

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Simone Merkel

**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM AÇÃO ANTIFÚNGICA, ISOLADAS E EM  
ASSOCIAÇÃO COM FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS, FRENTE A *MALASSEZIA  
PACHYDERMATIS IN VITRO E IN VIVO***

Porto Alegre

2023

Simone Merkel

**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM AÇÃO ANTIFÚNGICA, ISOLADAS E EM ASSOCIAÇÃO COM FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS, FRENTE A *MALASSEZIA PACHYDERMATIS IN VITRO E IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Farmacologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Régis Adriel Zanette

Porto Alegre

2023

## CIP - Catalogação na Publicação

Merkel, Simone

AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM AÇÃO ANTIFÚNGICA,  
ISOLADAS E EM ASSOCIAÇÃO COM FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS,  
FRENTE A MALASSEZIA PACHYDERMATIS IN VITRO E IN VIVO /  
Simone Merkel. -- 2023.

85 f.

Orientador: Régis Adriel Zanette.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Malassezia pachydermatis. 2. suscetibilidade in  
vitro. 3. infecção sistêmica. 4. Drosophila  
melanogaster. 5. moscas Toll-deficientes. I. Zanette,  
Régis Adriel, orient. II. Título.

Simone Merkel

**AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM AÇÃO ANTIFÚNGICA, ISOLADAS E EM ASSOCIAÇÃO COM FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS, FRENTE A *MALASSEZIA PACHYDERMATIS IN VITRO E IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção  
do título de doutora em Farmacologia e Terapêutica.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Herrmann – UFRGS

---

Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria - UFRGS

---

Dr<sup>a</sup>. Priscilla Maciel Quatrin - UniRitter

---

Dr. Régis Adriel Zanette - UFRGS (orientador)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus  
maiores incentivadores:

**MEUS PAIS**

Essa conquista é para vocês!

## AGRADECIMENTOS

A minha família, minha base, por sempre incentivar os meus estudos. Em especial aos meus pais Fridolino e Emelda, por me mostrarem a importância da dedicação em tudo o que se faz, pela educação, pela disciplina, pelos valores, pela confiança, pelo apoio, pelo amor e pelo carinho que levo sempre comigo, o meu eterno muito obrigada por tudo que me ensinaram, fizeram e fazem por mim; e ao meu irmão Simão e a cunhada Delsi obrigada pelo apoio, compreensão e carinho.

Ao meu orientador, Dr. Régis Adriel Zanette, minha admiração, e respeito pelo excelente profissional e sincero agradecimento pela confiança e oportunidade de fazer parte do teu grupo de pesquisa, ainda mais sendo a primeira aluna deste grupo. Muito obrigada por todos os ensinamentos e pela tua generosidade de me ajudar a crescer profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria, pela parceria nos trabalhos, em especial os testes micológicos realizados em seu laboratório, com uma equipe de pessoas extraordinárias e competentes. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Scroferneker, agradeço pela parceria nos trabalhos, acolhimento na sua equipe, ensinamentos e troca de experiências. Também gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade, pelos promissores compostos fornecidos ao meu trabalho, assim como ao Prof. Dr. Ricardo José Alves, pela síntese de compostos avaliados neste estudo.

Agradeço aos componentes da comissão examinadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula, Prof. Dr. Alexandre e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscilla, pela disponibilidade e atenção em avaliar o meu trabalho; já de antemão o meu sincero agradecimento pelas correções, sugestões e ideias. Ainda, gostaria de agradecer aos órgãos de fomentos, especialmente à CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos colegas de laboratório Jonnathan e Estela e os que por lá passaram Marina, Mirela, Karina, Paula, Julia, Pâmela, Arthur, Helena, Arianne, Marco e Lara pela amizade, carinho e pelo precioso auxílio nas atividades experimentais e troca de experiências.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela parceria e ensinamentos, por terem me apresentado pessoas muito especiais como a Bruna Pippi, que me ensinou desde as coisas mais básicas dentro do laboratório de micologia até as mais complexas; além dos ensinamentos da Gabriella e da Paula que

também foram essenciais para a realização desse trabalho e que inclusive se tornaram amigas da UFRGS para a vida; assim como a Bárbara, Daiane, Bruna Batista, Luana e as demais pessoas do grupo que sempre me acolheram muito bem.

A Angélica Rocha Joaquim, do PPGCF, por sintetizar e disponibilizar os compostos antifúngicos para a realização do meu trabalho, pela sua parceria, ensinamentos e por sua amizade. Ao laboratório de Micologia do ICBS, as alunas Daiane, Amanda, Letícia, Alessandra, Danielle, Carine, Fernanda e Eduarda pelo acolhimento, parceria, ensinamentos e troca de experiências.

Aos professores do PPGFT, que foram essenciais para a minha formação, e aos colegas do PPGFT, em especial a Pricila, Gabriela, Letícia, Rianne e Greice, e a colega e técnica de laboratório Chris, muito obrigada pela essencial ajuda, por todo aprendizado e convívio. Ao departamento de Farmacologia e Terapêutica, ao ICBS e à UFRGS por disponibilizar a infraestrutura e seus servidores.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho. Não tenho palavras para agradecer. MUITO OBRIGADA, por tornarem mais leve e possível a concretização deste sonho, porque é isso que a finalização desta etapa representa para mim.

## RESUMO

*Malassezia pachydermatis* é um fungo leveduriforme comumente encontrado na microbiota de cães saudáveis, principalmente no canal auditivo. Fatores diversos podem desencadear a patogenicidade desse microrganismo, provocando otite externa, dermatite e até mesmo doença sistêmica em animais e humanos. Azóis é a classe mais utilizada para o tratamento e a prevenção da malasseziose. Fungos resistentes aos antimicrobianos têm tornado ainda mais crítico o controle desses microrganismos, pois a incapacidade de responder à terapia antifúngica é complexa e está relacionada com fatores associados aos mesmos e ao hospedeiro. Esse cenário também decorre do número limitado de classes de fármacos antifúngicos e alvos de ação desses. Neste trabalho foi avaliada a atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de azóis e da alilamina terbinafina (TRB), sozinhos e em associação com derivados da 8-hidroxiquinolina (8-HQs) – clioquinol (CQL) e as moléculas 8-hidroxiquinolina-5-(n-4-clorofenil) sulfonamida (PH151) e 8-hidroxiquinolina-5-(n-4-metoxifenil) sulfonamida (PH153), – frente a 16 isolados de *M. pachydermatis*. Os testes *in vitro* de microdiluição em caldo demonstraram que o cetoconazol (KTZ) foi o fármaco mais ativo, seguido pela TRB e pelo CQL. As associações itraconazol (ITZ)+CQL e ITZ+PH151 foram as que resultaram nas maiores porcentagens de sinergismo, e nenhuma combinação resultou em antagonismo. Em geral, o ensaio de tempo de morte demonstrou que todos os compostos antifúngicos apresentaram efeito fungicida frente a *M. pachydermatis*, com diminuição no tempo de morte de acordo com o aumento da concentração do fármaco. Nas avaliações *in vivo*, utilizando moscas *Drosophila melanogaster* Toll-deficientes, a TRB foi o fármaco com as maiores taxas de sobrevivência após sete dias de tratamento, seguido pelo CQL e pelo KTZ. A avaliação da carga fúngica nas moscas mortas ao final do experimento demonstrou maior efeito fungicida dos azóis em relação aos demais fármacos. A associação de azóis ou TRB com 8-HQs não resultou em diferenças significativas em relação aos fármacos sozinhos. Com base nos resultados, conclui-se que as 8-HQs, especialmente o CQL, são potencialmente interessantes para o tratamento das infecções causadas por *M. pachydermatis*.

**Palavras-chave:** *Malassezia pachydermatis*; suscetibilidade *in vitro*; infecção sistêmica; *Drosophila melanogaster*; moscas Toll-deficientes.



## ABSTRACT

*Malassezia pachydermatis* is a yeast fungus commonly found in the microbiota of healthy dogs, mainly in the ear canal. Several factors can trigger the pathogenicity of this microorganism, causing external otitis, dermatitis and even systemic disease in animals and humans. Azoles are the most used class for the treatment and prevention of malasseziosis. Antimicrobial resistant fungi have made the control of these microorganisms even more critical, as the inability to respond to antifungal therapy is complex and is related to factors associated with the microorganism and the host. This scenario also stems from the limited number of classes of antifungal drugs and their targets of action. In this work, the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of azoles and terbinafine (TRB), an allylamine, alone and in combination with derivatives of 8-hydroxyquinoline (8-HQs) – clioquinol (CQL) and molecules 8-hydroxyquinoline-5-(n-4-chlorophenyl) sulfonamide (PH151) and 8-hydroxyquinoline-5-(n-4-methoxyphenyl) sulfonamide (PH153), – was evaluated against 16 isolates of *M. pachydermatis*. *In vitro* broth microdilution tests showed that ketoconazole (KTZ) was the most active drug, followed by TRB and CQL. The combinations itraconazole (ITZ)+CQL and ITZ+PH151 resulted in the highest percentages of synergism, and no combination resulted in antagonism. In general, the time-kill assay demonstrated that all antifungal compounds showed a fungicidal effect against *M. pachydermatis*, with a decrease in the time of death according to the increase in drug concentration. In *in vivo* evaluations using *Toll*-deficient *Drosophila melanogaster* flies, TRB was the drug with the highest survival rates after seven days of treatment, followed by CQL and KTZ. The evaluation of fungal burden in dead flies at the end of the experiment showed a greater fungicidal effect of azoles compared to other drugs. The combination of azoles or TRB with 8-HQs did not result in significant differences from the drugs alone. Based on the results, it is concluded that the 8-HQs, especially the CQL, are potentially interesting for the treatment of infections caused by *M. pachydermatis*.

**Keywords:** *Malassezia pachydermatis*; *in vitro* susceptibility; systemic infection; *Drosophila melanogaster*; *Toll*-deficient flies.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação dos principais antifúngicos disponíveis comercialmente .....	21
Figura 2 – Estrutura química da 8-hidroxiquinolina .....	33
Figura 3 – Estrutura química do clioquinol .....	34
Figura 4 – Estruturas químicas do PH151 (A) e do PH153 (B) .....	35
Figura 5 – Estrutura química da molécula 2j .....	36
Figura 6 – Sequência de adição dos componentes na realização dos testes de suscetibilidade antifúngica.....	42
Figura 7 – Ordem de pipetagem dos compostos na microplaca e sua diluição no teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> .....	43
Figura 8 - Processos sequenciais de macro e microdiluição para o ensaio de tempo de morte .....	45
Figura 9 – Ensaio de tempo de morte para <i>M. pachydermatis</i> ATCC 14522 frente aos antifúngicos ITZ, TRB, CQL, PH151 e PH153, nas diferentes CIMs .....	55
Figura 10 – Determinação da toxicidade de antifúngicos azóis, TRB e 8-HQs.....	56
Figura 11 – Curvas de sobrevivência de moscas <i>D. melanogaster</i> <i>Toll</i> -deficientes infectadas com <i>M. pachydermatis</i> e tratadas com KTZ, CTZ, FCZ, ITZ, MCZ e TRB (A) e com CQL, PH151 e PH153 (B).....	57
Figura 12 – Cargas fúngicas obtidas de moscas mortas após sete dias de infecção com <i>M. pachydermatis</i> e tratadas com agentes antifúngicos azólicos, TRB e 8-HQs.....	58
Figura 13 - Curvas de sobrevivência de moscas <i>D. melanogaster</i> <i>Toll</i> -deficientes infectadas com <i>M. pachydermatis</i> e tratadas com fármacos em associação.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da concentração inibitória mínima (CIM) entre os 16 isolados de <i>M. pachydermatis</i> testados.....	50
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) individual e entre combinações de antifúngicos frente a 11 isolados de <i>M. pachydermatis</i> .....	52
Tabela 3 – Suscetibilidade aos fármacos sozinhos dos 11 isolados de <i>M. pachydermatis</i> utilizadas no teste de combinação de fármacos <i>in vitro</i> .....	53
Tabela 4 – Resultados das combinações <i>in vitro</i> de fármacos e interpretação das interações frente a 11 isolados de <i>M. pachydermatis</i> .....	53

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Combinações de substâncias antifúngicas no teste de sinergismo <i>in vitro</i> e as concentrações testadas.....	43
Quadro 2 – Grupos de tratamento de antifúngicos utilizados no teste de combinação de fármacos <i>in vivo</i> .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2j – 1,3-bis(3,4-diclorofenoxi) propano-2-cloreto de aminio
- 5-FC – Flucitosina
- 8-HQ – 8-hidroxiquinolina
- AFG – Anidulafungina
- AmB - Anfotericina B
- ANT – Antagonismo
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- CBPs – *Clinical breakpoints*
- CFG – Caspofungina
- CFU – Unidades formadoras de colônias
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CO<sub>2</sub> – Gás carbônico
- CQL – Clioquinol
- CTZ – Clotrimazol
- CYP51 – Enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DNAr – Ácido desoxirribonucleico ribossomal
- EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- FCZ – Fluconazol
- FDA – *Food and Drug Administration*
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- ICIF – Índice de concentração inibitória fracionada
- ICSRC – Infecções da corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateteres
- IND – Indiferença
- INT – Interpretação
- ICZ – Isavuconazol
- ITZ – Itraconazol
- KTC – Cetoconazol

MALDI-TOF – Espectrometria de massa por meio de ionização e dessorção a laser assistida por matriz por tempo de voo

MCZ – Miconazol

MDR – *Multiple drug resistance*

MFG – Micafungina

MG – Média geométrica

NIS – Nistatina

pH – Potencial hidrogeniônico

PH151 – molécula 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil) sulfonamida

PH153 – molécula 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-metoxifenil) sulfonamida

PCZ – Posaconazol

RNA – Ácido ribonucleico

SDA – Ágar Sabouraud dextrose

SIN – Sinergismo

SMON – Síndrome subaguda de mieloneuropatia óptica

TCZ – Terconazol

TRB – Terbinafina

UFC – Unidades formadoras de colônia

UTI – Unidade de terapia intensiva

VCZ – Voriconazol

WT – *Wild-type*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
2.1	<i>Malassezia pachydermatis</i> .....	17
2.2	TERAPIA ANTIFÚNGICA.....	21
<b>2.2.1</b>	<b>Azóis</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Polienos</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Equinocandinas</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Alilaminas</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Outros fármacos com atividades antifúngicas</b> .....	<b>26</b>
2.3	TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....	28
2.4	RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA .....	29
2.5	NOVOS AGENTES ANTIFÚNGICOS .....	31
<b>2.5.1</b>	<b>8-Hidroxiquinolinas</b> .....	<b>33</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Bisariloxipropanaminas</b> .....	<b>36</b>
2.6	SELEÇÃO DE MOLÉCULAS PARA TESTES EM MODELOS ANIMAIS .....	36
2.7	<i>Drosophila melanogaster</i> .....	37
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
4.1	TESTES <i>IN VITRO</i> .....	40
<b>4.1.1</b>	<b>Isolados de <i>M. pachydermatis</i></b> .....	<b>40</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Teste de suscetibilidade</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Combinação de fármacos</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Ensaio de tempo de morte (<i>time-kill</i>)</b> .....	<b>44</b>
4.2	TESTES <i>IN VIVO</i> .....	45
<b>4.2.1</b>	<b><i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>45</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Antifúngicos</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Inóculo fúngico</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Infecção das moscas</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Carga fúngica</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Combinação de fármacos</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>

5.1	TESTES <i>IN VITRO</i> .....	50
5.1.1	Suscetibilidade .....	50
5.1.2	Combinação de fármacos <i>in vitro</i> .....	51
5.1.3	Ensaio de tempo de morte ( <i>time-kill</i> ).....	53
5.2	TESTES <i>IN VIVO</i> .....	56
5.2.1	Teste de toxicidade .....	56
5.2.2	Perfil de sobrevivência .....	56
5.2.3	Avaliação da carga fúngica .....	57
5.2.4	Combinação de fármacos <i>in vivo</i> .....	59
6	DISCUSSÃO .....	61
7	CONCLUSÃO .....	67
	REFERÊNCIAS.....	69



## 1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas vêm crescendo desproporcionalmente nos últimos anos, representando uma grande ameaça global aos níveis de saúde, ocorrendo em aproximadamente 1,2 bilhão de indivíduos com pelo menos 1,5 milhão de mortes a cada ano (PIANALTO e ALSPAUGH, 2016; CAMPOY e ADRIO, 2017; FUENTEFRIA et al., 2017). Índices elevados de morbidade e mortalidade ocorrem principalmente em pacientes imunocomprometidos, em especial os que fazem uso de quimioterapia anticancerígena, tratamento longínquo com corticosteroides e os transplantados, onde se desenvolvem infecções invasivas profundas com infecções da corrente sanguínea e sistêmica, assim como infecção de órgãos específicos (CHANG et al., 2017; CAMPOY e ADRIO, 2017). Além disso, os fungos causam uma alta incidência de infecções superficiais na pele e em mucosas, diminuindo a qualidade de vida dos indivíduos afetados (SCORZONI et al., 2017; VAN DIJCK et al., 2018).

Os altos índices de morbimortalidade ainda estão associados ao atual arsenal antifúngico limitado, à alta toxicidade dos compostos e à resistência à praticamente todos os agentes antifúngicos existentes. Há uma necessidade urgente no desenvolvimento de novos antifúngicos que sejam mais seguros, eficazes e com novos alvos específicos no controle destas infecções. Neste contexto, um grande desafio no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos é a semelhança entre as células fúngicas e as humanas (GINTJEE, DONNELLEY, THOMPSON III, 2020; NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016).

O aquecimento global é um fator relevante para o desenvolvimento de doenças fúngicas, pois se este não for controlado, poderá haver um aumento concomitante de isolados fúngicos capazes de se desenvolver à temperatura corporal dos mamíferos (NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016; CHANDRIKA e SHARMA, 2020).

*Malassezia pachydermatis* é um fungo oportunista, vive em comensalismo na pele normal de cães, gatos e outros animais, colonizando a pele e os sítios das mucosas de cães saudáveis (CHEN e HILL, 2005), o canal auditivo e a pele de cães, gatos e outros animais de sangue quente, além de morcegos, provocando otite externa, dermatite e doença sistêmica em animais e humanos, sendo nestes, um agente esporádico de infecções (VELEGRAKI et al., 2015; LORCH et al., 2018; RHIMI et al., 2020).

O tratamento de *M. pachydermatis* pode ser tópico, para lesões locais e casos recorrentes, e/ou sistêmico, para casos extensos, com recidivas ou quando o tratamento tópico não apresentar resultados. A terapia antifúngica deve ser escolhida com muito rigor, principalmente em casos de falha de tratamento antifúngico, pois tratamentos de infecções crônicas e recorrentes, na maioria dos casos, não apresentam eficácia (CAFARCHIA et al., 2012a; HOBI et al., 2022).

Estão disponíveis no mercado quatro principais classes de agentes antifúngicos: azóis, equinocandinas, polienos e alilaminas (CAMPOY e ADRIO, 2017; CHANG et al., 2017; HOWARD et al., 2020). Nem todas as classes têm ação contra *M. pachydermatis*, mas as que são frequentemente utilizadas, como os azóis e os polienos, vêm apresentando sérios problemas de resistência antifúngica (JESUS et al., 2011).

A atual necessidade de desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, assim como a revalidação dos já existentes e introdução de novas estratégias terapêuticas, nos deparamos com os derivados da 8-hidroxiquinolina (8-HQ), que vêm demonstrando potencial atividade antifúngica (PIPPI et al., 2017).

Entre os derivados das 8-HQs testamos o fármaco clioquinol (CQL) e as moléculas 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil) sulfonamida (PH151) e 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-metoxifenil) sulfonamida (PH153). O CQL já vem sendo utilizado como antisséptico tópico (ALSTERHOLM, KARAMI, FAERGEMANN, 2010), e vem sendo testado como antifúngico de uso sistêmico contra diversos fungos, como *Candida* spp., enquanto as moléculas PH151 e o PH153 também vêm demonstrando atividade antifúngica contra diversas classes de fungos (PIPPI et al., 2017; JOAQUIM et al., 2019), só que de forma experimental.

A partir das diversas dificuldades observadas com os tratamentos existentes de *M. pachydermatis*, tópicos e sistêmicos, testamos os principais fármacos utilizados na clínica, assim como novas moléculas com potencial atividade antifúngica, na tentativa de descobrir compostos com atividades mais promissoras para o tratamento, bem como a associação de fármacos e moléculas que possam apresentar uma atividade sinérgica potencial frente a esta infecção fúngica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Malassezia pachydermatis*

O gênero *Malassezia* foi descrito pela primeira vez por Baillon, em 1889, classificado atualmente no reino Fungi, filo Basidiomycota, subfilo Ustilagomycotina, classe Exobasidiomycetes, ordem Malasseziales compondo a família *Malasseziaceae* (SCHLOTTFELDT et al., 2002; BATRA et al., 2005; GAITANIS et al., 2012). É composto por 18 espécies de fungos leveduriformes lipodependentes, presentes principalmente em humanos (LORCH et al., 2018; GUILLOT e BOND, 2021), sendo todas as espécies classificadas e identificadas com base em sequências de ácido desoxirribonucleico ribossomal (DNAr) na região 26S (CABAÑES et al., 2016; LORCH et al., 2018; HOBI et al., 2022).

