com atividade contra *Scedosporium prolificans* - patógeno multirresistente que normalmente causa doença fatal (LARRU; ZAOUTIS, 2013). Em estudos anteriores, albaconazol tem demonstrado ação em modelos animais com aspergilose sistêmica, candidíase, criptococose e hialohifomicose. Resultados referentes aos estudos clínicos de fase III ainda não estão disponíveis (GUILLON et al., 2013).

A refratariedade ao tratamento com derivados azólicos tem surgido gradativamente durante terapia prolongada, principalmente em pacientes com infecção avançada pelo HIV e complicações infecciosas provocadas por *Candida* spp. (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003). Estudos *in vitro* têm revelado resistência a FLC e ITC em cepas de *C. glabrata* e nenhuma resposta ao tratamento com esses antifúngicos (BLANCO et al., 2009). *C. krusei* é sensível a AMB e ao VRZ, mas intrinsecamente resistente aos azólicos FLC e ITC (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003).

Os principais efeitos adversos decorrentes da utilização dos derivados azólicos estão associados à intolerância gastrointestinal, hepatotoxicidade, hipersensibilidade, náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia e irregularidades menstruais (KAUFFMAN, 2006; MARTINEZ, 2006). Várias classes de drogas interagem com os azólicos, ora reduzindo os níveis séricos do antifúngico - rifampicina, isoniazida, ritonavir, carbamazepina, ora elevando os níveis de outros fármacos - ciclosporina, digoxina, tacrolimus e inibidores de protease (BENNETT, 2006; FLÜCKIGER et al., 2006; KAUFFMAN, 2006).

O grupo dos derivados azólicos é bastante utilizado no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, devido ao seu amplo espectro de ação e baixa toxicidade em comparação com a anfotericina B (ALCAZAR-FUOLI; RODRÍGUEZ-TUDELA; MELLADO, 2008). Como já descrito, tais compostos atuam inibindo a enzima 14- α -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica, impedindo a demetilação do precursor lanosterol em ergosterol. A produção desta enzima é codificada pelos genes *ERG11* ou *CYP51* (PIERCE et al., 2013).

No tratamento de candidíase e de criptococose, o FLC é comumente empregado devido à sua alta biodisponibilidade, via de administração oral e boa ação antifúngica, sendo inclusive utilizado em esquemas profiláticos em pacientes imunocomprometidos. No entanto,

o uso indiscriminado e em doses subclínicas de FLC e ITC, tem impulsionado a seleção de cepas mais resistentes. Além disso, espécies naturalmente resistentes ao FLC, como *C. krusei*, vêm sendo frequentemente isoladas em pacientes com infecções fúngicas sistêmicas, restringindo assim o uso clínico deste fármaco nessas condições (PIERCE et al., 2013).

O ITC é utilizado em candidíase e em casos menos graves de criptococose, apesar de apresentar potente ação antifúngica *in vitro*, devido à sua alta ligação às proteínas plasmáticas, clinicamente apresenta uma menor biodisponibilidade que o FLC, mostrando pequena distribuição no líquido e, portanto, uso restrito nas meningoencefalites fúngicas. Dessa forma, tem-se verificado um problema grave: a emergência de resistência cruzada que inclui vários azólicos (PIERCE et al., 2013).

Os mecanismos moleculares de resistência secundária aos azólicos foram elucidados principalmente em isolados de *C. albicans* originados de pacientes portadores do vírus HIV com candidíase orofaríngea refratária ao FLC, no entanto, tais mecanismos podem ser encontrados em qualquer espécie fúngica com algumas adaptações (KANAFANI; PERFECT, 2008). O primeiro mecanismo refere-se à redução do excesso de drogas azólicas no interior das células fúngicas. Este efeito está associado à expressão aumentada – superexpressão - de genes que codificam as proteínas de efluxo de drogas (Figura 5a). Nos fungos, assim como em outras células eucariontes, são conhecidos dois tipos de proteínas: os transportadores da família ABC (*ATP-Binding Cassette*) e os transportadores MSF (*Major Superfamily Facilitator*) (CANNON et al., 2009; MORSCHHÄUSER, 2010). Em *C. albicans*, foram descritos três genes que codificam tais proteínas: *CDR1*, *CDR2* e *MDR1*. *CDR1* e *CDR2* são genes homólogos aos transportadores ABC, e quando superexpressos são responsáveis pela resistência em micro-organismos recuperados de pacientes expostos a várias terapias antifúngicas - resistência a múltiplas drogas (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002). Já o terceiro gene *MDR1* codifica os transportadores MSF, cuja superexpressão parece ser específica a fluconazol e não está associada com uma resistência cruzada a outros azóis, ao contrário dos genes *CDR1* e *CDR2* que parecem reduzir o acúmulo de várias drogas azólicas (KANAFANI; PERFECT, 2008).

Em outras espécies, genes homólogos funcionais de *CDR1* e *CDR2* estão sendo descritos e associados com a resistência aos azólicos em diversos estudos (SANGLARD; COSTE; FERRARI, 2009). Em *C. glabrata*, a superexpressão dos genes transportadores ABC, *CgCDR1*, *CgCDR2* e *CgSNQ2*, desempenham papel dominante na resistência aos azólicos (TORELLI et al., 2008). Outros transportadores ABC para *C. dubliniensis* (*CdCDR1* e *CdCDR2*), *C. krusei* (*ABC1* e *ABC2*), *C. tropicalis* (homólogo *CDR1*) e *C. neoformans*

(*CnAFR1*) foram reportados em isolados resistentes. Em *Aspergillus fumigatus*, os genes *atrF* e *AfuMDR4* têm sua expressão regulada em cepas resistentes à itraconazol (MORSCHHÄUSER, 2010).

O segundo mecanismo de resistência é conhecido por meio de alterações na enzima-alvo lanosterol-14- α -demetilase mediada pelos genes *ERG11/CYP51* (KANAFANI; PERFECT, 2008). Esse mecanismo de resistência envolve mutações pontuais de aminoácidos e/ou superexpressão dos genes. O efeito de superdosagem do gene consiste no aumento do número de moléculas *ERG11* o que dificulta a completa ligação entre os azóis e as enzimas-alvo (Figura 5b). A superexpressão do gene *ERG11* está frequentemente associada à resistência aos azóis em *C. albicans* e em isolados clínicos de *C. tropicalis* (FORASTIERO et al., 2013). Em *A. fumigatus* a resistência ao ITC em isolados clínicos está relacionada à ocorrência de substituições de aminoácidos no *CYP51A*, gene ortólogo funcional ao *ERG11* nesta espécie fúngica. As razões do surgimento de resistência em isolados clínicos de *A. fumigatus* não foram esclarecidas, no entanto, acredita-se que o uso terapêutico prolongado de azólicos pode ser definido como uma das possíveis causas (ALCAZAR-FUOLI; RODRÍGUEZ-TUDELA; MELLADO, 2008).

O terceiro mecanismo estudado trata-se de mutações de perda de função do gene *ERG3*, responsável pela biossíntese do ergosterol. Mutações nesse gene conferem alterações nas etapas de síntese dos esteróis e aumentam a resistência aos azóis, uma vez que bloqueiam o acúmulo do ergosterol tóxico 14 α -metil-3,6-diol, levando à formação do composto não tóxico 14 α -metilfecosterol. Este último substitui o ergosterol nas membranas fúngicas, anulando a ação dos azólicos (Figura 5c) (SANGLARD; COSTE; FERRARI, 2009). As mutações em *ERG3* não são frequentemente relatadas como mecanismo de resistência, entretanto, têm se mostrado capazes de provocar resistência cruzada entre azólicos e anfotericina B em isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (KANAFANI; PERFECT, 2008).

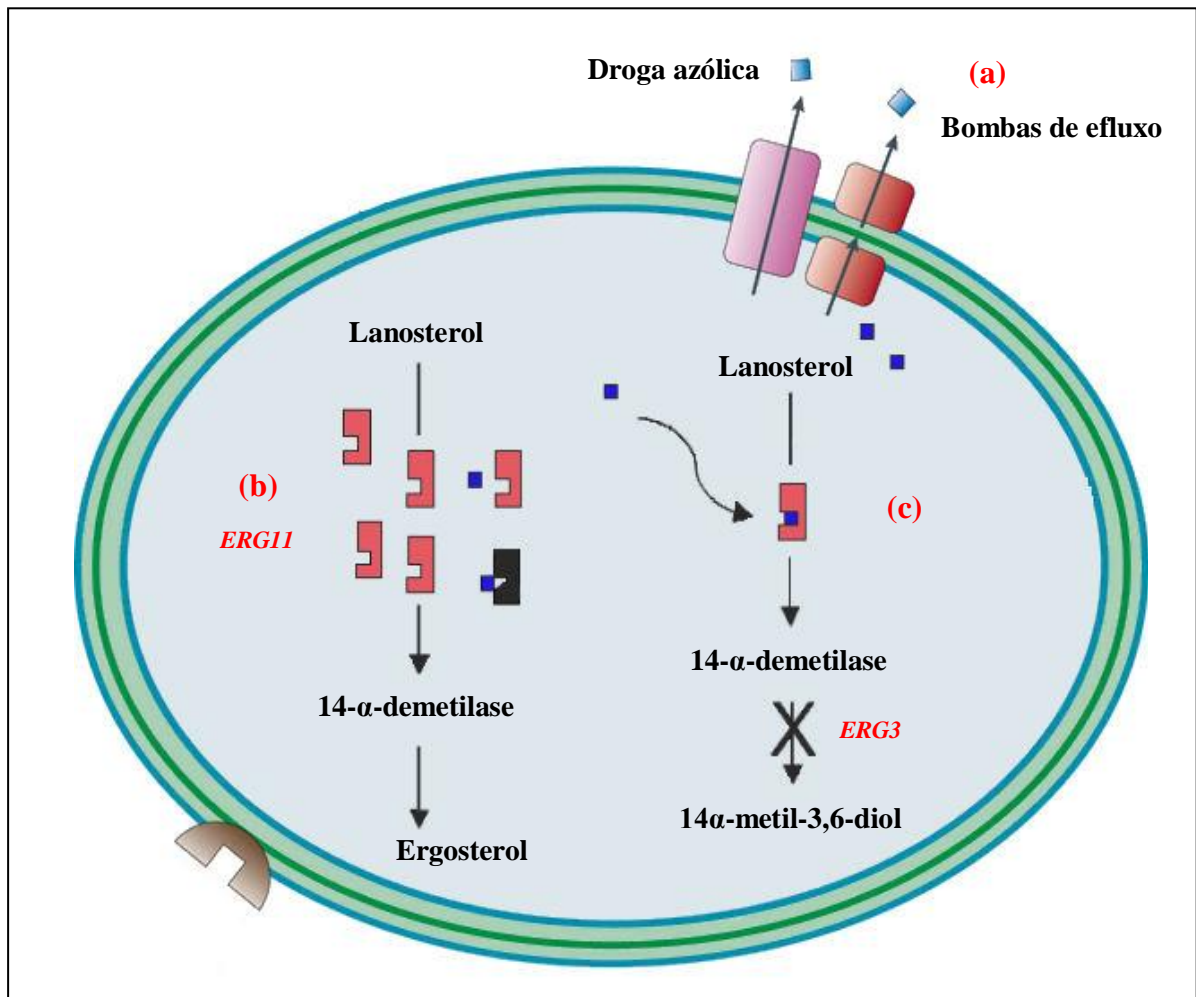


Figura 5 – Principais mecanismos de resistência dos derivados azólicos. (a) superexpressão de genes que codificam as proteínas de efluxo de drogas; (b) alterações na enzima-alvo lanosterol-14- α -demetilase mediada pelos genes *ERG11*; (c) mutações de perda de função do gene *ERG3*, responsável pela biossíntese do ergosterol. Fonte: Adaptada de MOREIRA, 2010.

1.2.3 Equinocandinas

As equinocandinas consistem de um grupo de fármacos antifúngicos semi-sintéticos, que foram isolados de culturas de *Aspergillus* spp. pela primeira vez em 1974. O desenvolvimento dessas drogas deu origem a dois compostos: a cilofungina, que teve posteriormente sua produção interrompida devido ao seu efeito nefrotóxico e a atual anidulafungina (GOBERNADO; CANTÓN, 2008). A primeira aprovação comercial das equinocandinas pelo FDA deu-se apenas em 2001, com a caspofungina, seguida da micafungina em 2005 e anidulafungina em 2006. Atualmente, as equinocandinas representam um importante grupo de drogas na terapia intravenosa de candidíase superficial e invasiva e

no tratamento de aspergiloses (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). Quanto à estrutura química, são compostos cíclicos macrolipopeptídicos possuidores de uma cadeia lateral acil-lipídica, unida a um átomo de nitrogênio e sujeita a vários padrões de hidroxilação: a caspofungina (Figura 6a) é um ácido graxo, a micafungina (Figura 6b) um complexo aromático e a anidulafungina (Figura 6c) uma cadeia alcoxitrifênilo (GOBERNADO; CANTÓN, 2008).

O mecanismo de ação das equinocandinas é único dentre todos os fármacos antifúngicos, e trata-se da inibição não competitiva e irreversível da enzima (1,3)- β -D-glicano sintase, necessária à síntese do (1,3)- β -D-glucano, um importante polissacarídeo da parede celular de várias espécies fúngicas como *Candida* e *Aspergillus* (CHANDRASEKAR; SOBEL, 2006; CHEN; SLAVIN; SORRELL, 2011). A produção insuficiente desse polissacarídeo resulta em danos na estrutura e integridade da parede celular, impedindo o crescimento das células fúngicas e, conseqüentemente, provocando a morte do micro-organismo (Figura 7) (GOBERNADO; CANTÓN, 2008).

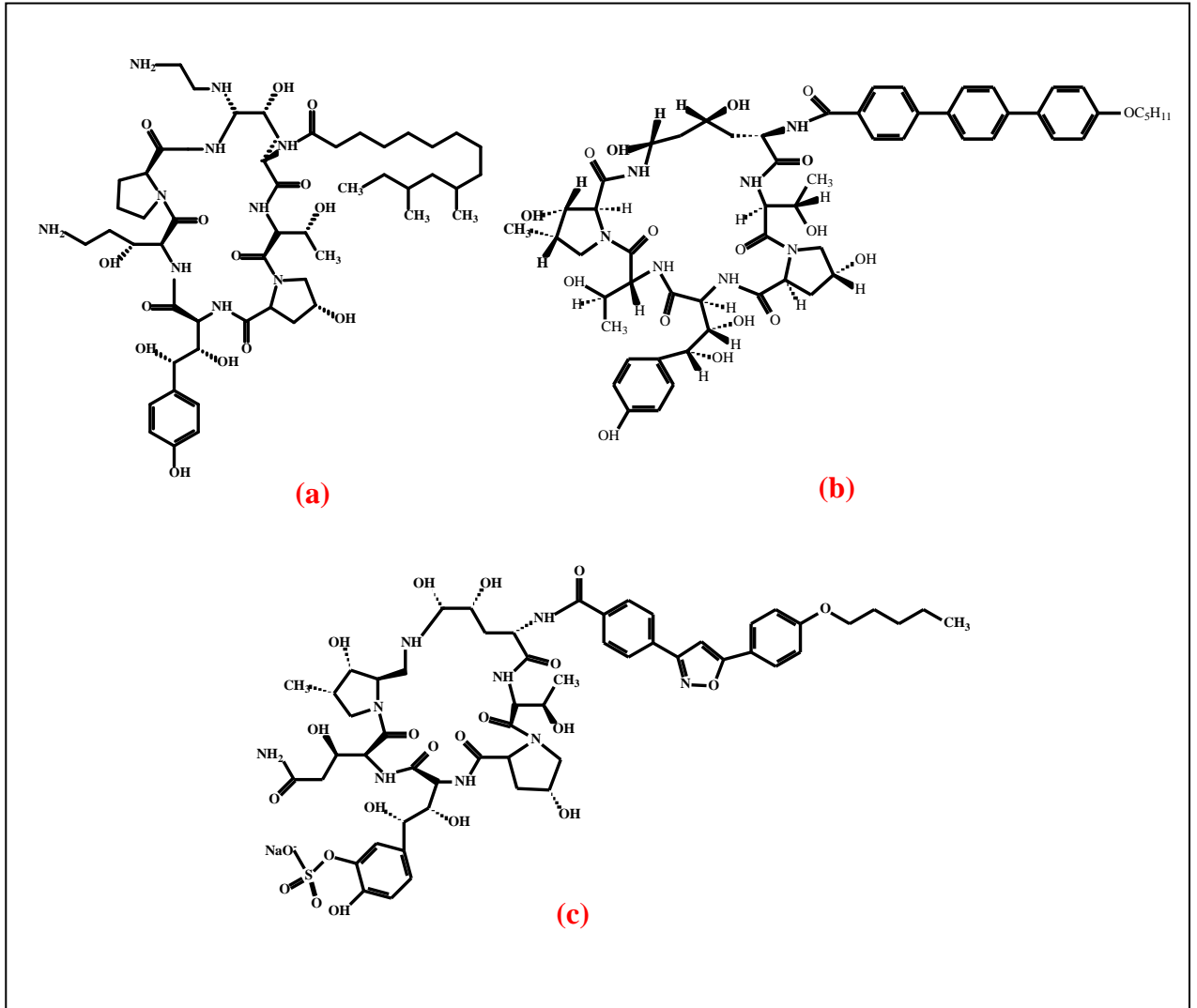


Figura 6 - Estrutura química das equinocandinas: (a) caspofungina, (b) micafungina e (c) anidulafungina.

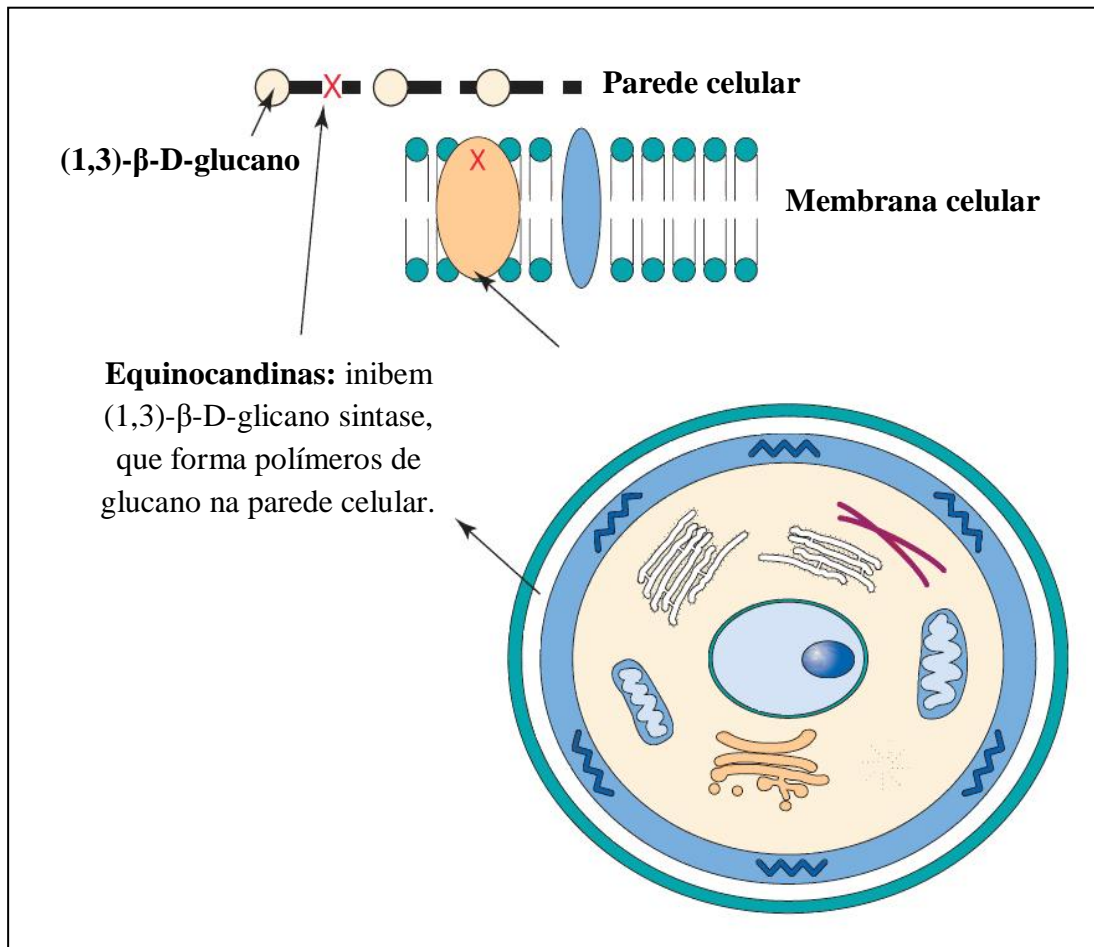


Figura 7 – Mecanismo de ação das equinocandinas: inibição da biossíntese do β-(1,3)-D-glucano.

Fonte: Adaptada de MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009.

Diferentemente dos derivados azólicos, todas as drogas do grupo das equinocandinas, de maneira geral, apresentam espectro de ação semelhante, o que se estende também para biofilmes de *Candida* (LARRU; ZAOUTIS, 2013). As equinocandinas apresentam atividade fungicida contra *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e efeito fungistático contra *Aspergillus* spp. (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). A anidulafungina tem ainda atividade *in vitro* mais acentuada que a caspofungina e micafungina contra *C. glabrata*, *C. famata*, *C. rugosa*, *C. stellatoidea* e *C. lusitaniae* (GOBERNADO; CANTÓN, 2008). No entanto, não possuem atividade *in vitro* frente à *Cryptococcus* spp., *Trichosporon asahii*, *Rhizopus* spp., *Scedosporium* spp e *Fusarium* spp. (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

A caspofungina e a anidulafungina são empregadas no tratamento de aspergilose invasiva em pacientes refratários ou intolerantes a outras terapias (CATALÁN; MONTEJO, 2006), sendo também utilizadas na terapia de candidíase esofágica, abscesso intra-abdominal

e candidemia. A micafungina é licenciada apenas na Europa e no Japão, utilizada principalmente para o tratamento de candidíase invasiva, aspergilose, nos casos de candidíase esofágica e como profilaxia em pacientes submetidos a transplante de células-tronco (LARRU; ZAOUTIS, 2013).

A anidulafungina possui também atividade *in vivo* contra vários fungos filamentosos, como *Mucor* spp., *Penicillium marneffeii*, *Exophiala jeanselmei*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* e *Pseudallescheria boydii*. Mas, assim como todas as equinocandinas, não é indicada para o tratamento de infecções causadas por *C. neoformans*, *Fusarium* spp., *Trichosporon asahii*, *Trichosporon* spp., *B. dermatitidis*, *Acremonium strictum*, *Rhizopus arrhizus* e *H. capsulatum*, devido principalmente ao baixo teor de glucano na parede celular dessas espécies (GOBERNADO; CANTÓN, 2008).

A parede celular dos fungos é formada por uma camada externa de mananoproteínas e uma camada interna composta por quitina e alfa e/ou beta glucanos entrelaçados com mananoproteínas. Esses componentes são ausentes nas células dos mamíferos, conferindo às equinocandinas uma baixa toxicidade (CHANDRASEKAR; SOBEL, 2006). Dessa forma, as equinocandinas são notavelmente bem toleradas e nenhum efeito adverso grave tem sido relatado, sendo os mais frequentes: flebites, náuseas, vômitos, diarreia, elevação transitória das enzimas hepáticas e cefaleia (AZANZA; MONTEJO, 2008). Alguns pacientes apresentam reações como rubor facial e dispneia (GOBERNADO; CANTÓN, 2008).

A associação *in vitro* entre caspofungina e outras drogas antifúngicas como a anfotericina B, demonstram na maioria das vezes, sinergismo, devido principalmente ao seu mecanismo de ação inovador (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; CHANDRASEKAR; SOBEL, 2006). A caspofungina e a micafungina tem apresentado efeito sinérgico *in vitro* quando combinada com FLC, ITC, VRZ e posaconazol contra espécies de *Aspergillus*, *Candida* e *Fusarium* spp. (ESPINEL-INGROFF, 2003). Alguns estudos já descrevem sucesso terapêutico em pacientes com micoses sistêmicas quando medicados com micafungina e AMB em combinação (KONTOYIANNIS et al., 2009). A anidulafungina não interage com AMB, VRZ, ciclosporina, tacrolimus e outras drogas, mas pode ser usada juntamente com outros agentes antifúngicos e co-administrada com drogas imunossupressoras (GOBERNADO; CANTÓN, 2008; CHEN; SLAVIN; SORRELL, 2011).

Em especial, para espécies de *Candida*, os mecanismos de resistência associados às equinocandinas estão relacionados com mutações pontuais nos genes *FKS1* e *FKS2* da β -(1,3)-D-glucana sintase, um complexo de enzimas que participa da produção de polímeros

glucanos na parede celular fúngica. Alterações no complexo enzimático reduz a ação da droga na parede celular do fungo. Este mecanismo já foi demonstrado em *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*, provocando resistência cruzada para todas as drogas do grupo das equinocandinas (MORSCHHÄUSER, 2010; PFALLER, 2012). Estudo anterior descreve que a superexpressão dos genes *CDR2* parece mediar resistência à caspofungina, mas novos testes ainda devem ser realizados (SILVER et al., 2008).