*M. pachydermatis* foi identificada em 1925 por Weidman e descrita pela primeira vez por Dodge, em 1935. É uma levedura unicelular, com formato oval pequeno, aspecto de amendoim (CHEN e HILL, 2005), brotação unipolar (MASON et al., 2013), coloração fosca, aspecto cremoso, e textura macia, chegando a ser friável (MARASCHIN et al., 2008). Assim como as demais espécies de *Malassezia*, recentemente *M. pachydermatis* também foi reconhecida como lipodependente, ou seja, exige uma fonte externa de lipídios para o seu crescimento, e como as demais espécies, não possui o gene que codifica a síntese de ácidos graxos (PUIG et al., 2017; GUILLOT e BOND, 2021), deixando de ser a única lipofílica, incapaz de sintetizar ácidos graxos (ROJAS et al., 2014; WU et al., 2015). As leveduras podem ser cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (SDA) ou meio de Dixon, a 37 °C, não podendo ultrapassar 41 °C (LACAZ et al., 2002; CHEN e HILL, 2005). *M. pachydermatis* é uma levedura principalmente zoofílica, infectando primariamente animais (ILAHÍ et al., 2018).

*Malassezia* spp. vivem em comensalismo na pele normal de animais e humanos, onde coloniza a pele e os sítios das mucosas de cães saudáveis, o canal auditivo e a pele de cães, gatos e outros animais de sangue quente (BOND, GUILLOT, CABAÑES, 2010; VELEGRAKI et al., 2015; WU et al., 2015), além de animais selvagens como os morcegos, onde explora nutrientes essenciais ao crescimento (LORCH et al., 2018). Alterações neste processo levam a adaptação, modificando a

expressão de enzimas, lipases, fosfolipases e proteases que contribuem para a inflamação cutânea, as alterações no pH, a liberação de eucosanoides e a ativação do complemento (MATOUSEK et al., 2003; LAUTERT et al., 2011; BUOMMINO et al., 2013).

A ativação do sistema imune do hospedeiro ocorre pela presença de antígenos da *Malassezia* que estimulam respostas imunológicas inatas, as quais são mediadas por anticorpos e células, desencadeando reações de hipersensibilidade (BOND, PATTERSON-KANE, LLOYD, 2004; GUILLOT e BOND, 2021). A patogenicidade das leveduras é controlada por meio das alterações nos processos físicos, químicos ou imunológicos da pele, bem como, pelos fatores de virulência da própria levedura (WHITE et al., 2014; VELEGRAKI et al., 2015; RHIMI et al., 2020). Estações do ano como o verão e a primavera, que apresentam climas quentes e úmidos, são mais propícias para o desenvolvimento de dermatite em animais e humanos, em especial nas dobras cutâneas, onde a umidade e as alterações lipídicas na superfície da pele favorecem a disponibilidade de nutrientes para a colonização da levedura, que passa da forma comensal para a patogênica, com aparecimento de prurido no local (CHEN e HILL, 2005; BRILHANTE et al., 2018; THEELEN et al., 2018; BOND, GUILLOT, CABAÑES, 2010). Portanto, quaisquer alterações nos processos normais de homeostasia das leveduras podem desencadear otite externa em animais de estimação, dermatite e doença sistêmica em animais e humanos (JESUS et al., 2011; SCHLEMMER et al., 2019; SAUNTE, GAITANIS, HAY, 2020).

A otite externa canina é uma inflamação do canal auditivo, que ocorre pela presença de condições subjacentes do animal, como anomalias ou alterações anatômicas que criam estenose do canal auditivo, maior secreção ou retenção de cerúmen, umidade e inibição da circulação de ar (CHEN e HILL, 2005; CAFARCHIA et al., 2014; CHIAVASSA, TIZZANI, PEANO, 2014). A partir dessas doenças inflamatórias primárias do canal auditivo, a otite externa pode se desenvolver pela presença de ectoparasitas, corpos estranhos, hipersensibilidade, distúrbios de queratinização e neoplasia, podendo ser considerada aguda ou crônica, quando durar mais que dois meses (MASON et al., 2013; CHIAVASSA, TIZZANI, PEANO, 2014).

Dermatite ocorre em animais com doenças inflamatórias da pele, apresentando lesões eritematosas ou gordurosas, prurido, hipersensibilidade, presença de ectoparasitas, infecção bacteriana, endocrinopatias, ou defeitos de queratinização

(NEGRE, BENSIGNOR, GUILLOT, 2009; VELEGRAKI et al., 2015), apresentando odor fétido e rançoso, com consistência ceruminosa e raramente purulenta (CHEN e HILL, 2005; BOND, GUILLOT, CABAÑES, 2010). Alterações na imunidade do hospedeiro são um fator condicionante para o desenvolvimento da dermatite (SANTIN et al., 2014), mas em humanos é considerada eventual (ILAHI et al., 2018).

A doença sistêmica em animais é muito pouco mencionada, embora ela possa se desenvolver a partir da presença de dermatite atópica ou seborreica, infecção parasitária, diabetes *mellitus* canino, infecção pelo vírus da imunodeficiência felina ou pelo vírus da leucemia felina, além do uso prolongado de antibióticos associados a glicocorticoides (CHEN e HILL, 2005; VELEGRAKI et al., 2015). As infecções invasivas de *M. pachydermatis* e *Malassezia* spp. em humanos vêm sendo descritas há bastante tempo, desde 1979, quando Wallace e colaboradores a presenciaram em um paciente de unidade de terapia intensiva (UTI) (GAITANIS et al., 2012). A infecção sistêmica em humanos, conhecida como fungemia, comumente se desenvolve em pacientes que recebem nutrição parenteral total por meio de cateter venoso central, como recém-nascidos, bebês com baixo peso ao nascer (<1500 g) e prematuros (23 a 27 semanas) (CHANG et al., 1998; CHRYSANTHOU, BROBERGER, PETRINI, 2001; ALSWEITH et al., 2014; IATTA et al., 2018; ILAHI et al., 2018), além de pacientes imunodeprimidos, como pacientes trombocitopênicos, leucêmicos e pacientes submetidos à transplante de medula óssea (CHOUDHURY e MARTE, 2014; IATTA et al., 2014; ROMAN et al., 2016; LEE et al., 2019).

As infecções da corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateteres (ICSRC) ocorrem desde a inserção, manipulação ou manutenção, pelas mãos da equipe de saúde ou do cuidador, pela microbiota da pele do paciente, pelo uso de solução contaminada, pela colonização do conector e pela permanência do cateter por mais de sete dias (LONA-REYES et al., 2016; CHAVES et al., 2018). As mãos da equipe de saúde colonizadas com *M. pachydermatis*, obtida de cães de estimação, têm sido um dos agravantes mais observados (CHANG et al., 1998; CHRYSANTHOU, BROBERGER, PETRINI, 2001; HOBI et al., 2022). A rápida identificação microbiana de pacientes com suspeita de infecção da corrente sanguínea, através de espectrometria de massa por meio de ionização e dessorção a laser assistida por matriz por tempo de voo (MALDI-TOF), reduz o tempo de identificação dos microrganismos e agiliza o atendimento (KOLECKA et al., 2014; YAMAMOTO et al.,

2014). As ICSRC estão associadas ao aumento de morbimortalidades e dos custos hospitalares, ficando entre 15 e 30% de todas as bacteremias nosocomiais hospitalares (DAS NEVES JUNIOR et al., 2010; PERIN et al., 2016).

Nos casos de fungemia por *Malassezia* spp. em UTIs, a remoção do cateter na maioria dos casos leva à resolução da infecção, assim como a administração de um antifúngico sistêmico e a descontinuação da infusão de lipídios. De forma a evitar a propagação da infecção nestes ambientes, é indispensável a adesão da equipe de saúde a medidas de higiene padrão, como a lavagem correta e assepsia das mãos (CHANG et al., 1998; THEELEN et al., 2018; RHIMI et al., 2020).

A resistência ao tratamento e as infecções recorrentes levam à doença crônica, o que torna a terapia convencional ineficaz, exigindo fármacos cada vez mais potentes ou uso de doses próximas a concentrações tóxicas dos antimicrobianos, que na maioria dos casos, não apresentam eficácia (ARENDRUP et al., 2013; SARDI et al., 2014; ANGILERI et al., 2019). Nas terapias de longo prazo, acima de quatro semanas, o menor risco de toxicidade faz com que os tratamentos tópicos sejam preferenciais aos sistêmicos, pois disponibilizam uma alta concentração do fármaco para a área desejada e efeitos limitados. Independentemente do tipo de tratamento, estes resultam em taxas de cura elevadas, mas não evitam a recidiva (NEGRE, BENSIGNORT, GUILLOT, 2009; GAITANIS et al., 2012; CAFARCHIA et al., 2014). O tratamento tópico de *M. pachydermatis* é indicado em casos de poucas lesões locais e na profilaxia das recidivas, enquanto o tratamento sistêmico é eficaz nas formas clínicas extensas, infecções recorrentes ou na falha da terapêutica tópica, sendo a escolha do fármaco feita de acordo com a gravidade da lesão e a sua viabilidade (CAFARCHIA et al., 2012a; THEELEN et al., 2018).

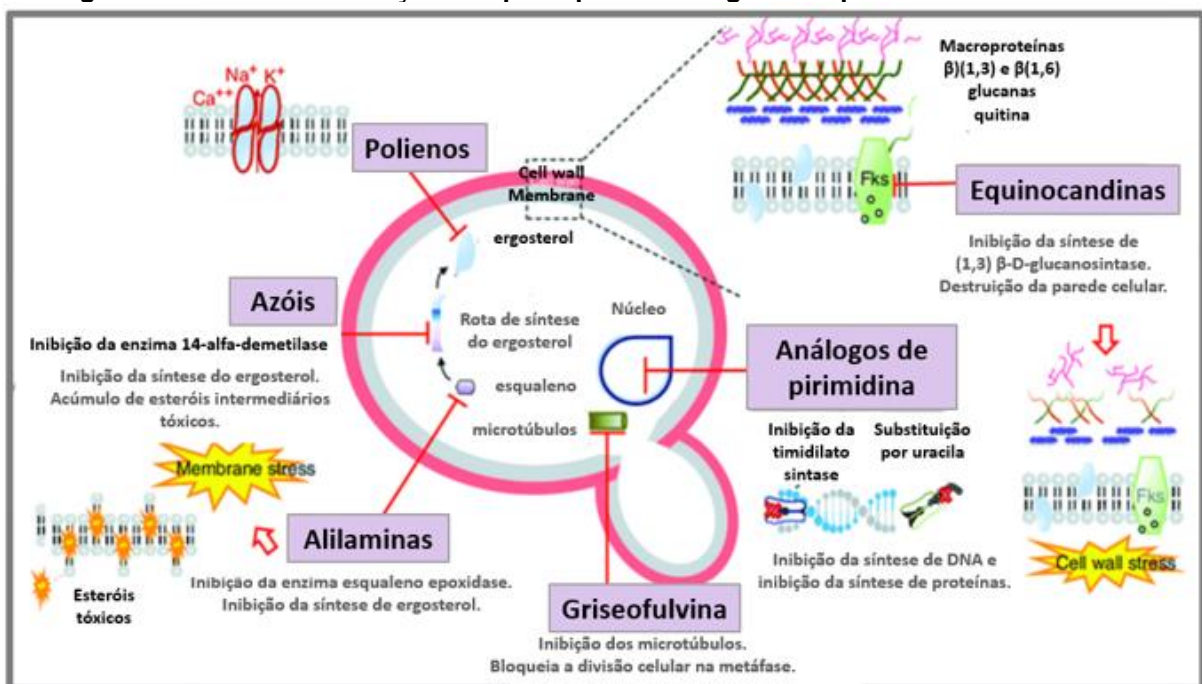
Para o tratamento de *M. pachydermatis* estão disponíveis agentes antissépticos como sulfeto de selênio e clorexidina, além de terapia sistêmica e tópica com agentes antifúngicos das classes dos azóis, como cetoconazol (KTC), miconazol (MCZ), clotrimazol (CTZ), econazol (ECZ), fluconazol (FCZ), itraconazol (ITZ), voriconazol (VCZ) e posaconazol (PCZ); das alilaminas, a terbinafina (TRB); e dos polienos, a anfotericina B (AmB) e a nistatina (NIS); além do antiparasitário tiabendazol (TBZ), sendo estes os mais utilizados e estudados (GAITANIS et al., 2012; IATTA et al., 2016; THEELEN et al., 2018; PEANO et al., 2020; HOBI et al., 2022). O KTC e o ITZ são os fármacos que apresentam a maior atividade antifúngica *in vitro* contra todas as

espécies de *Malassezia* e são os fármacos de primeira escolha para tratamento sistêmico, em especial nas formas estendidas, graves ou recorrentes (CARRILLO-MUNOZ et al., 2013; PEANO et al., 2017). Peano e col. (2020) fizeram uma revisão sobre vários trabalhos publicados sobre suscetibilidade *in vitro* de agentes antifúngicos frente a *M. pachydermatis* e observaram que o ITZ e o PCZ foram os mais ativos, seguidos pelo KTZ, enquanto o FCZ se mostrou pouco eficaz.

## 2.2 TERAPIA ANTIFÚNGICA

Quatro principais classes de agentes antifúngicos estão atualmente disponíveis para uso clínico: azóis, polienos, equinocandinas e alilaminas, sendo usados por via oral, tópica ou intravenosa, para o tratamento de infecções fúngicas. Atuam principalmente na membrana citoplasmática, na parede celular, na síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e nas proteínas (Figura 1) (CAMPOY e ADRIO, 2017; HOWARD et al., 2020; BOUZ e DOLEZAL, 2021).

Figura 1 – Mecanismo de ação dos principais antifúngicos disponíveis comercialmente



Fonte: Adaptado de Musculoskeletal Medicine (2020).

### 2.2.1 Azóis

Antifúngicos sintéticos de amplo espectro, os azóis são os mais utilizados para o tratamento e a prevenção de doenças fúngicas (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012). Agem inibindo a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51) codificada pelo gene *ERG11*, responsável pela remoção oxidativa da metila do lanosterol na rota biossintética do ergosterol, resultando na interrupção da biossíntese do ergosterol, que é essencial para manter a integridade da membrana fúngica (CHANG et al., 2017; HOWARD et al., 2020). Esse processo leva ao acúmulo de esteróis 14-metilados (precursores do ergosterol) que conduzem à síntese de 14 $\alpha$ -metil-3,6-diol, que é tóxico para as células fúngicas (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; CAMPOY e ADRIO, 2017).

A classe dos azóis está dividida em dois grupos de fármacos, os imidazóis e os triazóis. Os imidazóis foram os precursores entre os azóis, surgiram nos anos 1960, com o MCZ (comercializado em 1974), CTZ (1975), KTZ (1981), ECZ (1982), tioconazol (1983), sulconazol (1989), e mais recentemente o sertaconazol (2003) e o luliconazol (2013) (NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016; HOWARD et al., 2020).

A atividade antifúngica dos imidazóis ocorre pela presença de pelo menos um anel imidazólico que se liga à molécula através de uma ligação C-N (carbono-nitrogênio) (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; LACAZ et al., 2002). Os imidazóis estão disponíveis apenas para tratamentos de uso tópico, na forma de creme, pó, solução, loção ou xampu, pois apresentam elevada toxicidade quando administrados por via oral. O KTZ é o único representante dos imidazóis disponível tanto para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas quanto tópicas, apesar dos inúmeros problemas apresentados, como a má absorção por via oral e a elevada toxicidade hepática. É também administrado na forma de comprimidos, xampu ou creme (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; RANG et al., 2016).

Entre os triazóis, temos o terconazol (TCZ) (1981), FCZ (1990), ITZ (1992), VCZ (2002), PCZ (2006), e o pró-fármaco do isavuconazol (ICZ), também chamado de isavuconazônio (2015) (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; CHANG et al., 2017; HOWARD et al., 2020). São derivados modificados no anel ativo, apresentando três átomos de nitrogênio, e apresentam maior espectro de ação e melhor perfil de



segurança em relação aos imidazóis (CAMPOY e ADRIO, 2017; BOUZ e DOLEZAL, 2021). Os triazóis podem ser administrados pela via oral, como cápsulas, comprimidos ou suspensões; pela via tópica, como loção ou supositório ou por soluções intravenosas (RANG et al., 2016; GINTJEE, DONNELLEY, THOMPSON III, 2020). ITZ e FCZ são os triazóis de primeira escolha, mas ambos estão associados ao aumento da resistência antifúngica devido à sua ação fungistática. Isto levou ao desenvolvimento da segunda geração de triazóis, representada por VCZ, PCZ, TCZ e ICZ, a qual foi desenvolvida com efeito fungicida (CAMPOY e ADRIO, 2017; HOWARD et al., 2020).

### 2.2.2 Polienos

Fazem parte deste grupo de produtos naturais a NIS (1950), isolada a partir de bactérias *Streptomyces noursei*, a AmB (1953), que foi isolada eventualmente por amostras de solo na Venezuela a partir de *S. nodosum* e a natamicina (1960), obtida a partir de *S. natalenses*. O grupo dos polienos é constituído por mais de 200 compostos, mas apenas estes três possuem atividade clínica (PRAJNA et al., 2010; NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016; CAMPOY e ADRIO, 2017).

A estrutura dos polienos é constituída por um anel de macrolactona insaturado composto de 20 a 40 carbonos ligados a um sacarídeo de d-micosamina (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; CAMPOY e ADRIO, 2017; HOWARD et al., 2020). Nas células fúngicas ligam-se à bicamada lipídica e formam um complexo com o ergosterol produzindo poros, levando à ruptura da membrana celular e consequente ao vazamento do conteúdo citoplasmático, resultando em morte celular fúngica (NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016; CAMPOY e ADRIO, 2017; GINTJEE, DONNELLEY, THOMPSON III, 2020).

A NIS, por ser muito tóxica, não pode ser utilizada para o tratamento de infecções sistêmicas, portanto é utilizada apenas para uso tópico de infecções fúngicas, na forma de creme ou suspensão (HOWARD et al., 2020). A AmB foi o primeiro fármaco a tratar infecções fúngicas sistêmicas profundas, é o polieno mais comumente utilizado e o "padrão ouro" de agentes antifúngicos para infecções sistêmicas. Apresenta atividade fungicida de amplo espectro contra leveduras e

fungos filamentosos. A administração intravenosa se faz necessária devido a sua hidrofobicidade e má absorção através do trato gastrointestinal, o que pode desencadear efeitos adversos graves, como nefrotoxicidade, anormalidades eletrolíticas e reações graves relacionadas à infusão. Devido à alta toxicidade e à excelente eficácia da AmB, foi necessário fazer alterações nas formulações e foram desenvolvidos um complexo lipídico de AmB e a AmB lipossomal, os quais são combinações de AmB e lipídios, o que melhora o seu perfil de segurança e eficácia (CHANG et al., 2017; CAMPOY e ADRIO, 2017; HOWARD et al., 2020). A NAT é usada topicamente, como colírio, para infecções fúngicas oculares (HOWARD et al., 2020).

Apesar de quase insignificante, a afinidade dos polienos com o colesterol humano explica a alta toxicidade associada a estes antifúngicos, que é responsável por vários dos seus efeitos colaterais (CAMPOY e ADRIO, 2017; HOWARD et al., 2020; GINTJEE, DONNELLEY, THOMPSON III, 2020). Os polienos são fungicidas e têm o mais amplo espectro de atividade em comparação com quaisquer outras moléculas antifúngicas, além de apresentar um perfil de resistência bastante raro na clínica (CHANG et al., 2017; CAMPOY e ADRIO, 2017).

### 2.2.3 Equinocandinas

As equinocandinas compõem a última classe de antifúngicos descoberta. São lipopeptídeos semissintéticos que passaram por alterações estruturais para alcançar um resultado terapêutico desejado (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; HOWARD et al., 2020). O grupo das equinocandinas é composto pela caspofungina (CFG) (2001), derivada de pneumocandina B produzida por *Glarea lozoyensi*; pela micafungina (MFG) (2005), um produto semissintético de equinocandina B produzida por *Aspergillus nidulans*; e pela anidulafungina (AFG) (2006), produzida por modificação química de uma fermentação de *Coleophoma empetri* (NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016; CHANG et al., 2017; CAMPOY e ADRIO, 2017).