A parede celular do fungo *C. neoformans* possui maior teor de α -(1,6) ou α -(1,3)-D-glucano que β -(1,3)-D-glucano, o que justifica a resistência intrínseca dessa espécie às drogas equinocandinas como caspofungina e micafungina (PETRIKKOS; SKIADA, 2007). Entretanto, estudo *in vitro* determinou que o complexo enzimático β -(1,3)-D-glucana sintase de *C. neoformans* é bastante sensível a essas drogas (MALIGIE; SELITRENNIKOFF, 2005). A ineficácia das equinocandinas frente à *Cryptococcus* spp. também pode ser explicada pela produção de melanina nessas espécies. A produção induzida de melanina também foi observada em *Histoplasma capsulatum*, fenômeno que foi acompanhado pela redução da sensibilidade às equinocandinas neste fungo (EMRI et al., 2013). No entanto os mecanismos de resistência às equinocandinas não estão completamente esclarecidos nessas espécies. Outros mecanismos que inclui degradação enzimática, ativação do sistema “bombas” de efluxo e resposta ao estresse via calcineurina são sugeridos para isolados de *C. neoformans* como possíveis métodos de resistência (CANNON et al., 2009; KANAFANI; PERFECT, 2008).

1.2.4 Mecanismo de resistência em biofilmes fúngicos

Um fator crucial responsável pela virulência e aumento da resistência intrínseca às drogas antifúngicas é a capacidade dos fungos em formar biofilmes em dispositivos médicos, tais como cateteres venosos, cateteres urinários e próteses artificiais, cujo número de usuários tem aumentado drasticamente em mais de 10 milhões de beneficiários/ano nos Estados Unidos (ROBBINS et al., 2011; TAFF, et al., 2012). Em consequência da falta de uma terapia eficiente muitas vezes a remoção cirúrgica do dispositivo infectado é a única alternativa para a erradicação da doença fúngica (MUKHERJEE et al., 2003).

Os biofilmes são definidos como comunidades microbianas estruturadas e complexas, capazes de aderir a superfícies abióticas ou bióticas. As células são incorporadas em uma matriz extracelular produzida pelos próprios micro-organismos que formam o

biofilme, através da qual interagem uns com os outros e com o ambiente (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; SOTO, 2013). A matriz extracelular é formada por substâncias como polissacarídeos, proteínas, DNA de micro-organismos, e exibem um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e aos genes de transcrição (TAFF, et al., 2012). Dessa forma, a estrutura bioquímica do biofilme proporciona proteção para as células contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, fagocitose, biocidas, forças hidrodinâmicas e os mecanismos de ação dos antibióticos em geral (CANNIZZO et al., 2007).

As primeiras pesquisas foram destinadas apenas a biofilmes bacterianos, com o desenvolvimento do primeiro modelo de biofilme *in vitro* de *C. albicans* em 1994 (HAWSER; DOUGLAS, 1994). Desde então, estudos sobre a capacidade de formar biofilmes para várias espécies fúngicas têm sido descritos na literatura: *Cryptococcus neoformans* (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007), *Malassezia pachydermatis* (CANNIZZO et al., 2007), *Aspergillus* spp. (LIU et al., 2012) e recentemente *Histoplasma capsulatum* (PITANGUI et al., 2012).

Muitas das pesquisas com biofilmes concentram-se em desenvolver modelos de ensaio *in vitro* com o intuito de investigar o perfil de sensibilidade das comunidades microbianas frente aos fármacos de uso clínico, em comparação com o perfil de sensibilidade de seus homólogos planctônicos (TOBUDIC et al., 2010; CORDEIRO et al., 2012). Além disso, tem-se buscado compreender os principais mecanismos de resistência a essas drogas (MUKHERJEE et al., 2003; PERUMAL; MEKALA; CHAFFIN, 2007). Em modelo de biofilme de *C. albicans* vários fatores foram elucidados para justificar a elevada resistência *in vitro* e *in vivo*, dentre eles incluem: aumento da expressão de bombas de efluxo de drogas, redução do teor de ergosterol (MUKHERJEE et al., 2003), elevados níveis de β -(1,3)-D-glucana da parede celular e da matriz do biofilme (NETT et al., 2007), aumento da densidade de células (PERUMAL; MEKALA; CHAFFIN, 2007), e sinalização mediada pelas proteínas cinase C (PKC) (KUMAMOTO, 2005) e fosfatase calcineurina (UPPULURI et al., 2008). Alguns dos fatores propostos são mecanismos de resistência comuns entre as células planctônicas e os biofilmes, tal como regulação positiva de bombas de efluxo de drogas e regulação positiva de expressão do gene alvo, e outros são características específicas dos biofilmes, como presença de matriz extracelular (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; SOTO, 2013).

A resistência aos medicamentos de uso clínico também pode advir da incapacidade que alguns antimicrobianos têm de se difundirem através da camada polissacarídica que compõe a matriz extracelular. Ou, ainda, devido à existência de

subpopulações de micro-organismos no interior dos biofilmes, denominadas células persistentes (*Persister cells*) que são fenotipicamente diferentes das demais e possuem a habilidade de sobreviver em concentrações bem superiores à concentração inibitória mínima dos antifúngicos em geral (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; SOTO, 2013).

Os biofilmes são considerados mecanismos de sobrevivência dos micro-organismos tanto na natureza como no hospedeiro, uma vez que tais estruturas são muito mais resistentes aos antimicrobianos que as células planctônicas (TAFF, et al., 2012). Este fato foi primeiramente verificado em espécies bacterianas, quando se observou um aumento da concentração do antibiótico em até 100 vezes para a eliminação das bactérias associadas em biofilme, quando comparada às células planctônicas (DONLAN; COSTERTON, 2002). Mais tarde, habilidade semelhante foi detectada em biofilmes fúngicos, nos quais eram necessárias concentrações mais elevadas de cada droga para uma redução relevante da atividade metabólica do biofilme em comparação com as células planctônicas (EL-AZIZI, 2007). Estes resultados foram confirmados para diferentes espécies fúngicas como *Candida albicans* (SHUFORD et al., 2006; TOBUDIC et al., 2010), *C. glabrata* (EL-AZIZI, 2007; MONTEIRO et al., 2013); *C. parapsilosis*, *C. krusei* (EL-AZIZI, 2007); *C. neoformans* (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006) e *Aspergillus* spp. (LIU et al., 2012).

A elucidação dos mecanismos de resistência em biofilmes é o primeiro passo para a otimização das terapias, ora pelo uso de terapias antifúngicas clássicas como por exemplo, o bloqueio do cateter com antimicrobianos/antissépticos e o uso de cateteres impregnados com antibióticos, ora pelo emprego de terapias com combinação de drogas (SARDI et al., 2013). Uma vez que ocorram infecções relacionadas a cateteres, o procedimento clínico atual é a remoção do dispositivo e a administração de antifúngicos com ação sistêmica. No entanto tem se verificado uma redução da quantidade de células em biofilme de *C. albicans* formado em cateter vascular central quando tratado com caspofungina usada como uma solução de bloqueio durante o tratamento (SHUFORD et al., 2006). Essa estratégia pode ser adotada em pacientes com candidemia clinicamente estáveis para evitar substituição intravascular do cateter (CATEAU; RODIER; IMBERT, 2008).

Para o tratamento de infecções causadas por biofilmes, as equinocandinas, a anfotericina B e suas formulações lipídicas têm demonstrado eficiência tanto *in vitro* (CATEAU; RODIER; IMBERT, 2008; RAMAGE et al., 2013) quanto *in vivo* (MUKHERJEE et al., 2009). No entanto, os derivados azólicos, os análogos da pirimidina, alilaminas e as formulações clássicas de poliênicos, como a nistatina, não vêm apresentando atividade eficaz contra biofilmes fúngicos (MONTEIRO et al., 2013). Para superar a ineficácia dessas drogas,

alguns pesquisadores têm se dedicado em avaliar o efeito sinérgico entre várias classes de medicamentos, como antifúngicos, antibacterianos, analgésicos, imunossupressores, entre outros. Exemplos dessas combinações são encontrados com frequência na literatura científica: associação entre fluconazol e doxiciclina (GAO et al., 2013), combinação entre anfotericina B e aspirina (ZHOU et al., 2012), combinação de caspofungina e o analgésico/anti-inflamatório diclofenaco (BINK et al., 2012) e a sensibilidade de biofilmes de *C. albicans* a diferentes antifúngicos e o medicamento imunossupressor ciclosporina (SHINDE et al., 2012).

1.3 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DROGAS ANTIBACTERIANAS

Tendo em vista o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos antifúngicos atualmente utilizados, nota-se um crescente interesse na prospecção por novas drogas nos últimos anos. Além de drogas já usadas na prática médica, como as sulfonamidas (BRILHANTE et al., 2010; CORDEIRO et al., 2011b) e as drogas antituberculose (CORDEIRO et al., 2006; 2011a), muitas classes de compostos químicos têm sido investigadas quanto ao seu potencial antifúngico, como as estatinas (CHAMILOS; LEWIS; KONTOYIANNIS, 2006), as quinonas (TSANG; BANDARA; FONG, 2012) e as hidrazonas (JUDGE et al., 2012).

Com o intuito de descobrir moléculas potencialmente ativas, várias substâncias vêm sendo testadas isoladas ou em combinação com drogas antifúngicas (CORDEIRO et al., 2009; 2011a; GAO et al., 2013). A interação entre drogas antifúngicas e compostos não antimicrobianos pode representar uma alternativa para o tratamento de pacientes infectados com cepas resistentes aos fármacos antifúngicos tradicionais, como relatado por Afeltra et al. (2004). Porém, a importância dessas drogas no tratamento de infecções fúngicas requer ainda estudos adicionais (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

1.3.1 Isoniazida e Etionamida

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2013), as drogas isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA) e etambutol (EMB) compõem o esquema padrão usado para o tratamento de “primeira linha” da tuberculose (TB). No caso de cepas multirresistentes aos agentes etiológicos da TB outros quimioterápicos designados de

“segunda linha” como a etionamida (ETH), são utilizados para substituir INH e RMP (VALE; GOMES; SANTOS, 2013). Essas drogas combinam elevado nível de eficiência, moderada toxicidade e baixo custo (ANDRADE, 2008).

A INH trata-se de uma pró-droga muito eficiente, considerada o fármaco mais importante para o tratamento da TB na atualidade (PARSONS et al, 2005; FERREIRA et al., 2007). Sua atividade antimicrobiana foi observada pela primeira vez por Chorine em 1945, quando avaliava o efeito tuberculostático da nicotinamida em modelos animais (ZHANG, 2005). A INH foi desenvolvida apenas em 1952, sete anos depois de sua descoberta (FERREIRA; NOGUEIRA; SOUZA, 2007).

A droga INH pertence ao grupo das hidrazidas do ácido isonicotínico (Figura 8a) e apesar de apresentar uma molécula química pequena, possui um mecanismo de ação complexo (PETRI, 2001). A INH interfere com a síntese dos ácidos micólicos da parede celular das micobactérias, mediante inibição de enzimas específicas (ZHANG, 2005). O fármaco primeiramente é convertido pela enzima catalase/peroxidase (KatG) do *Mycobacterium tuberculosis* em um metabólito ativo que constitui um ânion ou radical (ANDRADE et al., 2008), que gera espécies reativas de oxigênio (O_2^- e H_2O_2) e radicais orgânicos que danificam as moléculas de DNA, lipídios e carboidratos das micobactérias (SOMOSKOVI; PARSONS; SALFINGER, 2001; ZHANG, 2005). Em consequência, há o bloqueio da biossíntese dos ácidos micólicos - lipídios longos e ramificados, fixados a um polissacarídeo da parede celular das micobactérias (Figura 8c) (PETRI, 2001). Estudos indicam serem os genes *inhA* e *KasA* os principais alvos do fármaco. De fato, o metabólito ativo da INH liga-se aos produtos desses genes: a proteína transportadora enoil-acil redutase e a β -cetoacil ACP-sintase I, ambas envolvidas na via biossintética dos ácidos micólicos (SOMOSKOVI; PARSONS; SALFINGER, 2001).

A atividade antimicrobiana da INH é direcionada às micobactérias, no entanto trabalhos anteriores relataram o efeito inibitório *in vitro* deste quimioterápico contra cepas de fungos dimórficos como *Coccidioides posadasii* (CORDEIRO et al., 2006) e *Histoplasma capsulatum* (CORDEIRO et al., 2011a). A droga é capaz de penetrar nas células fagocíticas, como macrófagos, e atingir até mesmo patógenos intracelulares. Apesar de ser um fármaco eficaz contra *M. tuberculosis*, pode ocasionar efeitos tóxicos indesejáveis, seja pelo próprio princípio ativo ou pelos seus metabólitos formados. Os efeitos colaterais mais proeminentes estão relacionados à febre, icterícia e neurite periférica (PETRI, 2001).

A ETH também é um pró-fármaco e foi produzida pela primeira vez na década de 1950, quando pesquisadores sintetizavam análogos da INH como novos medicamentos

antimicobacterianos (VALE; GOMES; SANTOS, 2013). Somente em 1956 a ETH foi introduzida como droga de “segunda linha” no tratamento da TB (ARBEX et al., 2010). A molécula da ETH é estruturalmente semelhante à INH (Figura 8b), caracterizada pela presença de uma função tioamida (R_1 -CS-NR₂R₃) que a distingue da INH (VALE; GOMES; SANTOS, 2013).

Estudos sugerem que o mecanismo de ação da ETH está relacionado ao mesmo sítio de ação da INH. Similarmente, por oxidação da porção tiourea da molécula, a ETH se converte à sua forma ativa, etionamida sulfóxido catalizada pela enzima KatG. Após a ativação, o gene *EthA* do *M. tuberculosis* sofre inibição e a síntese proteica é suspensa, impedindo a biossíntese dos ácidos micólicos e outros ácidos graxos de cadeia longa, comprometendo a estrutura da membrana celular micobacteriana (VALE; GOMES; SANTOS, 2013).

A ETH tem sido bastante utilizada no tratamento de pacientes com TB que apresentaram resistência à INH ou estreptomicina e na terapia de infecções causadas por *M. leprae* e *M. avium* (FERNANDES, 2006). A resistência à ETH ocorre normalmente devido a modificações genéticas no gene *EthA*. Nota-se que cepas de *M. tuberculosis* que possuem resistência à INH devido a alterações do gene de KatG (enzima catalase/peroxidase) permanecem sensíveis à ETH, o que pode indicar que as enzimas responsáveis pela ativação da INH e da ETH são diferentes (ARBEX et al., 2010; NLM, 2013).

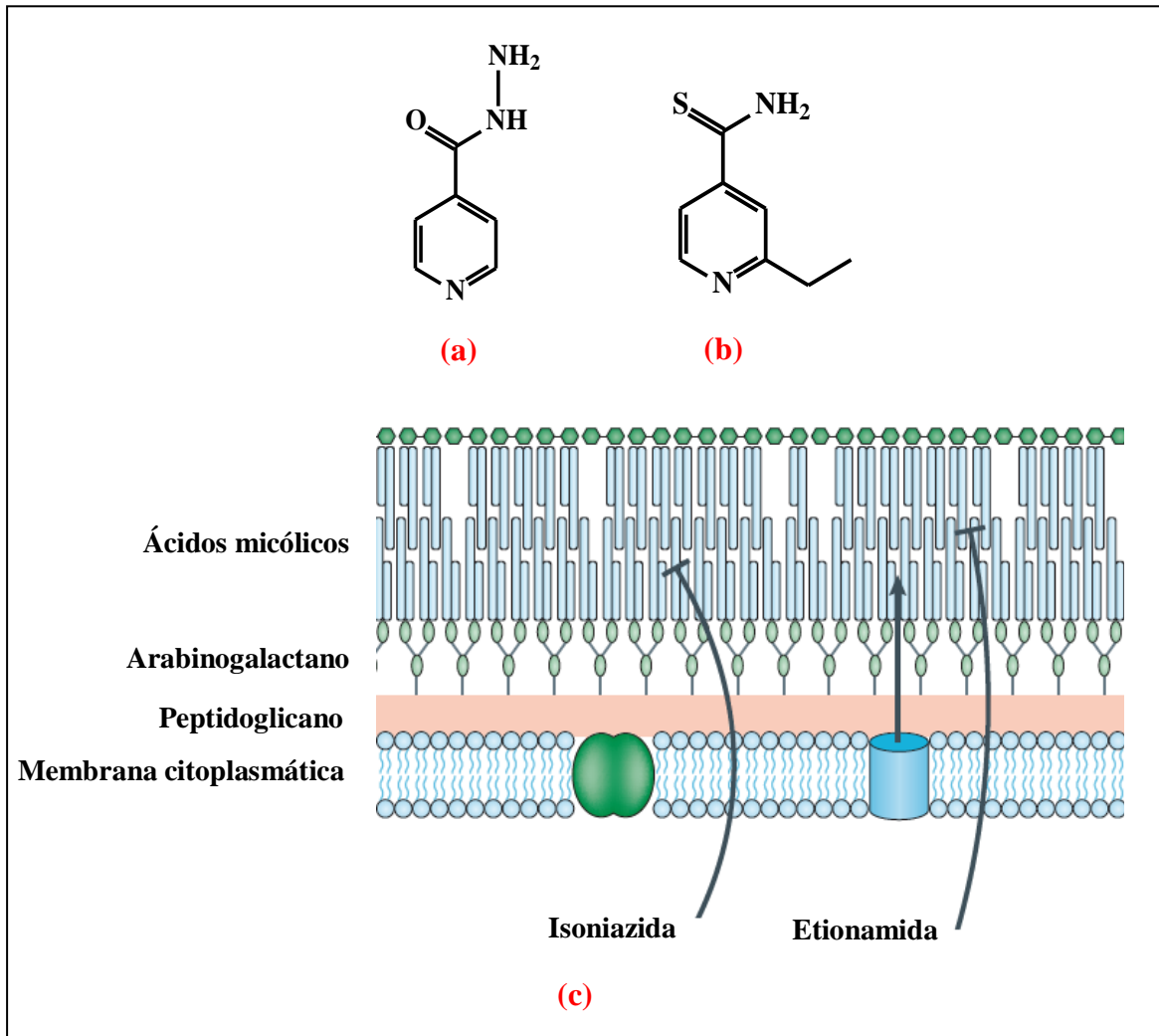


Figura 8 - (a) Estrutura química das drogas antituberculose isoniazida e (b) etionamida; (c) Esquema simplificado da membrana citoplasmática de *Mycobacterium tuberculosis*, demonstrando os sítios alvos das drogas isoniazida e etionamida. Fonte: Adaptada de ZUMLA; NAHID; COLE, 2013.

1.3.2 Hidrazonas

As hidrazonas são moléculas quimicamente classificadas como iminas, compostos orgânicos caracterizados por conter a estrutura geral $R_1R_2C=N-NR_3R_4$ (UPPAL et al., 2011). Normalmente esses compostos são formados pela reação de condensação entre cetonas ou aldeídos e uma hidrazida, catalisada pela presença de ácido ou base. Na catálise ácida ocorre uma quebra da carbinolamina intermediária com a liberação de uma molécula de água, já na catálise básica observa-se uma desidratação do intermediário tetraédrico, desprotonação do

nitrogênio com a eliminação do íon hidróxido (OH^-) ou íon hidroxônio (H_3O^+). (Figura 9) (SINGH; RAGHAV, 2011).

Geralmente, as reações de síntese são de baixo custo e de grande economia de átomos, visto que, com exceção da água que é liberada na reação, todos os outros átomos dos compostos reagentes são utilizados para a formação do produto final. No que concerne à síntese desses compostos, a principal característica é a versatilidade de obtenção, bem como, sua vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes (TENÓRIO; GÓES, 2005).

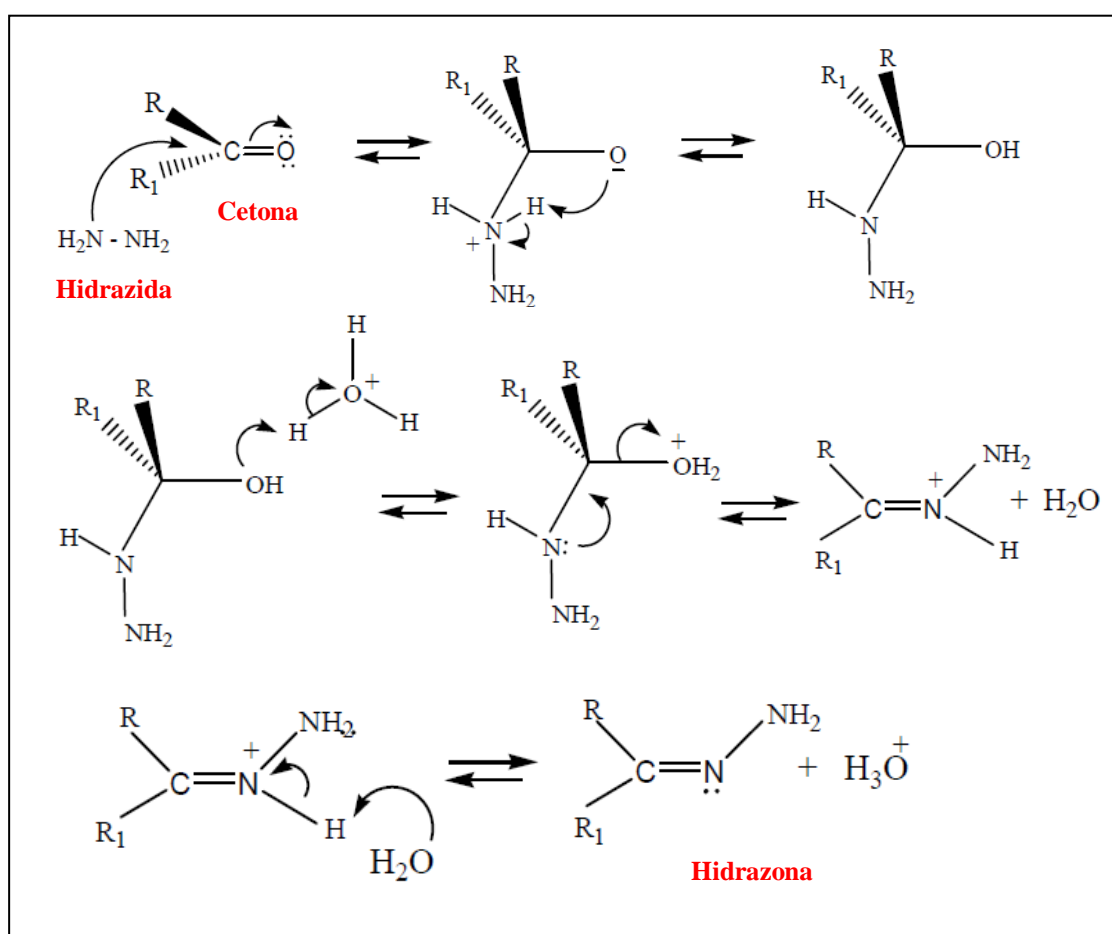


Figura 9 - Reação de formação entre uma cetona e uma hidrazida, catalisada pela presença de uma base com a desidratação do intermediário tetraédrico, desprotonação do nitrogênio com a eliminação do íon hidroxônio (H_3O^+). Fonte: Adaptada de SINGH; RAGHAV, 2011

As propriedades químicas apresentadas pelas hidrazonas são atribuídas principalmente ao comportamento quelante dessas moléculas que são usadas em diversas aplicações, desde reagentes em química analítica, compostos cromogênicos, catalisadores,

sondas luminescentes até sensores moleculares (DESPAIGNE et al., 2010). Além disso, esses compostos são utilizados para o controle de pragas agrícolas e como fotorreceptor eletrofotográfico de impressores a laser (PARRILHA et al., 2011). As hidrazonas heterocíclicas constituem uma importante classe de moléculas biologicamente ativas, que têm sido intensamente reportadas na literatura nos últimos anos, devido suas amplas propriedades, tais como atividades antibacteriana, antifúngica, antituberculose (JUDGE et al., 2012), anti-inflamatória (SALGIN-GÖKŞEN et al., 2007), analgésica, anticonvulsivante (REIS et al., 2008), antimalárica (MELNYK et al., 2006), antitumoral (TERZIOGLU; GÜRSOY, 2003), dentre outras.

Muitos pesquisadores vêm sintetizando hidrazonas e utilizando-as no desenvolvimento de novas moléculas biologicamente mais ativas, eficazes e com menor toxicidade (PARASHAR et al., 2009). Um exemplo interessante é o antimicrobiano sintético de amplo espectro denominado nifuroxazida, o qual não promove resistência bacteriana e vem sendo usado como segunda droga de escolha para o tratamento de infecção entérica causada por *Staphylococcus aureus* (MASUNARI; TAVARES, 2007).

As atividades biológicas dos compostos derivados de hidrazonas têm instigado grande interesse da comunidade científica na última década (SUVARAPU et al., 2012), sendo investigadas por vários cientistas. Muitas substâncias que pertencem ao grupo das hidrazonas têm sido descritas na literatura como inibidores das enzimas ciclo-oxigenase (COX) e 5-Lipo-oxigenase (5-LO), apresentando atividades analgésica e anti-inflamatória. Pesquisas demonstram que o grupamento hidrazona, presente em derivados fenil-hidrazonas e compostos aril e acil-hidrazonas apresentam caráter farmacofórico para a inibição de COX e pronunciada atividades analgésica e anti-inflamatória, além de outras atividades, como anticonvulsivante e antimicrobiana (TODESCHINI et al., 1998; REIS et al., 2011). Muitos processos fisiológicos e patológicos, como a inflamação ou mesmo a progressão de tumores cancerígenos são conduzidos por substâncias como as prostanoídes que tem sua biossíntese regulada pela enzima COX. Outras substâncias como o leucotrieno B₄ que se origina da enzima 5-LO, também contribuem para a hiperalgesia durante a inflamação, por diminuir os limiares mecânicos e térmicos das fibras. Portanto, substâncias que inibem tanto a COX, quanto a 5-LO, são alvos atraentes para a química medicinal, visando o combate à dor, causada por processos inflamatórios (REIS et al., 2011).

Em química inorgânica, as hidrazonas formam facilmente complexos estáveis com a maioria dos metais de transição, como cobalto, níquel, gálio e zinco, desempenhando um importante papel no campo da química bioinorgânica. Coordenadas a metais, as

hidrazonas estão sendo pesquisadas como agentes antibacterianos e antifúngicos (NORA et al., 2007), assim como também inibidores de enzimas (SUVARAPU et al., 2012).

Trabalhos recentes investigaram a atividade antimicrobiana, antitumoral e antiparasitária de complexos de gálio(III) formados a partir de hidrazona derivadas de 2-benzoilpiridina e 2-acetilpiridina. De acordo com o estudo, tais moléculas não apresentaram atividade importante contra bactérias das espécies *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto alguns compostos demonstraram atividade antifúngica compatível à do fluconazol contra *Candida albicans*. Com isso, foi possível constatar que a complexação reduz significativamente os valores de CIM obtidos nos ensaios de sensibilidade contra *C. albicans* (PARRILHA, 2012).

No que concerne à atividade antitumoral, as hidrazonas e seus complexos de gálio(III) mostraram ação citotóxica contra duas diferentes células de glioblastoma, U87 e T98, que expressam a proteína pro-apoptótica p53 e a proteína p53 mutante, respectivamente. O percentual de sobrevivência das células U87 e T98 em contato com as hidrazonas variaram entre 14,4 e 35,1% (DESPAIGNE et al., 2012). Em estudos anteriores, Mendes et al. (2009) investigaram o efeito de fármacos antitumorais de uso clínico sobre a sensibilidade de linhagens de células cancerígenas humanas e revelaram que as células em que a proteína p53 está ausente ou que apresentam a proteína mutante são menos sensíveis à maioria dos compostos que as células que expressam essa proteína.

As hidrazonas derivadas de 2-acetilpiridina e seus complexos de gálio(III) também tiveram suas atividades antimaláricas avaliadas. As hidrazonas foram ativas contra *Plasmodium falciparum* e apresentaram baixa toxicidade contra células de hepatoma humano. Observa-se neste caso que a coordenação das hidrazonas ao gálio(III) não fez aumentar a atividade antimalárica e resultou em um aumento da citotoxicidade (PARRILHA, 2012).

Nos últimos anos, aproximadamente 3.000 compostos análogos da isoniazida foram sintetizados, destes quase 2.000 são hidrazonas como, por exemplo, a furonazida, opioniazida e sulfoniazida que possuem atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*. Judge e colaboradores (2012) estudaram o potencial antibacteriano, antifúngico, antimicobacteriano e antiviral de uma série de hidrazonas provenientes da isoniazida. Esses compostos foram testados frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, além da micobactéria *Mycobacterium tuberculosis* e vírus de DNA e RNA. Os resultados mostraram que as hidrazonas sintetizadas foram capazes de inibir o crescimento das bactérias e dos fungos testados, apresentando valores de CIM, igual ou menor que o agente antibacteriano norfloxacina e o antifúngico

FLC. Ademais os compostos foram pesquisados quanto ao seu potencial antimicobacteriano, e os resultados indicaram que estas substâncias podem ser consideradas altamente ativas, com algumas delas exibindo atividade maior do que a droga padrão isoniazida. Nove dos doze compostos obtidos apresentaram atividade antiviral contra uma variedade de vírus de DNA e RNA em concentrações subtóxicas (JUDGE et al., 2012).

Visbal et al. (2011) sintetizaram quatro análogos de hidrazona, que apresentaram atividade inibitória *in vitro* contra o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. A pesquisa objetivou investigar o efeito dos compostos sintetizados sobre o teor de esteróis nas células do fungo. Os dados obtidos demonstraram uma redução de 50% no conteúdo final de esteróis brasicasterol, ergosterol, e aumento concomitante nos níveis de lanosterol, indicando que tais compostos são capazes de inibir a enzima esterol Δ^{24} esterol-C-metiltransferase, de um modo dependente da localização estereoquímica do grupo hidrazona. Apenas um composto não teve uma atividade antiproliferativa associada ao bloqueio de qualquer etapa na via de biossíntese de esteróis, sugerindo um mecanismo de ação diferente.

Neste contexto, a busca racional por novas moléculas com atividade antiproliferativa levou à descoberta de que muitas hidrazonas possuem amplo espectro de atividade, sem provocar efeitos colaterais indesejáveis, que passa a ser de grande importância na área de pesquisa em medicina.

1.4 MICOSES SISTÊMICAS: CONTEXTO ATUAL DE HISTOPLASMOSE E CRIPTOCOCOSE

A ascensão das infecções fúngicas sistêmicas, nos últimos 25 anos tem transformado o cenário da saúde humana mundial (ABADIO et al., 2011; PIERCE et al., 2013). Apesar da menor frequência de casos quando comparada às doenças bacterianas, as infecções fúngicas sistêmicas têm representado uma grave ameaça especialmente em indivíduos hospitalizados com doenças subjacentes, como pacientes submetidos à quimioterapia imunossupressora, cirurgias de grande porte ou transplante, portadores de cateteres venosos, bem como os infectados com vírus HIV/aids (HICHERI; COOK; CORDONNIER, 2012; KONTOYIANNIS, 2012). *Candida albicans* continua sendo o patógeno fúngico mais prevalente em humanos que apresentam infecção hospitalar adquirida, com taxas de mortalidade que se aproximam de 50% nos casos de doença sistêmica disseminada (FORASTIERO et al., 2013; LI et al., 2013). No entanto, apesar de espécies de

Candida e *Aspergillus* (HICHERI; COOK; CORDONNIER, 2012) serem as maiores responsáveis pelos casos de micoses sistêmicas em todo o mundo, tem-se observado uma mudança epidemiológica relevante, que demonstra que outras espécies como *Histoplasma capsulatum* (EMRI et al., 2013) e *Cryptococcus neoformans* também vêm apresentando risco eminente à saúde humana (PIERCE et al., 2013).

A histoplasmose clássica e a criptococose são micoses sistêmicas de caráter oportunista, potencialmente fatais em pacientes imunodeprimidos principalmente portadores do vírus HIV/aids (CHONG et al., 2010; JAIMES et al., 2013). A histoplasmose é considerada uma importante doença respiratória fúngica das Américas e afeta milhões de pessoas em todo o mundo (BRILHANTE et al., 2012). Em indivíduos infectados pelo vírus HIV a micose acomete cerca de 2 a 5% dos casos (SOLARI et al., 2007), sendo que 50 a 75% dos pacientes apresentam histoplasmose disseminada como primeira manifestação clínica da aids (JAIMES et al., 2013).

No Brasil, a histoplasmose é relativamente comum e se dá através da observação de casos clínicos autóctones, seja uma ocorrência isolada ou sob a forma de microepidemias, comprovados por inquéritos epidemiológicos empregando testes cutâneos (CHANG et al., 2007). A micose é relatada com maior frequência no sul e sudeste do país (MORAIS et al., 2008), mas novos estudos revelam a ocorrência de histoplasmose em outras áreas do Brasil, como nos Estados do Maranhão e Piauí, remetendo a existência de microfocos nessas regiões (DEUS FILHO et al., 2009). No Ceará, estudo realizado entre janeiro de 2006 a dezembro de 2010 em hospitais da rede pública de Fortaleza, registrou 208 casos de histoplasmose disseminada em pacientes HIV positivos (BRILHANTE et al., 2012).

A histoplasmose clássica é causada pela espécie *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (Figura 10), fungo dimórfico térmico, saprófita, encontrado na forma de micélio em solos ricos de compostos nitrogenados e alta umidade, geralmente associado com dejetos de aves, morcegos ou pássaros (BRAZÃO-SILVA et al., 2013). O contágio por *H. capsulatum* ocorre após o revolvimento do solo contaminado que proporciona a inalação de propágulos infectantes, formados por pequenos fragmentos de micélio e microconídios, que são depositados nos alvéolos pulmonares, (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005; COOPER; ZARNOWSKI; WOODS, 2009), onde são envolvidos por fagossomas a 37 °C, e convertidos à sua forma leveduriforme, causando uma pneumonite focal e, por conseguinte o complexo pulmonar ganglionar primário, semelhante ao da TB pulmonar (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE, 2005). Apesar do seu efeito nefrotóxico, a AMB continua sendo a droga de escolha para a terapêutica da histoplasmose, principalmente nos quadros

clínicos mais severos, enquanto o ITC é indicado para histoplasmose pulmonar aguda ou pulmonar cavitária crônica (RAMOS-E-SILVA et al., 2012).

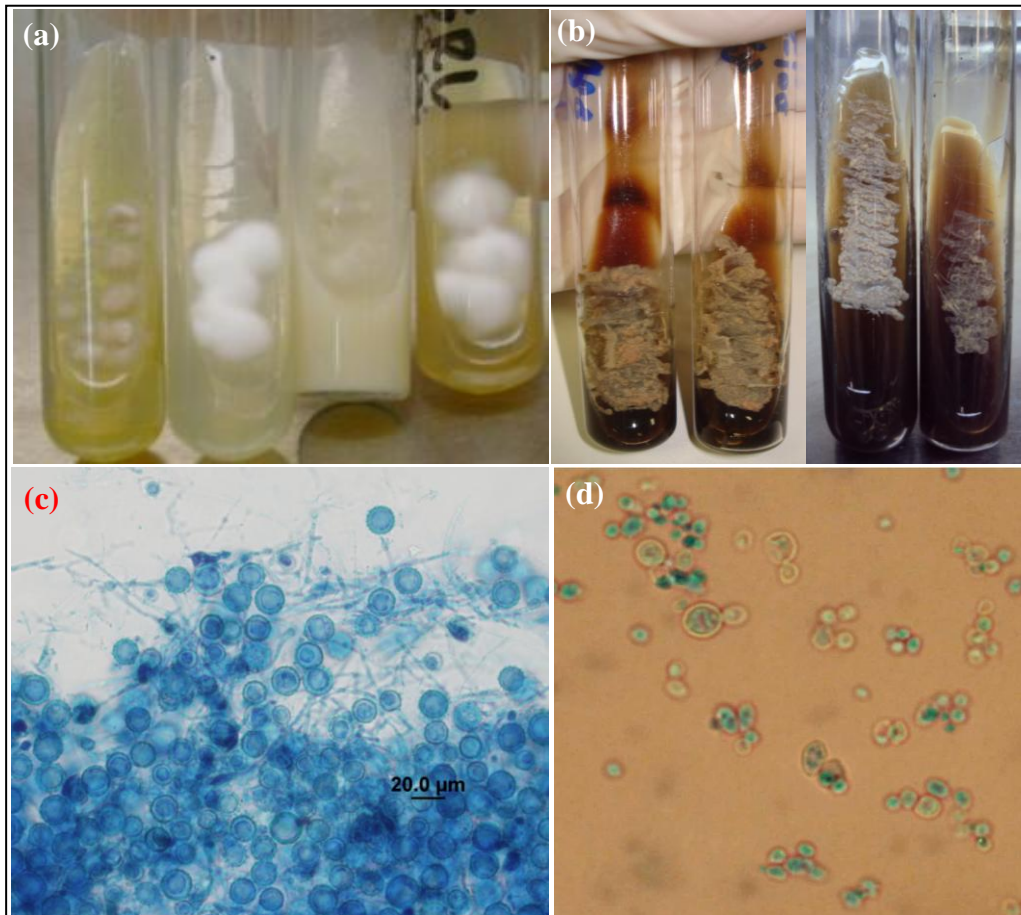


Figura 10 - Aspectos morfofisiológicos de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (a) Cultura de *H. capsulatum* na fase filamentosa obtida em (da esquerda para a direita) ágar BHI, ágar batata dextrose, ágar lactrimel e ágar malte a 2% à temperatura de 25 °C; (b) Cultura de *H. capsulatum* na fase leveduriforme obtida em ágar BHI suplementado com 10% de sangue de carneiro à 37 °C; (c) Aspecto micromorfológico de *H. capsulatum* na fase filamentosa obtida em preparação de lâmina-lamínula com lactofenol azul-algodão; (d) Aspecto micromorfológico de *H. capsulatum* na fase leveduriforme obtida em preparação de lâmina-lamínula com lactofenol azul-algodão. Fonte: CEMM, 2013.

Historicamente, a histoplasmose pulmonar crônica tem sido associada à TB pulmonar, por ambas apresentarem características clínicas, radiológicas e histopatológicas semelhantes (FERREIRA; BORGES, 2009). Estes casos têm levado indivíduos com histoplasmose pulmonar a serem tratados com agentes antituberculose, mas sem

demonstrarem cura clínica. Os primeiros casos de histoplasmose pulmonar crônica foram relatados em 1948 nos EUA, em indivíduos provenientes de sanatórios para TB, que recebiam tratamento antituberculose antes do diagnóstico da doença fúngica (UNIS; SEVERO, 2005). As manifestações clínicas e as lesões pulmonares da doença são semelhantes as da TB pulmonar, sendo, portanto a associação de ambas um fato comum até hoje (DEUS FILHO et al., 2009; BRAZÃO-SILVA et al., 2013; MENG; CAI; LI, 2013). Como a apresentação clínica das duas doenças é bastante análoga, observa-se que vários pacientes com diagnóstico definido de histoplasmose já fizeram tratamento prévio para TB (DEUS FILHO et al., 2009). Estes pacientes em geral não respondem a terapia e só apresentam melhora clínica após a introdução da medicação antifúngica (UNIS; SEVERO, 2005).

A criptococose afeta quase um milhão de pessoas por ano em todo o mundo, e a maioria dos casos é atribuída a pacientes com vírus HIV/aids, dos quais aproximadamente 18% vão a óbito quando associados a esta micose (VIJAYAN; KLAUSNER, 2013). Em regiões com elevadas taxas de infecção por HIV, a criptococose é a principal causa de meningite e, conseqüentemente, é uma das doenças oportunistas mais comuns definidoras de aids (ANTINORI, 2013). Depois do acometimento do sistema nervoso central, o envolvimento pulmonar na criptococose é o mais frequente, com o aparecimento do complexo primário pulmonar-linfonodo, bastante semelhante ao encontrado na TB e histoplasmose pulmonar. O quadro pulmonar pode apresentar potencial risco de disseminação em presença de imunodepressão nos pacientes (MORETTI et al., 2008; ANDAMA et al., 2013). A criptococose é causada pelas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* (Figura 11) (BUTTS et al., 2013), considerados patógenos oportunistas de distribuição mundial (CHONG et al., 2010). *C. neoformans* normalmente infecta pacientes imunodeprimidos, incluindo os pacientes com vírus HIV/aids (GUIMARÃES et al., 2010), e *C. gattii* é um patógeno humano primário emergente que acomete também indivíduos saudáveis (SANTOS et al., 2012).

A terapia padrão-ouro para meningoencefalite criptocócica é AMB isolada ou em combinação com a droga 5-flucitosina (5FC) e está associada com baixas taxas de mortalidade entre 10 e 20%. No entanto, a AMB-5FC não é amplamente disponível em regiões com recursos escassos, pois além do alto custo, é considerada tóxica e requer a administração intravenosa, com necessidade de acompanhamento terapêutico frequente, o que não é comum nessas regiões (BUTTS et al., 2013). Assim, nos países em desenvolvimento, o FLC é a droga mais comumente usada no tratamento alternativo. Administrado por via oral, não há necessidade de cuidados médicos constantes, e atualmente é fornecido gratuitamente

em programas governamentais (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). No entanto, alguns estudos têm mostrado que a resistência à FLC pode ser um problema grave nos países em desenvolvimento, com taxa de mortalidade de cerca de 50% (VARMA; KWON-CHUNG, 2010; BUTTS et al., 2013).

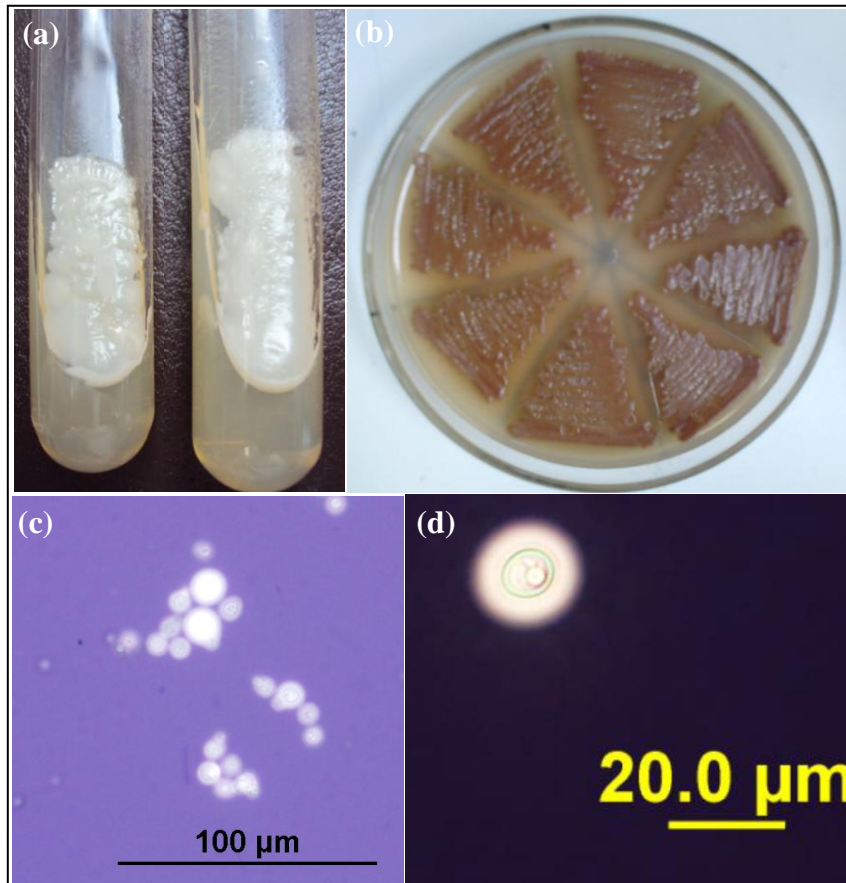


Figura 11 - Aspectos morfofisiológicos de espécies de *Cryptococcus* (a) Cultura de *Cryptococcus* spp. obtida em ágar batata dextrose à temperatura de 25 °C; (b) Cultura de *Cryptococcus* spp. obtida em ágar Semente de Níger com colônias acastanhadas; (c) e (d) Microscopia de *C. neoformans* com presença de cápsula polissacarídica obtida em preparação com tinta da China observadas em microscópio óptico em objetiva de 100x. Fonte: CEMM, 2013.

A criptococose pulmonar costuma estar associada a outras doenças, como diabetes e TB (VIJAYAN; KLAUSNER, 2013). Na última década, tem-se observado com maior frequência casos de criptococose em pacientes com suspeita de TB pulmonar. Na África do Sul, doença criptocócica foi associada a 75% dos casos de mortes por infecções oportunistas em garimpeiros com TB pulmonar. Entretanto, há poucos estudos que descrevem o impacto

da criptococose em pacientes HIV soropositivos com suspeita de TB (SOUSA et al., 2006; ANDAMA et al., 2013).

Apesar da resistência aos fármacos antifúngicos em cepas de *H. capsulatum* e *Cryptococcus* spp. seja considerada incomum, nos últimos anos, casos de histoplasmose e criptococose refratárias ao tratamento com drogas antifúngicas convencionais, como o fluconazol, têm sido descritos (WHEAT et al., 2001; CLARCK et al., 2005; CHANG et al., 2009; VARMA; KWON-CHUNG, 2010). Fato que vêm estimulando a busca de novos compostos antifúngicos para a terapia dessas micoses (BRILHANTE et al., 2010; CORDEIRO et al., 2012).

O desenvolvimento de novas drogas ainda é um desafio de destaque mundial, visto que fungos e humanos compartilham estreitas relações evolutivas o que torna cada vez mais difícil a identificação de alvos moleculares específicos para as células fúngicas (COWEN, 2008; PIERCE et al., 2013). Preocupada com essa situação, a Organização Mundial de Saúde – OMS, contemplou esta problemática como tema relevante, com o objetivo de dar visibilidade a esta questão que assola os serviços de saúde, enfatizando que não é uma dificuldade nova, mas que se torna cada dia mais preocupante (OMS, 2012).

As drogas antituberculose INH, RMP, PZA, e EMB, utilizadas no tratamento de quadros de TB apresentaram resultados promissores *in vitro* frente às cepas de *C. posadasii* (CORDEIRO et al., 2006) e *H. capsulatum* (MARQUES, 2009; CORDEIRO et al., 2011a). Sabe-se que os agentes antituberculose atuam sobre alvos específicos do metabolismo micobacteriano. De posse desses dados, supõe-se que sítios análogos de ligação a essas drogas estejam presentes em células de fungos causadores de micoses sistêmicas como *C. posadasii*, *H. capsulatum* e *Cryptococcus* spp., resultando no efeito inibitório observado nos trabalhos anteriores.

Dessa forma, a prospecção por novas drogas para o tratamento de micoses sistêmicas, como a histoplasmose e a criptococose, impulsionou este trabalho a avaliar o potencial antifúngico de drogas não utilizadas na terapia antifúngica, bem como determinar o efeito inibitório de novos compostos sintetizados a partir de uma droga já existente. Além disso, com o conhecimento recente de que a maioria das infecções fúngicas está relacionado com a formação de biofilme, que por sua vez resulta no aumento da resistência aos convencionais antifúngicos, também se preocupou em analisar a atividade antifúngica dessas drogas sobre o biofilme de isolados de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e do complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Este estudo também buscou determinar os mecanismos de ação das drogas envolvidas sobre as células dos referidos fungos.

2 PERGUNTAS DE PARTIDA

1. As hidrazonas sintetizadas a partir da droga isoniazida são capazes de inibir o crescimento *in vitro* de isolados de *H. capsulatum*?
2. As hidrazonas apresentam efeito sinérgico em combinação com anfotericina B frente à *H. capsulatum*?
3. Quais os mecanismos de ação associados à atividade antifúngica das hidrazonas no fungo dimórfico *H. capsulatum*?
4. Hidrazonas são capazes de potencializar a ação fungicida de macrófagos infectados por *H. capsulatum*?
5. As drogas antituberculose isoniazida e etionamida possuem atividade antifúngica frente a cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*?
6. Quais os mecanismos de ação das drogas isoniazida e etionamida em *Cryptococcus* spp.?

3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

1. Isolados de *H. capsulatum* na fase leveduriforme e filamentosa são sensíveis, *in vitro*, frente à hidrazonas derivadas da droga isoniazida.
2. As hidrazonas interagem sinérgicamente com anfotericina B *in vitro* contra *H. capsulatum* nas formas planctônica e biofilme.
3. As hidrazonas agem no envoltório celular fúngico, alterando o conteúdo de ergosterol e/ou provocando poros na membrana plasmática em *H. capsulatum*.
4. As hidrazonas promovem aumento da taxa de morte fúngica mediada por fagocitose.
5. As drogas antituberculose isoniazida e etionamida isoladas e/ou em combinação com os derivados azólicos possuem atividade antifúngica frente a cepas do Complexo *C. neoformans / C. gattii* nas formas planctônica e biofilme.
6. A atividade antifúngica *in vitro* das drogas antituberculose está relacionada a redução do teor de ergosterol do envoltório celular fúngico e/ou alterações na estrutura da membrana plasmática de *Cryptococcus* spp.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar análogos químicos da droga isoniazida e determinar o efeito inibitório, *in vitro*, destes e das drogas antituberculose frente aos patógenos fúngicos oportunistas *H. capsulatum* var. *capsulatum* e espécies do complexo *C. neoformans*, bem como investigar os mecanismos de ação relacionados com a atividade antifúngica dessas drogas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar hidrazonas derivadas da droga isoniazida.
2. Determinar o efeito citotóxico *in vitro* dos compostos sintetizados sobre células tumorais humanas.
3. Avaliar o potencial antifúngico, *in vitro*, das hidrazonas isoladas e em combinação com anfotericina B frente à *H. capsulatum* na forma planctônica e biofilme.
4. Investigar o efeito das hidrazonas sobre o teor de ergosterol total e permeabilidade da membrana plasmática em *H. capsulatum*.
5. Investigar o efeito das hidrazonas sobre a taxa de morte intracelular de *H. capsulatum* mediada por macrófagos.
7. Determinar o potencial antifúngico, *in vitro* das drogas antituberculose isoniazida e etionamida isoladas e em combinação com os derivados azólicos contra cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* nas formas planctônica e biofilme.
6. Investigar o efeito das drogas isoniazida e etionamida sobre o teor de ergosterol total e integridade da membrana plasmática em isolados de *Cryptococcus* spp.

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS

As cepas de *H. capsulatum* estocadas em solução salina 0,9% foram recuperadas mediante semeadura em ágar batata dextrose (Difco, Detroit, EUA) e ágar infusão de cérebro-coração – BHI (Himedia, Índia). A identificação de cada cepa foi confirmada através da análise das características morfológicas. Para avaliação macroscópica, as cepas foram repicadas em ambos os meios, levando em consideração relevo, textura e pigmentação das colônias, após sete a dez dias de incubação em temperatura de 28°C. A análise micromorfológica foi realizada através da observação, em microscópio óptico, de fragmentos de colônia com no mínimo sete dias de incubação, montados entre lâmina e lamínula com lactofenol azul-algodão. As culturas positivas para *H. capsulatum* foram confirmadas pela presença de macroconídios tuberculados ou mamilonados e hifas hialinas finas (KAUFFMAN, 2009).