Compostas de um núcleo hexapeptídeo com cadeias laterais lipídicas variáveis, as equinocandinas visam a síntese de glucanos, onde agem como inibidores não competitivos do complexo enzimático de  $\beta$ -1,3-D-glucano sintetase, visando a

subunidade Fsk1, que leva à ruptura da parede celular, com consequente instabilidade osmótica e morte das células fúngicas. Os glucanos são polissacarídeos compostos de monômeros de D-glicose interligados por ligações  $\beta$ -(1-3) ou  $\beta$ -(1-6)-glucano, onde o  $\beta$ -(1-3)-D-glucano corresponde a 50% da parede celular (CAMPOY e ADRIO, 2017; HOWARD et al., 2020).

As equinocandinas são amplamente utilizadas para o tratamento de infecções fúngicas invasivas, apesar de seu uso limitado pela falta de formulações orais, que ocorre devido ao alto peso molecular e por não serem estáveis em meio ácido. Estão disponíveis apenas como infusões intravenosas uma vez ao dia, isso porque apresentam curto tempo de meia-vida, sendo, portanto, utilizadas apenas em âmbito hospitalar (NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016; CHANG et al., 2017; GINTJEE, DONNELLEY, THOMPSON III, 2020). Apresentam bom perfil de segurança, menos interações medicamentosas, além de baixa toxicidade, pois agem contra um único alvo, as células fúngicas, sendo atualmente os fármacos antifúngicos mais seguros disponíveis (CHANG et al., 2017; CAMPOY e ADRIO, 2017; HOWARD et al., 2020).

CFG, MFG e AFG são fungicidas contra muitas espécies de *Candida* e fungistáticas contra *Aspergillus* spp. A AFG apresenta vantagem, quanto a sua degradação corporal sem envolvimento hepático ou renal, podendo, portanto, ser usada em pacientes com insuficiências hepática ou renal (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; CAMPOY e ADRIO, 2017).

#### **2.2.4 Alilaminas**

As alilaminas são agentes fungicidas sintéticos que interferem na síntese do ergosterol por meio da inibição da enzima biossintética esqualeno epoxidase, que ocorre pela conversão de esqualeno epoxidase em esqualeno-2,3-epóxido. A inibição desta enzima leva ao acúmulo de esqualeno, o que pode aumentar a permeabilidade e conseqüentemente o rompimento da organização celular (CAMPOY e ADRIO, 2017; HOWARD et al., 2020; GINTJEE, DONNELLEY, THOMPSON III, 2020). As alilaminas são inibidores reversíveis e não competitivos dessa enzima e surgiram como

alternativa para superar o problema de seletividade entre as enzimas fúngicas (NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016; CAMPOY e ADRIO, 2017).

Representam este grupo a TRB (1996), naftidina (1988) e butenafina (1996) (NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016), na forma de pós, cremes, pomadas e sprays, utilizados para o tratamento tópico de infecções cutâneas desenvolvidas por micoses. Apenas a TRB foi aprovada para uso oral na forma de comprimidos, para o tratamento de onicomicoses, isto porque interfere tanto na biossíntese do colesterol das células dos mamíferos como na biossíntese do ergosterol nas células fúngicas (CAMPOY e ADRIO, 2017; HOWARD et al., 2020).

## **2.2.5 Outros fármacos com atividades antifúngicas**

### **2.2.5.1 Análogos da pirimidina**

A flucitosina (5-FC) é um análogo estrutural sintético da citosina, com atividade fungistática, que interfere no metabolismo da pirimidina, na síntese de ácidos nucleicos e de proteínas. Nas células fúngicas a citosina permease é convertida por citosina desaminase no antimetabólito 5-fluorouracil. Esse é transformado em 5-fluoruridina monofosfato, que é fosforilado e incorporado ao RNA, resultando em inibição da síntese proteica, ou é convertido em 5-fluordeoxiuridina monofosfato, inibidor da timidilato sintetase, que inibe a síntese de DNA e a divisão celular fúngica. A 5-FC foi sintetizada em 1957 como terapia antitumoral e em 1963 descobriram seu efeito antifúngico (CAMPOY e ADRIO, 2017; HOWARD et al., 2020).

A 5-FC possui alta hidrossolubilidade, sendo administrada pela via oral e intravenosa, agindo contra fungos leveduriformes, filamentosos e protozoários. Como efeitos adversos apresenta hepatotoxicidade e supressão da medula óssea, e ainda apresenta frequente resistência inata e adquirida contra certos patógenos fúngicos. Na maioria das vezes não é usada como monoterapia, sendo associada com outros antifúngicos como AmB ou azóis (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; CAMPOY e ADRIO, 2017; GINTJEE, DONNELLEY, THOMPSON III, 2020). Desde 2014, a importação de 5-FC passou a ser de caráter excepcional no Brasil, regulamentada e controlada pelo Ministério da Saúde e pela Agência Nacional de

Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Instrução Normativa nº 1, de 28 de fevereiro de 2014 (BRASIL, 2014).

#### 2.2.5.2 Griseofulvina

A griseofulvina (1939) é um produto de origem natural, isolada a partir de *Penicillium griseofulvum*, e é o agente antifúngico mais antigo. Age inibindo a mitose da célula por interferir na função dos microtúbulos presentes nas células eucarióticas, que são polímeros formados por tubulina e que formam o esqueleto celular. É o primeiro antifúngico de uso oral (1958), com ação fungistática, praticamente insolúvel em água. Como efeitos adversos, causa alterações gastrointestinais, cefaleia, fotossensibilidade e é hepatotóxico. Seu espectro de ação é restrito aos fungos dermatófitos (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; CAMPOY e ADRIO, 2017; RANG et al., 2016).

#### 2.2.5.3 Amorolfina

A amorolfina (1981) é um fármaco sintético derivado da morfolina que apresenta atividade antimicótica (TABARA et al., 2015). As morfolinas inibem duas enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol,  $\Delta 7,8$  isomerase (ERG2) e a  $\Delta 14$ -redutase (ERG24) (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; TABARA et al., 2015; CAMPOY e ADRIO, 2017). Amorolfina é usada no tratamento tópico de infecções fúngicas de unhas, por meio de cremes e esmaltes, pois apresenta uma boa penetração no leito ungueal da unha, e com consequente absorção da substância ativa na circulação muito baixa. Como efeitos adversos apresenta eritema, queimação, descoloração das unhas e onicólise (TABARA et al., 2015; LIPNER, 2019).

#### 2.2.5.4 Tolnaftato

O tolnaftato é um tiocarbamato sintético utilizado como agente antifúngico. Ele inibe a enzima esqualeno epoxidase e bloqueia a biossíntese de ergosterol na parede celular fúngica (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; ABOUSAMRA e SALAMA, 2016). Apresenta um amplo espectro de ação contra dermatófitos e *Malassezia furfur*, podendo ser usado no tratamento da maioria das micoses cutâneas assim como nas onicomicoses, sendo encontrado na forma de cremes, pomadas e soluções tópicas.

Não apresenta reações tóxicas ou alérgicas (HILAL-DANDAN e BRUNTON, 2015; ABOUSAMRA e SALAMA, 2016).

#### 2.2.5.5 Ciclopirox

O ciclopirox e o seu sal ciclopirox olamina (1975) são agentes antifúngicos de origem sintética, derivados da hidroxipiridona (GUPTA, FLECKMAN, BARAN, 2000). Seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado, mas o que se sabe é que o ciclopirox está envolvido na quelação de cátions polivalentes, como o  $Fe^{3+}$  e o  $Al^{3+}$ , inibindo enzimas dependentes de metais, como os citocromos, a catalase e a peroxidase, que degradam peróxidos tóxicos na célula fúngica, interrompendo as atividades celulares, como transporte de elétrons mitocondriais, produção de energia e ingestão de nutrientes pela membrana celular (GUPTA, FLECKMAN, BARAN, 2000; LIPNER, 2019; SONTHALIA, AGRAWAL, SEHGAL, 2019). Além disso, também pode alterar a permeabilidade da membrana causando o bloqueio do transporte intracelular de precursores (SONTHALIA, AGRAWAL, SEHGAL, 2019). Como efeitos adversos podem ocorrer queimação, eritema periungueal e reações no local de aplicação, e seu uso deve ser evitado em mulheres grávidas e que amamentam (LIPNER, 2019).

Ciclopirox apresenta amplo espectro de atividade antifúngica, principalmente contra onicomicoses, onde é usado na forma farmacêutica tópica como creme, solução e esmalte (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; HILAL-DANDAN e BRUNTON, 2015; LIPNER, 2019).

### 2.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA

O teste de suscetibilidade *in vitro* é utilizado para a seleção dos agentes antifúngicos mais eficazes para o tratamento das fungemias e micoses, com risco de morte (CAFARCHIA et al., 2012a; VAN DIJCK et al., 2018). Para *Malassezia* spp. o teste de suscetibilidade ainda não foi padronizado pelo protocolo de microdiluição em caldo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), nem pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), resultando na ausência de pontos de interrupção clínica (*clinical breakpoints*, CBPs). A ausência de CBPs para avaliação de *Malassezia* spp. levou especialistas a um consenso sobre o uso

dos valores de corte epidemiológicos podendo estes serem usados para separar os isolados suscetíveis, do tipo selvagem (*wild-type*; WT) e os resistentes (não WT) (CAFARCHIA et al., 2015; PEANO et al., 2020). O protocolo de suscetibilidade para *Candida* (CLSI M27-A3) é o que vem sendo utilizado e adaptado, com modificações no tempo de incubação e inóculos, mas não é o mais adequado, devido ao crescimento lento de *M. pachydermatis*, por ser dependente de lipídios e pela tendência de formar aglomerados de leveduras (CLSI, 2008; CAFARCHIA et al., 2015; PEANO et al., 2020). Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) encontrados nos testes de suscetibilidade *in vitro* são indicadores da relativa suscetibilidade de fungos aos agentes testados. Individualmente são insuficientes para prever o resultado clínico *in vivo*, mas quando associados aos CBPs demonstram valores de CIM com zonas de inibição dos fungos entre as categorias clínica suscetível, intermediária e resistente (THEELEN et al., 2018; PEANO et al., 2020; HOBI et al., 2022).

## 2.4 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA

A incidência e a gravidade de doenças fúngicas têm aumentado significativamente nos últimos anos, com índices elevados de morbimortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos. A emergência de fungos resistentes aos antimicrobianos tem tornado ainda mais crítico o controle desses microrganismos, pois a incapacidade de responder à terapia antifúngica é complexa e está relacionada com fatores associados ao microrganismo e ao hospedeiro (PFALLER, 2012; CHANG et al., 2017).

Quando a resistência é devido ao microrganismo, ela ocorre pela falta de suscetibilidade do microrganismo ao antifúngico, podendo ser detectada pela avaliação da CIM em testes *in vitro* (FUENTEFRÍA et al., 2017; PEANO et al., 2020). A resistência microbiológica pode ser tanto intrínseca, quando o fungo é menos suscetível a um determinado antifúngico, quanto extrínseca, quando o desenvolvimento da resistência ocorre em resposta à exposição a um antifúngico (NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016; CHANG et al., 2017; PEANO et al., 2020). Portanto, a resistência extrínseca ocorre pela diminuição na concentração

efetiva da droga, devido a alterações no alvo da droga e por desvios metabólicos, enquanto a resistência intrínseca ocorre pela diminuição na concentração intracelular, devido ao efluxo ativo, superexpressão do alvo e pela formação de biofilmes (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016).

Já a resistência clínica ocorre quando um paciente não responde ao tratamento após administração de uma dose padrão de antifúngico. A resposta clínica eficaz depende da suscetibilidade do microrganismo, do sistema imunológico do hospedeiro, da penetração e distribuição do fármaco e da adesão do paciente à terapia (NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016; CHANG et al., 2017; PEANO et al., 2020). A utilização em pacientes de cateteres intravenosos, válvulas cardíacas artificiais e outros dispositivos cirúrgicos pode contribuir para infecções refratárias, pois os microrganismos infectantes presentes nestes dispositivos podem produzir biofilmes resistentes à ação dos antifúngicos (CHANG et al., 2017; PIPPI et al., 2018a).

Existem inúmeros relatos de mecanismos de resistência de fungos contra a terapia medicamentosa, os quais estão ligados a quatro estratégias principais utilizadas pelos fungos, como a superexpressão de proteínas-alvo na classe dos azóis; mutações induzidas por proteínas alvo, nas classes dos azóis e das equinocandinas; superexpressão de bombas de efluxo, na classe dos azóis; e acesso reduzido ao alvo, como no sequestro de ergosterol, na classe dos polienos (CAMPOY e ADRIO, 2017; PARENTE-ROCHA et al., 2017; HOWARD et al., 2020). Além desses mecanismos, a resistência cruzada a pelo menos duas classes antifúngicas (*multiple drug resistance*, MDR) tem sido altamente preocupante (CAMPOY e ADRIO, 2017; VAN DIJCK et al., 2018), bem como a capacidade dos fungos de formar biofilmes, aumentando sua resistência a vários fármacos, como azóis, análogos da pirimidina e polienos (CAMPOY e ADRIO, 2017; HOBI et al., 2022).

Os mecanismos de resistência a *M. pachydermatis* estão relacionados à falha do tratamento em cães, à atividade antifúngica reduzida frente a isolados de leveduras de cães expostos a fármacos antifúngicos e de isolados expostos a agentes antifúngicos *in vitro* (JESUS et al., 2011). Como existem poucos relatos confirmados de falha no tratamento devido à resistência antifúngica, o desenvolvimento de resistência é visto como uma eventualidade rara, mas que pode estar relacionada à subnotificação de casos resistentes pela dificuldade de obter uma confirmação



laboratorial (ROBSON et al., 2010; ANGILERI et al., 2019; KANO et al., 2019; PEANO et al., 2020). A resistência a antifúngicos tópicos *in vitro* é vista como pouco significativa na clínica, pois está baseada em altos valores de CIM, devido ao uso de uma concentração até 1000 vezes maior do que é utilizado na clínica (PEANO et al., 2020).

A baixa suscetibilidade de *M. pachydermatis* a classe dos azóis é a mais relatada, especialmente frente ao FCZ (JESUS et al., 2011), que provavelmente ocorre pelo seu uso generalizado e não por causa de alguma propriedade intrínseca dos azóis (HOWARD et al., 2020; RHIMI et al., 2020). Faz-se necessário que sejam determinadas as condições *in vitro* empregadas para induzir a resistência, e que estas imitem o que ocorre *in vivo*, ou seja, no momento em que a levedura é exposta aos agentes antifúngicos durante o tratamento de cães infectados (PEANO et al., 2020).

## 2.5 NOVOS AGENTES ANTIFÚNGICOS

As atuais terapias antifúngicas encontram-se muito limitadas, apresentam taxas de toxicidade consideráveis, problemas com propriedades farmacocinéticas, efeitos colaterais indesejáveis, espectro de atividade e um pequeno número de alvos, além dos inúmeros problemas de resistência com os fungos (PFALLER 2012; CAMPOY e ADRIO, 2017). Em 2006, o EUCAST e a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovaram a última classe de antifúngicos, as equinocandinas, especificamente a AFG (CAMPOY e ADRIO, 2017).

Identificar novas terapias antifúngicas é um enorme desafio e se torna cada vez mais necessária e urgente. A semelhança entre as células fúngicas e humanas é uma das grandes barreiras para distinguir novos alvos de fármacos (VANDEPUTTE, FERRARI, COSTE, 2012; CAMPOY e ADRIO, 2017; SCORZONI et al., 2017).

Estão sendo testadas diferentes opções de tratamento, como o efeito sinérgico entre antifúngicos, para reduzir a toxicidade; desenvolvimento de novas formulações de antifúngicos; nanopartículas; modificações na estrutura química do produto; reaproveitamento de antifúngicos atuais ou outros medicamentos aprovados pela FDA; imunoterapia; produtos naturais; além do uso de mini-hospedeiro para testes *in vivo*, pela sua semelhança com os mamíferos e aumentar a rapidez e facilitar o teste

preliminar de novos antifúngicos (NGO, GARNEAU-TSODIKOVA, GREEN, 2016; SCORZONI et al., 2017; VAN DIJCK et al., 2018).

Para o desenvolvimento de um novo agente antifúngico é observado o *design* de fármacos, especialmente quanto ao aperfeiçoamento de sua estrutura química, também conhecida como *hit*, a fim de aperfeiçoar a atividade e a seletividade desta substância. Ensaio *in vitro* são a primeira etapa para a confirmação da ação biológica de um potencial agente, bem como a obtenção do perfil toxicológico, característica limitante para o desenvolvimento de fármacos antifúngicos. Na sequência são avaliadas as propriedades das modificações sintéticas e físico-químicas, além da farmacocinética, levando a seleção de um candidato a fármaco. Escolher um fármaco já utilizado no mercado como protótipo ou composto principal (*lead compound*) é uma vantagem, pois este precisa ser otimizado para uma nova indicação (CALDERONE et al., 2014).

Novas terapias devem diminuir as mortalidades em decorrência dos efeitos adversos dos antifúngicos, ter uma melhor atividade fungicida, um maior espectro de atividade contra fungos resistentes, melhorar a farmacocinética e farmacodinâmica, diminuir ou mesmo evitar a toxicidade do hospedeiro e causar poucas interações medicamentosas. Também se espera que ajam por meio de mecanismos novos que sejam mais seletivos e com diferentes ações, além de agentes com ação contra biofilme (CAMPOY e ADRIO, 2017; VAN DIJCK et al., 2018), aumentando a qualidade de vida dos pacientes (SCORZONI et al., 2017).

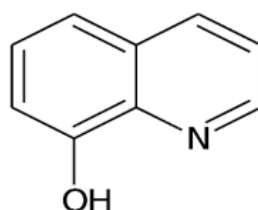
Atualmente, apenas algumas moléculas promissoras estão em desenvolvimento pré-clínico ou nos primeiros estágios de desenvolvimento clínico, o que não nos traz a certeza de que originarão um novo antifúngico (CAMPOY e ADRIO, 2017). Frente à necessidade de revalidação dos antifúngicos e a introdução de novas estratégias terapêuticas, surgem os derivados da 8-HQ (PIPPI et al., 2017; JOAQUIM et al., 2019) e da bisariloxipropanamina (LAVORATO et al., 2017) que podem vir a ter um importante papel na terapia fúngica, com alta versatilidade sintética e grande variedade de efeitos biológicos.

### 2.5.1 8-Hidroxiquinolinas

A estrutura da 8-HQ apresenta um anel heterocíclico de seis membros ligado a um anel benzênico (Figura 2) (SASHIDHARA et al., 2009). A 8-HQ e seus derivados fazem parte da subclasse de quinolinas, que apresentam uma vasta gama de atividades biológicas, isso porque possuem uma estrutura privilegiada na qual modificações em posições específicas podem levar ao desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para diferentes enfermidades (OLIVERI e VECCHIO, 2016).

Nos derivados da 8-HQ, a atividade antimicrobiana parece estar relacionada com o substituinte nas posições 5 e 7 (GERSHON, GERSHON, CLARKE, 2002; JOAQUIM et al., 2019).

Figura 2 – Estrutura química da 8-hidroxiquinolina



Fonte: Sashidhara et al. (2009).

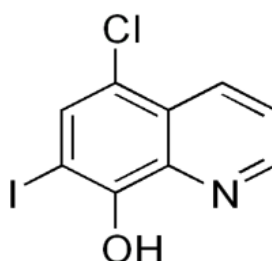
#### 2.5.1.1 Clioquinol

CQL (5-cloro-7-iodo-8-quinolinol; Figura 3), faz parte do grupo das 8-HQ halogenadas e chegou ao mercado em 1934 por Ciba-Geigy (agora Novartis) como um antibiótico (CAHOON, 2009). É utilizado atualmente como agente antisséptico tópico (ALSTERHOLM, KARAMI, FAERGEMANN, 2010), além de ter sido utilizado como agente sistêmico para tratar infecções intestinais ou urinárias durante os anos de 1950 e 1970 (CAHOON, 2009; OLIVERI e VECCHIO, 2016). Na década de 1970, o CQL de uso oral foi retirado do mercado devido a relatos de associação com a síndrome subaguda de mieloneuropatia óptica (SMON) em pacientes japoneses. É uma síndrome neurodegenerativa que provoca um início agudo de distúrbios sensoriais, motor dos membros inferiores e deficiência visual (NAKAE et al., 1973; OLIVERI e VECCHIO, 2016; YOU et al., 2018). Os pacientes relatavam dormência, dor e desconforto intestinais, e o sintoma mais bizarro era o aparecimento da língua verde-escura, o que caracteriza acúmulo de ferro pelo CQL (CAHOON, 2009). Seu

mecanismo de ação não está totalmente elucidado, mas sugere-se que a toxicidade esteja relacionada em parte com a ação não quelante de íons metálicos entre átomos de oxigênio e nitrogênio e que a presença de iodo na posição 7 e do cloro na posição 5 também podem estar relacionados com sua toxicidade (GERSHON, GERSHON, CLARKE, 2002; MAO e SCHIMMER, 2008; OLIVERI e VECCHIO, 2016; PIPPI et al., 2019a). Existe pouca informação disponível referente à segurança de seu uso em humanos e existem controvérsias quanto à associação entre CQL e SMON, pois ocorreram raros casos fora do Japão, onde a dose e a duração da administração foram maiores do que nos demais países, além da diferença na sua formulação (CAHOON, 2009; NAKAE et al., 1973; MEADE, 1975; KONAGAYA et al., 2004). Alguns estudos descrevem que muitos destes casos podem ter sido relacionados com a deficiência de vitamina B12 concomitante ou devido às diferentes formulações de CQL usadas no Japão, além da influência da suscetibilidade genética (NAKAE et al., 1973). Estudos mais recentes relatam sérios problemas de depressão entre os pacientes japoneses que tiveram SMON (KONISHI, HAYASHI, SUGIYAMA, 2017).