Em seguida, a conversão das cepas de *H. capsulatum* para a forma leveduriforme foi realizada por meio de repiques semanais das culturas miceliais em ágar Sabouraud dextrose (Himedia, Índia) ou ágar BHI suplementado com 10% de sangue de carneiro e incubadas a uma temperatura de 35 °C, durante 30 a 45 dias a depender das características de cada cepa (RIBEIRO, 2012). A micromorfologia de cada cepa foi analisada através da observação, em microscópio óptico, de fragmentos de colônia com no mínimo sete dias de incubação, montados entre lâmina e lamínula com lactofenol azul-algodão, a fim de verificar a presença de células ovais uninucleadas. A conversão foi considerada completa quando todos os campos da lâmina examinados possuíam células de aspecto de leveduras. Para o desenvolvimento desta pesquisa, foram utilizadas 25 cepas de *H. capsulatum*, sendo 23 isolados humanos e duas cepas de origem animal. Os isolados humanos eram provenientes de três tipos de amostras: aspirado de medula óssea, creme leucocitário e biopsia. Todas as culturas de *H. capsulatum* foram manipuladas em laboratório de nível de biossegurança 3, em cabine de segurança biológica classe II - B2. As culturas miceliais e leveduriformes foram empregadas na preparação dos inóculos para a realização de todos os testes desta pesquisa.

As cepas de origem ambiental e clínica de *Cryptococcus* spp. em estoque em solução salina 0,9% foram recuperadas mediante semeadura em ágar batata dextrose, e em seguida submetidas a exame microscópico direto com tinta da China para a visualização de leveduras capsuladas. A identificação foi confirmada com provas bioquímicas da cultura

fúngica como a utilização de ureia em meio de Christensen's, meio de Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB) e assimilação de carboidratos (DE HOOG et al., 2000; CORDEIRO et al., 2011c). Todas as cepas desta pesquisa pertencem à Coleção de Culturas do Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM da Universidade Federal do Ceará.

5.2 SÍNTESE DOS ANÁLOGOS DA DROGA ANTITUBERCULOSE ISONIAZIDA

A síntese dos análogos da isoniazida foi realizada a partir da reação entre a droga isoniazida e diferentes cetonas, conforme metodologia descrita por Ilić et al. (2010) com modificações, pelo método de Preparação de Bases de Schiff. Os compostos foram preparados a partir da mistura de 0,003 mol de cada cetona (uma cetona por reação) a 0,006 mol da droga isoniazida dissolvidos em 5,0 mL de etanol. Essa mistura foi selada em um reator de aço inox, revestido de Teflon e submetida à radiação de micro-ondas na potência de 300 W por 4 a 5 minutos. O processo de purificação foi realizado através da solubilização das impurezas em álcool etílico e álcool metílico à temperatura ambiente, após sucessivas lavagens alternadas de centrifugação. Em seguida, as hidrazonas obtidas permaneceram a temperatura ambiente durante 24 a 72 h até completa evaporação dos solventes (ILIC' et al., 2010).

O controle das reações foi realizado através da cromatografia em camada delgada (CCD) empregando gel de sílica 60 (Φ 63-200 μ m) da Carlo Erba e cromatofolhas de plástico de gel de sílica 60 F254 (Merck, Germany). As revelações das substâncias foram realizadas através da exposição à irradiação ultravioleta (UV) e por aspensão em 0,5 mol/L de solução ácida de vanilina (Sigma-Aldrich, Germany) seguida por aquecimento (VASCONCELOS et al., 2009). As cetonas utilizadas nas reações foram: acetofenona e seus derivados como 2-metoxiacetofenona, 3-metoxiacetofenona, 2-nitroacetofenona, 3-metilacetofenona, 4-bromoacetofenona, 4-cloroacetofenona e 4-fenilacetofenona (Sigma-Aldrich, Germany).

As estruturas químicas das hidrazonas obtidas foram confirmadas pelo método de espectrometria de massa de alta resolução (EMAR) e ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono-13, obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance DRX-500 (CENAUREMN-UFC), que opera na frequência de 300 MHz para hidrogênio (^1H) e 75 MHz para carbono-13 (^{13}C), usando como solvente DMSO- d_6 (AZARIFAR; GHASEMNEJAD, 2003; VASCONCELOS et al., 2009). As reações foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob orientação do Prof. Dr. Jair Mafezoli e a Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.

5.3 EFEITO CITOTÓXICO DAS HIDRAZONAS SOBRE CÉLULAS HUMANAS

Para a análise de citotoxicidade foi utilizada o método do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} (Sigma-Aldrich, Germany), realizado pelo programa de screening do *National Cancer Institute* - NCI dos Estados Unidos (SKEHAN et al., 1990). Para tanto foram utilizadas três linhagens de células: NCIH358M (pulmão - humano), PC-3M (próstata - humano) e OVACAR-8 (ovário - humano) que foram gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos. Todas as linhagens celulares foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ céls/mL. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término da incubação, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 0,03 mL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por quatro horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 0,15 mL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. As amostras dos análogos foram diluídas em DMSO puro estéril. As substâncias foram testadas na maior concentração de 250 µg/mL (MOKOKA et al., 2013). Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará, pela aluna de doutorado Ana Jérsia Araújo sob orientação da Profa. Dra. Letícia Veras Lotufo.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

A atividade antifúngica *in vitro* foi determinada em ensaio de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo descrito no documento M27-A3 padronizado pelo CLSI, levando em consideração a espécie fúngica testada (CLSI, 2008). Os análogos químicos da isoniazida foram testados frente à cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* (NAKAI et al., 2003) na forma leveduriforme e filamentosa; e as drogas antituberculosas isoniazida e etionamida frente às espécies do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* (CORDEIRO et al., 2012).

Para a confecção dos inóculos fúngicos, foram preparadas suspensões a partir de culturas mantidas em ágar BHI suplementando com 10% de sangue de carneiro e ágar BHI, respectivamente, para *H. capsulatum* nas fases leveduriforme e filamentosa; e ágar batata para as demais espécies, respeitando o tempo de crescimento de cada uma delas. Para tanto, as culturas foram cobertas com um mL de salina estéril e, com auxílio de uma alça

microbiológica, foram realizadas leves raspagens na superfície do micélio, a fim de obter uma suspensão livre de fragmentos de meio de cultura. As suspensões foram transferidas para tubos de ensaio estéreis contendo 4 mL de solução salina 0,9% e, em seguida, submetidas a agitação em vórtex por 5 segundos. As suspensões foram deixadas em repouso por 5 minutos até que todos os fragmentos fossem depositados no fundo do tubo. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 530 nm e a sua transmitância ajustada para 95%; alternativamente a suspensão foi ajustada com solução salina até se alcançar uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de Mcfarland (CLSI, 2008).

As hidrazonas sintetizadas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido 100% em cabine de segurança biológica em concentrações até 100 vezes maior que o valor utilizado nos testes. O material foi homogeneizado até completa dissolução da droga e, em seguida, filtrado em membranas de milipore 0,22 µm, transferido para microtubos estéreis e mantido a -20°C até a análise.

Os fármacos antifúngicos utilizados para a realização dos testes de sensibilidade anfotericina B – AMB (Sigma Chemical Corporation, EUA) e itraconazol – ITC (Janssen Pharmaceutica, Belgium) foram preparados em DMSO 100% enquanto fluconazol – FLC (Merck Sharp & Dohme, Brazil) foi dissolvido em água destilada estéril. Em seguida todas as soluções das drogas utilizadas no estudo foram diluídas em RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e estocadas a -20°C até análise.

A concentração inibitória mínima (CIM) para cada hidrazona sintetizada e droga antituberculose foi determinada como a menor concentração que causa redução de 80% no crescimento fúngico, quando comparado àquele do tubo-controle livre da droga (CORDEIRO et al., 2006). A concentração inibitória mínima da AMB foi tida como a menor concentração capaz de impedir 100% do crescimento fúngico para as espécies estudadas. Para os derivados azólicos, a CIM foi determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir 80% do crescimento de fúngico para as cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum* e 50% para as espécies do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, comparado ao tubo-controle livre da droga (CLSI, 2008).

A concentração fungicida mínima (CFM) das hidrazonas avaliadas isoladamente foi determinada por meio da remoção de 0,1 ml do conteúdo de todos os tubos que não apresentavam crescimento visível, ou seja, os tubos contendo concentrações superiores a CIM. As amostras foram semeadas em ágar batata dextrose e incubadas a 35°C por 15 dias. Os valores da CFM foram definidos como a menor concentração que não permitiu o

crescimento de colônias visíveis, o que representa a morte de > 97% do inóculo inicial (LI et al., 2000).

A interação entre as drogas foi analisada através do cálculo do índice da concentração inibitória fracionária (FICI), segundo Odds (2003). O índice FICI é definido como a soma dos índices de Concentração Inibitória Fracionada (FIC) para cada droga. O índice FIC corresponde a relação entre o CIM de cada droga combinada e o CIM da mesma droga testada isoladamente. Desta forma, sendo considerados os seguintes parâmetros: $FICI \leq 0,5$: Sinergismo; $FICI > 4,0$: Antagonismo; $0,5 < FICI < 4,0$: Sem interação. Todas as leituras foram visualmente feitas em duplicata. A leitura foi realizada após cinco e sete dias de incubação para *H. capsulatum* para as cepas nas formas leveduriforme e filamentosa respectivamente (WHEAT et al., 2001); e dois dias para *Cryptococcus* spp. (COSTA et al., 2010), em temperatura de 35°C.

5.5 DETERMINAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DAS HIDRAZONAS E DAS DROGAS ANTITUBERCULOSE SOBRE O TEOR DE ERGOSTEROL CELULAR NA FASE PLANCTÔNICA DE *H. capsulatum* e *Cryptococcus* spp.

As culturas fúngicas de *H. capsulatum* na forma leveduriforme e *Cryptococcus* spp. foram incubadas em meio RPMI à 35°C, levando em consideração o tempo de incubação de cada espécie para o teste de microdiluição em caldo, em contato com concentrações das drogas-teste que correspondem as doses supra-CIM; CIM e sub-CIM de cada droga. Após esse período, 1 mL de cada suspensão fúngica, ajustada à escala padrão 0,5 McFarland para obter um inóculo de aproximadamente $1,0$ a $5,0 \times 10^6$ células/mL, foi transferido para microtubos, os quais foram centrifugados por três minutos na velocidade de $9,660 \times g$, a fim de se obter a formação de *pelet*. Em seguida o *pelet* foi ressuspenso em 0,5 mL de solução alcoólica de KOH 20%. A suspensão foi incubada a 95°C por 1 hora. Após a incubação, 0,6 mL de hexano foram adicionados aos microtubos e agitados em vórtex por alguns segundos. Em seguida, as soluções foram centrifugadas novamente a velocidade de $13,416 \times g$ por um minuto. Toda a camada superior de hexano, que contém os esteróis, foi removida e transferida para microtubos estéreis. Em seguida, 0,6 mL de hexano foram adicionados e misturados. A quantificação do ergosterol foi feita através da curva de absorção entre 295 nm, utilizando a função *scanning* do espectrofotômetro. Como controle para os testes foram utilizadas cepas de *H. capsulatum* e *Cryptococcus* spp. cultivadas em meio RPMI contendo itraconazol. O controle negativo foi formado pelas cepas crescendo em meio RPMI sem adição de

antifúngicos e/ou inibidores. Como controle para os testes foram ainda utilizado cepas de *Candida albicans* cultivadas em meio RPMI contendo itraconazol e fluconazol, incubadas em um período de 48 horas na temperatura de 35°C (MORAN et al., 2007). A curva de calibração foi construída utilizando uma quantidade conhecida de ergosterol padrão (Sigma, EUA).

5.6 DETERMINAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DAS HIDRAZONAS E DAS DROGAS ANTITUBERCULOSE SOBRE A PERMEABILIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA NA FASE PLANCTÔNICA DE *H. capsulatum* e *Cryptococcus* spp.

A atividade antifúngica *in vitro* para as cepas de *H. capsulatum* na forma leveduriforme e *Cryptococcus* spp. foi determinada previamente pelo ensaio de microdiluição em caldo (CLSI, 2008). Foram incluídos como controle de qualidade do ensaio poços contendo: micro-organismos em contato com anfotericina B para cada cepa e micro-organismos em meio RPMI. A incubação foi realizada conforme teste de sensibilidade como descrito anteriormente.

Após este período os poços que correspondem à concentração inibitória mínima (CIM); concentrações subinibitórias (CIM/2) dos compostos-teste e os controles foram utilizados para os experimentos de análise da permeabilidade da membrana. Cerca de 1,0 mL de cada suspensão fúngica, ajustada à escala padrão 0,5 McFarland para se obter um inóculo de aproximadamente $1,0$ a $5,0 \times 10^6$ células/mL foi transferido para microtubos estéreis, os quais foram centrifugados por 15 minutos em temperatura ambiente na velocidade de 13.400 x g. Em seguida, o sobrenadante obtido de cada suspensão fúngica foi diluído na proporção de 1:10 em água destilada estéril para a realização da leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 e 280 nm para a análise da presença de ácidos nucleicos e proteínas respectivamente (DEVI et al., 2010).

5.7 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DAS HIDRAZONAS SOBRE O BIOFILME MADURO DE *H. capsulatum*

Para a montagem do biofilme maduro de *H. capsulatum* na fase leveduriforme foram preparadas suspensões em solução salina 0,9% a partir de culturas mantidas por sete dias em ágar BHI suplementando com 10% de sangue de carneiro na concentração de $2,4$ a $5,5 \times 10^6$ células/mL. Em seguida, 0,05 mL da suspensão fúngica foram adicionados em cada poço das placas de poliestireno (TPP[®], Trasadingen, Suíça) e incubadas a 35 °C durante sete

horas em agitador rotativo a 80 rpm, para a pré-adesão das células. Após esse período, os sobrenadantes foram removidos e 0,2 mL de BHI caldo foram adicionados a cada poço. As placas foram novamente incubadas durante 72 h, sob agitação de 80 rpm a 35 °C, para adesão e maturação do biofilme. O ensaio foi baseado no protocolo descrito por Pitangui et al. (2012) com modificações.

Subsequentemente após a incubação o sobrenadante foi removido e os poços lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remover as células não-aderentes. Em seguida, alíquotas de 0,2 mL das drogas antimicrobianas isoladas e em combinação foram diluídas em meio BHI caldo e adicionadas em cada poço nas seguintes concentrações: hidrazona, 6,250 µg/mL a 97,6 µg/mL; AMB, 3,12 µg/mL a 0,048 µg/mL; hidrazona, 780 µg/mL a 11,7 µg/mL mais AMB, 1,56 µg/mL a 0,023 µg/mL. As placas foram novamente incubadas durante 72 h, sob agitação de 80 rpm a 35 °C. Após incubação, o sobrenadante foi aspirado e uma alíquota de 0,1 mL de cristal violeta 0,3% foi adicionada em cada poço. Após 20 minutos em temperatura ambiente, a solução do corante foi aspirada e os poços lavados com água destilada estéril. Aos poços foram então adicionados 0,2 mL de ácido acético 33% e imediatamente transferida para uma nova placa, na qual foi realizada leitura em espectrofotômetro a 550 nm. Os testes foram conduzidos em duplicata e em todos os ensaios poços contendo apenas BHI caldo foram incluídos como controles negativos. O efeito da hidrazona foi comparado ao da AMB, a qual é considerada um forte inibidor de biofilmes fúngicos. A viabilidade do biofilme foi monitorizada pela mudança de cor da solução de resazurina (0,1 mg/mL em meio RPMI) após incubação a 37 ° C durante, pelo menos, 6 h.

5.8 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DAS DROGAS ANTITUBERCULOSE ISONIAZIDA E ETIONAMIDA SOBRE O BIOFILME EM FORMAÇÃO E MADURO DE *Cryptococcus* spp.

Para o teste de inibição da formação de biofilme de *Cryptococcus* spp., as cepas foram escolhidas aleatoriamente a partir do conjunto de amostras clínicas e ambientais disponíveis. As culturas de *Cryptococcus* spp. foram cultivadas em Sabouraud dextrose caldo durante 24 horas a 30 °C em agitador rotativo a 150 rpm. Após este período, a suspensão de células fúngicas foram recolhidas por centrifugação, lavadas com PBS, e resuspendidas em meio RPMI 1640 para se obter uma concentração de 10⁷ células/mL. Em seguida, 0,1 mL da suspensão fúngica foram adicionados a cada poço acrescido de 0,1 mL de cada antimicrobiano em duas concentrações diferentes (10xCIM e 50xCIM). Após a incubação a

37 °C durante 48 h sem agitação, os poços contendo biofilme de *Cryptococcus* spp. foram lavados com PBS acrescido de Tween 20 0,05% (TBS) para remover as células não aderentes. O sobrenadante foi aspirado e 0,1 mL de solução cristal violeta 0,3% foram adicionados a cada poço. Após 20 minutos em temperatura ambiente, a solução corante foi aspirada e os poços lavados com água destilada estéril. Em seguida, foram adicionados 0,2 mL de ácido acético 33% em cada poço e imediatamente a mistura foi aspirada e transferida para uma nova placa e então lida em espectrofotômetro a 550 nm. Os testes foram conduzidos em duplicata e em todos os ensaios, poços contendo apenas meio de cultura foram incluídos como controles negativos. O efeito das drogas foi comparado ao da AMB, a qual é considerada um forte inibidor de biofilmes fúngicos. A viabilidade do biofilme foi monitorizada pela mudança de cor da solução de resazurina (0,1 mg/mL em meio RPMI) após incubação a 37 °C durante, pelo menos, 6 horas (MARTINEZ et al., 2010; CORDEIRO et al., 2012).

Ademais, foi avaliada a capacidade de INH e ETH em inibir o crescimento do biofilme maduro de *Cryptococcus* formado por 48 h, como descrito acima. Após este período de maturação, a camada de células fúngicas que permaneceu aderida à superfície de plástico foram considerados biofilme maduro. Em seguida, ao biofilme viável foram adicionados 0,2 mL de solução contendo meio de cultura e as drogas antimicrobianas-teste nas seguintes concentrações: 10xCIM e 50xCIM. As placas foram novamente incubadas a 37 °C durante 48 h, e após esse período tratadas como mencionadas anteriormente. Os controles de crescimento fúngico foram cultivados em meio RPMI 1640 sem antibióticos. A viabilidade do biofilme foi monitorizada pela mudança de cor da solução de resazurina (0,1 mg / mL em meio RPMI 1640), após incubação a 37 °C durante no mínimo 6 horas. Todos os testes foram realizados em duplicata (MARTINEZ et al., 2010; CORDEIRO et al., 2012).

5.9 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DAS HIDRAZONAS ASSOCIADAS COM AMB SOBRE A TAXA DE MORTE INTRACELULAR MEDIADA POR MACRÓFAGOS

Os macrófagos peritoneais (PM ϕ) foram obtidos a partir de camundongos fêmeas BALB/c, nas quais foram injetados intraperitonealmente 1,0 mL de tioglicolato 3% estéril. Após 72 horas, os animais foram sacrificados. PM ϕ foram adquiridos por lavagem da cavidade peritoneal com 10 mL de RPMI 1640 (gelado) contendo heparina (10 U/mL). PM ϕ foram centrifugados a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C, e o sedimento foi suspenso em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino,

2-mercaptoetanol, 2 mM de glutamina e 0,2 mL de penicilina (100 U/mL)/estreptomicina. Todos os PM ϕ foram plaqueadas a 1×10^6 células/poço em placa de 96 poços e incubados durante 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Após incubação, as células não aderentes foram removidas por lavagem com meio RPMI 1640, e as placas foram mantidas durante 24 horas a 37 °C numa incubadora de CO₂ a 5%. Após a remoção do meio sobrejacente por aspiração, 0,2 mL da suspensão de células de *H. capsulatum* na fase leveduriforme em meio RPMI 1640 ($0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^4$ UFC/mL) foi adicionada à superfície de cada monocamada. As monocamadas de células foram então incubadas durante 2 horas a 37 °C numa atmosfera contendo 5% de CO₂, a fim de permitir a fagocitose das leveduras. Em seguida, o meio foi removido por aspiração e as monocamadas celulares foram lavadas com RPMI. Após a lavagem, as drogas foram adicionadas aos poços nas seguintes concentrações: hidrazona, 62,5 µg/mL; AMB, 0,5 µg/mL; hidrazona + AMB, 3,9 µg/mL + 0,0078 µg/mL. Após incubação a 37 °C em atmosfera contendo CO₂ a 5% durante 24 e 48 h, o meio foi removido de cada poço por aspiração e as células infectadas foram lisadas com água destilada estéril, as células de *H. capsulatum* livres foram plaqueadas em ágar BHI (BD Diagnostic, USA) suplementado com 10% de sangue de carneiro. As placas foram incubadas a 35 °C durante duas semanas. O número de células de levedura viáveis em cada amostra foi determinado usando o método padrão de contagem em placa, para a obtenção de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Todos os procedimentos foram realizados em duplicata (BALTCH et al., 2008).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos neste trabalho para os testes de sensibilidade antimicrobiana foram avaliados estatisticamente pela Análise de Variância simples (One-way ANOVA) e pós-teste de comparação múltipla de Tukey. As diferenças entre os tratamentos foram avaliados por meio do teste de significância T de Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas com o *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 SÍNTESE DOS ANÁLOGOS DA DROGA ANTITUBERCULOSE ISONIAZIDA

Foram sintetizados nove derivados da droga isoniazida com rendimentos que variaram entre 11,2 a 82,1%. Todas as hidrazonas obtidas encontram-se registradas na literatura e tiveram suas identidades estruturais elucidadas através da aplicação de métodos espectroscópicos, tais como espectrometria de massa de alta resolução (EMAR) e ressonância magnética nuclear (RMN) de H^1 e C^{13} . A confirmação das estruturas foi realizada com base na análise dos gráficos dos espectros e a comparação com dados descritos na literatura. Os espectros de EMAR e RMN de hidrogênio e carbono-13 foram consistentes com as estruturas propostas. As bases de Schiff, $R_2C = NR$ são produtos da condensação de substâncias carbonílicas (cetonas) reagindo com uma amina primária, como a isoniazida.

6.2 EFEITO CITOTÓXICO DAS HIDRAZONAS SOBRE CÉLULAS HUMANAS

A atividade citotóxica das amostras está apresentada na tabela 1, com seus respectivos valores de Concentração Inibitória Média - CI_{50} . Nenhuma das amostras testadas apresentou potencial citotóxico.

Tabela 1: Valores de Concentração Inibitória Média (CI_{50}) com um intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não-linear a partir de dois experimentos independentes, feitos em duplicata em três linhagens tumorais humanas testadas na dose máxima de 250 $\mu\text{g/mL}$.

Hidrazonas	MTT CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	NCIH358M	PC-3M	OVCAR-8
N'-(1-feniletilideno)isonicotinohidrazide	> 250	> 250	> 250
N'-(1-(2-metoxifenil)etilideno)isonicotinohidrazide	> 250	> 250	> 250
N'-(1-(3-metoxifenil)etilideno)isonicotinohidrazide	> 250	> 250	> 250
N'-(1-(4-clorofenil)etilideno)isonicotinohidrazide	> 250	> 250	> 250
N'-(1-(2-nitrofenil)-etilideno)isonicotinohidrazide	> 250	> 250	> 250
N'-(1-m-tolileilidene)isonicotinohidrazide	> 250	> 250	> 250
N'-(1-(4-nitrofenil)-etilideno)isonicotinohidrazide	> 250	> 250	> 250
N'-(1-(4-bromofenil)-etilideno)isonicotinohidrazide	> 250	> 250	> 250
N'-(1,2-dipheniletilidene)-2-isonicotinohidrazide	> 250	> 250	> 250

NCIH358M: pulmão; PC-3M: próstata; OVACAR-8: ovário.

6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

Todas as hidrazonas sintetizadas tiveram suas atividades biológicas testadas contra cinco cepas de *H. capsulatum* na fase leveduriforme e filamentosa. Os resultados foram expressos em termos de concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$. Na Tabela 2 encontram-se as fórmulas e massas moleculares dos compostos sintetizados com suas nomenclaturas, as respectivas cetonas utilizadas para a síntese e os intervalos de CIM obtidos para cada hidrazona. Os resultados obtidos frente às cepas de *H. capsulatum* demonstraram que todos os compostos foram capazes de inibir o crescimento fúngico *in vitro*, podendo ser considerados substâncias promissoras na descoberta de novos fármacos. As hidrazonas apresentaram valores de CIM que variaram entre 7,8 a 2.000 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, alguns compostos apresentaram ação eficaz apenas em concentrações elevadas. Os menores valores de CIM foram encontrados para o derivado da acetofenona: N'-(1-feniletilideno) isonicotinohidrazide – [N'-(1-fenil)] para ambas as formas de *H. capsulatum*, por esta razão, esta droga foi escolhida para as posteriores experimentações.

Os intervalos de CIM para N'-(1-fenil) variaram entre 31,2 a 250 $\mu\text{g/mL}$ e 7,8 a 250 $\mu\text{g/mL}$ para as formas leveduriforme e filamentosa, respectivamente. Os valores de CFM variaram entre 62,5 a 500 $\mu\text{g/mL}$ para a forma leveduriforme e 15,6 a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ para a forma filamentosa (Tabela 3). Não foram detectadas diferenças significativas entre os valores de CIM ($p=0,1808$) e CFM ($p=0,558$) para ambas as fases. O composto N'-(1-fenil) também apresentou interação sinérgica relevante com a droga antifúngica AMB contra *H. capsulatum* em ambas as fases. A hidrazona N'-(1-fenil) em combinação com AMB mostrou sinergismo contra 14 das 18 cepas de *H. capsulatum* na forma filamentosa, com valores de FICI que variaram entre 0,009-0,78. Para a fase leveduriforme, a combinação de drogas mostrou valores de FICI que variaram entre 0,04-0,56. Apenas uma cepa (05-04-015) mostrou FICI maior do que 0,5 (Tabela 4).

Os valores de CIM das drogas antituberculose e antifúngicas para as cepas de *Cryptococcus* na forma planctônica, de origem ambiental e clínica e as cepas de referência (utilizadas como controle nesta experiência) estão representados na Tabela 5. As drogas antituberculose apresentaram em efeito inibitório *in vitro* contra todas as cepas testadas. Quanto aos antifúngicos, os valores de CIM para *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram: 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para a AMB e 2 $\mu\text{g/ml}$ para o FLC.

Em seguida, 14 cepas de *C. neoformans* ($n = 7$) e *C gattii* ($n = 7$) foram avaliadas quanto às interações sinérgicas entre as drogas antituberculose (INH e ETH) e os derivados

azólicos (FLC e ITC). Sinergismo foi observado em todas as condições testadas. Antagonismo não foi verificado em qualquer um dos casos. A Tabela 6 apresenta os intervalos de CIM obtidos e os valores FICI para ambas as espécies.

Tabela 2 - Identificação das hidrazonas sintetizadas de acordo com as cetonas utilizadas nas reações de síntese; valores de CIM para cada composto frente a cinco cepas de *H. capsulatum* na fase leveduriforme e filamentosa.

Cetona Utilizada	Composto Hidrazona	Fórmula Molecular	Intervalo CIM (µg/mL)	
			Levedura	Filamentoso
Acetofenona	N'-(1-feniletilideno)isonicotinohidrazide	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O	7,8 - 250	15,6 - 250
2' - Metoxiacetofenona	N'-(1-(2-metoxifenil)etilideno)isonicotinohidrazide	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₂	62,5 - 125	1000 - 2000
3' - Metoxiacetofenona	N'-(1-(3-metoxifenil)etilideno)isonicotinohidrazide	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₂	31,25 - 125	2000
4' - cloroacetofenona	N'-(1-(4-clorofenil)etilideno)isonicotinohidrazide	C ₁₄ H ₁₂ ClN ₃ O	125	125 - 500
2' - Nitroacetofenona	N'-(1-(2-nitrofenil)-etilideno)isonicotinohidrazide	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₃	31,25 - 125	250 - 500
3' - Metilacetofenona	N'-(1-m-tolileilidene)isonicotinohidrazide	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O	62,5 - 250	250 - 500
4' - Nitroacetofenona	N'-(1-(4-nitrofenil)-etilideno)isonicotinohidrazide	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₃	62,5 - 250	250 - 500
4' - bromoacetofenona	N'-(1-(4-bromofenil)-etilideno)isonicotinohidrazide	C ₁₄ H ₁₂ BrN ₃ O	62,5 - 125	125 - 500
2' - fenilcetofenona	N'-(1,2-dipheniletilidene)-2-isonicotinohidrazide	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O	62,5 - 250	1000 - 2000
Isoniazida	-		120 - 240	150 - 370
Amphotericin B	-		0,0156 - 0,25	0,0625 - 0,25

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) dos análogos químicos da isoniazida ($\mu\text{g/mL}$) frente acinco cepas de *H. capsulatum* na fase leveduriforme e filamentosa.

Cepas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		CFM ($\mu\text{g/mL}$)	
	Levedura	Filamentoso	Levedura	Filamentoso
03-02-090	125	125	500	250
03-03-035	15,6	31,2	31,2	62,5
03-06-059	31,2	250	62,5	500
05-01-097	125	62,5	250	250
05-02-021	62,5	62,5	500	62,5
05-02-034	62,5	125	500	500
05-02-035	7,8	31,2	15,6	62,5
05-02-037	31,2	62,5	62,5	125
05-02-042	31,2	31,2	62,5	250
05-02-053	62,5	125	500	500
05-02-074	62,5	62,5	500	250
05-02-087	62,5	62,5	250	250
05-02-088	250	125	1000	500
05-04-015	62,5	31,2	250	62,5
05-04-028	31,2	62,5	62,5	125
05-05-011	31,2	125	62,5	500

Tabela 4 - Atividade sinérgica *in vitro* de N'-(1-feniletilideno)isonicotinohidrazide [N'-(1-fenil)], combinada com anfotericina B (AMB) contra *Histoplasma capsulatum* na formas leveduriforme (L) e filamentosa (F) (n = 24).

Cepas	CIM µg/mL (droga isolada)				CIM µg/mL (droga combinada)				FICI	
	N'-(1-fenil)		AMB		N'-(1-fenil)		AMB		L	F
	L	F	L	F	L	F	L	F	L	F
03-02-090	125	125	0,5	0,5	3,9	3,9	0,0078	0,0019	0,046	0,035
03-03-035	15,6	31,2	0,5	0,5	3,9	1,0	0,0078	0,0009	0,265	0,034
03-03-054	-	125	-	0,5	-	3,9	-	0,0019	-	0,035
03-03-055	62,5	-	0,125	-	7,8	-	0,0156	-	0,2496	-
03-06-059	31,2	-	0,125	-	7,8	-	0,0156	-	0,3744	-
05-01-096	-	62,5	-	0,5	-	46,8	-	0,0019	-	0,753
05-01-097	-	62,5	-	0,25	-	46,8	-	0,0019	-	0,752
05-02-018	-	31,2	-	0,0312	-	1,0	-	0,0009	-	0,063
05-02-021	62,5	-	1,0	-	3,9	-	0,0078	-	0,0702	-
05-02-034	62,5	31,2	0,5	0,5	3,9	1,0	0,0078	0,0009	0,078	0,034
05-02-035	-	31,2	-	0,125	-	1,0	-	0,0009	-	0,039
05-02-042	-	31,2	-	0,0312	-	23,4	-	0,0009	-	0,782
05-02-053	62,5	-	0,5	-	7,8	-	0,0156	-	0,156	-
05-02-074	62,5	-	0,5	--	7,8	-	0,0156	-	0,156	-
05-02-084	15,6	62,5	0,5	0,0312	1,95	23,4	0,0039	0,0009	0,132	0,406
05-02-085	-	62,5	-	0,5	-	46,8	-	0,0019	-	0,753
05-02-086	-	62,5	-	0,5	-	23,4	-	0,0009	-	0,376
05-02-087	62,5	62,5	1,0	1,0	3,9	3,9	0,00781	0,0019	0,070	0,064
05-02-088	250	125	0,5	0,5	7,8	23,4	0,0156	0,0009	0,062	0,189
05-02-091	-	125	-	1,0	-	23,4	-	0,0009	-	0,188
05-03-040	-	125	-	0,5	-	1,0	-	0,0009	-	0,009
05-04-015	62,5	31,2	0,0156	1,0	3,9	3,9	0,78	0,0019	0,563	0,126
05-04-028	-	62,5	-	0,5	-	1,0	-	0,0009	-	0,017
05-05-011	31,2	-	0,5	-	7,8	-	0,0156	-	0,2808	-

Tabela 5 - Concentração inibitória mínima (CIM) de *in vitro* de cepas de *Cryptococcus* spp. na forma planctônica, de origem ambiental e clínica e cepas de referência para as drogas antituberculosas e antifúngicas.

Cepas	Espécies	Sorotipo	Fonte de isolamento	CIM µg/mL				
				INH	ETH	ITC	FLC	AMB
03-02-062	<i>C. gattii</i>	B	Humana	1,500	390	0.5	128	0.5
03-02-069	<i>C. gattii</i>	B	Humana	750	780	0.25	8.0	1.0
03-02-070	<i>C. gattii</i>	B	Humana	375	97	0.125	32	0.5
03-02-071	<i>C. gattii</i>	B	Humana	750	195	0.5	64	1.0
03-02-073	<i>C. gattii</i>	B	Humana	1,500	390	0.5	128	2.0
03-02-074	<i>C. gattii</i>	B	Ambiental	750	390	1.0	64	1.0
03-02-079	<i>C. gattii</i>	B	Ambiental	750	390	1.0	64	0.5
05-03-029	<i>C. gattii</i>	B	Humana	750	390	0.25	64	0.5
05-03-031	<i>C. gattii</i>	B	Humana	750	780	0.5	64	0.5
05-03-032	<i>C. gattii</i>	B	Humana	750	780	0.5	64	0.5
05-03-033	<i>C. gattii</i>	B	Humana	750	390	0.5	32	0.5
05-03-037	<i>C. gattii</i>	B	Humana	1,500	390	0.5	64	0.25
05-02-023	<i>C. neo var. neo</i>	A	Humana	93.7	97.6	0.125	4.0	0.125
03-02-057	<i>C. neoformans</i>	A	Humana	750	390	0.5	64	1.0
03-02-060	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	750	390	1.0	16	0.25
03-02-063	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	1,500	390	0.5	32	0.125
03-02-064	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	750	195	0.5	2.0	0.25
03-02-066	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	1,500	780	0.25	8.0	0.25
03-02-067	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	1,500	390	0.5	32	1.0
03-02-068	<i>C. neoformans</i>	A	Humana	1,500	390	0.5	64	1.0
03-02-072	<i>C. neoformans</i>	A	Humana	1,500	390	0.25	64	0.5
03-02-078	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	1,500	390	0.5	8.0	0.125
03-02-080	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	1,500	390	0.5	8.0	0.25
03-06-021	<i>C. neoformans</i>	A	Humana	1,500	780	0.5	2.0	NT
05-01-044	<i>C. neoformans</i>	A	Humana	750	780	0.125	2.0	NT
05-01-050	<i>C. neoformans</i>	A	Humana	750	390	1.0	128	NT
05-01-080	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	375	195	1.0	8.0	0.25
05-01-084	<i>C. neoformans</i>	A	Humana	375	390	1.0	128	1.0
05-01-088	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	187	780	1.0	8.0	1.0
Cepas de referencia	Espécies	Sorotipo		INH	ETH	ITC	FLC	AMB
WM 148	<i>C. neoformans</i>	A		750	390	0.25	8.0	0.25
WM 626	<i>C. neoformans</i>	A		375	390	0.5	8.0	0.5
WM 628	<i>C. neoformans</i>	AD		750	780	0.5	8.0	0.125
WM 629	<i>C. neoformans</i>	D		187	390	0.25	8.0	0.25
WM 179	<i>C. gatti</i>	B		750	780	0.25	32	1.0
WM 178	<i>C. gatti</i>	B		750	780	1.0	64	0.5
WM 175	<i>C. gatti</i>	B		750	780	0.5	32	0.5
WM 779	<i>C. gatti</i>	C		750	390	1.0	64	1.0

INH: isoniazida; ETH: etionamida; ITC: itraconazol; FLC: fluconazol; AMB: anfotericina B.

Tabela 6 - Interações sinérgicas *in vitro* entre as drogas antituberculosas isoniazida (INH) e etionamida (ETH) combinada com os derivados azólicos itraconazol (ITC) e fluconazol (FLC) contra *C. neoformans* e *C. gattii* na forma planctônica.

Espécies (n)	Intervalo CIM (µg/mL)		FICI	Resultado (n)	Intervalo CIM (µg/mL)		FICI	Resultado (n)
	INH	ITC			INH	FLC		
<i>C. neoformans</i> (7)	23 - 375	0,0078 - 0,125	0,07 - 0,5	Sinergismo (6)	375 - 750	2,0 - 16	0,5	Sinergismo (6)
			0,75	Indiferente (1)			2,0	Indiferente (1)
<i>C. gattii</i> (7)	46 - 375	0,03 - 0,125	0,09 - 0,5	Sinergismo (6)	46 - 375	4,0 - 32	0,06 - 0,5	Sinergismo (5)
			2,0	Indiferente (1)			0,56 - 2,0	Indiferente (2)
Espécies (n)	ETH	ITC	FICI	Resultado (n)	ETH	FLC	FICI	Resultado (n)
<i>C. neoformans</i> (7)	3,0 - 195	0,0078 - 0,125	0,03 - 0,5	Sinergismo (6)	48,7 - 97,5	2,0 - 16	0,5	Sinergismo (6)
			1,0	Indiferente (1)			1,0	Indiferente (1)
<i>C. gattii</i> (7)	24 - 195	0,03 - 0,25	0,08 - 0,5	Sinergismo (6)	12 - 48,7	2,0 - 16	0,04 - 0,5	Sinergismo (7)
			1,0	Indiferente (1)			-	Indiferente (0)

6.4 DETERMINAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DAS HIDRAZONAS E DAS DROGAS ANTITUBERCULOSE SOBRE O TEOR DE ERGOSTEROL CELULAR NA FASE PLANCTÔNICA DE *H. capsulatum* e *Cryptococcus* spp.

O teor de ergosterol total foi determinado para cada cepa cultivada em diferentes concentrações das drogas em estudo (2xCIM), (CIM) e (CIM/2). Foi observada uma redução significativa no teor de ergosterol, após determinado tempo de incubação de acordo com a espécie fúngica, à medida que se aumentava a concentração de cada droga. Todavia, quando *H. capsulatum* na forma planctônica foram expostos a concentrações inibitórias (CIM) e subinibitórias (CIM/2) de N'-(1-fenil), não se observou uma redução significativa do teor de ergosterol em comparação com o controle positivo - crescimento fúngico livre de droga. ITC foi utilizado como controle de qualidade para as todas as cepas testadas, observando-se uma diminuição significativa na produção de ergosterol nas concentrações (2xCIM), (CIM) e (CIM/2). Os dados para as cepas de *H. capsulatum* podem ser visualizados na figura 12 e para *Cryptococcus* spp. na figura 13.

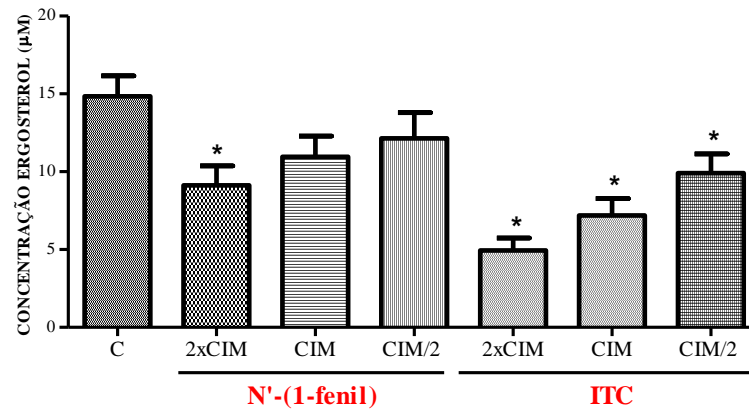


Figura 12 - Conteúdo total de ergosterol em cepas de *H. capsulatum* na fase leveduriforme cultivadas em meio RPMI sem antimicrobianos como controle (C) ou suplementado com N'-(1-fenil) ou itraconazol (ITC) em concentrações equivalentes a 2xCIM , CIM e CIM/2. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm SEM (n = 8) . Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles ($p < 0,05$).

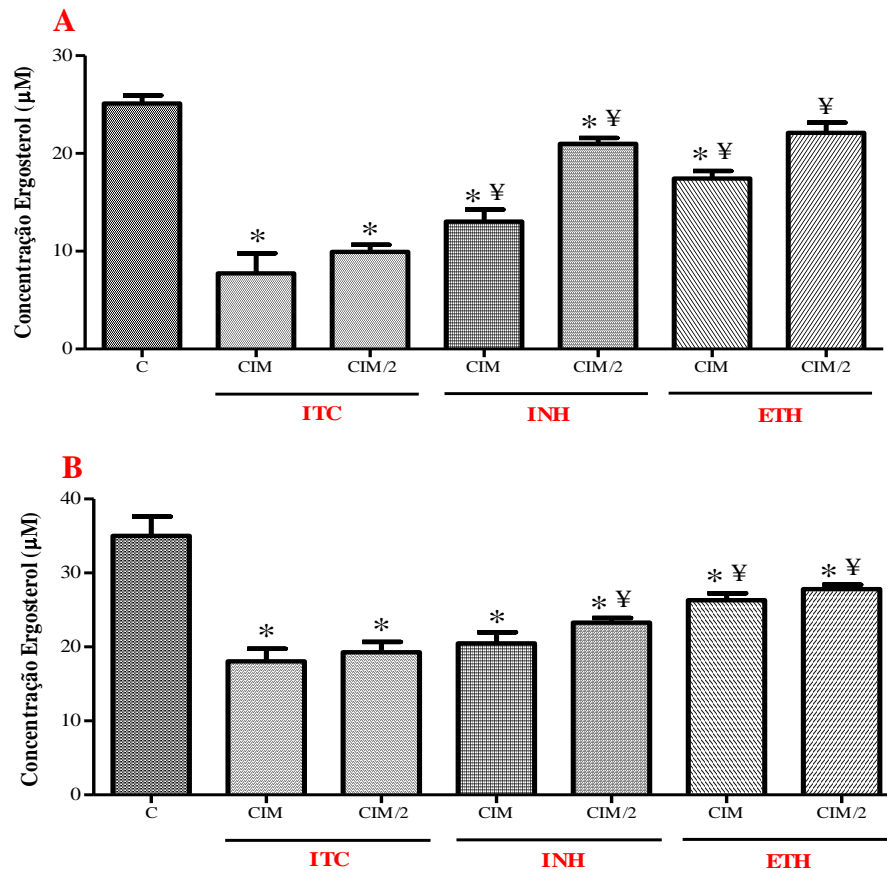


Figura 13 - Conteúdo total de ergosterol em cepas de *Cryptococcus* spp. cultivadas em meio RPMI sem antimicrobianos como controle (C) ou suplementado com isoniazida (INH), etionamida (ETH) e itraconazol (ITC) em concentrações equivalentes a CIM e CIM/2. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm SEM. Os (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p < 0,05$) e (¥) indica diferenças estatisticamente significativas em relação ao ITC ($p < 0,05$). A) conteúdo de ergosterol nas células de *C. neoformans* (n=7) e B) conteúdo de ergosterol nas células de *C. gattii* (n=7) .

6.5 DETERMINAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DAS HIDRAZONAS E DAS DROGAS ANTITUBERCULOSE SOBRE A PERMEABILIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA NA FASE PLANCTÔNICA DE *H. capsulatum* e *Cryptococcus* spp.

Perda significativa de material intracelular foi observada após tratamento de células de *H. capsulatum* em contato com N'-(1-fenil) (Figura 14) e *Cryptococcus* spp. em exposição às drogas antituberculose (Figura 15) em concentrações inibitórias (CIM) e subinibitórias (CIM/2). A leitura do teor do sobrenadante das culturas em comprimentos de onda de 260 e 280 nm apresentou valores de absorvâncias sugerindo vazamento de ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente, a partir da célula. A droga anfotericina B nas concentrações CIM e CIM/2 não foram capazes de induzir o escoamento de material a partir das células fúngicas.

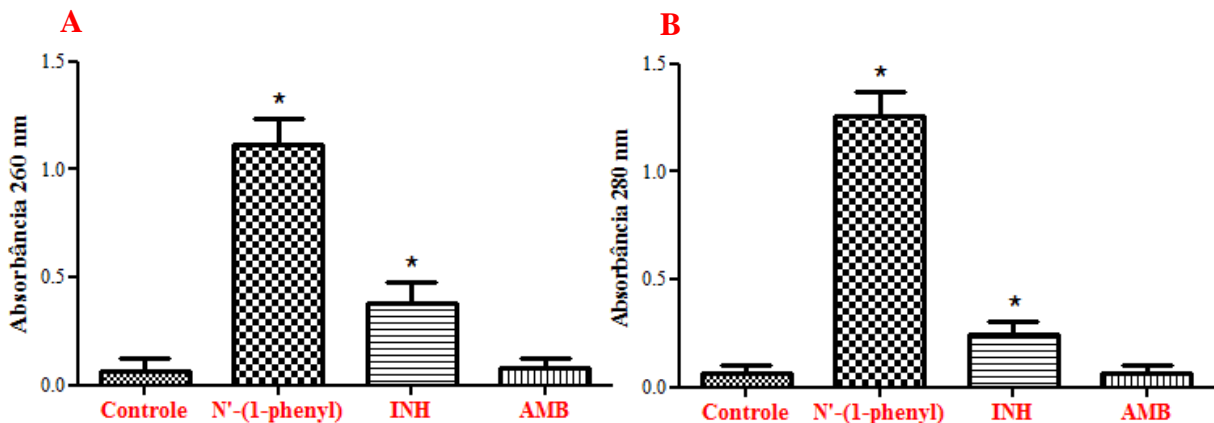


Figura 14 - Absorbâncias do conteúdo extracelular de *H. capsulatum* após contato com N'-(1-fenil), isoniazida (INH) e anfotericina B (AMB), testadas isoladamente. As cepas foram incubadas em meio RPMI 1640 sem antimicrobianos como controle e em concentrações equivalentes a CIM/2. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm SEM (n=6). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles ($p < 0,05$). Absorvância do conteúdo extracelular de *H. capsulatum* a A) 260 nm e B) 280 nm.

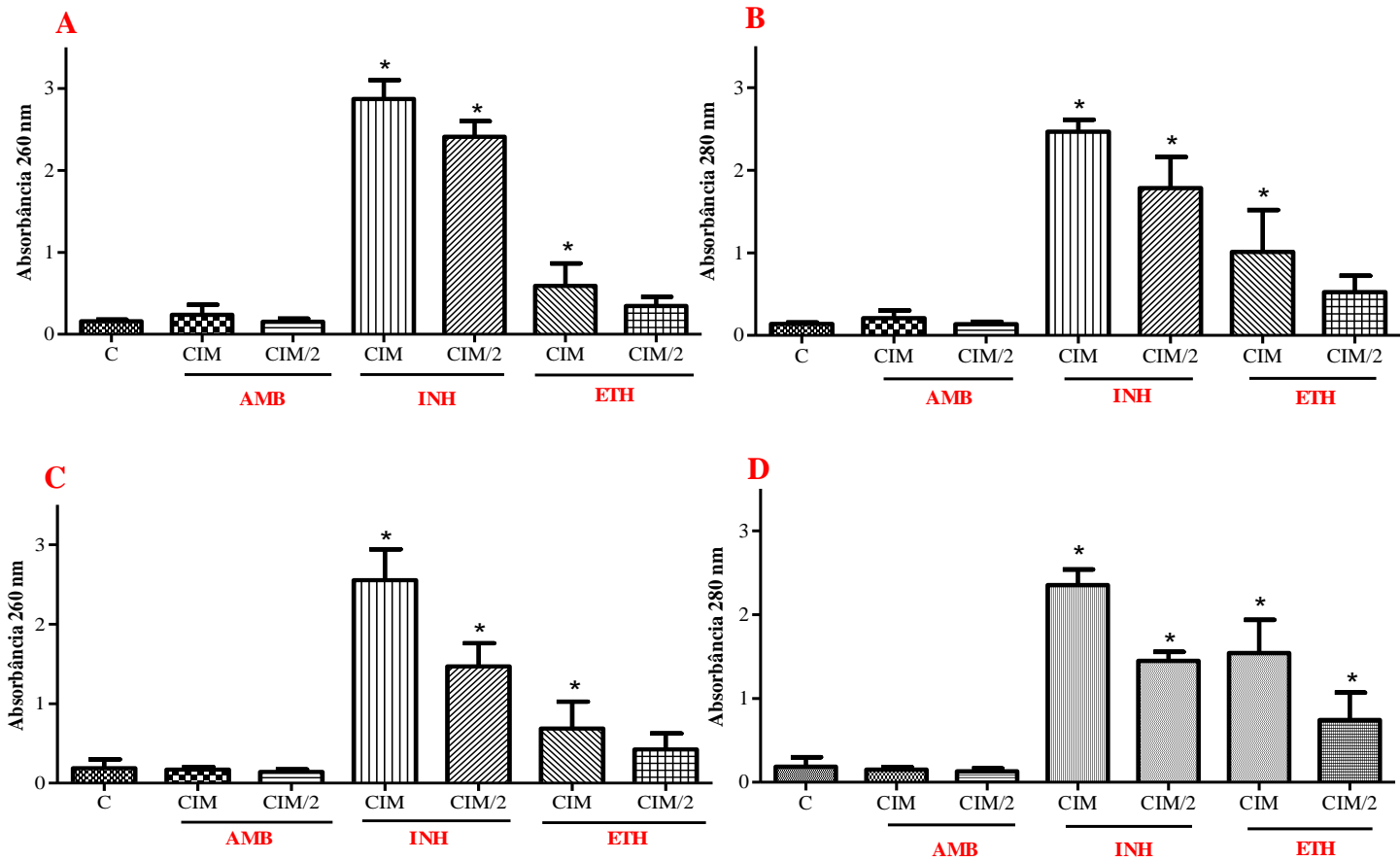


Figura 15 – As cepas de *Cryptococcus* spp. foram incubadas em meio RPMI 1640, sem antimicrobianos como controle (C), anfotericina B (AMB), isoniazida (INH) e etionamida (ETH) em concentrações equivalentes ao CIM e CIM/2. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm SEM (n=7). Os (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles ($p < 0,05$) Absorbância de conteúdo extracelular de *C. neoformans* A) a 260 nm, B) a 280 nm; Absorbância de conteúdo extracelular de células *C. gattii* C) a 260 nm e D) a 280 nm.