Atualmente existem estudos para sua utilização como agente antifúngico (DIXIT et al., 2010; PIPPI et al., 2017; YOU et al., 2018; JOAQUIM et al., 2019), anticanceroso (FRANKLIN et al., 2016; WEHBE et al., 2017), neurodegenerativo – principalmente contra Alzheimer (ZHANG et al., 2013; FINKELSTEIN et al., 2016), Parkinson (FINKELSTEIN et al., 2016) e doença de Huntington (FINKELSTEIN et al., 2016), e contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (OLIVERI e VECCHIO, 2016). A reintrodução de formulações orais do CQL como antifúngico sistêmico e para novas indicações está sendo avaliada, principalmente quanto à toxicidade e ao seu modo de ação.

**Figura 3 – Estrutura química do clioquinol**

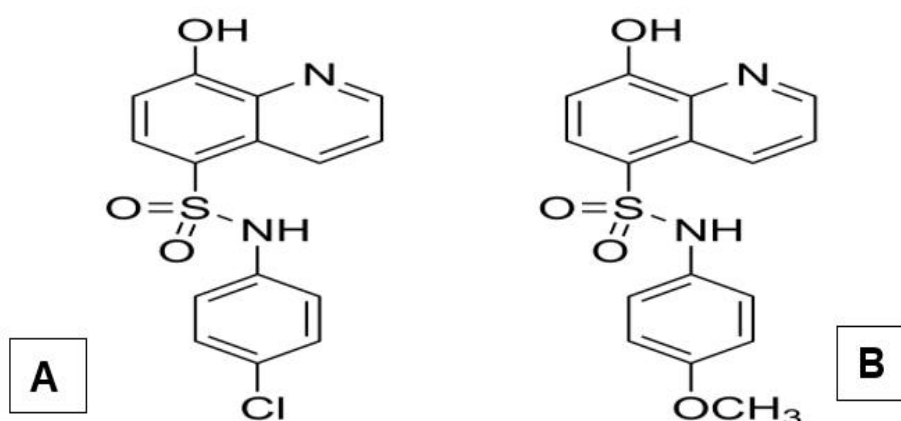


Fonte: Oliveri e Vecchio (2016).

### 2.5.1.2 PH151 e PH153

As moléculas 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil) sulfonamida (PH151) (Figura 4A) e a 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-metoxifenil) sulfonamida (PH153) (Figura 4B), também são derivados da 8-HQ, obtidos a partir do ácido sulfônico e a conversão do ácido sulfônico em uma sulfonamida, mostrando vantagens muito interessantes em relação ao aumento do efeito antifúngico (JOAQUIM et al., 2019), bem como a ausência de um átomo de iodo na posição sete o que pode ser uma vantagem, pois esse átomo pode aumentar a eletrofilia do composto e levar à toxicidade (GERSHON, GERSHON, CLARKE, 2002). Os ácidos sulfônicos não são bem absorvidos, devido à sua natureza ácida, o que pode dificultar sua penetração na célula fúngica, mas a conversão do ácido sulfônico em uma sulfonamida o transforma num ácido muito fraco e não ioniza, enquanto a adição de um N-substituinte na sulfonamida pode levar a novas interações, além de uma melhora da atividade. Além disso, esses derivados não são moléculas irritantes e apresentam ausência de toxicidade tóxica (JOAQUIM et al., 2019). De acordo com Joaquim e col. (2019), o PH151 é o composto mais potente e ativo contra *Candida* spp. e dermatófitos, apresentando baixa toxicidade em células normais. Tanto o PH151 quanto o PH153 foram testados para o tratamento de *Candida* spp. e dermatófitos, por via sistêmica em testes pré-clínicos, demonstrando resultados promissores com potencial antifúngico (PIPPI et al., 2017).

Figura 4 – Estruturas químicas do PH151 (A) e do PH153 (B)

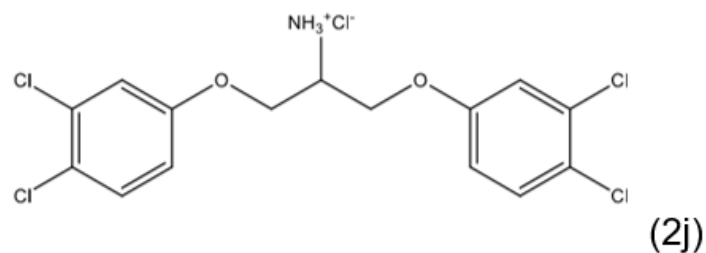


Fonte: Pippi (2018a).

### 2.5.2 Bisariloxipropanaminas

A molécula 1,3-bis(3,4-diclorofenoxi) propano-2-cloreto de aminio) (2j) (Figura 5), faz parte da classe das bisariloxipropanaminas sintetizada em 2017, por Lavorato e col. Inicialmente, alguns compostos dessa classe apresentaram atividade antiprotozoária favorável contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (LAVORATO et al., 2017). A molécula 2j, que compreende os tiocianatos alílicos da classe com atividade antifúngica, foi a única molécula que se destacou com um amplo espectro de atividade antifúngica, em nanoemulsão contra *Candida* spp. e dermatófitos (LAVORATO et al., 2017; DALLA LANA et al., 2018b), e em candidíase sistêmica induzida em moscas *Drosophila melanogaster*, apresentando baixa toxicidade (DALLA LANA et al., 2021). O mecanismo de ação da molécula 2j está relacionado à complexação com ergosterol fúngico (DALLA LANA et al., 2018b).

Figura 5 – Estrutura química da molécula 2j



Fonte: Dalla Lana (2018a).

### 2.6 SELEÇÃO DE MOLÉCULAS PARA TESTES EM MODELOS ANIMAIS

A atividade antifúngica *in vitro* e a citotoxicidade são as primeiras etapas para o desenvolvimento de um novo antifúngico, como já mencionado anteriormente. Após, este composto é analisado em sistemas complexos *in vivo* para descobrir se apresenta o mesmo comportamento em modelos animais convencionais e alternativos, sendo cruciais para a confirmação dos dados *in vitro* (SCORZONI et al., 2016).

Os mamíferos são os modelos animais conhecidos como padrão-ouro para estudos de descoberta de fármacos, virulência e resposta imune. Passam por um

rígido regulamento para a sua utilização, com comitês de ética e boas práticas laboratoriais (ARVANITIS, GLAVIS-BLOOM, MYLONAKIS, 2013; SCORZONI et al., 2017).

Burcha e Russell (1959) descreveram o uso de modelos experimentais alternativos *in vivo*, também conhecidos como “*minihosts*”, embasados no princípio de refinamento, redução e substituição de animais (SCORZONI et al., 2017). Entre estes modelos alternativos encontramos amebas, insetos, nematoides, peixes e embriões de galinha. Estes modelos animais são amplamente utilizados devido ao pouco desenvolvimento de seus sistemas neurais, quase não apresentando dor; têm origens genéticas bem definidas, são fáceis de manipular, sua manutenção é de baixo custo e um grande número de animais pode ser usado em cada experimento (ARVANITIS, GLAVIS-BLOOM, MYLONAKIS, 2013; TREVIJANO-CONTADOR e ZARAGOZA, 2014; SCORZONI et al., 2016). Além disso, existe uma boa correlação entre animais alternativos e mamíferos, sendo estes modelos adequados para pré-seleção de compostos biologicamente ativos (SCORZONI et al., 2016).

## 2.7 *Drosophila melanogaster*

Conhecida como mosca-das-frutas, *D. melanogaster* é uma espécie dimórfica, onde machos e fêmeas se distinguem por meio de características morfológicas. É um animal pequeno, com comprimento em torno de 3 mm. Possui um ciclo de vida curto, levando entre 8 e 12 dias para se obter uma mosca adulta, a uma temperatura de 25 °C. É um modelo para o desenvolvimento da biologia e genética em grande escala, no qual moscas mutantes vêm sendo amplamente utilizadas para o desenvolvimento e caracterização de doenças, isso porque o genoma inteiro das moscas já foi sequenciado (LIONAKIS e KONTOYIANNIS, 2012; CHYB e GOMPEL, 2013; SEGAL e FREENKEL, 2018).

Moscas *D. melanogaster* têm sido utilizadas com sucesso para estudos de resposta imune do hospedeiro, de fatores de virulência de patógenos e de eficácia de compostos antimicrobianos frente a bactérias e fungos (ARVANITIS, GLAVIS-BLOOM, MYLONAKIS, 2013; CHAMILOS et al., 2008; LIONAKIS et al., 2005). Possuem apenas a resposta imune inata, a qual é totalmente desenvolvida, e é

responsável por limitar a infecção nas primeiras horas após a exposição microbiana (HOFFMANN et al., 1999; PARSONS e FOLEY, 2016). Este díptero tem duas principais vias de sinalização da resposta imune para resistência microbiana: a via *Imd*, que se manifesta como fase aguda, contra bactérias gram-negativas, e a via *Toll*, que ocorre como fase tardia, agindo contra bactérias gram-positivas e fungos (LEMAITRE et al., 1995; HOFFMANN e REICHHART, 2002).

O sistema imune da mosca é ativado por meio da defesa celular local, através dos hemócitos, levando à fagocitose, à melanização do ferimento ou ao encapsulamento dos microrganismos (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007; PARSONS e FOLEY, 2016); ou por via sistêmica, onde no momento da lesão, o corpo de gordura da mosca induz a secreção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), produzindo o peptídeo ideal para a destruição dos patógenos (HOFFMANN et al., 1999), como drosomicina e metchnikowin, que têm ação antifúngica; cecropina, diptericina, drosocina e attacina, que têm ação antibacteriana Gram-negativa; e defensina, com ação contra bactérias Gram-positivas (LEMAITRE, REICHHART, HOFFMANN, 1997; HOFFMANN e REICHHART, 2002; FRANZ et al., 2018). Moscas *Toll*-deficientes não apresentam resistência contra a maioria das infecções fúngicas, e, portanto, vêm sendo amplamente testadas contra fungos oportunistas, ou seja, os que se desenvolvem em hospedeiros imunodeficientes (CHAMILOS et al., 2008; ARVANITIS, GLAVIS-BLOOM, MYLONAKIS, 2013).

*D. melanogaster* é um modelo alternativo de animais de laboratório e demonstra sua importância na prospecção de novos fármacos antifúngicos, em decorrência do aumento das infecções fúngicas e o potencial problema de resistência aos antifúngicos (LIONAKIS et al., 2005; SCORZONI et al., 2017; SEGAL e FREENKEL, 2018).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar novas substâncias com ação antifúngica, sozinhas e em combinação com fármacos antifúngicos de diferentes classes, frente a isolados de *M. pachydermatis in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade de antifúngicos como KTZ, CTZ, FCZ, ITZ, MCZ, e TRB contra *M. pachydermatis in vitro* e em moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes com malasseziose;

- Avaliar a atividade antifúngica do CQL e dos demais derivados das 8-HQs, as moléculas PH151 e PH153, contra *M. pachydermatis in vitro* e em moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes com malasseziose;

- Avaliar a atividade antifúngica da molécula 2j, da classe das bisariloxipropanaminas, contra *M. pachydermatis in vitro* e em moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes com malasseziose;

- Determinar a relação concentração e tempo de morte celular, bem como o perfil fungicida ou fungistático dos agentes antifúngicos *in vitro*;

- Avaliar a toxicidade dos agentes antifúngicos frente a moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes;

- Avaliar a interação resultante da combinação entre os diferentes antifúngicos frente a *M. pachydermatis in vitro* e em moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes com malasseziose.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 TESTES *IN VITRO*

#### 4.1.1 Isolados de *M. pachydermatis*

Foram utilizados 16 isolados de *M. pachydermatis*, sendo um ATCC 14522 e os demais obtidos a partir de cães com otite, pertencentes à micoteca do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A partir dos isolados foram feitos repiques em tubos contendo SDA (KASVI; PR, Brasil), acrescidos de 5% de azeite de oliva, e incubados a 37 °C por um período de sete dias.

#### 4.1.2 Teste de suscetibilidade

O teste de suscetibilidade *in vitro* para as isolados de *M. pachydermatis* foi realizado utilizando o protocolo de referência de microdiluição em caldo do CLSI M27-A3 (CLSI, 2008), com algumas modificações. O RPMI 1640 (Gibco; EUA) foi tamponado com MOPS (Sigma Aldrich; EUA) em pH 6,5 contendo 0,2% de Tween 80 (Sigma Aldrich; EUA) (JESUS et al., 2011; CAFARCHIA et al., 2012a; WEILER et al., 2013).

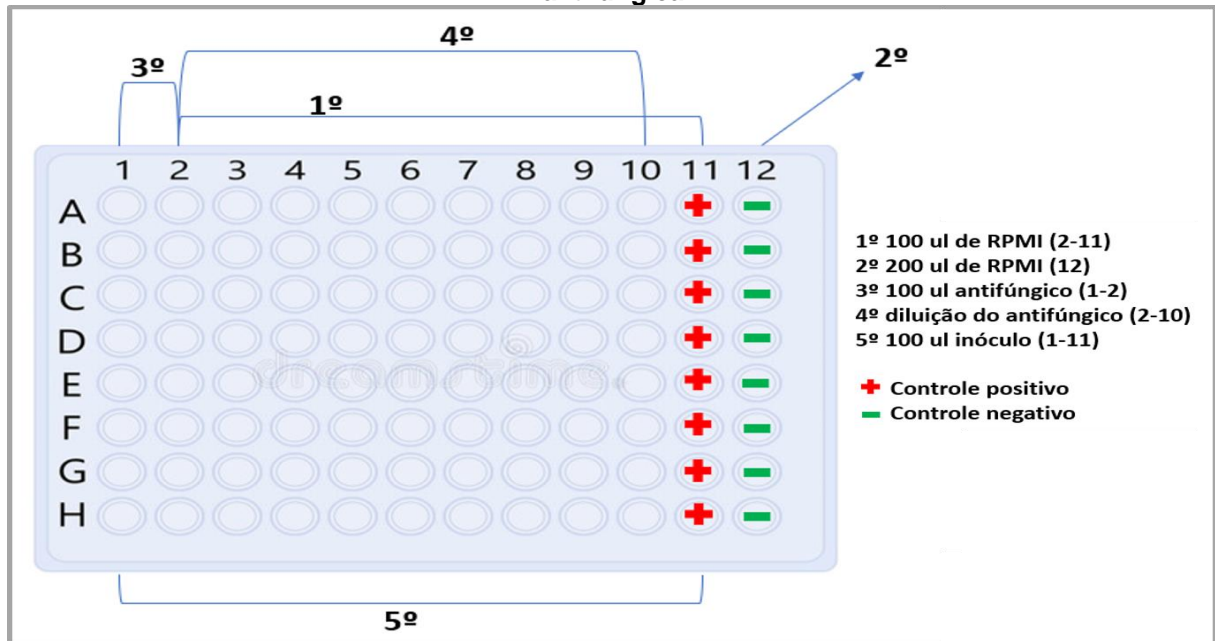
Os antifúngicos utilizados foram KTZ (Sigma Aldrich; EUA); CTZ (Via Farma; SP, Brasil); FCZ (Sanofi Medley Farmacêutica Ltda; SP, Brasil); ITZ (Sigma Aldrich; EUA); MCZ (Organic Coumpounding; SP, Brasil); MFG (Astellas Farma; SP, Brasil); TRB (Embrafarma; SP, Brasil); CQL e as moléculas PH151 e PH153 (Grupo de Síntese Farmacêutica - PHARSG, UFRGS, Brasil); e a molécula 2j (Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UFRGS, Brasil). A diluição dos antifúngicos foi feita em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich; EUA) ou água destilada estéril no caso do FCZ. Na sequência foram diluídos em RPMI 1640 tamponado com MOPS em pH 6,5 acrescido de 0,2% de Tween 80. As concentrações dos antifúngicos utilizadas

foram: KTZ, MCZ, CQL e MFG (0,016-8 ug/ml); CTZ, FCZ, PH151 e PH153 (0,031-16 ug/ml); ITZ e TRB (0,008-4 ug/ml); e 2j (0,125-64 ug/ml).

Inóculos de *M. pachydermatis* foram preparados a partir dos isolados de sete dias, e suspensos em salina estéril 0,85%. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro GT 7220, Global Trade Technology (São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 530 nm e transmitância entre 60-65%, o que equivale a  $1-5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC/ml). Na sequência, uma diluição de 1:100 da solução do inóculo foi feita em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, em pH 6,5 contendo 0,2% de Tween 80 (CAFARCHIA et al., 2012b; SANTIN et al., 2014; SCHLEMMER et al., 2018). Foram feitos testes de diluição para os antifúngicos entre 1:20; 1:50; 1:100; e 1:1000, baseados em trabalhos prévios de outros grupos, e a partir dos resultados que obtivemos optamos em utilizar a diluição de 1:100, que ficou bem próxima aos valores descritos por outros autores (CAFARCHIA et al., 2012b; WEILER et al., 2013; SANTIN et al., 2014; SCHLEMMER et al., 2018).

Após 72 h de incubação à 35 °C foi feita a leitura visual das placas e o crescimento de cada isolado foi determinado por várias concentrações dos compostos (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2013; SANTIN et al., 2014). Como controle positivo de viabilidade de células fúngicas foi utilizado o meio sem adição das substâncias antifúngicas (Figura 6). Os experimentos foram realizados em quadruplicata. Os valores de CIM foram obtidos pela menor concentração das substâncias onde os isolados testados não obtiveram crescimento visual após as 72 h de incubação. Em paralelo, foi utilizado o controle de esterilidade – controle negativo.

Figura 6 – Sequência de adição dos componentes na realização dos testes de suscetibilidade antifúngica



(Fonte: A autora).

#### 4.1.3 Combinação de fármacos

O ITZ e a TRB foram combinados com o CQL e as moléculas PH151 e PH153, totalizando 150 diferentes combinações (Quadro 1), tendo como referência as CIMs de cada um dos compostos individualmente frente a cada isolado testado: CIMx2; CIM; CIM/2; CIM/4 e CIM/8. Para os ensaios, as alíquotas dos compostos, previamente diluídos em DMSO, foram preparadas individualmente em meio RPMI tamponado com MOPS (pH 6,5), com adição de 0,2% de Tween 80, para cada um dos 11 isolados de *M. pachydermatis* testados (JESUS et al., 2011; JOHNSON et al., 2004). Os inóculos de *M. pachydermatis* foram preparados a partir de culturas de sete dias e suspensos em solução salina estéril 0,85% (p/v). A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro GT 7220 com comprimento de onda de 530 nm e transmitância entre 60-65%, o que equivale a  $1-5 \times 10^6$  UFC/ml. Na sequência, uma diluição de 1:100 da solução do inóculo foi feita em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS, em pH 6,5 contendo 0,2% de Tween 80 (CAFARCHIA et al., 2012b; SANTIN et al., 2014; SCHLEMMER et al., 2018). O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços, com volume final em cada poço de 200 µl, sendo os testes de

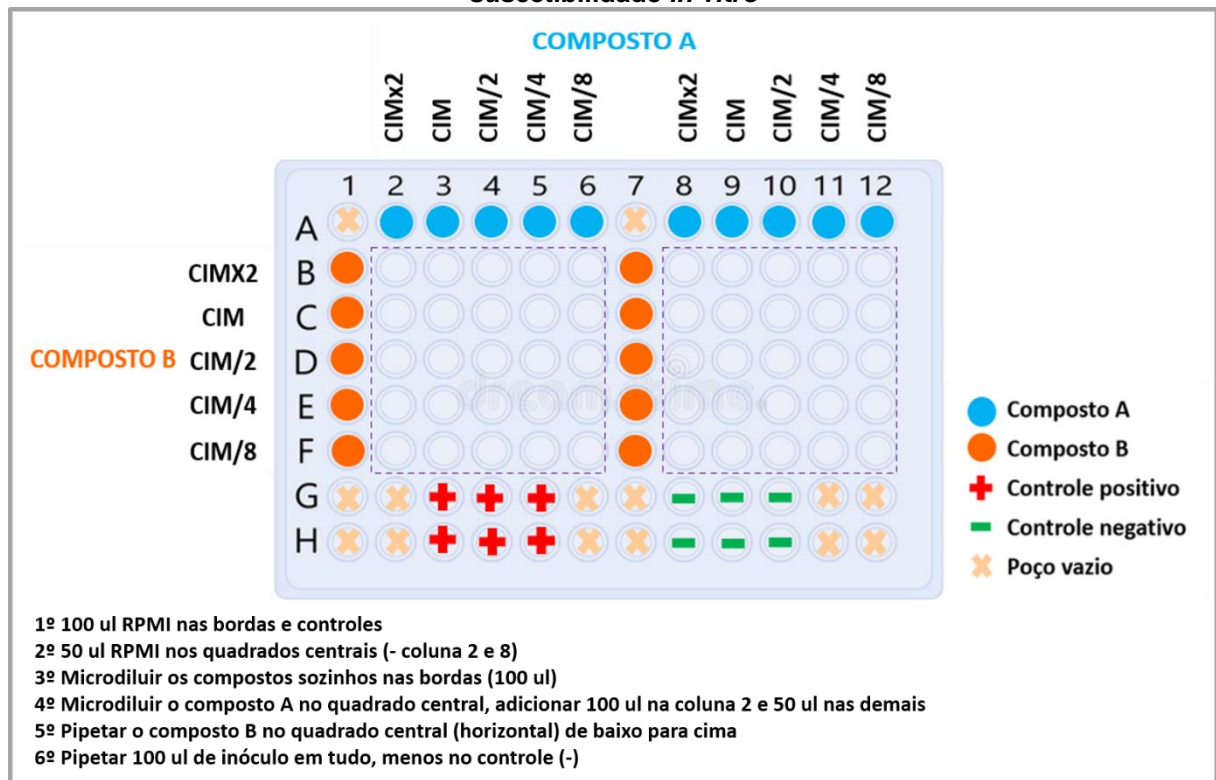
suscetibilidade realizados pelo método de microdiluição baseado nas orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) (Figura 7).