6.6 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DAS HIDRAZONAS SOBRE O BIOFILME MADURO DE *H. capsulatum*

A estrutura do biofilme maduro de *H. capsulatum* foi inibida indistintamente cerca de 50% após tratamento com N¹-(1-fenil) em diferentes concentrações ($p < 0,05$): 100xCIM, 50xCIM e 25xCIM. Em concentrações menores (1,5xCIM), a inibição foi de aproximadamente 30%. Resultados semelhantes foram observados com AMB nas mesmas concentrações. Melhores resultados foram obtidos com as combinações formadas por N¹-(1-fenil) mais AMB, que foram capazes de reduzir os biofilmes maduros em aproximadamente 80 % (Figura 16).

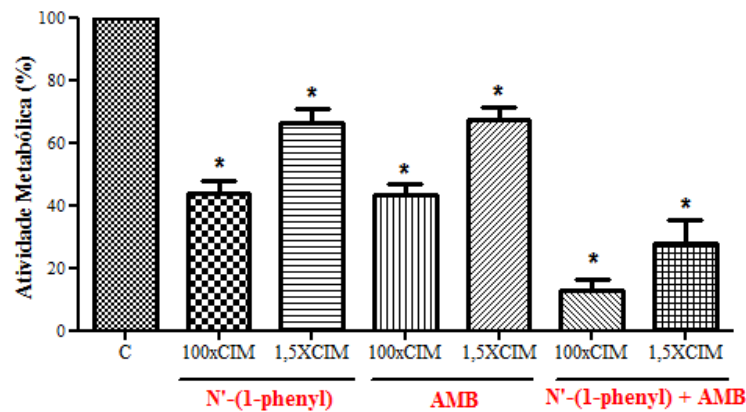


Figura 16 – Atividade metabólica de *H. capsulatum* na forma de biofilme maduro. As cepas foram cultivadas em meio BHI caldo durante 72 horas para a formação de biofilme e tratado com diferentes concentrações de N'-(1-fenil) e anfotericina B (AMB), isoladamente ou em combinação. Os poços de controles (C) foram incubados em meio RPMI sem antimicrobianos. Os resultados estão representados como percentagem de redução em comparação com os controles. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm SEM (n=6). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles ($p < 0,05$).

6.7 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO *IN VITRO* DAS DROGAS ANTITUBERCULOSE ISONIAZIDA E ETIONAMIDA SOBRE O BIOFILME EM FORMAÇÃO E MADURO DE *Cryptococcus* spp.

O efeito das drogas antituberculose INH e ETH sobre a cinética da formação de biofilme de *C. neoformans* e *C. gattii* está representada na figura 17. Foi possível observar uma redução da atividade metabólica de *C. neoformans* na formação de biofilme de aproximadamente 75%, quando exposto à INH e 70% para a concentração 50xCIM de ETH. Para *C. gattii*, a redução da atividade metabólica foi de 62% e 57%, quando em contato com a droga INH e ETH, respectivamente, em concentrações 50 vezes mais elevadas que a CIM.

O biofilme maduro de *Cryptococcus* spp. foi avaliado em duas concentrações diferentes de INH e ETH. Após 48 h de incubação, as drogas antituberculosas foram capazes de inibir a massa fúngica do biofilme maduro de *C. neoformans* em média 81% para INH e 71% para ETH em concentrações 50 vezes acima da CIM. Enquanto para *C. gattii* pode-se observar uma diminuição da atividade metabólica quando expostas em concentrações 50XCIM em até 65% para INH e 53% para ETH. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as drogas antituberculose e AMB em pelo menos uma concentração em todos os experimentos.

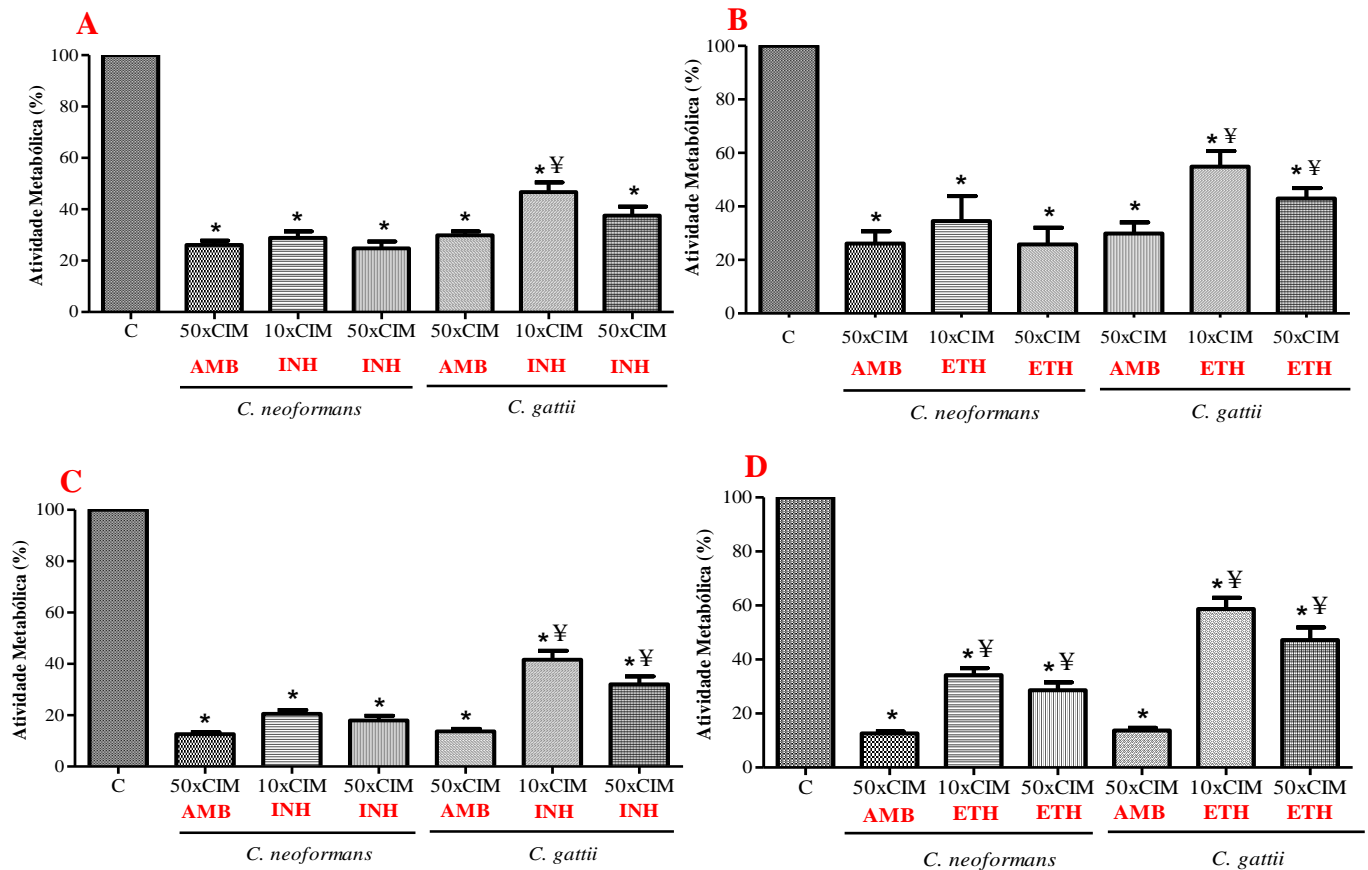


Figura 17 – Cepas de *Cryptococcus* spp. foram cultivadas em meio RPMI durante 48 horas para permitir a formação de biofilme sem adição de antimicrobianos (C) e tratados com diferentes concentrações de INH e ETH. Os resultados estão representados em percentagem de redução em comparação aos controles livres de droga. Os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são expressos como média \pm SEM (n = 8). Os (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles ($p < 0,05$) e (¥) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação a AMB ($p < 0,05$). Atividade metabólica de *Cryptococcus* spp. na formação de biofilmes tratados A) com INH; B) com ETH; Atividade metabólica de *Cryptococcus* spp. em biofilmes maduros tratados C)

6.8 EFEITO DE N¹-(1-FENIL) ASSOCIADO COM A AMB SOBRE A TAXA DE MORTE INTRACELULAR MEDIADA POR MACRÓFAGOS

O composto N¹-(1-fenil) isolado na concentração que corresponde a CIM da droga em células planctônicas não foi capaz de aumentar a morte de células leveduriformes de *H. capsulatum* depois da fagocitose, quando comparada ao controle livre de droga. No entanto, em combinação com AMB, na concentração de CIMsin obtida em sinergismo, 100% e 98% de mortalidade dos fungos foram observados após 24 e 48 horas, respectivamente (tabela 7). Para AMB sozinha na concentração CIM, quase 100% de mortalidade ocorreu em 24 e 48 h.

Tabela 7: Número de células viáveis em cada amostra submetida ao tratamento com N'-(1-fenil), AMB, e N'-(1-fenil) mais AMB frente à PM ϕ contendo células leveduriformes de *H. capsulatum*.

Incubação	UFC/mL			
	Controle	N'-(1-phenyl)*	AMB*	N'-(1-phenyl) + AMB [‡]
24 h	3.000	3.000	20	0
48 h	3.000	3.000	0	60

UFC/mL: unidade formadora de colônia por mililitro; N'-(1-fenil): N'-(1-feniletilden)isonicotinahidrazida; AMB: Anfotericina B; PM ϕ : macrófagos peritoneais; *CIM: CIM drogas isoladas; [‡]CIMsin: CIM drogas em sinergismo

7 DISCUSSÃO

As hidrazonas são uma classe de compostos orgânicos que possuem estrutura química geral $R_1R_2C=N-NR_3R_4$, formada pela substituição do oxigênio do grupo carbonila, pelo grupo funcional $-NNH_2$ (UPPAL et al., 2011). O próton azometino ($-NHN=CH-$) formado é uma importante fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos (ALI et al., 2012). Nos últimos anos, as hidrazonas despertaram grande interesse devido à variedade de atividades biológicas que apresentam, tais como ação antituberculose, antimicrobiana (JUDGE et al., 2012), antitumoral (TERZIOGLU; GÜRSOY, 2003), analgésica (REIS et al., 2008) e anti-inflamatória (SALGIN-GÖKŞEN et al., 2007). Alguns destes compostos têm sido descritos como compostos mais eficientes que os antibióticos de uso clínico (JUDGE et al., 2012).

Considerando o potencial antifúngico da droga INH descrito anteriormente contra patógenos dimórficos como *C. posadasii* (CORDEIRO et al., 2006) e *H. capsulatum* (MARQUES, 2009; CORDEIRO et al., 2011a), o presente estudo, avaliou o efeito *in vitro* de hidrazonas derivadas da INH contra *H. capsulatum* nas fases leveduriforme e filamentosa. Todas as hidrazonas sintetizadas demonstraram atividade antifúngica promissora, mas o composto N'-(1-fenil) foi o mais ativo dentre todos os derivados sintetizados, apresentando os menores valores de CIM para ambas as fases de *H. capsulatum*, por esta razão foi escolhido para os demais experimentos do estudo. Diante dos resultados, investigou-se também a atividade antifúngica de N'-(1-fenil) em combinação com a droga de escolha para o tratamento da histoplasmose - AMB. Os dados mostraram relevante efeito antifúngico contra células planctônicas de *H. capsulatum*, capazes de reduzir significativamente os valores da CIM de AMB *in vitro*.

O presente estudo, também investigou a atividade antifúngica das drogas antituberculosas INH e ETH contra cepas *C. neoformans* e *C. gattii* na forma planctônica. Os dados mostraram que as drogas isoladas foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* dos micro-organismos. ETH apresentou menores valores de CIM que INH para ambas as espécies, com atividade antifúngica relevante. Nossos resultados corroboram com dados descritos anteriormente para as drogas antituberculose INH e pirazinamida testadas frente à *Histoplasma capsulatum* (MARQUES, 2009; CORDEIRO et al. 2011a). Potencial efeito sinérgico também foi observado nas combinações entre INH e ETH mais os triazóis ITC e FLC contra *Cryptococcus* spp. Em geral, os valores de CIM para FLC em combinação com INH diminuiram 32 vezes quando comparado com o FLC sozinho, enquanto que os valores

de CIM para itraconazol diminuíram quatro vezes para a maioria das cepas. Para ETH, os resultados mostraram uma redução de até 32 vezes nos valores de CIM da droga testada isoladamente. O potencial sinérgico das drogas INH e ETH em combinação com drogas antifúngicas contra *C. neoformans* e *C. gattii* não foram anteriormente investigados, portanto interações farmacodinâmicas dessas combinações são desconhecidas.

Com o objetivo de compreender o mecanismo de ação de N'-(1-fenil) e as drogas antituberculose nas células fúngicas, foram investigados os efeitos dessas drogas sobre o conteúdo total de ergosterol celular e sobre a permeabilidade da membrana. De acordo com os resultados obtidos, N'-(1-fenil) foi capaz de provocar redução do teor de ergosterol em *H. capsulatum*, embora em menor proporção que o itraconazol, utilizado como controle. Visbal et al. (2011) também avaliaram os efeitos antiproliferativos de análogos de hidrazona na fase leveduriforme de *Paracoccidioides brasiliensis* e observou inibição do crescimento em torno de 90%. Os autores mostraram que os derivados de hidrazona são capazes de afetar o crescimento fúngico através da inibição da síntese de brassicasterol (esterol predominante) e do ergosterol na fase leveduriforme. No entanto, um dos compostos não mostrou associação com qualquer etapa do bloqueio da via biossintética dos esteróis, sugerindo diferentes mecanismos de ação. Além disso, este estudo demonstrou que as drogas INH e ETH foram igualmente capazes de provocar uma redução no teor total de ergosterol nas células de *C. neoformans* e *C. gattii* em comparação com o controle sem droga.

Ademais, os resultados mostraram que as drogas N'-(1-fenil), INH e ETH são capazes de alterar a integridade da membrana de *H. capsulatum* e *Cryptococcus* spp., tornando-as mais permeáveis à moléculas como ácidos nucleicos e proteínas. A dispersão dos componentes intracelulares sugere que o efeito crucial dessas drogas nas células fúngicas seja a formação de poros na membrana citoplasmática, provocando uma lise celular subsequente. Liberação de conteúdo intracelular é considerada um forte indicativo de danos graves, irreversíveis e perda da integridade da membrana celular (CARSON; MEE; RILEY, 2002; DEVI et al., 2010).

Este trabalho também buscou investigar o potencial antimicrobiano da hidrazona N'-(1-fenil) contra biofilmes maduros de *H. capsulatum* e das drogas antituberculose sobre biofilme de *Cryptococcus* spp. N'-(1-fenil) apresentou atividade anti-biofilme relevante, semelhante ao efeito encontrado para AMB, considerada droga eficaz contra biofilmes fúngicos (SHINDE et al., 2012). Além disso, os dados demonstraram que a combinação de N'-(1-fenil) com AMB reforça a atividade inibitória da droga antifúngica contra biofilme de *H. capsulatum*, mesmo em concentrações baixas. Embora detalhes sobre a estrutura e

dinâmica de biofilmes de *H. capsulatum in vivo* sejam desconhecidos, acredita-se que esta combinação antimicrobiana possa melhorar o tratamento em casos de infecções causadas por biofilme de *H. capsulatum*. O potencial antibiofilme das drogas antituberculose foi avaliado sobre dois aspectos: a capacidade de impedir a formação de biofilme e a ação contra biofilme maduro. INH e ETH apresentaram efeito antibiofilme atuando tanto sobre a formação quanto sobre o biofilme maduro de *Cryptococcus* spp. Sob estas condições, ambas as drogas inibiram os biofilmes em concentrações 10 e 50 vezes maiores que os valores de CIM para as células planctônicas. Os biofilmes formados por *C. neoformans* foram significativamente mais sensíveis a cada uma das drogas testadas que os biofilmes de *C. gattii*. Em relação à ação das drogas não foram observadas diferenças significativas na inibição dos biofilmes.

Além da capacidade para formar biofilmes, *H. capsulatum* utiliza uma grande variedade de mecanismos de virulência altamente eficazes, incluindo dimorfismo térmico e parasitismo intracelular. O curso da doença respiratória depende principalmente da capacidade da levedura de *H. capsulatum* em sobreviver e replicar-se dentro de macrófagos alveolares, a primeira linha de defesa celular encontrado no hospedeiro (PITANGUI et al., 2012). Em estudos iniciais, a capacidade de N'-(1-fenil) em penetrar nos macrófagos e aumentar a taxa de morte do fungo no fagossoma foi investigada. Os resultados obtidos sugerem que a hidrazona em combinação com AMB foram capazes de impedir o crescimento intracelular de *H. capsulatum*, em concentrações 16 e 64 vezes menores que N'-(1-fenil) e AMB, respectivamente, em comparação com os valores de CIM dessas drogas testadas isoladamente. No entanto, novos experimentos com maior número de cepas devem ser realizados com o objetivo de revalidar o efeito sinérgico dessas drogas contra células *H. capsulatum* fagocitados.

O presente estudo mostrou que N'-(1-fenil) possui potencial antifúngico contra *H. capsulatum* na forma planctônica e biofilme. Novos estudos devem ser realizados a fim de avaliar o efeito antifúngico e antibiofilme de N'-(1-fenil) *in vivo*. Além disso, os resultados deste trabalho acrescentam evidências sobre o potencial antifúngico das drogas antituberculose isoladas e em combinação frente à *Cryptococcus* spp. Estudos adicionais devem ser realizados para determinar os mecanismos moleculares específicos relacionados com a atividade antifúngica observada. Os resultados obtidos neste estudo apontam para a importância de trabalhos de prospecção de novos alvos moleculares que podem fornecer pontos de partida para o desenho racional de novos compostos com atividade antifúngica.

8 CONCLUSÕES

1. Os compostos sintetizados não apresentaram citotoxicidade contra três linhagens de células tumorais humanas.
2. Todas as hidrazonas sintetizadas foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de isolados de *H. capsulatum* nas fases leveduriforme e filamentosa. Dentre todos os derivados, o análogo químico formado a partir da acetofenona - N'-(1-feniletilideno)isonicotinahidrazida apresentou maior potencial antifúngico para ambas as fases.
3. O efeito inibitório *in vitro* de N'-(1-feniletilideno)isonicotinahidrazida foi potencializado pela combinação com a droga anfotericina B ante *H. capsulatum* nas formas planctônica e biofilme.
4. N'-(1-feniletilideno)isonicotinahidrazida foi capaz de provocar redução do teor de ergosterol total em *H. capsulatum* em concentrações suprainsibitórias, além de induzir alterações na estrutura da membrana plasmática em concentrações subinibitórias, permitindo o escape de macromoléculas essenciais para o crescimento do fungo, como ácidos nucléicos e proteínas.
5. A interação entre a hidrazona N'-(1-feniletilideno)isonicotinahidrazida e a droga anfotericina B nos valores CIMsin foi capaz de promover o aumento da taxa de morte de *H. capsulatum* no interior do fagossoma.
6. As drogas antituberculose isoniazida e etionamida isoladas e/ou em combinação com os derivados azólicos fluconazol e itraconazol demonstraram atividade antifúngica frente à cepas do Complexo *C. neoformans/C. gattii* nas formas planctônica e biofilme.
7. A atividade antifúngica *in vitro* das drogas antituberculose promoveu a redução do teor de ergosterol no envoltório celular fúngico e alterações irreversíveis na estrutura da membrana plasmática de leveduras de *Cryptococcus* spp.

9 PERSPECTIVAS

O presente trabalho apresenta dados promissores sobre o potencial antifúngico da droga antituberculose isoniazida e seus análogos químicos em associação com as drogas antifúngicas de uso terapêutico. Acredita-se ter contribuído para uma melhor compreensão acerca da atividade antifúngica dessas drogas frente ao fungo dimórfico *H. capsulatum* var. *capsulatum* e leveduras do gênero *Cryptococcus* spp. tanto na forma planctônica como biofilme, impulsionando novas pesquisas nesta área para tais espécies. Os resultados obtidos neste estudo contribuirão para aumentar os conhecimentos a respeito dos mecanismos de ação dessas drogas em células fúngicas, embora, novos estudos devam ser realizados a fim de determinar os alvos moleculares específicos relacionados com a atividade antifúngica observada, bem como o efeito destas combinações *in vivo* contra isolados de *H. capsulatum* e *Cryptococcus* spp.

BIBLIOGRAFIA

ABADIO, A. K. R.; KIOSHIMA, E. S.; TEIXEIRA, M. M.; MARTINS, N. F.; MAIGRET, B.; FELIPE, M. S. S. Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC Genomics*, v. 12, n. 75, p. 1-10, 2011.

AFELTRA, J.; VERWEIJ, P.E. Antifungal activity of nonantifungal drugs. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 22, p. 397-407, 2003.

AFELTRA, J.; VITALE, R. G.; MOUTON, J. W.; VERWEIJ, P. E. Potent synergistic *in vitro* interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* resistant to itraconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 4, p. 1335-1343, 2004.

ALCAZAR-FUOLI, L.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; MELLADO, E. Antifungal Drug Resistance in Molds: Clinical and Microbiological Factors. *Current Fungal Infection Reports*, v. 2, p. 36-42, 2008.

ALI, I.; WANI, W. A.; KHAN, A.; HAQUE, A.; AHMAD, A.; SALEEM, K.; MANZOOR, N. Synthesis and synergistic antifungal activities of a pyrazoline based ligand and its copper(II) and nickel(II) complexes with conventional antifungals. *Microbial Pathogenesis*, v. 53, p. 66-73, 2012.

AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, v. 1, n. 134, p. 1-7, 2010.

ANDAMA, A. O.; BOON, S.; MEYA, D.; CATTAMANCHI, A.; WORODRIA, W.; DAVIS, J. L.; WALTER, N. D.; YOO, S. D.; KALEMA, N.; HALLER, B.; HUANG, L. Prevalence and outcomes of cryptococcal antigenemia in HIV-seropositive patients hospitalized for suspected tuberculosis in Uganda. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 63, n. 2, p. 189-194, 2013.

ANDRADE, C. H.; PASQUALOTO, K. F. M.; ZAIM, M. H.; FERREIRA, E. I. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: Inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 2, p. 167-179, 2008.

ANTINORI, S. New insights into HIV/aids-associated cryptococcosis. *ISRN AIDS*, v. 2013, p. 1-22, 2013.

ARBEX, M. A.; VARELLA, M. C. L.; SIQUEIRA, H. R.; MELLO, F. A. F. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de primeira linha. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 36, n. 5, p. 626-640, 2010a.

ARBEX, M. A.; VARELLA, M. C. L.; SIQUEIRA, H. R.; MELLO, F. A. F. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 2: Fármacos de segunda linha. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 36, n. 5, p. 641-656, 2010b.

ARNOLD, T. M.; DOTSON, E.; SAROSI, G. A.; HAGE, C. A. Traditional and emerging antifungal therapies. *Proceedings of the American Thoracic Society*, v. 7, p. 222-228, 2010.

AYATI, A.; FALAHATI, M.; IRANNEJAD, H.; EMAMI, S. Synthesis, *in vitro* antifungal evaluation and *in silico* study of 3-azolyl-4-chromanone phenylhydrazones. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 20, n. 46, p. 1-7, 2012.

AZANZA, J. R.; MONTEJO, M. Farmacocinética y farmacodinamia. Interacciones y efectos secundarios. Comparación con otras equinocandinas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 26, n. 14, p. 14-20, 2008.

AZARIFAR, D.; GHASEMNEJAD, H. Microwave-assisted synthesis of some 3,5-arylated 2-pyrazolines. *Molecules*, v. 8, n. 8, p. 642-648, 2003.

BALTCH, A. L.; BOPP, L. H.; SMITH, R. P.; RITZ, W. J.; MICHELSEN, P. B. Anticandidal effects of voriconazole and caspofungin, singly and in combination, against *Candida glabrata*, extracellularly and intracellularly in granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)-activated human monocytes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, n. 6, p. 1285-1290, 2008.

BEKAI, L. H. *Atividade antibiótica do fungo Antrodia albida (fr.) donk. cultivado em laboratório*. 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2010.

BENNETT, J. E. Agentes antimicrobianos: agentes antifúngicos. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, R. L. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11ª edição. Nova York: McGraw-Hill, 2006, p. 1103-1118.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. *Visão Acadêmica*, v. 5, n. 2, p. 159 -172, 2004.

BERKES, C. A.; CHAN, L. L. Y.; WILKINSON, A.; PARADIS, B. Rapid quantification of pathogenic fungi by Cellometer image-based cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, v. 91, p. 468-476, 2012.

BINK, A.; KUCHARÍKOVÁ, S.; NEIRINCK, B.; VLEUGELS, J.; DIJCK, P. V.; CAMMUE, B. P. A. THEVISSSEN, K. The nonsteroidal antiinflammatory drug diclofenac potentiates the *in vivo* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 206, p. 1790-1797, 2012.

BLANCO, M. T.; CAÑADAS, J.; GARCÍA-MARTOS, P.; MARÍN, P.; GARCÍA-TAPIA, A.; RODRÍGUEZ, M. J. Actividad *in vitro* de posaconazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y voriconazol frente a *Candida glabrata*. *Revista Española de Quimioterapia*, v. 22, n. 3, p. 139-143, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília. *Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso*. 8ª edição revista, 2010.