**Quadro 1 – Combinações de substâncias antifúngicas no teste de sinergismo *in vitro* e as concentrações testadas**

COMBINAÇÕES		CONCENTRAÇÕES TESTADAS
A	B	
ITZ	CQL	CIMx2 CIM CIM/2
ITZ	PH151	
ITZ	PH153	
TRB	CQL	CIM/4 CIM/8
TRB	PH151	
TRB	PH153	

Fonte: A autora.

**Figura 7 – Ordem de pipetagem dos compostos na microplaca e sua diluição no teste de suscetibilidade *in vitro***



Fonte: A autora.

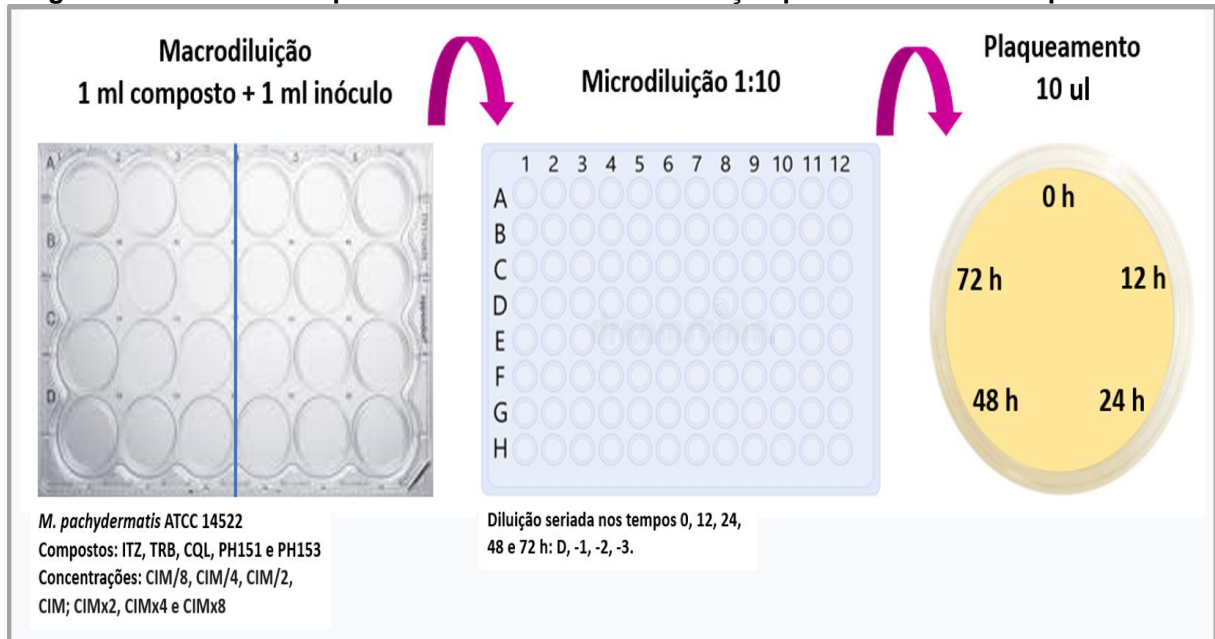
O crescimento fúngico foi observado após incubação da microplaca a 35 °C, por 72 h, e a leitura foi feita visualmente, com percentual de 100% de inibição do crescimento. O índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) foi calculado de acordo com a seguinte equação:  $ICIF = (CIM\ A\ em\ combinação/CIM\ A\ sozinho) + (CIM\ B\ em\ combinação/CIM\ B\ sozinho)$ , na qual as letras A e B indicam os fármacos da combinação em questão (ODDS et al., 2003; HALL et. al., 1983). Com base no resultado do ICIF, as interações foram interpretadas como sinérgicas ( $ICIF \leq 0,5$ ), indiferentes ( $0,5 < ICIF \leq 4$ ) ou antagônicas ( $ICIF > 4$ ). Os testes de suscetibilidade *in vitro* para antifúngicos foram realizados em três ensaios independentes. As médias geométricas (MGs) foram usadas estatisticamente para avaliar os resultados das CIMs.

#### 4.1.4 Ensaio de tempo de morte (*time-kill*)

Os fármacos ITZ, TRB, CQL, PH151 e PH153 nas concentrações de CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8 foram avaliados contra *M. pachydermatis* ATCC 14522 no ensaio de tempo de morte. Culturas com sete dias de crescimento a 35 °C, em SDA, foram utilizadas para a preparação do inóculo fúngico. As células fúngicas foram suspensas em solução salina estéril 0,85% (p/v), a transmitância foi medida em espectrofotômetro GT 7220 com comprimento de onda de 530 nm e ajustadas a uma transmitância entre 60-65%, o que equivale a  $1-5 \times 10^6$  UFC/ml. Na sequência, a solução final de inóculo fúngico foi preparada através de uma diluição 1:10 em meio caldo Sabouraud dextrose contendo 0,2% de Tween 80 (CAFARCHIA et al., 2012b; SANTIN et al., 2014; SCHLEMMER et al., 2018). Todas as soluções dos compostos testados foram preparadas em macrodiluição e adicionadas a placas de 24 poços, seguidas da adição do inóculo fúngico e, na sequência, incubadas a 35 °C (KLEPSEK et al., 1998). O ensaio foi realizado em triplicata. Os tempos 0, 12, 24, 48 e 72 h foram escolhidos para determinação da curva de tempo morte. Dessas soluções, 40 µl foram removidos e realizada uma diluição seriada de 10 vezes até  $10^{-3}$  em solução salina 0,85%. A partir destas diluições, 10 µl de cada foi semeada (método da gota) em placas contendo SDA com cloranfenicol e estas foram incubadas a 35 °C para contagem de UFC (Figura 8). Após o período de incubação, a contagem

das colônias fúngicas foi realizada e os resultados foram expressos por plotagem média  $\log_{10}$  UFC/ml.

**Figura 8 - Processos sequenciais de macro e microdiluição para o ensaio de tempo de morte**



Fonte: A autora.

## 4.2 TESTES *IN VIVO*

### 4.2.1 *Drosophila melanogaster*

Foram utilizadas moscas *Toll*-deficientes mutantes trans-heterozigotos fêmeas, originárias do cruzamento entre os fenótipos *Tlr<sup>632</sup>*, que carregam um alelo termossensível de *Tl*, com moscas *Tl<sup>-RXA</sup>*, que carregam um alelo nulo de *Tl*. Moscas *Toll*-deficientes apresentam maior suscetibilidade à infecção microbiana (LIONAKIS et al., 2005). As moscas foram obtidas da University of Texas MD Anderson Cancer Center e mantidas no Laboratório de Experimentação em Drosófila (Drosolab), pertencente ao Departamento de Farmacologia (ICBS-UFRGS). Para a obtenção e manutenção das moscas foram seguidos procedimentos padronizados para manipulação, alimentação e alojamento das moscas em todas as fases (LIONAKIS et al., 2005; CHAMILOS et al., 2006; MERKEL et al., 2018).

### 4.2.2 Antifúngicos

Foram utilizados os antifúngicos KTZ, CTZ, FCZ, ITZ, MCZ, TRB e CQL, bem como as moléculas PH151 e PH153. Os compostos foram solubilizados em 2% de DMSO e diluídos em água destilada estéril na concentração de 1 mg/ml, com exceção do FCZ que foi diluído somente em água destilada estéril na concentração de 1 mg/ml, sendo pipetados 100 µl da solução sobre o alimento das moscas. Prévio à colocação das moscas em contato com o alimento contendo antifúngico, essas foram submetidas a um jejum de 6 h. Após esse período, as moscas foram colocadas nos recipientes contendo alimento com antifúngico, cerca de 10 moscas por frasco, por um período de 24 h. Para o teste de toxicidade, as moscas foram expostas por um período de sete dias aos antifúngicos adicionados sobre o alimento. A mortalidade das moscas foi comparada ao grupo controle não tratado, composto por moscas que foram expostas ao alimento sem adição de antifúngico. Já nos testes de sobrevivência as moscas foram infectadas com *M. pachydermatis* e tratadas com estes compostos antifúngicos, durante um período de sete dias. Um grupo com moscas não infectadas (controle não infectado), também foi avaliado concomitantemente.

### 4.2.3 Inóculo fúngico

O isolado de *M. pachydermatis* ATCC 14522 foi utilizado neste experimento. Foram feitos cultivos em tubos contendo SDA acrescido de 5% de azeite de oliva, incubados a 37 °C por um período de sete dias. Os inóculos foram preparados com tampão fosfato-salino acrescido de 0,05% de Tween 80, em pH 7,4 e testados na concentração de  $10^7$  UFC/ml, de acordo com resultados obtidos em testes de virulência feitos anteriormente (MERKEL et al., 2018).



#### 4.2.4 Infecção das moscas

A inoculação de *M. pachydermatis* nas moscas *D. melanogaster* foi realizada através de punção com agulha número 000, previamente mergulhada no inóculo, no tórax das moscas, que estavam anestesiadas com CO<sub>2</sub>. Após a inoculação as moscas retornaram aos recipientes contendo alimento com antifúngico e os frascos foram tampados e incubados em estufa à temperatura de 29 °C por um período de sete dias, com contagem diária da sobrevivência.

#### 4.2.5 Carga fúngica

A determinação da carga fúngica de *M. pachydermatis* em moscas *D. melanogaster* foi feita a partir da maceração de moscas mortas durante os sete dias de contagem de sobrevivência. Diluições em série foram feitas em triplicata em 1 ml de água destilada estéril e diretamente das soluções contendo as moscas, e de cada diluição foram pipetadas 10 µl e semeadas em placa contendo SDA com cloranfenicol (0,5 g/L) (KASVI; PR, Brasil), com o auxílio de uma alça de Drigalski. O número de UFC foi contado após 72 h de incubação a 35 °C.

#### 4.2.6 Combinação de fármacos

No teste de combinação de fármacos *in vivo* foram utilizados os antifúngicos ITZ e TRB, combinados com o CQL, e as moléculas PH151 e PH153, obtendo-se seis combinações diferentes. Esses grupos foram comparados com grupos contendo o tratamento individual de cada composto, ITZ, TRB, CQL, PH151 e PH153, além do grupo controle somente inoculado (Quadro 2). *M. pachydermatis* ATCC 14522 foi o isolado utilizado no teste de sensibilidade.

**Quadro 2 – Grupos de tratamento de antifúngicos utilizados no teste de combinação de fármacos *in vivo***

TRATAMENTOS	
Combinações	Individuais
ITZ + CQL	ITZ
ITZ + PH151	TRB
ITZ + PH153	CQL
TRB + CQL	PH151
TRB + PH151	PH153
TRB + PH153	

Fonte: A autora.

#### 4.2.6.1 Tratamentos

Para os ensaios os compostos foram preparados em concentrações de 1 mg/ml, e pipetados 100 µl sobre o alimento das moscas. Os frascos então foram tampados e colocados na estufa à temperatura de 29 °C, onde permaneceram por 24 h para a absorção do composto no alimento. No dia seguinte, moscas *Toll*-deficientes fêmeas foram separadas, cerca de 10 por frasco, para o pré-tratamento com os compostos, onde permaneceram por 24 h até a inoculação. Moscas separadas para o experimento permaneceram em jejum por 6 h antes de serem colocadas em contato com a comida contendo os antifúngicos.

#### 4.2.6.2 Inóculos fúngicos

Os inóculos de *M. pachydermatis* ATCC 14522, utilizados no teste de suscetibilidade, foram preparados na concentração de  $10^7$  UFC/ml, de acordo com testes já padronizados anteriormente pelo grupo (MERKEL et al., 2018).

#### 4.2.6.3 Inoculação de *M. pachydermatis*

Moscas *Toll*-deficientes foram anestesiadas com CO<sub>2</sub> e inoculadas com *M. pachydermatis* por meio da punção com agulha, previamente mergulhada no inóculo, no tórax das moscas. Na sequência, as moscas retornaram aos recipientes contendo

alimento com os compostos e os frascos foram tampados e incubados em estufa à temperatura de 29 °C por um período de sete dias, com contagem diária da sobrevivência.

#### **4.2.7 Análise estatística**

Os experimentos *in vivo* em moscas *D. melanogaster* foram realizados em triplicata, ou seja, aproximadamente 10 moscas por frasco totalizando 30 moscas/grupo, e repetidos em pelo menos três dias diferentes em experimentos independentes. A toxicidade foi avaliada através da análise de Kaplan-Meier, e diferenças nas curvas de sobrevivência entre os grupos através do teste *logrank* (software GraphPad Prism, versão 6.01). A infecção e a efetividade dos tratamentos foram avaliadas por meio de curvas de sobrevivência (teste *logrank*) e através da contagem de UFC/ml, realizada a partir de um *pool* de moscas mortas. Os dados de UFC/ml foram transformados em  $\log_{10}$  e diferenças entre as médias dos grupos tratados e do controle foram analisadas através do teste *t* de Student. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 TESTES *IN VITRO*

#### 5.1.1 Suscetibilidade

O teste de suscetibilidade *in vitro* demonstrou que, dentre os antifúngicos testados, KTZ, TRB e MCZ obtiveram as menores MG de CIM frente aos 16 isolados de *M. pachydermatis*. No grupo das 8-HQs, o CQL apresentou os menores valores de MG de CIM, seguido pelas moléculas PH153 e PH151 (Tabela 1).

**Tabela 1 - Distribuição da concentração inibitória mínima (CIM) entre os 16 isolados de *M. pachydermatis* testados**

AGENTES	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) Distribuição entre isolados testados														MG	
	0,008	0,02	0,03	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64		
KTZ		9	5	2												0,03
CTZ								5	6	4		1				2,18
FCZ										10	6					5,19
ITZ							5		3	3	5					2,28
MCZ							1	5	9		1					1,61
TRB				3	1	1	1	2	7		1					0,7
CQL								11	5							1,24
PH151											3	4	8	1		21,7
PH153										1	3	11	1			13,5

MG, média geométrica

O PH151 foi o composto que obteve os maiores valores de CIM, ficando entre 8-64  $\mu\text{g/ml}$ , seguido pelo PH153 com CIMs entre 4-32  $\mu\text{g/ml}$ . O FCZ, ITZ e CTZ apresentaram valores intermediários de CIM, variando de 4-8  $\mu\text{g/ml}$  para o FCZ; 0,5-8  $\mu\text{g/ml}$  para o ITZ; e de 1-16  $\mu\text{g/ml}$  para o CTZ. Além desses agentes antifúngicos, ainda testamos a MFG (0,016-8  $\mu\text{g/ml}$ ) e a molécula 2j (0,125-64  $\mu\text{g/ml}$ ). Os valores das CIMs da MFG e da molécula 2j não puderam ser definidos, pois não se encontraram dentro das concentrações testadas, o que pode ser indicativo de resistência devido ao valor de CIM >16  $\mu\text{g/ml}$  (PEANO et al., 2020), e, portanto, não foram mostrados na Tabela 1.

### 5.1.2 Combinação de fármacos *in vitro*

A suscetibilidade *in vitro* e os valores de ICIF para os 11 isolados de *M. pachydermatis* testados estão listados na Tabela 2. Os intervalos da CIM e a média geométrica (MG) individual dos fármacos estão demonstrados na Tabela 3. A MG da CIM das combinações, assim como a interpretação da interação podem ser observadas na Tabela 4. A maioria das interações entre os antifúngicos resultou em indiferença (IND). As maiores proporções de sinergismo (SIN) ficaram entre as combinações de ITZ+CQL e ITZ+PH151 (54,5% dos isolados). Em geral, os resultados obtidos com as diferentes combinações de antifúngicos frente as 11 isolados de *M. pachydermatis* foram considerados bons, pois nenhuma das combinações resultou em antagonismo (ANT) entre as substâncias.

**Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) individual e entre combinações de antifúngicos frente aos 11 isolados de *M. pachydermatis***

Cepa	CIM (µg/ml)					CIM (µg/ml)																							
						TRB/CQL				TRB/PH151				TRB/PH153				ITZ/CQL				ITZ/PH151				ITZ/PH153			
	TRB	ITZ	CQL	PH 15 1	PH 15 3	TRB	CQL	ICIF	INT	TRB	PH 15 1	ICIF	INT	TRB	PH 153	ICIF	INT	ITZ	CQL	ICIF	INT	ITZ	PH 151	ICIF	INT	ITZ	PH 15 3	ICIF	INT
ATCC	2	8	1	64	16	1	0,5	0,75	IND	1	16	0,75	IND	1	4	0,75	IND	2	0,5	0,75	IND	1	16	0,375	SIN	4	2	0,625	IND
M14	0,062	8	1	16	16	0,015	0,25	0,375	SIN	0,007	8	0,625	IND	0,007	16	1,125	IND	1	0,25	0,375	SIN	1	4	0,375	SIN	2	2	0,375	SIN
M-C15	2	8	1	16	16	1	0,5	1	IND	0,5	4	0,5	SIN	0,25	8	0,625	IND	2	0,5	0,75	IND	4	2	0,625	IND	4	4	0,75	IND
M37	2	8	1	16	16	0,25	0,25	0,25	SIN	0,5	2	0,375	SIN	1	2	0,625	IND	1	0,25	0,375	SIN	2	2	0,375	SIN	4	8	1	IND
M1c	1	4	2	32	16	2	2	3	IND	0,125	8	0,375	SIN	0,5	4	0,75	IND	2	2	1,5	IND	2	8	0,75	IND	2	2	0,625	IND
M-C8	0,062	4	2	32	16	0,031	1	1	IND	0,031	8	0,75	IND	0,031	4	0,75	IND	2	2	1,5	IND	2	8	0,75	IND	2	8	1	IND
M2c	2	0,5	2	32	16	0,5	0,5	0,5	SIN	0,5	8	0,5	SIN	1	2	0,625	IND	0,062	0,5	0,375	SIN	0,125	4	0,375	SIN	0,062	8	0,625	IND
M3c	2	0,5	1	32	16	1	0,25	0,75	IND	1	8	0,75	IND	1	4	0,75	IND	0,25	0,125	0,625	IND	0,125	16	0,75	IND	0,125	2	0,375	SIN
M4c	0,5	0,5	1	32	16	0,25	0,25	0,75	IND	0,25	4	0,625	IND	0,25	4	0,75	IND	0,062	0,25	0,375	SIN	0,062	8	0,375	SIN	0,125	4	0,5	SIN
M5c	2	0,5	1	32	16	0,5	0,125	0,375	SIN	1	4	0,625	IND	0,5	4	0,5	SIN	0,125	0,125	0,375	SIN	0,125	4	0,375	SIN	0,125	4	0,5	SIN
M-C22	0,062	0,5	2	32	16	0,015	1	0,75	IND	0,015	8	0,5	SIN	0,015	8	0,75	IND	0,125	0,5	0,5	SIN	0,125	16	0,75	IND	0,125	4	0,5	SIN

TRB, terbinafina; ITZ, itraconazol; CQL, clioquinol; ICIF, índice de concentração inibitória fracionada; INT, interpretação; IND, indiferente; SIN, sinergismo.

**Tabela 3 – Suscetibilidade aos fármacos sozinhos dos 11 isolados de *M. pachydermatis* utilizadas no teste de combinação de fármacos *in vitro***

MOLÉCULAS	CIM (ug/ml) range	GM
ITZ	0,5 - 8	2
TRB	0,06 - 2	0,64
CQL	1 - 2	1,29
PH151	16 - 64	28,21
PH153	16	16

CIM, concentração inibitória mínima; MG, média geométrica.

**Tabela 4 – Resultados das combinações *in vitro* de fármacos e interpretação das interações frente aos 11 isolados de *M. pachydermatis***

INTERAÇÕES ENTRE OS COMPOSTOS				
COMBINAÇÕES	MG	%		
		SIN	IND	ANT
TRB+CQL	0,69	36,4	63,6	0,0
TRB+PH151	0,56	45,5	54,5	0,0
TRB+PH153	0,71	9,1	90,9	0,0
ITZ+CQL	0,59	54,5	45,5	0,0
ITZ+PH151	0,51	54,5	45,5	0,0
ITZ+PH153	0,59	45,5	54,5	0,0

MG, média geométrica; SIN, sinergismo; IND, indiferença; ANT, antagonismo.

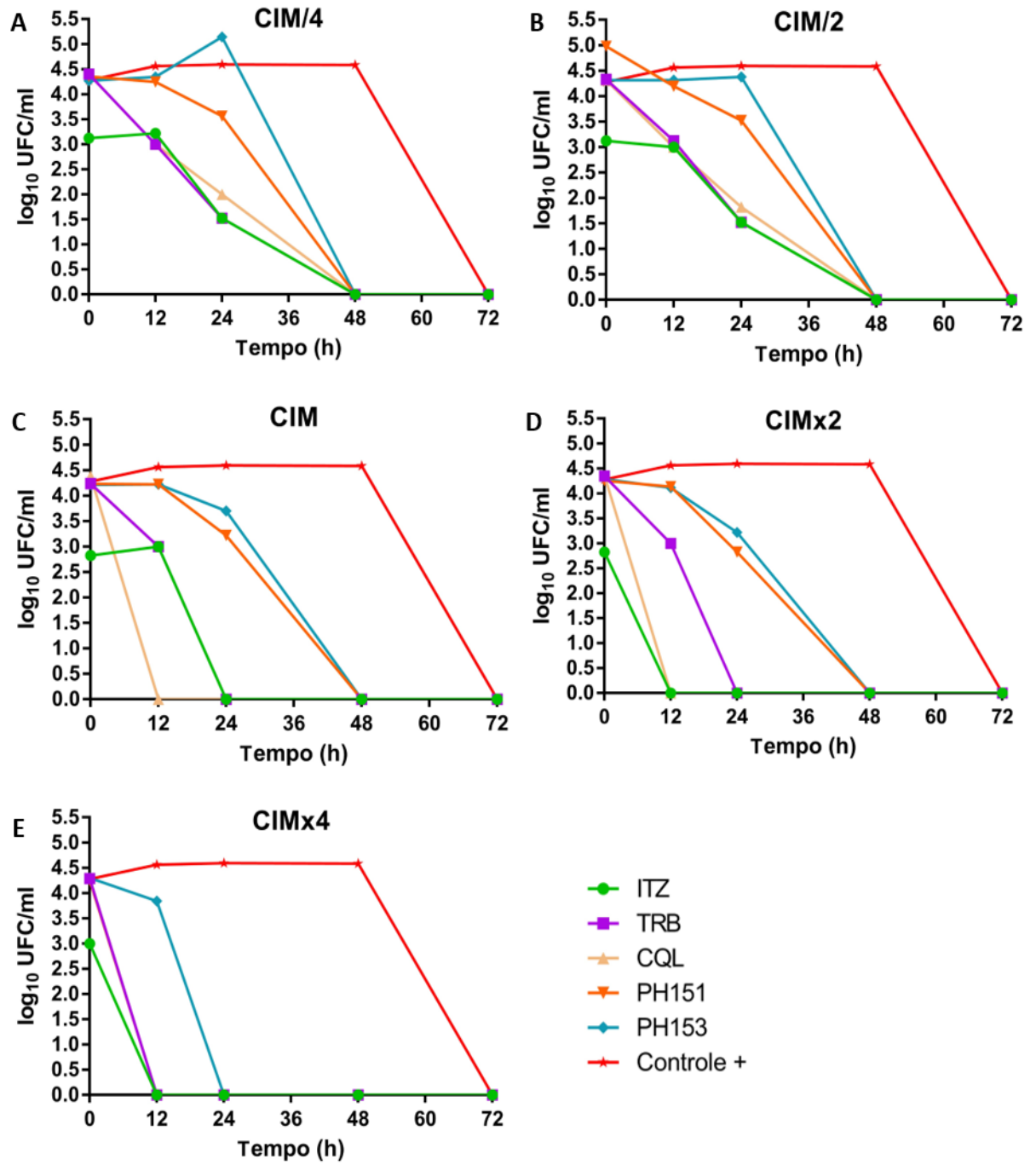
### 5.1.3 Ensaio de tempo de morte (*time-kill*)

Os ensaios de tempo de morte utilizando a isolado *M. pachydermatis* ATCC 14522, com inóculo entre  $1-5 \times 10^6$  UFC/ml, foram realizados frente aos antifúngicos ITZ, TRB, CQL, PH151 e PH153, nas concentrações de CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2 e CIMx4, nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72 h. A Figura 9 demonstra que todas as concentrações dos antifúngicos testadas foram fungicidas frente a *M. pachydermatis*,

ou seja, o efeito fungicida foi considerado quando houve uma diminuição de  $\geq 99,9\%$  no  $\log_{10}$  UFC/ml em comparação com o inóculo inicial, diferindo apenas quanto ao tempo. Para o ITZ as CIM/4 (2 ug/ml) e CIM/2 (4 ug/ml) demonstraram atividade fungicida em 48 h, a CIM (8 ug/ml) em 24 h e as CIMx2 (16 ug/ml) e CIMx4 (32 ug/ml) em 12 h. A TRB demonstrou atividade fungicida para CIM/4 (0,5 ug/ml) e CIM/2 (1 ug/ml) em 48 h, para CIM (2 ug/ml) e CIMx2 (4 ug/ml) em 24 h, e para CIMx4 (8 ug/ml) em 12 h. A atividade fungicida do CQL foi observada em 48 h nas CIM/4 (0,25 ug/ml) e CIM/2 (0,5 ug/ml), e 12 h para CIM (1 ug/ml) e CIMx2 (2 ug/ml), enquanto na CIMx4 (4 ug/ml) nenhum crescimento fúngico foi observado. Para o PH151 CIM/4 (16 ug/ml), CIM/2 (32 ug/ml), CIM (64 ug/ml) e CIMx2 (128 ug/ml) a atividade fungicida foi demonstrada em 48 h. Na CIMx4 (256 ug/ml) não houve crescimento fúngico. Já o PH153 demonstrou atividade fungicida na CIMx4 (64 ug/ml), em 24 h, mas na sequência a atividade fungicida predominou em 48 h para CIM/4 (4 ug/ml), CIM/2 (8 ug/ml), CIM (16 ug/ml) e CIMx2 (32 ug/ml). Com exceção do PH153 que apresentou proliferação celular na CIM/4 no tempo 24 h, todas as demais concentrações das substâncias antifúngicas nos diferentes tempos demonstraram uma diminuição no tempo de morte de acordo com o aumento da concentração da substância.



Figura 9 – Ensaio de tempo de morte para *M. pachydermatis* ATCC 14522 frente aos antifúngicos ITZ, TRB, CQL, PH151 e PH153, nas diferentes CIMs

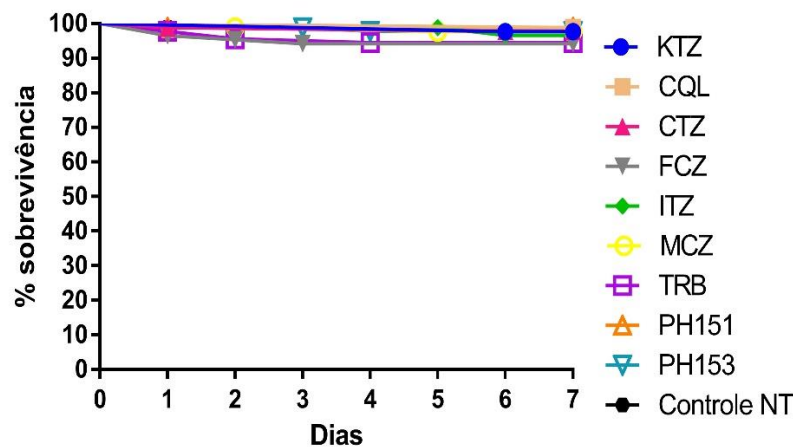


## 5.2 TESTES *IN VIVO*

### 5.2.1 Teste de toxicidade

Com o teste de toxicidade *in vivo*, em moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes, obtivemos os percentuais de sobrevivência das moscas frente aos antifúngicos KTZ, CTZ, FCZ, ITZ, MCZ, TRB, CQL, PH151 e PH153, testados na dose de 1 mg/ml, pela via oral, por um período de sete dias. Esses percentuais foram comparados ao grupo controle sem tratamento (Figura 10). Todos os antifúngicos foram considerados não tóxicos para as moscas, pela via oral, pois o percentual de mortalidade de cada grupo não diferiu estatisticamente do grupo não tratado.

**Figura 10 – Determinação da toxicidade de antifúngicos azóis, TRB e 8-HQs. Moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes foram expostas a 1 mg/ml de cada substância, via oral, e a curva de sobrevivência comparada ao grupo controle não tratado (NT). Os dados foram obtidos de três experimentos independentes, e não houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os grupos ( $n=30$  moscas/grupo)**

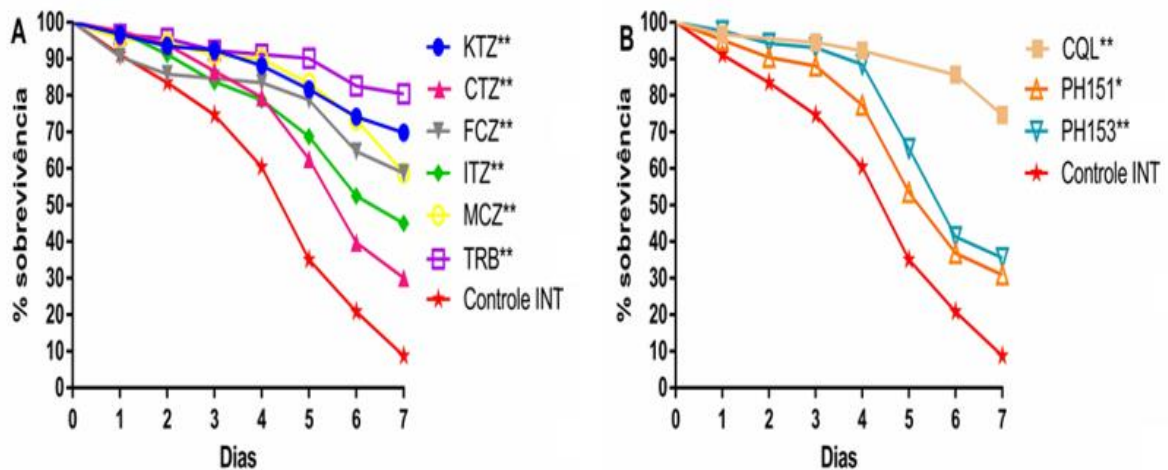


### 5.2.2 Perfil de sobrevivência

A efetividade dos azóis, da TRB e das 8-HQs no tratamento de moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes infectadas com *M. pachydermatis* ATCC 14522 foi observada a partir de curvas de sobrevivência (teste de *logrank*). Moscas infectadas e tratadas com os agentes antifúngicos tiveram taxas de sobrevivência estatisticamente maiores em comparação ao grupo de moscas infectadas e não

tratadas. Entre os fármacos (Figura 11A), a TRB obteve a melhor taxa, com 80,4% de sobrevivência após os sete dias de tratamento, seguido pelo KTZ, com 69,9%, MCZ com 58,9%, FCZ com 58,8%, ITZ com 45% e CTZ com 30,1%. Entre as 8-HQs (Figura 11B), o CQL teve o melhor percentual de sobrevivência, com 74,7%; já as moléculas tiveram valores bem inferiores, PH153 com 35,6% e PH151 com 30,9%. Mesmo apresentando valores de percentual de sobrevivência mais baixos, as moléculas PH153 e PH151 também diferiram estatisticamente quando comparadas ao grupo controle infectado e não tratado, assim como os demais fármacos. As moscas do grupo controle infectadas e não tratadas tiveram um percentual de sobrevivência de 8,8% no dia 7 pós-inoculação.

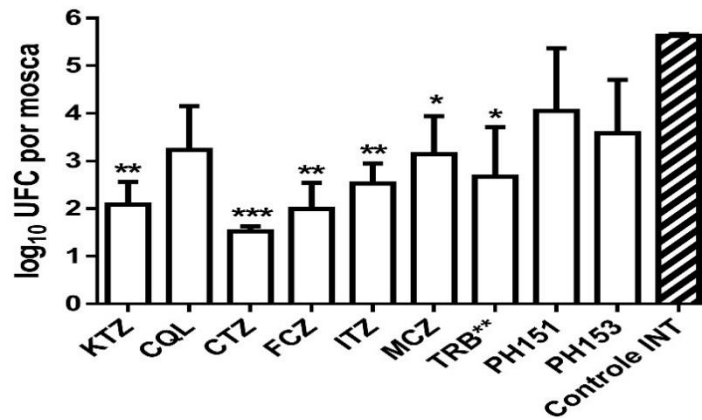
**Figura 11 – Curvas de sobrevivência de moscas *D. melanogaster* Toll-deficientes infectadas com *M. pachydermatis* e tratadas com KTZ, CTZ, FCZ, ITZ, MCZ e TRB (A) e com CQL, PH151 e PH153 (B). Os dados foram obtidos de médias de três experimentos independentes (n=30 moscas/grupo). Os asteriscos indicam a diferença estatística com o grupo controle infectado e não tratado (INT) (\*P<0,01 e \*\*P<0,001)**



### 5.2.3 Avaliação da carga fúngica

A carga fúngica das moscas *D. melanogaster* Toll-deficientes mortas, que foram infectadas com *M. pachydermatis* e tratadas com os agentes antifúngicos, foi determinada após a maceração dessas, a partir da contagem de UFC/ml, após 72 h de incubação a 35 °C e foi expressa em valores de log<sub>10</sub> UFC/mosca (Figura 12).

**Figura 12 – Cargas fúngicas obtidas de moscas mortas após sete dias de infecção com *M. pachydermatis* e tratadas com agentes antifúngicos azólicos, TRB e 8-HQs. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao controle infectado e não tratado (INT) (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ). Os testes foram realizados em triplicata.**

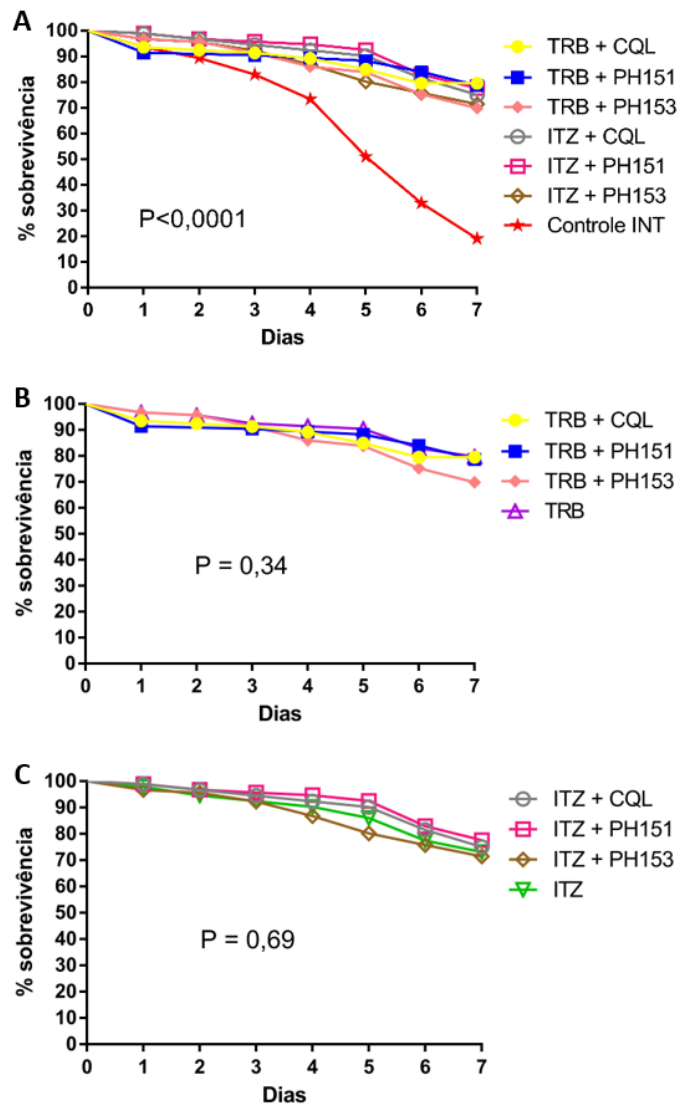


Moscas tratadas com os antifúngicos CTZ, FCZ, KTZ, ITZ, TRB e MCZ tiveram as menores cargas fúngicas, em ordem decrescente, em comparação ao grupo controle infectado não tratado após os sete dias de tratamento, e obtiveram diferenças estatísticas significativas em comparação com o grupo controle infectado e não tratado. As cargas fúngicas do CTZ não condizem com os percentuais de sobrevivência obtidos anteriormente, pois o grupo tratado com CTZ, que aqui obteve o menor crescimento fúngico, no perfil de sobrevivência foi o que menos protegeu as moscas contra a infecção, enquanto o CQL, que obteve uma das maiores cargas fúngicas em comparação ao grupo infectado e não tratado, não diferindo estatisticamente do grupo controle, foi um dos antifúngicos que apresentou o maior percentual de sobrevivência entre as moscas tratadas. O ITZ, a TRB e o MCZ apresentaram valores de carga fúngica significativos, mas o ITZ que aqui obteve um valor de  $P < 0,01$  apresentou um percentual de sobrevivência de 45%; enquanto a TRB e o MCZ obtiveram valores de carga fúngica com  $P < 0,05$ , sendo que a TRB apresentou o maior percentual de sobrevivência entre todos os compostos (80,4%), e o MCZ 58,9%. Os derivados das 8-HQs não tiveram resultados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle infectado e não tratado. Esses resultados estão em linha com os encontrados nas curvas de sobrevivência das moscas, à exceção do CQL, que foi um dos antifúngicos que apresentou o maior percentual de sobrevivência entre as moscas tratadas (Figura 11).

### 5.2.4 Combinação de fármacos *in vivo*

Moscas *Toll*-deficientes foram utilizadas no teste de combinação de fármacos *in vivo*, onde os antifúngicos ITZ, TRB, CQL, PH151 e PH153, em seis combinações diferentes, foram comparados com grupos tratados contendo os compostos isolados e um grupo controle sem tratamento, todos inoculados com *M. pachydermatis* ATCC 14522 ( $10^7$  UFC/ml). Os resultados, após sete dias de inoculação, estão demonstrados na Figura 13.

**Figura 13 - Curvas de sobrevivência de moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes infectadas com *M. pachydermatis* e tratadas com fármacos em associação. Combinações comparadas com o grupo controle infectado e não tratado (INT) (A). Comparação entre as associações de substâncias com a TRB (B) e o ITZ (C) isolados. Três experimentos independentes (n=30 moscas/grupo) foram realizados para a obtenção dos dados. A diferença estatística com o grupo controle infectado e não tratado (INT) foi determinada quando  $P < 0,05$ .**



Todas as combinações de antifúngicos testadas, ITZ+CQL, ITZ+PH151, ITZ+PH153, TRB+CQL, TRB+PH151 e TRB+PH153, demonstraram atividade antifúngica significativa contra a cepa de *M. pachydermatis* ATCC 14522 em moscas *Toll*-deficientes, assim como os compostos individuais ITZ, TRB, CQL, PH151 e PH153, quando comparados ao grupo controle infectado sem tratamento ( $P < 0,0001$ ) (Figura 13A). Quando analisamos as curvas de sobrevivência da TRB, sozinha e em combinação (Figura 13B), e do ITZ, sozinho e em combinação (Figura 13C), os resultados não foram estatisticamente significativos para nenhuma das comparações ( $P > 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores de suscetibilidade entre antifúngicos mostraram valores de CIM semelhantes aos encontrados pelo nosso grupo, como para o KTZ, o MCZ e a TRB (PEANO et al., 2012; CAFARCHIA et al., 2012a; WEILER et al., 2013; CHIAVASSA, TIZZANI, PEANO, 2014; SCHLEMMER et al., 2019). Esses resultados demonstram que tanto o KTZ, o MCZ e a TRB podem ser excelentes opções para o tratamento oral e tópico de *M. pachydermatis*. Os valores de CIM encontrados para o CTZ e o ITZ foram considerados intermediários, sendo os resultados semelhantes aos encontrados por outros grupos, mas diferiram quanto às MG encontradas por eles (WEILER et al., 2013; SCHLEMMER et al., 2019).