BRAZÃO-SILVA, M. T.; MANCUSI, G. W.; BAZZOUN, F. V.; ISHISAKI, G. Y.; MARCUCCI, MARCELO. A gingival manifestation of histoplasmosis leading diagnosis. *Contemporary Clinical Dentistry*, v. 4, p. 97-101, 2013.

BRILHANTE, R. S. N.; FECHINE, M. A. B.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; LIMA, R. A. C.; MESQUITA, J. R. L.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, p. 3978-3979, 2010.

BRILHANTE, R. S. N.; FECHINE, M. A. B.; MESQUITA, J. R. L.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; MONTEIRO, A. J.; LIMA, R. A. C.; CAETANO, E. P.; PEREIRA, J. F.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Histoplasmosis in HIV-positive patients in Ceará, Brazil: clinical-laboratory aspects and *in vitro* antifungal susceptibility of *Histoplasma capsulatum* isolates. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 106, p. 484-488, 2012.

BURHALDE, A. J. Indústria farmacêutica brasileira e mundial: uma revisão histórica de suas origens e de seu desenvolvimento. *Revista de Ciências Empresariais, Políticas e Sociais*, n. 15, p. 63-66, 2008.

BURNIE, J. P.; CARTER, T. L.; HODGETTS, S. J.; MATTHEWS, R. C. Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, p. 53-88, 2006.

BUTTS, A.; DIDONE, L.; KOSELYN, K.; BAXTER, B. K.; CHABRIER-ROSELLO, Y.; WELLINGTON, M.; KRYSANB, D. J. A Repurposing approach identifies off-patent drugs with fungicidal cryptococcal activity, a common structural chemotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of cryptococcosis. *Eukaryotic Cell*, v. 12, n. 2, p. 278-287, 2013.

CANNIZZO, F. T.; ERASO, E.; EZKURRA, P. A.; VILLAR-VIDAL, M.; BOLLO, E.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J.; VIDOTTO, V.; QUINDÓS, G. Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. *Medical Mycology*, v., 45, p. 357-361, 2007.

CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; BARET, P. V.; KENIYA, M. V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B. C. Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 2, p. 291-321, 2009.

CARNEIRO, T. M. *Uso indiscriminado de antibióticos*. 2009. 32 f. Monografia (Especialização em Aplicações Complementares às Ciências Militares) - Escola de Saúde do Exército, Rio de Janeiro, 2009.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. *Revista Española de Quimioterapia*, v. 19, n. 2, p. 130-139, 2006.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 1914-1920, 2002.

- CATALÁN, M.; MONTEJO, J.C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 23, p. 39-49, 2006.
- CATEAU, E.; RODIER, M. H.; IMBERT, C. *In vitro* efficacies of caspofungin or micafungin catheter lock solutions on *Candida albicans* biofilm growth. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, p. 153-155, 2008.
- CAZEDEY, E. C. L.; AZEVEDO, R. C. P.; SILVA, E. F.; ARAÚJO, M. B. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 774-776, 2007.
- CHAMILOS, G.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Lovastatin has significant activity against zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 1, p. 96-103, 2006.
- CHANDRASEKAR, P. H.; SOBEL, J. D. Micafungin: A new echinocandin. *Clinical Infectious Diseases*, v. 42, p. 1171-1178, 2006.
- CHANG, H. H.; LEE, N. Y.; KO, W. C.; LEE, H. C.; YANG, Y. H.; WU, C. J.; CHANG, C. M. Voriconazole inhibition of tacrolimus metabolism in a kidney transplant recipient with fluconazole-resistant cryptococcal meningitis. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 14, n. 4, p. e348–e350, 2009.
- CHANG, M. R.; TAIRA, C. L.; PANIAGO, A. M. M.; TAIRA, D. L.; CUNHA, R. V.; WANKE, B. Study of 30 cases of Histoplasmosis observed in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 49, n. 1, p. 37-39, 2007.
- CHAPMAN, S. W.; SULLIVAN, D. C.; CLEARY, J. D. In search of the holy grail of antifungal therapy. *Transactions of The American Clinical and Climatological Association*, v. 119, p. 197-216, 2008.
- CHEN, S. C. A.; SLAVIN, M. A.; SORRELL, T. C. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs*, v. 71, n. 1, p. 11-41, 2011.
- CHONG, H. S.; DAGG, R.; MALIK, R.; CHEN, S.; CARTER, D. *In vitro* susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 11, p. 4115-4120, 2010.
- CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 1541-1550, 2006.
- CLARK, B.; FOSTER, R.; TUNBRIDGE, A.; GREEN, S. A case of disseminated histoplasmosis successfully treated with the investigational drug posaconazole. *Journal of Infection*, v. 51, n. 3, p. 177-180, 2005.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*: approved standard - second edition. CLSI document M38-A2. CLSI, Wayne, USA, 2008.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*: approved standard - second edition. CLSI document M27-A3. CLSI, Wayne, USA, 2008.

COOPER, K. G.; ZARNOWSKI, R.; WOODS, J. P. *Histoplasma capsulatum* encodes a dipeptidyl peptidase active against the mammalian immunoregulatory peptide, substance P. *Plos One*, v. 4, n. 4, p. e5281- e5281, 2009.

CORDEIRO, R. A.; ASTETE-MEDRANO, D. J.; MARQUES, F. J. F.; ANDRADE, H. T. L.; PERDIGÃO NETO, L. V.; TAVARES, J. L.; LIMA, R. A. C.; PATOILLO, K. K. N. R.; MONTEIRO, A. J.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Cotrimoxazole enhances the in vitro susceptibility of *Coccidioides posadasii* to antifungals. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 8, p. 1045-1048, 2011b.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; FECHINE, M. A. B.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* inhibitory effect of antituberculosis drugs on clinical and environmental strains of *Coccidioides posadasii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, p. 575–579, 2006.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; MEDRANO, D. J. A.; MONTEIRO, A. J.; TAVARES, J. L.; LIMA, R. A. C.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. *In vitro* synergistic effects of antituberculous drugs plus antifungals against *Coccidioides posadasii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 34, p. 278-280, 2009.

CORDEIRO, R. A.; COSTA, A. K.; BRILHANTE, R. S.; LIMA, R. A.; CASTELO-BRANCO, D. S.; RIBEIRO, J. F.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, F. A.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. PCR-REA as an important tool for the identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from human and veterinary sources. *Veterinary Microbiology*, v. 154, n. 1–2, p. 180–184, 2011c.

CORDEIRO, R. A.; MARQUES, F. J. F.; BRILHANTE, R. S. N.; SILVA, K. R. C.; MOURÃO, C. I.; CAETANO, E. P.; FECHINE, M. A. B.; RIBEIRO, J. F.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; LIMA, R. A. C.; MESQUITA, J. R. L.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, F. A. C.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Synergistic effect of antituberculosis drugs and azoles *in vitro* against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 9, p. 4482–4484, 2011a.

CORDEIRO, R. A.; MOURÃO, C. I.; ROCHA, M. F. G.; MARQUES, F. J. F.; TEIXEIRA, C. E. C.; MIRANDA, D. F. O.; NETO, L. V. P.; BRILHANTE, R. S. N.; BANDEIRA, T. J. P. G.; SIDRIM, J. J. C. Antifolates inhibit *Cryptococcus* biofilms and enhance susceptibility of planktonic cells to amphotericin B. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 32, p. 557-564, 2012.

COSTA, A. K. F.; SIDRIM, J. J. C.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on Antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia*, v. 169, p. 207-213, 2010.

COWEN, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nature*, v. 6, p. 187-198, 2008.

COWEN, L. E.; LINDQUIST, S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science*, v. 309, p. 2185-2189, 2005.

COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryotic Cell*, v. 7, n. 5, p. 747-764, 2008.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, M. J.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 3, p. 917-921, 2006.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. *Atlas of Clinical Fungi*, 2ª edição, Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, Universitat Rovira i Virgili, Espanha, 2000.

DESPAIGNE, A. A. R.; PARRILHA, G. L.; IZIDORO, J. B.; COSTA, P. R.; SANTOS, R. G.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; ROCHA, W. R.; BERALDO, H. 2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones and their gallium(III) complexes are highly cytotoxic to glioma cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, p. 163-172, 2012.

DESPAIGNE, A. A. R.; VIEIRA, L. F.; MENDES, I. C.; COSTA, F. B.; SPEZIALI, N. L.; BERALDO, H. Organotin(IV) Complexes with 2-acetylpyridine benzoyl hydrazones: antimicrobial activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 7, p. 1247-1257, 2010.

DEUS FILHO, A.; WANKE, B.; CAVALCANTI, M. A. S.; MARTINS, L. M. S.; DEUS, A. C. B. Histoplasmose no Nordeste do Brasil. Relato de três casos. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, v. 15, n. 1, p. 109-114, 2009.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 130, p. 107-115, 2010.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

EL-AZIZI, M. Enhancement of the *in vitro* activity of amphotericin B against the biofilms of non-albicans *Candida* spp. by rifampicin and doxycycline. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, p. 645-649, 2007.

EMA - European Medicines Agency. 2011. EPAR summary for the public: Noxafil – posaconazole, p. 1-3, 2011.

EMA - European Medicines Agency. 2011. EPAR summary for the public: Vfend – voriconazole, p. 1-3, 2012.

EMRI, T.; MAJOROS, L.; TÓTH, V.; PÓCSI, I. Echinocandins: production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, p. 3267-3284, 2013.

ESPINEL-INGROFF, A. *In vitro* antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 20, p. 121-136, 2003.

ESPINEL-INGROFF, A.; BOYLE, K.; SHEEHAN, D. J. *In vitro* antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: Review of the literature. *Mycopathologia*, v. 150, p. 101–115, 2001.

FDA Drug Safety Communication: FDA limits usage of Nizoral[®] (ketoconazole) oral tablets due to potentially fatal liver injury and risk of drug interactions and adrenal gland problems. Safety Announcement, 2013.

FDA prescribing information: Noxafil[®] (Posaconazole) oral suspension 40 mg/mL. Product information, 2010.

FERA, M. T.; LA CAMERA, E.; DE SARRO, A. New triazoles and echinocandins: mode of action, *in vitro* activity and mechanisms of resistance. *Expert Review Ant- Infective Therapy*, v. 7, n. 8, p. 981-998, 2009.

FERNANDES, J. P. S. *Síntese e atividade antimicrobiana de ésteres do ácido pirazinóico e quinolonas*. 2006. 141 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos Área de Insumos Farmacêuticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FERREIRA, M. L.; BORGES, R. S.; NOGUEIRA, T. C. M.; ROCHA, L. C.; SOUZA, M. V. N. Tuberculose infantil: tratamento e problemas relacionados. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 88, n. 1, p. 38-44, 2007.

FERREIRA, M. L.; NOGUEIRA, T. C. M.; SOUZA, M. V. N. Problemas relacionados ao tratamento da tuberculose em pacientes com problemas hepáticos e renais. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 88, n. 3, p. 125-131, 2007.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Histoplasmose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n.2, p. 192-198, 2009.

FIANCHI, L.; PAGANO, L.; CAIRA, M.; NOSARI, A.; VAN LINT, M. T.; CANDONI, A.; OFFIDANI, M.; ALOISI, T.; IRRERA, G.; BONINI, A.; PICARDI, M.; CARAMATTI, C.; INVERNIZZI, R.; MATTEI, D.; MELILLO, L.; WAURE, C.; REDDICONTO, G. Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study - sorveglianza epidemiologica infezioni fungine nelle emopatie maligne. *Clinical Infectious Diseases*, v. 45, n. 9, p. 1161-1170, 2007.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FLÜCKIGER, U.; MARCHETTI, O.; BILLE, J.; EGGIMANN, P.; ZIMMERLI, S.; IMHOF, A.; GARBINO, J.; RUEF, C.; PITTET, D.; TÄUBERE, M.; GLAUSER, M.; CALANDRA, T. Treatment options of invasive fungal infections in adults. *Swiss Medical Weekly*, v. 136, p. 447-463, 2006.

FORASTIERO, A.; MESA-ARANGO, A. C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; ALCAZAR-FUOLI, L.; BERNAL-MARTINEZ, L.; PELAEZ, T.; LOPEZ, J. F.; GRIMALT, J. O.; GOMEZ-LOPEZ, A.; CUESTA, I.; ZARAGOZA, O.; MELLADO, E. *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 10, p. 4769-4781, 2013.

GAMALETSSOU, M. N.; SIPSAS, N. V.; KONTOYIANNIS, D. P.; TSIKALOS, A.; KONTOS, N. A.; STEFANOY, I.; KORDOSSIS, T. Successful salvage therapy of refractory HIV-related cryptococcal meningitis with the combination of liposomal amphotericin B, voriconazole, and recombinant interferon- γ . *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 74, p. 409-411, 2012.

GAO, Y.; ZHANG, C.; LU, C.; LIU, P.; LI, Y.; LI, H.; SUN, S. Synergistic effect of doxycycline and fluconazole against *Candida albicans* biofilms and the impact of calcium channel blockers. *FEMS Yeast Research*, v. 13, n. 5, p. 453-462, 2013.

GOBERNADO, M.; CANTÓN, E. Anidulafungina. *Revista Española de Quimioterapia*, v. 21, n. 2, p. 99-114, 2008.

GONZÁLEZ, G. M. *In vitro* activities of isavuconazole against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *Medical Mycology*, v. 47, p. 71-76, 2009.

GREER, N. D. Posaconazole (Noxafil): a new triazole antifungal agent. *Baylor University Medical Center Proceedings*, v. 20, n. 2, p. 188-196, 2007.

GUILLOIN, R.; PAGNIEZ, F.; PICOT, C.; HÉDOU, D.; TONNERRE, A.; CHOSSON, E.; DUFLOS, M.; BESSON, T.; LOGÉ, C.; LE PAPE, P. Discovery of a novel broad-spectrum antifungal agent derived from albaconazole. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 4, p. 288-292, 2013.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUMBO, T. Princípios gerais do tratamento antimicrobiano. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, R. L. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11^a edição. Nova York: McGraw-Hill, 2001, p. 1365-1381.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 3, p. 915-921, 1994.

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

HILLS-NIEMINEN, C.; HUGHES, C. A.; HOUSTON, S.; SHAFRAN, S. D. Drug-drug interaction between itraconazole and the protease inhibitor lopinavir/ritonavir. *Annals of Pharmacotherapy*, v. 43, p. 2117-2120, 2009.

HUANG, W.; ZHANG, Z.; HAN, X.; TANG, J.; WANG, J.; DONG, S.; WANG, E. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol or ergosterol-containing

supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophysical Journal*, v. 83, n. 6, p. 3245–3255, 2002.

ILIĆ, B. S.; KONSTANTINOVIĆ, S. S.; SAVIĆ, D. S.; VELJKOVIĆ, V. B.; GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, G. The impact of Schiff bases on antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus*. *Medicinal Chemistry Research*, v. 19, n. 7, p. 690-697, 2010.

JAIMES, A.; MUVDI, S.; ALVARADO, Z.; RODRÍGUEZ, G. Perforation of the nasal septum as the first sign of histoplasmosis associated with aids and review of published literature. *Mycopathologia*, v. 176, p. 145-150, 2013.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 693-715, 2004.

JOHNSON, P. C.; WHEAT, L. J.; CLOUD, G. A.; GOLDMAN, M.; LANCASTER, D. BAMBERGER, D. M.; POWDERLY, W. G.; HAFNER, R.; KAUFFMAN, C. A.; DISMUKES, W. E. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B compared with conventional amphotericin B for induction therapy of histoplasmosis in patients with aids. *Annals of Internal Medicine*, v. 137, n. 2, p. E-105-E110, 2002.

JUDGE, V.; NARASIMHAN, B.; AHUJA, M.; SRIRAM, D.; YOGEE SWARI, P.; DE CLERCQ, E.; PANNECOUQUE, C.; BALZARINI, J. Synthesis, antimycobacterial, antiviral, antimicrobial activities, and QSAR studies of isonicotinic acid-1-(substituted phenyl)-ethylidene/cycloheptylidene hydrazides. *Medicinal Chemistry Research*, v. 21, p. 1935-1952, 2012.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, p. 120-128, 2008.

KAUFFMAN, C. A. Endemic Mycoses: Blastomycosis, Histoplasmosis, and Sporotrichosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 20, p. 645–662, 2006.

KAUFFMAN, CA. Histoplasmosis. *Clinics in Chest Medicine*, v. 30, p. 217-225, 2009.

KONTOYIANNIS, D. P. Invasive mycoses: strategies for effective management. *The American Journal of Medicine*, v. 125, n. 1A, p. S25-S38, 2012.

KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*, v. 359; p. 1135-1144, 2002.

KONTOYIANNIS, D. P.; RATANATHARATHORN, V.; YOUNG, J. A.; RAYMOND, J.; LAVERDIÈRE, M.; DENNING, D.W.; PATTERSON, T.F.; FACKLAM, D.; KOVANDA, L.; ARNOLD, L.; LAU, W.; BUELL, D.; MARR, K.A. Micafungin alone or in combination with other systemic antifungal therapies in hematopoietic stem cell transplant recipients with invasive aspergillosis. *Transplant Infectious Disease*, v. 11, p. 89-93, 2009.

KRESGE, N.; SIMONI, R. D.; HILL, R. L. Selman Waksman: the father of antibiotics. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 48, p. 101-102, 2004.

- KRIESEL, J. D.; SUTTON, D. S.; SCHULMAN, S.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G. Persistent pulmonary infection with an azole-resistant *Coccidioides* species. *Medical Mycology*, v. 46, n. 6, p. 607-610, 2008.
- KUHN, D. M.; BALKIS, M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n.1, p. 506–508, 2003.
- KUMAMOTO, C. A. A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 15, p. 5576-5581, 2005.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9a edição. São Paulo: Sarvier, 2002.
- LARRU, B.; ZAOUTIS, T. E. Newer antifungal agents. *Current Opinion in Pediatrics*, v. 25, p. 110-115, 2013.
- LAUTERT, C.; JESUS, F. P. K.; ZANETTE, R. A.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Eficácia da caspofungina em fungos filamentosos. *Veterinária e Zootecnia*, v. 18, n. 2, p. 175-186, 2011.
- LEDTKE, C.; REHM, S. J.; FRASER, T. G.; SHRESTHA, N. K.; TAN, C. D.; RODRIGUEZ, E. R.; TOMFORD, J. W.; JAIN, A.; LYTLE, B.; JOHNSTON, D.; SABIK, J.; GORDON, S. M.; DUIN, D. Endovascular infections caused by *Histoplasma capsulatum* a case series and review of the literature. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 136, p. 640-645, 2012.
- LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Microbiology*, v. 11, p. 370-384, 2013.
- LI, D. D.; XU, Y.; ZHANG, D. Z.; QUAN, H.; MYLONAKIS, E.; HU, D. D.; LI, M. B.; ZHAO, L. X.; ZHU, L. H.; WANG, Y.; JIANG, Y. Y. Fluconazole assists berberine to kill fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013. doi:10.1128/AAC.00499-13
- LI, R. K; CIBLAK, M. A; NORDOFF, N; PASARELL, L; WARNOCK, D. W; MCGINNIS, MR. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 6, p. 1734–1736, 2000.
- LIU, W.; LI, L.; SUN, Y.; CHEN, W.; WAN, Z.; LI, R.; LIU, W. Interaction of the echinocandin caspofungin with amphotericin B or voriconazole against *Aspergillus* biofilms *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 12, p. 6414-6416, 2012.
- LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; MÉNDÉZ-TOVAR, L. J. Blastomycosis. *Clinics in Dermatology*, v. 30, p. 565-572, 2012.
- LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J. M. Antifúngicos de uso sistémico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 21, n. 7, p. 366-380, 2003.

MALIGIE, M. A.; SELITRENNIKOFF, C. P. *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3)-glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 7, p. 2851-2856, 2005.

MARQUES, F. J. F. *Efeito inibitório das drogas antituberculose, antifúngicas e análogos químicos da isoniazida frente a Histoplasma capsulatum var. capsulatum, in vitro*. 2009. 122 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 14, p. 4592-4601, 2007.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 3, p. 1021-1033, 2006.

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

MASUNARI, A.; TAVARES, L. C. A new class of nifuroxazide analogues: synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 4229-4236, 2007.

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

MEIRELES, M. A. O. M. *Uso de antimicrobianos e resistência bacteriana: aspectos socioeconômicos e comportamentais e seu impacto clínico e ecológico*. 2008. 47 f. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2008.

MELNYK, P. ; LEROUX, V.; SERGHERAERT, C.; GRELLIER, P. Design, synthesis and in vitro antimalarial activity of na acylhydrazone library. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, p. 31-35, 2006.

MENDES, I. C.; SOARES, M. A.; DOS SANTOS, R. G.; PINHEIRO, C.; BERALDO, H. Gallium(III) complexes of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones: cytotoxic activity against malignant glioblastoma. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 5, p. 1870-1877, 2009.

MENG, Y.; CAI, S.; LI, X. Pathologically confirmed histoplasmosis: analysis of 14 cases. *Journal of Central South University*, v. 33, n. 2, p. 296-298, 2013.

MÍMICA, L. M. J.; UEDA, S. M. Y.; MARTINO, M. D. V.; NAVARINI, A.; MARTINI, I. J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.

- MOKOKA, T. A.; MCGAW, L. J.; MDEE, L. K.; BAGLA, V.P.; IWALEWA, E. O.; ELOFF, J. N. Antimicrobial activity and cytotoxicity of triterpenes isolated from leaves of *Maytenus undata* (Celastraceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, n. 111, p. 1-16, 2013.
- MONTEIRO, D. R.; SILVA, S.; NEGRI, M.; GORUP, L. F.; CAMARGO, E. R.; OLIVEIRA, R.; BARBOSA, D. B.; HENRIQUES, M. Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Mycoses*, v. 56, n. 6, p. 672-680, 2013.
- MORAIS, S. S.; MAFRA, M. O.; CANTERLE, E. M.; LIMA, L. L.; RIBEIRO, S. L. E. *Histoplasma capsulatum* simulando espondilodiscite tuberculose em doente com artrite reumatóide. *Acta Reumatológica Portuguesa*, v. 33, p. 360-363, 2008.
- MORAN, G. P.; PINJON, E.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. Analysis of drugs resistance in pathogenic fungi. p. 93-113. In: Kavanagh K. (Ed.), *Medical Mycology: Cellular and Molecular Techniques*. John Wiley & Sons, Ltd, USA. 2007.
- MOREIRA, M. I. M. C. G. *Azóis: farmacologia e interações medicamentosas*. 2010. 54 f. Monografia (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Fernando Pessoa, Porto, 2010.
- MORETTI, M. L.; RESENDE, M. R.; LAZÉRA, M. S.; COLOMBO, A. L.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Consenso em criptococose-2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.
- MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, p. 94-106, 2010.
- MOWAT, E.; LANG, S.; WILLIAMS, C.; MCCULLOCH, E.; JONES, B.; RAMAGE, G. Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, p. 1281-1284, 2008.
- MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; GHANNOUM, M. A. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 8, p. 4333-4340, 2003.
- MUKHERJEE, P. K.; LONG, L.; KIM, H. G.; GHANNOUM, M. A. Amphotericin B lipid complex is efficacious in the treatment of *Candida albicans* biofilms using a model of catheter-associated *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 33, p. 149-153, 2009.
- MÜLLER, G. G.; KARA-JOSÉ, N.; CASTRO, R. S. Antifúngicos em infecções oculares: drogas e vias de administração. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2013.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 947 p.

NAKAI, T.; UNO, J.; IKEDA, F.; TAWARA, S.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. *In vitro* antifungal activity of micafungin (fk463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 4, p. 1376–1381, 2003.

National Library of Medicine, National Institutes of Health, U.S. Department of Health & Human Services. Disponível em: <<http://livertox.nih.gov/Ethionamide.htm#insert>>. Acesso em: 20 set. 2013.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: approved standard M38-A. NCCLS, Wayne, USA, 2002.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A2. NCCLS, Wayne, USA, 2002

NETT, J. E.; CAIN, M. T.; CRAWFORD, K.; ANDES, D. R. Optimizing a *Candida* biofilm microtiter plate model for measurement of antifungal susceptibility by tetrazolium salt assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 4, p. 1426-1433, 2011.

NETT, J. E.; CRAWFORD, K.; MARCHILLO, K.; ANDES, D. R. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 8, p. 3505-3508, 2010.

NETT, J.; LINCOLN, L.; MARCHILLO, K.; MASSEY, R.; HOLOYDA, K.; HOFF, B.; VANHANDEL, M.; ANDES, D. Putative role of β -1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 2, p. 510-520, 2007.

NORA, H. A. Antimicrobial activity and spectral, magnetic and thermal studies of some transition metal complexes of a schiff base hydrazone containing a quinoline moiety. *Molecules*, v. 12, p. 1080-1091, 2007.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, p. 1, 2003.

OKAMOTO, Y.; AOKI, S.; MATAG, I. Enhancement of amphotericin B activity against *Candida albicans* by superoxide radical. *Mycopathologia*, v. 158, p. 9-15, 2004.

OLIVEIRA, A. R. M.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. *Química Nova*, v. 32, n. 7, p. 1971-1974, 2009.

OLIVEIRA, J. C. Tópicos em Micologia Médica. Rio de Janeiro: J. Carvalhaes de Oliveira. 3ª edição, 2012. 255 p.

OMS - Organização Mundial da Saúde. 2012. Disponível em <<http://www.telegraph.co.uk/health/healthnews/9147414/>>. Acesso em 29 out. 2013.