A menor atividade *in vitro* do FCZ também foi observada por diferentes grupos, indicando sua menor eficácia em relação aos demais antifúngicos azóis. Ademais, tem histórico de isolados de *M. pachydermatis* resistentes, além da falta de efeito fungicida que pode levar à erradicação incompleta dos fungos, com tratamentos prolongados e repetitivos, à recorrência das infecções, e à produção de biofilme (CAFARCHIA et al., 2012a; CARRILLO-MUNOZ et al., 2013; CAFARCHIA et al., 2015; FIGUEREDO, CAFARCHIA, OTRANTO, 2013; SCHLEMMER et al., 2019; RHIMI et al., 2020).

Este é o primeiro trabalho de suscetibilidade *in vitro* entre as 8-HQs CQL, PH151 e PH153 frente a isolados de *M. pachydermatis*, no qual obtivemos os menores valores de CIM para o CQL e elevados valores de CIM para as moléculas PH153 e PH151. A faixa de valores de CIM do CQL é semelhante ao encontrado por Pippi e col. (2017), que variou de 0,063-1 µg/ml para *Candida krusei*; 0,25-1 µg/ml para *Microsporum canis*; de 0,5-1 µg/ml para *Nanizzia gypsea*; de 0,25-2 µg/ml para *Trichophyton mentagrophytes* e de 0,125-1 µg/ml para *T. rubrum*. Os valores de CIM encontrados para as moléculas PH151 e PH153 parcialmente não condizem com os resultados encontrados por Joaquim e col. (2019), que obtiveram os seguintes valores de CIMs; PH151 = 3 µM (1-2 ug/ml) e PH153 = 24 uM (4-8ug/ml), tanto para *C. albicans*, *M. canis* e *T. mentagrophytes*, pois encontramos valores bem superiores de CIM para o PH151 e o PH153. Os valores das CIMs do CQL mostraram que esse fármaco é eficaz contra *M. pachydermatis in vitro*. No trabalho de Costa e col. (2020) os valores encontrados para a CIM do CQL frente aos dermatófitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *N. gypsea* ficou entre 0,5-1 ug/ml, mesma faixa de CIM

encontrada por Chaves e col. (2020) para o CQL frente a *Fusarium* spp., sendo os resultados encontrados em ambos os trabalhos semelhantes aos do presente trabalho.

Um obstáculo para a seleção dos agentes antifúngicos mais eficazes para o tratamento das fungemias localizadas ou generalizadas de *Malassezia* spp. é a falta de testes de suscetibilidade *in vitro*, pois estes ainda não foram padronizados, o que dificulta a comparação de dados encontrados em diferentes trabalhos, devido ao uso de diferentes técnicas, concentrações e diluições (GUILLOT e BOND, 2021; PEANO et al., 2020; RHIMI et al., 2020; HOBI et al., 2022).

Os azóis e a TRB são os antifúngicos mais utilizados no tratamento das malassezioses, mas apesar das inúmeras tentativas de tratar essas infecções fúngicas, existe uma enorme tendência em direção à recorrência de infecções em animais e humanos (NEGRE et al., 2009; BOND et al., 2010; RHIMI et al., 2020; SAUNTE et al., 2020). A resistência microbiológica é um fator determinante para a ocorrência de sucesso ou falha na terapia antifúngica, e os testes *in vitro* são indispensáveis para a sua avaliação. Diferentes estudos vêm demonstrando efeitos benéficos nas associações entre os antifúngicos com diferentes mecanismos de ação (DANIELLI et al. 2018; COSTA et al., 2020). Nesse estudo avaliamos o efeito antifúngico entre seis combinações de compostos frente a 11 isolados de *M. pachydermatis*, sendo elas TRB+CQL, TRB+PH151, TRB+PH153, ITZ+CQL, ITZ+PH151 e ITZ+PH153. O ITZ e a TRB foram os agentes antifúngicos escolhidos para serem testados em associação com o CQL, PH151 e PH153, por terem demonstrado excelentes valores de CIM e de MG no teste de suscetibilidade anterior e também por não apresentarem resistência a *M. pachydermatis*. As interações sinérgicas encontradas nas combinações ITZ+CQL e ITZ+PH151 podem estar relacionadas ao efeito simultâneo dessas substâncias em alvos diferentes, pois o ITZ age inibindo a síntese do ergosterol em células fúngicas, componente vital da membrana celular dos fungos, enquanto o CQL (PIPPI et al., 2019b), o PH151 e o PH153 (PIPPI et al., 2019a) têm um provável mecanismo de ação antifúngico sobre a parede celular, como observado para *Candida* sp. e dermatófitos. A associação de antifúngicos é uma alternativa importante quando a monoterapia não é eficaz, pois pode reduzir a toxicidade do tratamento através da administração de doses menores



e potencializar a atividade antifúngica dos compostos (DANIELLI et al., 2018; SCHLEMMER et al., 2019).

Os ensaios de tempo de morte para *M. pachydermatis* ATCC 14522, realizados com os antifúngicos ITZ, TRB, CQL, PH151 e PH153, demonstraram atividade fungicida em todas as concentrações testadas (CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2 e CIMx4), com diminuição de  $\geq 99,9\%$  do número de UFC/ml de *M. pachydermatis* em comparação ao inóculo inicial, estando o aumento das concentrações diretamente relacionado à diminuição do tempo de morte fúngica. O efeito fungicida variou frente às diferentes concentrações dos compostos, para o ITZ, a TRB e o CQL que ficou entre 12 e 48 h, e para o PH151 e o PH153 ficou em 48 h. Pippi e col. (2017) mostraram resultados semelhantes de atividade fungicida do CQL frente a *T. mentagrophytes* em 96 h, e Costa e col. (2020) demonstraram atividade fungicida do CQL frente a *T. rubrum* também em 96 h e da TRB frente a *T. rubrum* em 72 h. Já no trabalho de Chaves e col. (2020) a atividade fungicida frente a *Fusarium solani* foi observada nas associações entre CQL+VRC e CQL+ ciclopirox olamina em 24 h. Sugita e col. (2006) demonstraram que o ITZ diminuiu o crescimento de *M. globosa* e *M. restricta* em até 90% da concentração do inóculo inicial, mas não apresentou atividade fungicida, resultado semelhante encontrado por Öz e col. (2016) frente a isolados de *Aspergillus não-fumigatus*. Até o momento não foram encontrados resultados de ensaio de tempo de morte para PH151 e PH153. De acordo com o trabalho de Chaves e col. (2020), o CQL demonstrou atividade contra biofilme de *Fusarium spp.* e, portanto, pode ter atividade antibiofilme em *M. pachydermatis*, pois esta levedura também é capaz de produzir biofilme, o que afeta diretamente a persistência da doença como consequência da resistência ao tratamento antifúngico. Substâncias com características fungicidas são altamente relevantes na clínica, principalmente em infecções fúngicas prolongadas, pois o uso de fármacos fungistáticos está fortemente associado ao aumento da resistência antifúngica (DANIELLI et al., 2018; COSTA et al., 2020). A ação fungistática ou fungicida não é absoluta para antifúngicos de uso clínico, como FCZ (LEE e LEE 2018), CTZ (CROWLEY e GALLAGHER 2014), TRB (SIGURGEIRSSON e HAY 2016), equinocandinas (INGHAM e SCHNEEBERGER 2012) e AMB (KOVACIC e COOKSY 2012), que já demonstraram que podem apresentar tanto efeito fungicida quanto

fungistático, dependendo da concentração do fármaco e da espécie fúngica em questão (MACHADO et al., 2019).

Moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes foram utilizadas nos testes *in vivo* para determinar a toxicidade dos antifúngicos KTZ, CTZ, FCZ, ITZ, MCZ, TRB, CQL, PH151 e PH153. A partir do percentual de sobrevivência encontrado, concluiu-se que todos os compostos foram considerados não tóxicos para as moscas quando utilizados pela via oral, dentro da dose proposta para os estudos de eficácia *in vivo*.

Resultados semelhantes de percentual de sobrevivência em moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes infectadas por *Aspergillus*, tratadas com agentes antifúngicos azólicos (VRC), e comparadas ao grupo não tratado, foram descritos por Lionakis e col. (2005). Os autores obtiveram 60% de sobrevivência entre as moscas tratadas em comparação a 15% das não tratadas. Chamilos e col. (2006) infectaram as moscas com *C. albicans* e trataram com 1 mg/ml de FCZ, e obtiveram >70% de sobrevivência após oito dias de tratamento em comparação ao grupo não tratado (5%). Wurster e col. (2019) infectaram moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes com duas cepas de *C. auris*, AR-0381 e AR-0386, e trataram com 1 mg/ml de FCZ ou PCZ e, após oito dias de tratamento, obtiveram 35 e 25% de sobrevivência entre as moscas tratadas com PCZ e 10 e 5% de sobrevivência entre as moscas tratadas com FCZ, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle não tratado (zero por cento de sobrevivência). Não foram encontrados até o momento estudos determinando o perfil de sobrevivência de moscas *D. melanogaster* tratadas com TRB frente a infecções fúngicas.

Resultados anteriores obtidos com as 8-HQs, testadas em moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes infectadas com *C. albicans*, diferiram dos nossos resultados, como pode ser visto no trabalho de Pippi e col. (2019c), que obtiveram um percentual de sobrevivência em torno de 90% entre as moscas tratadas com CQL e de 5% entre as não tratadas. Em um segundo trabalho, Pippi e col. (2020) infectaram as moscas com *C. albicans* e as trataram com as moléculas PH151 e PH153 (1 mg/ml) por sete dias, e obtiveram 80% de sobrevivência entre os grupos tratados, em comparação ao grupo não tratado (5%), para ambas as moléculas.

De acordo com os resultados obtidos em nosso trabalho, os agentes antifúngicos testados KTZ, CTZ, FCZ, ITZ, MCZ, TRB, CQL, PH151 e PH153, foram significativamente efetivos na concentração de 1 mg/ml, protegendo as moscas *D.*

*melanogaster Toll*-deficientes infectadas com *M. pachydermatis*, apesar de nenhum dos antifúngicos proteger as moscas completamente da infecção.

Os azóis KTZ, CTZ, FCZ, ITZ e MCZ são os agentes antifúngicos mais utilizados para o tratamento de infecções de *M. pachydermatis*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, apresentando bons resultados e, portanto, foram o primeiro grupo de antifúngicos escolhidos para o tratamento de moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes. A TRB faz parte das alilaminas, outra classe importante de agentes antifúngicos e amplamente utilizada clinicamente no tratamento de *M. pachydermatis* (CARRILLO-MUNOZ et al., 2013; PEANO et al., 2017). Entre os derivados das 8-HQs, o CQL, está sendo testado para uso oral e sistêmico em animais e humanos, pois já existe no mercado farmacêutico para uso tópico em associação com outros agentes farmacológicos no tratamento de infecções fúngicas. Enquanto isso, as moléculas PH151 e PH153, também derivadas das 8-HQs, vêm sendo testadas como agentes antifúngicos para uso tópico e sistêmico com testes *in vitro* e *in vivo* (PIPPI et al., 2017; JOAQUIM et al., 2019).

Os valores de carga fúngica de moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes infectadas e tratadas com antifúngicos azóis foram semelhantes aos encontrados por Chamilos e col. (2006), que infectaram as moscas com *Candida* e trataram com o FCZ e observaram que, apesar do percentual de sobrevivência ter sido maior que 70% nas moscas tratadas, os níveis de inflamação foram inferiores ao grupo não tratado. (Lionakis e col. (2005) infectaram moscas com *Aspergillus* e trataram com VRC e observaram uma maior sobrevivência (~60%) entre as moscas tratadas, além de valores de carga fúngica inferiores nos grupos de moscas tratadas quando comparadas as não tratadas. Já no trabalho de Wurster e col. (2019), onde a infecção nas moscas foi desenvolvida com *C. auris* e tratada com PCZ e FCZ, o perfil de sobrevivência das moscas tratadas foi bem inferior ficando entre ~35 e ~5% respectivamente, mas os níveis de inflamação demonstrados a partir da contagem de UFC/ml também foi bem menor nas moscas tratadas em comparação às não tratadas. No presente trabalho a carga fúngica encontrada nas moscas infectadas com *M. pachydermatis* e tratadas com CQL, PH151 e PH153, em relação ao grupo infectado e não tratado, não foi estatisticamente diferente, diferindo dos resultados encontrados por Pippi e col. (2019c), que infectaram as moscas com *C. albicans*, e obtiveram

resultados muito significativos quanto à redução da carga fúngica nas moscas tratadas com CQL.

Os testes de combinação de fármacos *in vivo* com antifúngicos em associação, ITZ+CQL, ITZ+PH151, ITZ+PH153, TRB+CQL, TRB+PH151 e TRB+PH153, em moscas *Toll*-deficientes infectadas com *M. pachydermatis* ATCC 14522, demonstraram atividade antifúngica estatisticamente significativa ( $P < 0,0001$ ) quando comparados ao grupo controle infectado e não tratado, corroborando com o observado nos testes de suscetibilidade *in vitro*. Contudo, a associação dos antifúngicos *in vivo* não teve resultado significativo quando comparada aos compostos isolados. Resultados semelhantes aos observados por Chamilos e col. (2006), ao infectarem moscas *Toll*-deficientes com zigomicetos e tratarem com lovastatina+VRC. A atividade antifúngica significativa observada entre as associações de antifúngicos frente a *M. pachydermatis* demonstra que mais estudos utilizando combinações devem ser realizados, objetivando tratamentos mais potentes, com doses menores e efeitos adversos minimizados, levando a uma maior adesão terapêutica do paciente.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com o nosso trabalho podemos concluir que:

✓ Todos os antifúngicos avaliados nesse estudo demonstraram atividade antimicrobiana *in vitro* frente aos 16 isolados de *M. pachydermatis* testados, com exceção da MFG e da molécula 2j. O KTZ foi o fármaco mais ativo, seguido por, em ordem decrescente, TRB, CQL, MCZ, CTZ, ITZ, FCZ, PH153 e PH151;

✓ As combinações entre as substâncias antifúngicas ITZ+CQL e ITZ+PH151, frente aos 11 isolados de *M. pachydermatis* demonstraram atividade predominantemente sinérgica, enquanto as demais combinações ITZ+PH153, TRB+CQL, TRB+PH151 e TRB+PH153 resultaram principalmente em indiferença. Nenhuma das associações resultou em interações antagônicas;

✓ Os antifúngicos apresentaram efeito fungicida para *M. pachydermatis*, com diminuição no tempo de morte de acordo com o aumento da concentração do composto. As moléculas PH151 e PH153 demonstraram uma atividade fungicida bem menor que a dos demais;

✓ O teste de toxicidade *in vivo* demonstrou que todos os antifúngicos testados, na dose de 1 mg/ml, via oral, por um período de sete dias, não foram tóxicos para as moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes;

✓ Já o perfil de sobrevivência das moscas *D. melanogaster Toll*-deficientes, infectadas com *M. pachydermatis* ATCC 14522 e tratadas com azóis, TRB e 8-HQs, demonstrou que o tratamento com os antifúngicos resultou em taxas de sobrevivência maiores e estatisticamente significativas em relação ao grupo de moscas infectadas e não tratadas. A TRB foi o composto com as melhores taxas de sobrevivência após os sete dias de tratamento, seguido, em ordem decrescente, por CQL, KTZ, MCZ, FCZ, ITZ, PH153, PH151 e CTZ;

✓ A avaliação da carga fúngica (UFC/ml) das moscas mortas pela infecção por *M. pachydermatis* e tratadas com os antifúngicos mostrou que CTZ, FCZ, KTZ, ITZ, TRB e MCZ, em ordem decrescente, foram os que apresentaram maior atividade fungicida. A carga fúngica das moscas tratadas com as 8-HQs não diferiu estatisticamente do grupo não tratado, demonstrando uma ação mais fungistática desse grupo;

✓ KTZ e TRB foram considerados os antifúngicos mais eficazes para o tratamento de moscas infectadas com *M. pachydermatis*, pois tiveram os maiores percentuais de sobrevivência e menores resultados de carga fúngica entre todos os grupos de moscas tratadas;

✓ No teste de combinação de fármacos *in vivo*, todas as combinações de compostos antifúngicos apresentaram resultados significativos de sobrevivência das moscas quando comparados ao grupo controle infectado e sem tratamento; no entanto, não houve diferença estatística quando as combinações foram comparadas com a TRB ou com o ITZ isolados;

✓ As 8-HQs, especialmente o CQL, têm potencial enorme para serem utilizadas em estudos clínicos contra infecções causadas por *M. pachydermatis*.

## REFERÊNCIAS

- ABOUSAMRA, M. M.; SALAMA, A. H. Enhancement of the topical tolnaftate delivery for the treatment of *tinea pedis* via proovesicular gel systems. **Journal of Liposome Research**. v. 27, n. 4, p. 324-334, 2016.
- AL-SWEIH, N. et al. *Malassezia pachydermatis* fungemia in a preterm neonate resistant to fluconazole and flucytosine. **Medical Mycology Case Reports**. v. 5, p. 9-11, 2014.
- ALSTERHOLM, M.; KARAMI N.; FAERGEMANN, J. Antimicrobial activity of topical skin pharmaceuticals - An *in vitro* study. **Acta Dermato-Venereologica**. v. 90, p. 239-245, 2010.
- ANGILERI, M. et al. Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog. **Medical Mycology Case Reports**. v. 23, p. 58-61, 2019.
- ARENDRUP, M. C. et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 20, n. 3, p. 76-98, 2013.
- ARVANITIS, M.; GLAVIS-BLOOM, J.; MYLONAKIS, E. Invertebrate models of fungal infection. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1832, n. 9, p. 1378-1383, 2013.
- BATRA, R. et al. *Malassezia* Baillon, emerging clinical yeasts. **Federation of European Microbiological Societies**. v. 5, p. 1101-1113, 2005.
- BOND, R.; PATTERSON-KANE, J.C.; LLOYD, D.H. Clinical, histopathological and immunological effects of exposure of canine skin to *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**. v. 42, p. 165-175, 2004.
- BOND, R.; GUILLOT, J.; CABAÑES, F. J. *Malassezia* yeasts in animal disease. *In: Malassezia and the Skin: Science and Clinical Practice*. New York: Springer. 2010. p. 271-299.
- BOUZ, G.; DOLEZAL, M. Advances in antifungal drug development: an up-to-date mini review. **Pharmaceuticals**. v. 14, n. 12, p. 1312, 2021.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 1**, de 28 de fevereiro de 2014. Dispõe sobre a lista de medicamentos liberados para importação em caráter excepcional. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0001\\_28\\_02\\_2014.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/int0001_28_02_2014.html). Acesso em: 09 ago. 2020.

BRILHANTE, R. S. N. et al. *Malassezia pachydermatis* from animals: Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. **Veterinary Microbiology**. v. 220, p. 47-52, 2018.

BUOMMINO, E. et al. Innate immune response in human keratinocytes infected by a feline isolate of *Malassezia pachydermatis*. **Veterinary Microbiology**. v. 163, p. 90-96, 2013.

CABAÑES, F. J. et al. New lipid-dependent *Malassezia* species from parrots. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 33, n. 2, p. 92-99, 2016.

CAFARCHIA, C. et al. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. **Veterinary Microbiology**. v. 155, n. 2-4, p. 395-398, 2012a.

CAFARCHIA, C. et al. Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. **Veterinary Microbiology**. v. 159, n. 3-4, p. 536-540, 2012b.

CAFARCHIA, C. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of a killer peptide against *Malassezia pachydermatis* causing otitis in dogs. **Medical Mycology**. v. 52, p. 350-355, 2014.

CAFARCHIA, C. et al. Azole susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* and tentative epidemiological cut-off values. **Medical Mycology**. v. 53, n. 7, p. 743-748, 2015.

CAHOON, L. The curious case of clioquinol. **Nature Medicine**. v. 15, n. 4, p. 356-359, 2009.

CALDERONE, R. et al. Antifungal drug discovery: the process and outcomes. **Future Microbiology**. v. 9, n. 6, p. 791-805, 2014.

CAMPOY, S.; ADRIO J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**. v.133, p. 86-96, 2017.



CARRILLHO-MUNOZ, A. J. et al. *In vitro* antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *Malassezia* species. **Mycoses**. v. 56, n. 5, p. 571-575, 2013.

CHAMILOS, G. et al. *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 193, n. 7, p. 1014-1022, 2006a.

CHAMILOS, G. et al. Lovastatin has significant activity against zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 1, p. 96-103, 2006.

CHAMILOS, G. et al. *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immune pathogenesis of zygomycosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 105, n. 27, p. 9367-9372, 2008.