OMS - Organização Mundial da Saúde. 2013. Disponível em <<http://www.who.int/tb/en/index.html>>. Acesso em 29 out. 2013.

OMS, Organização Mundial da Saúde. Antimicrobial resistance in the European Union and the world. Disponível em: <<http://www.who.int/dg/speeches/2012/>> Acesso em: 18 out. 2013.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J. H.; PAPPAS, P. G.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; HOROWITZ, H. W.; POWDERLY, W. G.; HYSLOP, N.; KAUFFMAN, C. A.; CLEARY, J.; MANGINO, J. E.; LEE, J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 10, p. 3149–3154, 2003.

PARASHAR, B.; PUNJABI, P. B.; GUPTA, G. D.; SHARMA, V. K. Synthesis of some novel N-arylhydrazone derivatives of N-phenyl anthranilic acid. *International Journal of ChemTech Research*, v. 1, n. 4, p. 1022-1025, 2009.

PARRILHA, G. L. *Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e lapachol: atividade farmacológica e avaliação de relações estrutura-atividade*. 2012. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências-Química) – Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte. 2012.

PARRILHA, G. L.; VIEIRA, R. P.; REBOLLEDO, A. P.; MENDES, I. C.; LIMA, L. M.; BARREIRO E. J.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; BERALDO, H. Binuclear zinc(II) complexes with the anti-inflammatory compounds salicylaldehyde semicarbazone and salicylaldehyde-4-chlorobenzoyl hydrazone (H2LASSBio-1064). *Polyhedron*, v. 30, p. 1891–1898, 2011.

PARSONS, L. M.; SALFINGER, M.; CLOBRIDGE, A.; DORMANDY, J.; MIRABELLO, L.; POLLETTA, V. L.; SANIC, A.; SINYAVSKIY, O.; LARSEN, S. C.; DRISCOLL, J.; ZICKAS, G.; TABER, H. W. Phenotypic and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to both isoniazid and ethambutol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 6, p. 2218–2225, 2005.

PASQUALOTTO, A. C.; DENNING, D. W. New and emerging treatments for fungal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, n. 1, p. i19–i30, 2008.

PEIGNE, V.; DROMER, F.; ELIE, C.; LIDOVE, O.; LORTHOLARY, O.; FRENCH MYCOSIS STUDY GROUP. Imported acquired immunodeficiency syndrome–related histoplasmosis in metropolitan france: a comparison of pre–highly active anti-retroviral therapy and highly active anti-retroviral therapy eras. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 5, p. 934-941, 2011.

PERUMAL, P.; MEKALA, S.; CHAFFIN, W. L. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 7, p. 2454-2463, 2007.

PETRI, W. A. J. Quimioterapia da tuberculose, complexo *Mycobacterium avium* e hanseníase. In: BRUNTON, LL; LAZO, JS; PARKER, RL. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11ª edição. Nova York: McGraw-Hill, 2001, p. 1083-1102.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, p. 108–117, 2007.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*, v. 125, p. S3-S13, 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; JONES, R. N.; MESSER, A. S.; HOLLIS, R. J.; the SENTRY Participants Group. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. Isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 to 2000. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 3, p. 852–856, 2002.

PIERCE, C. G.; SRINIVASAN, A.; UPPULURI, P.; RAMASUBRAMANIAN, A. K.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 13, p.1-5, 2013.

PING, B.; ZHU, Y.; GAO, Y.; YUE, C.; WU, B. Second- versus first-generation azoles for antifungal prophylaxis in hematology patients: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Hematology*, v. 92, p. 831-839, 2013.

PITANGUI, N. S.; SARDI, J. C. O.; SILVA, J. F.; BENADUCCI, T.; SILVA, R. A. M.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; TAYLOR, M. L.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. *Biofouling*, v. 28, p. 711-718, 2012.

RAMAGE, G.; JOSE, A.; SHERRY, L.; LAPPIN, D. F.; JONES, B.; WILLIAMS, C. Liposomal amphotericin b displays rapid dose-dependent activity against *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 5, p. 2369-2371, 2013.

RAMOS-E-SILVA, M.; LIMA, C. M. O.; SCHECHTMAN, R. C.; TROPE, B. M.; CARNEIRO, S. Systemic mycoses in immunodepressed patients (AIDS). *Clinics in Dermatology*, v. 30, p. 616-627, 2012.

REIS, S. L. G. B.; ALMEIDA, V. M.; ALMEIDA, G. C.; BOAVIAGEM, M. K.; MENDES, C. C. B.; FARIA, A. R. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolilaril-hidrazonas. *Química Nova*, v. 34, p. 76-81, 2011.

RIBEIRO, J. F. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*: taxa de conversão in vitro, detecção do gene *ryp1* e estudo da diversidade genética de cepas brasileiras. 2012. 115 f. Tese (Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

ROBBINS, N.; COLLINS, C.; MORHAYIM, J.; COWEN, L. E. Metabolic control of antifungal drug resistance. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, p. 81-93, 2010.

ROBBINS, N.; UPPULURI, P.; NETT, J.; RAJENDRAN, R.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; ANDES, D.; COWEN, L. E. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 9, p. 1-18, 2011.

RODRIGUES, P. R. C.; KOSACHENCO, B. G.; MAIA, J. Z.; PULZ, R. S.; MELLO, J. R. B. O uso das cefalosporinas na clínica de pequenos animais: breve revisão. *Veterinária em Foco*, v. 4, n. 2, p.143-158, 2007.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: does it matter? *International Journal of Infectious Diseases*, v. 6, n. 1, p. S47-S53, 2002.

ROLLAS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, Ş. G. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules*, v. 12, p. 1910-1939, 2007.

SALGIN-GÖKŞEN, U.; GÖKHAN-KELEKÇİ, N.; GÖKTAS, O.; KÖYSAL, Y.; KILIÇ, E.; IŞIK, Ş.; AKTAY, G.; ÖZALP, M. 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: Synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 5738–5751, 2007.

SANGLARD, D.; COSTE, A.; FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Research*, v. 9, p. 1029–1050, 2009.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, L. F.; TAYLOR, E. L. S.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; PIANETTI, G. A.; CÉSAR I. C.; SANTOS, D. A. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 5, p. 2553-2558, 2012.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, p. 10-24, 2013.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 75, n. 2, p. 213–267, 2011.

SHEPPARD, D.; LAMPIRIS, H. Agentes Antifúngicos. In: Katzung, B. G. *Farmacologia Básica & Clínica* - 10ª edição. Nova York: Mcgraw-Hill Interamericana, 2010, p. 707-713.

SHINDE, R. B.; CHAUHAN, N. M.; RAUT, J. S.; KARUPPAYI, S. M. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 11, n. 27, p. 1-7, 2012.

SHUFORD, J. A.; ROUSE, M. S.; PIPER, K. E.; STECKELBERG, J. M.; PATEL, R. Evaluation of caspofungin and amphotericin b deoxycholate against *Candida albicans* biofilms in an experimental intravascular catheter infection model. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 194, p. 710-713, 2006.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVER, P. M.; OLIVER, B. G.; WHITE, T. C. Characterization of caspofungin susceptibilities by broth and agar in *Candida albicans* clinical isolates with characterized mechanisms of azole resistance. *Medical Mycology*, v. 46, n. 3, p. 231-392, 2008.

SINGH, M.; RAGHAV, N. Biological activities of hydrazones: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 3, p. 26-32, 2011.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOLARI, R.; CORTI, M.; CANGELOSI, D.; ESCUDERO, M.; NEGRONI, R.; SACCHERI, C.; SHTIRBU, R. Disseminated histoplasmosis with lesions restricted to the larynx in a patient with AIDS. Report of a case and review of the literature. *Revista Iberoamericana de Micologia*, n. 24, p. 164-166, 2007.

SOMOSKOVI, A.; PARSONS, L. M.; SALFINGER, M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory Research*, v. 2, n. 3, p. 164-168, 2001.

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

SOUZA, M. B.; MELO, C. S. N.; SILVA, C. S.; SANTO, R. M.; MATAYOSHI, S. Criptococose palpebral: relato de caso. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 69, n. 2, p. 265-267, 2006.

STEVENS, D. A. Advances in systemic antifungal therapy. *Clinics in Dermatology*, v. 30, p. 657–661, 2012.

SUVARAPU, L. N.; SEO, Y. K.; BAEK, Y. S. O.; AMMIREDDY, V. R. Review on analytical and biological applications of hydrazones and their metal complexes. *E-Journal of Chemistry*, v. 9, n. 3, p. 1288-1304, 2012.

TAFF, H. T.; NETT, J. E.; ZARNOWSKI, R.; ROSS, K. M.; SANCHEZ, H.; CAIN, M. T.; HAMAKER, J.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 8, p. 1-13, 2012.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J. S. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

TERZIOGLU, N.; GURSOY, A. Synthesis and anticancer e valuation of some new hydrazone derivatives of 2,6-dimethylimidazo[2,1-b]-[1,3,4]thiadiazole-5-carbohydrazone. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 38, p. 781-786, 2003.

THOMPSON, G. R.; CADENA, J.; PATTERSON, T. F. Overview of Antifungal Agents. *Clinics in Chest Medicine*, v. 30, n. 2, p. 203-215, 2009.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; LASSNIGG, A.; GRANINGER, W.; PRESTERL, E.; In vitro activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 271–274, 2010.

TODESCHINI, A. R.; MIRANDA, A. L. E.; SILVA, K. C. M.; PARRINI, S. C.; BARREIRO, E. J. Synthesis and evaluation of analgesic, antiinflammatory and antiplatelet properties of new 2-pyridylarylhydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 33, p. 189-199, 1998.

TORELLI, R.; POSTERARO, B.; FERRARI, S.; LA SORDA, M.; FADDA, G.; SANGIARD, D.; SANGUINETTI, M. The ATP-binding cassette transporter-encoding gene CgSNQ2 is contributing to the CgPDR1-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. *Molecular Microbiology*, v. 68, n.1, p. 186-201, 2008.

TSANG, P. W-K.; BANDARA, H. M. H. N.; FONG, W-P. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. *Plos One*, v. 7, n. 11, p. e50866, 2012.

UNIS, G.; SEVERO, L. C. Chronic pulmonary Histoplasmosis mimicking tuberculosis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, n. 4, p. 318-324, 2005.

UPPAL, G.; BALA, S.; KAMBOJ, S.; SAINI, M. Therapeutic review exploring antimicrobial potential of hydrazones as promising lead. *Der Pharma Chemica*, v. 3, n. 1, p. 250-268, 2011.

UPPULURI, P.; NETT, J.; HEITMAN, J.; ANDES, D. Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 3, p. 1127–1132, 2008.

VALE, N.; GOMES, P.; SANTOS, H. A. Metabolism of the antituberculosis drug ethionamide. *Current Drug Metabolism*, v. 14, p. 151-158, 2013.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to Fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 6, p. 2303-2311, 2010.

VASCONCELOS, J. N.; LIMA, J. Q.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, M. C. F.; ALMEIDA, M. M. B.; ANDRADE-NETO, M.; MAFEZOLI, J.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R. Estudo químico e biológico de *Tephrosia toxicaria* Pers. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p. 382-386, 2009.

VEEN, M.; LANG, C. Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways. *Biochemical Society Transactions*, v. 33, n. 5, p. 1178-1181, 2005.

VIJAYAN, T.; KLAUSNER, J. D. Integrating clinical services for HIV, tuberculosis, and cryptococcal disease in the developing world: A step forward with 2 novel diagnostic tests. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care*, v. 12, n. 5, 301-305, 2013.

VISBAL, G.; SAN-BLAS, G.; MALDONADO, A.; ALVAREZ-AULAR, A.; CAPPARELLI, M. V.; MURGICH, J. Synthesis, *in vitro* antifungal activity and mechanism of action of four sterol hydrazone analogues against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Steroids*, v. 76, p. 1069-1081, 2011.

WANKE, B.; PEDROSA, P. N.; BRETAS, G. S.; SETUBAL, S. Associação da rifampicina a anfotericina B no tratamento da paracoccidioidomicose. Resultados em três pacientes tratados. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 26, n. 4, p. 205-211, 1984.

WELSH, O.; VERA-CABRERA, L.; RENDON, A.; GONZALEZ, G.; BONIFAZ, A. Coccidioidomycosis. *Clinics in Dermatology*, v. 30, p. 573-591, 2012.

WHEAT, L. J. Therapy for Severe Histoplasmosis: What's Best? *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, n. 3, p. 461-463. 2004.

WHEAT, L. J.; CONNOLLY, P.; SMEDEMA, M.; BRIZENDINE, E.; HAFNER, R. Emergence of resistance to fluconazole as a cause of failure during treatment of histoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency disease syndrome. *Clinical Infectious Diseases*, v. 33, p. 1910-1913, 2001.

WHEAT, L. J.; CONNOLLY, P.; SMEDEMA, M.; DURKIN, M.; BRIZENDINE, E.; MANN, P.; PATEL, R.; MCNICHOLAS, P. M.; GOLDMAN, M. Activity of newer triazoles against *Histoplasma capsulatum* from patients with aids who failed fluconazole. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, n. 6, p. 1235-1239, 2006.

WHEAT, L. J.; CONNOLLY, P.; SMEDEMA, M.; ROGERS, P. D. 2009. Antifungal drug resistance in histoplasmosis. p. 987-992. In: Wheat LJ, DL Mayers (ed.), *Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological aspects*, Humana Press, NY.

WILLS, E. A.; REDINBO, M. R.; PERFECT, J. R.; DEL POETA, M. New potential targets for antifungal development. *Emerging Therapeutic Targets*, v. 4, n. 3, p. 1-32, 2000.

YAMAZAKI, T.; INAGAKI, Y.; FUJII, T.; OHWADA, J.; TSUKAZAKI, M.; UMEDA, I.; KOBAYASHI, K.; SHIMMA, N.; PAGE, M. G. P.; ARISAWA, M. *In vitro* activity of isavuconazole against 140 reference fungal strains and 165 clinically isolated yeasts from Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 36, n. 4, p. 324-331, 2010.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; MUNIZ, M. M.; WANKE, B. Histoplasmosis. In: COURA, J. R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 3a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 1208-1221.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 45, p. 529-564, 2005.

ZHOU, Y.; WANG, G.; LI, Y.; LIU, Y.; SONG, Y.; ZHENG, W.; ZHANG, N.; HU, X.; YAN, S.; JIA, J. In vitro interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and *C. parapsilosis*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, v. 56, n. 6, p. 3250-3260, 2012.

ZUMLA, A.; NAHID, P.; COLE, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 12, n. 5, p. 388-404, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Tabela 8: Identificação, origem, ano de isolamento e procedência das cepas de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* utilizadas na pesquisa.

Número Coleção	Sítio de isolamento	Ano	Localidade
CEMM 03-02-090	Creme leucocitário	2007	Ceará
CEMM 03-03-035	Creme leucocitário	2007	Ceará
CEMM 03-03-054	Creme leucocitário	2007	Ceará
CEMM 03-03-055	Mucosa nasal (gato)	2008	Ceará
CEMM 03-06-059	Mucosa nasal (gato)	2008	Ceará
CEMM 05-01-096	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM 05-01-097	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM 05-02-018	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM 05-02-021	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM 05-02-034	Aspirado medular	2010	Ceará
CEMM 05-02-035	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM 05-02-037	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM 05-02-042	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM 05-02-053	Creme leucocitário	2009	Ceará
CEMM 05-02-074	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM 05-02-084	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM 05-02-085	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM 05-02-086	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM 05-02-087	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM 05-02-088	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM 05-02-091	Creme leucocitário	2010	Ceará
CEMM 05-03-040	Creme leucocitário	2011	Ceará
CEMM 05-04-015	Biópsia	2007	São Paulo
CEMM 05-04-028	Creme leucocitário	2011	Ceará
CEMM 05-05-011	Creme leucocitário	2011	Ceará

APÊNDICE B - Tabela 9: Identificação, espécie, sorotipo e origem de isolamento das cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* utilizadas na pesquisa.

Número Coleção	Espécie	Sorotipo	Origem de isolamento
CEMM 03-02-062	<i>C. gattii</i>	B	Humana
CEMM 03-02-069	<i>C. gattii</i>	B	Humana
CEMM 03-02-070	<i>C. gattii</i>	B	Humana
CEMM 03-02-071	<i>C. gattii</i>	B	Humana
CEMM 03-02-073	<i>C. gattii</i>	B	Humana
CEMM 03-02-074	<i>C. gattii</i>	B	Ambiental
CEMM 03-02-079	<i>C. gattii</i>	B	Ambiental
CEMM 05-03-029	<i>C. gattii</i>	B	Humana
CEMM 05-03-031	<i>C. gattii</i>	B	Humana
CEMM 05-03-032	<i>C. gattii</i>	B	Humana
CEMM 05-03-033	<i>C. gattii</i>	B	Humana
CEMM 05-03-037	<i>C. gattii</i>	B	Humana
CEMM 05-02-023	<i>C. neoformans</i>	A	Humana
CEMM 03-02-057	<i>C. neoformans</i>	A	Humana
CEMM 03-02-060	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental
CEMM 03-02-063	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental
CEMM 03-02-064	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental
CEMM 03-02-066	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental
CEMM 03-02-067	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental
CEMM 03-02-068	<i>C. neoformans</i>	A	Humana
CEMM 03-02-072	<i>C. neoformans</i>	A	Humana
CEMM 03-02-078	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental
CEMM 03-02-080	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental
CEMM 03-06-021	<i>C. neoformans</i>	A	Humana
CEMM 05-01-044	<i>C. neoformans</i>	A	Humana
CEMM 05-01-050	<i>C. neoformans</i>	A	Humana
CEMM 05-01-080	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental
CEMM 05-01-084	<i>C. neoformans</i>	A	Humana
CEMM 05-01-088	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental
Cepas de referência	Espécie	Sorotipo	
WM 175	<i>C. gattii</i>	B	
WM 178	<i>C. gattii</i>	B	
WM 179	<i>C. gattii</i>	B	
WM 779	<i>C. gattii</i>	C	
WM 148	<i>C. neoformans</i>	A	
WM 626	<i>C. neoformans</i>	A	
WM 628	<i>C. neoformans</i>	AD	
WM 629	<i>C. neoformans</i>	D	

APÊNDICE C - Publicações durante o período de doutorado

Synthesis and antifungal activity *in vitro* of isoniazid derivatives against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Aceito)

In vitro inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp.

Medical Mycology (aceito)

Antigens of *Coccidioides posadasii* as an important tool for the immunodiagnosis of Coccidioidomycosis.

Mycopathologia (2013)

Coccidioides posadasii Infection in Bats, Brazil.

Emerging Infectious Diseases (2012)

Ciprofloxacin shows synergism with classical antifungals against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Coccidioides posadasii*.

Mycoses (2012)

Antifolates inhibit *Cryptococcus* biofilms and enhance susceptibility of planktonic cells to amphotericin B.

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (2012)

Synergistic effect of antituberculosis drugs and azoles *in vitro* against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2011)

Cotrimoxazole enhances the *in vitro* susceptibility of *Coccidioides posadasii* to antifungals.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (2011)

ANEXOS

1. MEIOS DE CULTURA

1.1 Ágar Batata

Infusão de batatas* 500 mL

Dextose 10 g

Ágar bacteriológico 15 g

Água deionizada q.s.p. 1000 mL

* 250 g de batatas (*Solanum tuberosum*) cozidas em 500 mL de água por 1 hora, seguido de filtração em gaze e reconstituição do volume para 500 mL.

1.2 Ágar BHI (*Brain Heart Infusion*)

Cérebro-coração, infusão de sólidos 8,0 g

Hidrolisado péptico de tecido animal 5,0 g

Hidrolisado pancreático de caseína 16,0 g

Cloreto de sódio 5,0 g

Glucose 2,0 g

Fosfato dissódico de hidrogênio 2,5 g

Ágar 13,5 g

Água destilada q.s.p 1000 mL

1.3 Ágar Sabouraud dextrose

Glicose 20,0 g

Peptona 10,0 g

Extrato de levedura 5,0 g

Ágar 20,0 g

Água destilada q.s.p. 1000 mL

1.4 Ágar Sabouraud suplementado com sangue de carneiro a 10%

Ágar Sabouraud 6,5g

Água destilada 100 mL

Sangue de carneiro 5 mL

Os meios de cultura foram preparados conforme indicação do fabricante, fervidos para dissolução do ágar e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Em seguida foram esfriados a 50°C e distribuídos em alíquotas de 4,0 mL em tubos de ensaio estéreis sob condições assépticas. O meio ágar Sabouraud suplementado com sangue de carneiro a 5% foi esfriado até 45°C e em seguida adicionado 5% de sangue de carneiro, homogeneizado e distribuído em tubos inclinados estéreis.

1.5 Meio RPMI 1640

RPMI 1640 com glutamina e sem bicarbonato de sódio 10,5 g

Água destilada q.s.p 1000 ml

Adicionar lentamente o pó sob agitação em água destilada e ajustar o pH final para 7,0 utilizando-se solução de MOPS com concentração final de 0,165 mol/L. Completar o volume com água destilada e filtrar em membranas de 0,22 µm de poro, utilizando pressão positiva.

1.6 Ágar C.G.B. (Canavanina, Glicina, Azul de Bromotimol)

Água destilada 880 mL

Solução B 20 mL

Solução A 100 mL

Ágar bacteriológico 20 g

Solução A:

Glicina 10 g

Fosfato de potássio monobásico 1 g

Sulfato de magnésio 1 g

Sulfato de L-canavanina 30 mg

Água destilada q.s.p. 1000 mL

Solução B:

Azul de bromotimol 0,4 g

Hidróxido de sódio 0,01 mol/L 64 mL

Água destilada 36 mL

Preparo da Solução de NaOH 0,01 mol/L:

Hidróxido de sódio - NaOH 0,04 g

Água destilada 100 mL

Dissolver os ingredientes da solução A em água destilada, ajustar o pH para 5,6 e filtrar a solução com filtro 0,22 µm. Estocar em refrigerador. Dissolver o azul de bromotimol em NaOH e adicionar água. Acondicionar em frasco de cor âmbar e manter sob refrigeração. Dissolver completamente o ágar em água destilada. Adicionar a solução B. Autocalvar o meio, por 15 minutos, a 121 °C e resfriar até 48 °C. Acrescentar 100 mL da solução A, homogeneizar o meio e distribuir, alíquotas de 4 mL, em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de aproximadamente 6 cm.

1.7 Ágar Ureia de Christensen's (sólida)

Solução A:

Ágar base ureia (Christensen's) 29 g

Água destilada q.s.p. 100 mL

Solução B:

Ágar bacteriológico 15 g

Água destilada 900 mL

Suspender o ágar base ureia em água destilada, misturar até dissolver completamente. Esterilizar por filtração. Distribuir, alíquotas de 10 mL, e manter, sob refrigeração, até o momento do uso. Dissolver o ágar bacteriológico em água destilada. Distribuir, alíquotas de 90 mL, e esterilizar em autoclave, a 121 °C, por 15 minutos. Para preparar 100 mL de meio, é necessário fundir 90 mL da solução B, esperar esfriar até que esta atinja aproximadamente 50 °C e adicionar 10 mL da solução A. Homogeneizar bem a mistura e distribuir, alíquotas de 1 mL, em tubos de ensaio estéreis. Deixar solidificar na posição inclinada.

2. SOLUÇÕES

2.1 Lactofenol azul-algodão

Ácido láctico 20 g

Fenol 20 g

Glicerina 20 g

Azul-algodão 0,05 g

Água deionizada 20 mL

2.2 Solução Salina

Cloreto de sódio - NaCl 0,85 g

Água deionizada 100 mL

2.3 MOPS (ácido 2-[N-morfolino] propanosulfônico)

MOPS em pó 6,9 g

Dissolver o MOPS em 200 mL de água destilada autoclavada e armazenar na geladeira em garrafa envolvida com papel alumínio.

2.4 Solução alcoólica de KOH 20%

Hidróxido de potássio - KOH em pó 7,89 g

Dissolver o KOH em 50 mL de solução de álcool etílico 60%, utilizar em seguida.

2.5 Tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) acrescido de 0,05% de Tween 20

Cloreto de sódio - NaCl 8 g

Cloreto de potássio - KCl 0,2 g

Fosfato de sódio dibásico - Na₂HPO₄ 1,44 g

Fosfato de potássio monobásico - KH₂PO₄ 0,24 g

Água deionizada 800 mL

Tween 20 500 µL

Água destilada 1000 mL

Dissolver todos os sais em 800 mL de água deionizada. Ajustar o pH para 7,4 utilizando solução de ácido clorídrico 1 mol/L e acrescentar 500 µL de Tween 20, em seguida completar para 1000 mL com água destilada.

2.6 Solução de Cristal Violeta 0,3%

Cristal Violeta em pó 2 g

Álcool etílico 95% 20 mL

Oxalato de amônio 0,8 g

Água destilada 80 mL

Água destilada estéril 8,5 mL

Solução A: dissolver 2 g de cristal violeta em 20 mL de álcool etílico 95%

Solução B: dissolver 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL de água destilada

Misturar as soluções A e B para o preparo da solução-mãe de cristal violeta a 2%. Esterilizar por autoclavação a 121 °C por 15 minutos. Para o preparo de 10 mL da solução de cristal violeta a 0,3%, adicionar 1,5 mL da solução-mãe em 8,5 mL de água destilada estéril.

2.7 Solução de Ácido Acético 33%

Água deionizada 67 mL

Ácido acético P.A. 33 mL

Adicionar 33 mL de ácido acético em 67 mL de água deionizada.