CHANDRIKA, K. V. S. M.; SHARMAA, S. Promising antifungal agents: a minireview. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.28, n. 7, p. 115398, 2020.

CHANG, H. J. et al. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. **The New England Journal of Medicine**. v. 338, n. 11, p. 706-711, 1998.

CHANG, Y. L, et al. New facets of antifungal therapy. **Virulence**. v. 8, n. 2, p. 222-236, 2017.

CHAVES, F. et al. Executive summary: Diagnosis and treatment of catheter-related bloodstream infection: Clinical guidelines of Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) and the Spanish Society of Intensive Care Medicine and coronary Units (SEMICYUC). **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 36, n. 2, p. 112-119, 2018.

CHAVES, M. A. et al. Synergistic association of clioquinol with antifungal drugs against biofilm forms of clinical *Fusarium* isolates. **Mycoses**. v. 63, n. 10, p. 1069-1082, 2020.

CHEN, T. A.; HILL, P. B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Veterinary Dermatology**. v. 16, p. 4-26, 2005.

CHIAVASSA, E.; TIZZANI, P.; PEANO, A. *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with chronic and acute otitis externa. **Mycopathologia**. v. 178, p. 315-319, 2014.

CHOUDHURY, S.; MARTE, R. L. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in an adult on posaconazole prophylaxis for acute myeloid leukaemia. **Pathology**. v. 46, n. 5, p. 466-467, 2014.

CHRYSSANTHOU, E.; BROBERGER, U.; PETRINI, B. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. **Acta Paediatrica**. v. 90, n. 3, p. 323-327, 2001.

CHYB, S.; GOMPEL, N. **Atlas of *Drosophila* Morphology: Wild-type and classical mutants**. Oxford, UK: Academic Press, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard, 3 ed. CLSI Document M27– A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.

COSTA, B. et al. *In vitro* antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopirox and terbinafine. **Mycoses**. v. 63, n. 9, p. 993-1001, 2020.

CROWLEY, P. D.; GALLAGHER, H. C. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. **Journal of Applied Microbiology**. v. 117, p. 611-617, 2014.

DALLA LANA, D. F. **Desenvolvimento de novas entidades químicas e formulações para o tratamento de dermatomicoses**. 2018. 303f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018a.

DALLA LANA, D. F. et al. Nanoemulsion improves the antifungal activity of allylic thiocyanates against yeasts and filamentous pathogenic fungi. **Chemistry Select**. v. 3, p. 11663-11670, 2018b.

DALLA LANA, D. F. et al. *In vitro* pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling and efficacy against systemic candidiasis in *Drosophila melanogaster* of a bisaryloxypropanamine derivative. **Medical Mycology**. v. 59, n. 1, p. 58-66, 2021.

DAS NEVES JUNIOR, M. A. et al. Infecções em cateteres venosos centrais de longa permanência: revisão da literatura. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 9, n. 1, p. 46-50, 2010.

DANIELLI, L. J. et al. Antifungal mechanism of action of *Schinus lentiscifolius* Marchand essential oil and its synergistic effect *in vitro* with terbinafine and ciclopirox against dermatophytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 70, p. 1216-1227, 2018.

DIXIT, R. B. et al. Synthesis and antimicrobial activities of sulfono hydrazide-substituted 8-hydroxyquinoline derivative and its oxinates. **Applied Organometallic Chemistry**. v. 24, p. 408-413, 2010.

FIGUEREDO, L. A.; CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. **Medical Mycology**. v. 51, n. 8, p. 863-867, 2013.

FINKELSTEIN, D. I. et al. Clioquinol improves cognitive, motor function, and microanatomy of the alpha-synuclein hA53T transgenic mice. **ACS Chemical Neuroscience**. v. 7, p. 119-129, 2016.

FRANZ, A.; WOOD, W.; MARTIN, P. Fat body cells are motile and actively migrate to wounds to drive repair and prevent infection. **Developmental Cell**. v. 44, p. 460-470, 2018.

FRANKLIN, R. B. et al. Zinc ionophore (clioquinol) inhibition of human zip1-deficient prostate tumor growth in the mouse ectopic xenograft model: a zinc approach for the efficacious treatment of prostate cancer. **International Journal of Cancer and Clinical Research**. v. 3, n. 1, p. 1-11, 2016.

FUENTEFRÍA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**. v. 66, p. 2-13, 2017.

GAITANIS, G. et al. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 25, n. 1, p. 106-141, 2012.

GERSHON, H.; GERSHON, M; CLARKE, D. D. Antifungal activity of substituted 8-quinolinol-5 and 7-sulfonic acids: a mechanism of action is suggested based on intramolecular synergism. **Mycopathologia**. v. 155, p. 213-217, 2002.

GINTJEE, T. J.; DONNELLEY, M. A.; THOMPSON III, G. R. Aspiring antifungals: review of current antifungal pipeline developments. **Journal of Fungi**. v. 6, n. 28, p. 1-11, 2020.

GUILLOT, J.; BOND, R. Antifungal activity and toxicological parameters of 8-hydroxyquinoline-5-sulfonamides using alternative animal models. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 10. n. 79, p. 1925-1934, 2021.

GUPTA, A. K.; FLECKMAN, P.; BARAN, R. Ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of toenail onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 43, n. 4, p. S70-80, 2000.

HALL, M. J.; MIDDLETON, R. F.; WESTMACOTT, D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 11, p. 427-433, 1983.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. L. **Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman**. 2 ed. Porto Alegre: AMGH, 2015.

HOBI, S. et al. *Malassezia*: Zoonotic implications, parallels and differences in colonization and disease in humans and animals. **Journal of Fungi**. v. 8, n. 7, p. 708, 2022.

HOFFMANN, J. A., et al. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**. v. 284, n. 5418, p. 1313-1318, 1999.

HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. **Nature Immunology**. v. 3, n. 2, p. 121-126, 2002.

HONNAVAR, P. et al. *Malassezia arunalokei* sp. Nov., a novel yeast species isolated from seborrheic dermatitis patients and healthy individuals from India. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 54, n. 7, p. 1826-1834, 2016.

HOWARD, K. C. et al. A comprehensive overview of the medicinal chemistry of antifungal drugs: perspectives and promise. **Chemical Society Reviews**. v. 49, n. 8, p. 2426-2480, 2020.

IATTA, R. et al. Bloodstream infections by *Malassezia* and *Candida* species in critical care patients. **Medical Mycology**. v.52, p. 264-269, 2014.

IATTA, R. et al. The role of drug efflux pumps in *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia furfur* defense against azoles. **Mycoses**. v. 60, n. 3, p. 178-182, 2016.

IATTA, R. et al. Blood culture procedures and diagnosis of *Malassezia furfur* bloodstream infections: Strength and weakness. **Medical Mycology**. v. 56, p. 828-833, 2018.

ILAHI, A. e al. Molecular epidemiology of a *Malassezia pachydermatis* neonatal unit outbreak. **Medical Mycology**. v. 56, n. 1, p. 69-77, 2018.

INGHAM, C. J.; SCHNEEBERGER. P. M. Microcolony imaging of *Aspergillus fumigatus* treated with echinocandins reveals both fungistatic and fungicidal activities. **PLoS ONE**. v. 7: p. e35478, 2012.

JESUS, F. P. K. et al. *In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and-resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. **Veterinary Microbiology**. v. 152, n. 1-2, p. 161-164, 2011.

JOAQUIM, A. C. et al. Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8- hydroxyquinolines with few fungal lines. **Chemical Biology & Drug Design**. v. 93, n. 6, p. 1186-1196, 2019.

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

KANO, R. et al. Multi-azole-resistant strain of *Malassezia pachydermatis* isolated from a canine *Malassezia* dermatitis. **Medical Mycology**. v. 57, p. 346-350, 2019.

KLEPSEK, M. E. et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, p. 1207-1212, 1998.

KOLECKA, A. et al. Efficient identification of *Malassezia* yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time off light mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **British Journal of Dermatology**. v. 170, n. 2, p. 332-341, 2014.

KONAGAYA, M. et al. Clinical analysis of longstanding subacute myelo-optico-neuropathy: sequelae of clioquinol at 32 years after its ban. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 218, p. 85-90, 2004.

KONISHI, T.; HAYASHI, K.; SUGIYAMA, H. The aggravation of depression with aging in Japanese patients with subacute myelo-optico-neuropathy (SMON). **Internal Medicine**. v. 56, p. 2119-2123, 2017.

KOVACIC, P.; COOKSY, A. Novel, unifying mechanism for amphotericin B and other polyene drugs: electron affinity, radicals, electron transfer, autoxidation, toxicity, and antifungal action. **Medicinal Chemistry Communications**. v. 3, p. 274-280, 2012.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: SARVIER, 2002.

LAUTERT, C. et al. Enzymatic characterization of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. **African Journal of Microbiology Research**. v. 5, n. 21, p. 3532-3536, 2011.

LAVORATO, S. N. et al. Synthesis and antileishmanial activity of 1,3-bis(aryloxy)propano-2-amines. **Medicinal Chemistry Research**. v. 26, p. 1052-1072, 2017.

LEE, J. et al. First case of catheter-related *Malassezia pachydermatis* fungemia in an adult. **Annals of Laboratory Medicine**. v. 39, p. 99-101, 2019.

LEE, W.; LEE, D. G. A novel mechanism of fluconazole: fungicidal activity through dose-dependent apoptotic responses in *Candida albicans*. **Microbiology**. v. 164, p. 194-204, 2018.

LEMAITRE, B., et al. A recessive mutation, immune deficiency (*Imd*), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. **Genetics**. v. 92, p. 9465-9469, 1995.

LEMAITRE, B.; REICHHART, J.; HOFFMANN, J. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 94, n. 26, p. 14614-14619, 1997.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**. v. 25, p. 697-743, 2007.

LIONAKIS, M. S. et al. *Toll*-deficient *Drosophila* flies as a fast, high-through put model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* Virulence. **The Journal of Infectious Diseases**. v, 191, n. 7, p. 1188-1195, 2005.

LIONAKIS, M. S.; KONTOYIANNIS, D. P. *Drosophila melanogaster* as a model organism for invasive Aspergillosis. In: BRAND, A. C.; MACCALLUM, D. M. (Ed.). **Host-fungus interactions: Methods and protocols, methods in molecular biology**. New York: Humana Press. v. 845, cap. 32, p. 455-468, 2012.

LIPNER, S. R. Pharmacotherapy for onychomycosis: new and emerging treatments. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. v. 20, n. 6, p. 725-735, 2019.

LONA-REYES, J. C. et al. Bacteriemia relacionada con catéter venoso central: incidencia y factores de riesgo en um hospital del occidente de México. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**. v. 73, n, 2, p. 105-110, 2016.

LORCH, J. M. et al. *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. **Persoonia**. v. 41, p. 56-70, 2018.

MACHADO, G. R. M. et al. Chloroacetamide derivatives as a promising topical treatment for fungal skin infections. **Mycologia**. v. 111, n. 4: 612-623, 2019.

MAO, X.; SCHIMMER, A. D. The toxicology of clioquinol. **Toxicology Letters**. v. 182, p. 1-6, 2008.

MARASCHIN, M. M. et al. Infecções causadas por *Malassezia*: novas abordagens. **Saúde, Santa Maria**. v. 34, n. 1-2, p. 4-8, 2008.

MASON, C. L. et al. Study to assess *in vitro* antimicrobial activity of nine ear cleaners against 50 *Malassezia pachydermatis* isolates. **Veterinary Dermatology**. v. 24, p. 362-381, 2013.

MATOUSEK, J. L. et al. Evaluation of the effect of pH on *in vitro* growth of *Malassezia pachydermatis*. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 67, n. 1, p. 56-59, 2003.

MEADE, T. W. Subacute myelo-optic neuropathy and clioquinol. An epidemiological case-history for diagnosis. **British Journal of Preventive and Social Medicine**. v. 29, p. 157-169, 1975.

MERKEL, S. et al. *Drosophila melanogaster* as a model for the study of *Malassezia pachydermatis* infections. **Veterinary Microbiology**. v. 224, p. 31-33, 2018.

MUSCULOSKELETAL MEDICINE. **Mechanism of action of antifungal drugs**. 2019. Disponível em: <https://musculoskeletalkey.com/antifungal-therapy/>. Acesso em 08 jul. 2020.

NAKAE, K., Relation between subacute myelo-optic neuropathy (S.M.O.N.) and clioquinol: nationwide survey. **The Lancet**. v. 1, n. 7796, p. 171-173, 1973.

NEGRE, A.; BENSIGNORT, E.; GUILLOT, J. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for *Malassezia* dermatitis in dogs. **Veterinary Dermatology**. v. 20, n. 1, p. 1-12, 2009.

NGO, H. X.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; GREEN, K. D. A complex game of hide and seek: the search for new antifungals. **Medicinal Chemistry Communications**. v. 7, n. 7, p. 1285-130, 2016.

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

OLIVERI, V.; VECCHIO, G. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.120, p. 252-274, 2016.

ÖZ, Y. et al. Time-kill kinetics and *in vitro* antifungal susceptibility of Non-*fumigatus* *Aspergillus* species isolated from patients with ocular mycoses. **Mycopathologia**. v. 181, p. 225-233, 2016.

PARENTE-ROCHA, J. A. Antifungal resistance, metabolic routes as drug targets, and new antifungal agents: an overview about endemic dimorphic fungi. **Mediators of Inflammation**. v. 2017, p. 9870679, 2017.

PARSONS, B.; FOLEY, E. Cellular immune defenses of *Drosophila melanogaster*. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 58, p. 95-101, 2016.

PEANO, A. et al. Evaluation of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to clotrimazole, miconazole and thiabendazole using a modified CLSI M27-A3 microdilution method. **Veterinary Dermatology**. v. 23, p. 131-e29, 2012.



PEANO, A. et al. Methodological issues an antifungal susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis*. **Journal of Fungi**. v. 3, n. 3, p. 1-15, 2017.

PEANO, A. et al. Antifungal resistance regarding *Malassezia pachydermatis*: Where are we now? **Journal of Fungi**. v. 25, p. 93, 2020.

PERIN, D. C. et al. Evidence-based measures to prevent central line-associated bloodstream infections: a systematic review. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. v. 24, p. 1-10, 2016.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**. v. 125, n. 1A, p. S3-S13, 2012.

PIANALTO, K. M.; ALSPAUGH, J. A. New horizons in antifungal therapy. **Journal of Fungi**. v. 2, n. 26, p. 1-24, 2016.

PIPPI, B. et al. Evaluation of 8-hydroxyquinoline derivatives as hits for antifungal drug design. **Medical Mycology**. v. 55, n. 7, p. 763-773, 2017.

PIPPI, B. **Análogos da 8-hidroxiquinolina como candidatos a agentes antimicóticos: estudo da atividade antifúngica, mecanismos de ação e parâmetros toxicológicos**. 2018. 254 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018a.

PIPPI, B. et al. Clioquinol is a promising preventive morphological switching compound in the treatment of *Candida* infections linked to the use of intrauterine devices. **Journal of Medical Microbiology**. v. 67, p. 1655-1663, 2018b.

PIPPI, B. et al. 8-Hydroxyquinoline-5-sulfonamides are promising antifungal candidates for the topical treatment of dermatomycosis. **Journal of Applied Microbiology**. v. 128, p. 1038-1049, 2019a.

PIPPI, B. et al. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v. 27, p. 41-48, 2019b.

PIPPI, B. et al. Oral clioquinol is effective in the treatment of a fly model of *Candida* systemic infection. **Mycoses**. v. 62, p. 475-481, 2019c.

PIPPI, B. et al. Antifungal activity and toxicological parameters of 8-hydroxyquinoline-5-sulfonamides using alternative animal models. **Journal of Applied Microbiology**. v. 130, p. 1925-1934, 2020.

PRAJNA, N. V. et al. Comparison of natamycin and voriconazole for the treatment of fungal keratitis. **Archives of Ophthalmology**. v. 128, n.6, p. 672-678, 2010.

PUIG, L. et al. Characterization of the species *Malassezia pachydermatis* and re-evaluation of its lipid dependence using a synthetic agar medium. **PLoS One**. v. 12, p. 1-12, 2017.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale: Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RHIMI, W. et al. *Malassezia* spp. yeasts of emerging concern in fungemia. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 10, p. 370, 2020.

ROBSON, D. et al. Evidence for possible clinically relevant antifungal resistance in *Malassezia pachydermatis*: 10 Cases. **Dermatology Chapter of the ACVSc Science Week Proceedings**. 2010. p. 93-100.

ROJAS, F. D. et al. Antifungal susceptibility of *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, and *Malassezia globosa* to azole drugs and amphotericin B evaluated using a broth microdilution method. **Medical Mycology**. v. 52, p. 641-646, 2014.

ROMAN, J. et al. *Malassezia pachydermatis* fungemia in an adult with multibacillary leprosy. **Medical Mycology Case Reports**. v. 12, p. 1-3, 2016.

SASHIDHARA, K. V. et al. Antidyslipidemic and antioxidative activities of 8-hydroxyquinoline derived novel keto-enamine Schiff's bases. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 44, p. 1813-1818, 2009.

SANTIN, R. et al. Atividade antifúngica de óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 66, n. 2, p. 367-373, 2014.

SARDI, J. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 31, n. 1, p. 22-29, 2014.

SAUNTE, D. M. L.; GAITANIS, G.; HAY, R. J. *Malassezia*-associated skin diseases, the use of diagnostics and treatment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 10, p. 112, 2020.

SCHLEMMER, K. B. et al. An experimental murine model of otitis and dermatitis caused by *Malassezia pachydermatis*. **Mycoses**. v. 61, p. 954-958, 2018.

SCHLEMMER, K. B. et al. *In vitro* combination of antifungal agents against *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**. v. 57, p. 324-327, 2019.

SCHLOTTFELDT, F. S. et al. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clínico laboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 38, n. 3, p. 199-204, 2002.

SCORZONI, L. et al. Searching new antifungals: The use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**. v. 123, p. 68-78, 2016.

SCORZONI, L. et al. Antifungal therapy: New advances in the understanding and treatment of mycosis. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, n. 36, p. 1-23, 2017.

SEGAL, E.; FRENKEL, M. Experimental *in vivo* models of candidiasis. **Journal of Fungi**. v. 4, n. 21, p. 1-10, 2018.

SIGURGEIRSSON, B.; HAY, R. J. The antifungal drugs used in skin disease. *In*: ÓLAFSSON, J.; HAY, R.; ed. **Antibiotic and Antifungal Therapies in Dermatology**. Cham: Springer. 2016. p. 141-156.

SONTHALIA, S.; AGRAWAL, M.; SEHGAL, V. N. Topical ciclopirox olamine 1%: revisiting a unique antifungal. **Indian Dermatology Online Journal**. v. 10, n. 4, p. 481-485, 2019.

SUGITA, T. et al. Time-kill assay of itraconazole against *Malassezia* species. **Microbiology and Immunology**. v. 50, n. 8, p. 625-627, 2006.

TABARA, K. et al. Amorolfine vs. ciclopirox – lacquers for the treatment of onychomycosis. **Postępy Dermatologii i Alergologii**. v. XXXII, n. 1, p. 40-45, 2015.

THEELEN, B. et al. *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. **Medical Mycology**. v. 56, p. S10-S25, 2018.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens. **Virulence**. v. 5, n. 4, p. 454-456, 2014.

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

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**. v. 3, p. 1-26, 2012.

VELEGRAKI, A. et al. *Malassezia* infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. **PLoS Pathogens**. v. 11, n. 1, p. 1-6, 2015.

WEHBE, M. et al. Development of a copper-clioquinol formulation suitable for intravenous use. **Drug Delivery and Translational Research**. v. 8, n. 1, p. 239-251, 2017.

WEILER, C. B. et al. Susceptibility variation of *Malassezia pachydermatis* to antifungal agents according to isolate source. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 1, p. 174-178, 2013.

WHITE, T. C. et al. Fungi on the skin: dermatophytes and *Malassezia*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 4, n. 8, p. a019802, 2014.

WU, G. et al. Genus-wide comparative genomics of *Malassezia* delineates its phylogeny, physiology, and niche adaptation on human skin. v. 11, n. 11, p. e1005614. **PLOS Genetics**. 2015.

WURSTER, S. et al. *Drosophila melanogaster* as a model to study virulence and azole treatment of the emerging pathogen *Candida auris*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 74, p. 1904-1910, 2019.

YAMAMOTO, M. et al. Utilization of matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of infantile seborrheic dermatitis-causing *Malassezia* microbiota of 1-month-old infants. **The Journal of Dermatology**. v. 41, p. 117-123, 2014.

YOU, Z. et al. Clotrimazole, an alternative antimicrobial agent against common pathogenic microbe. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 28, p. 492-501, 2018.

ZHANG, Y. H. et al. Efficacy and toxicity of clotrimazole treatment and A-beta42 inoculation in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**. v. 10, n. 5, p. 494-506, 2013.