



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOFÍSICA)



KELLY ISHIDA

**Atividade antifúngica de diferentes inibidores da
biossíntese de esteróis sobre isolados clínicos de *Candida* spp.:
efeito sobre o crescimento, ultraestrutura, ciclo celular e perfil
lipídico.**

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Rozental
Co-orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

KELLY ISHIDA

Atividade antifúngica dos inibidores da biossíntese de esteróis sobre isolados clínicos de *Candida* spp.: efeito sobre o crescimento, ultraestrutura, ciclo celular e perfil lipídico.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Rozental
Co-orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Rio de Janeiro
2010

Ficha catalográfica

Ishida, Kelly.

Atividade antifúngica de diferentes inibidores da biossíntese de esteróis sobre isolados clínicos de *Candida* spp.: efeito sobre o crescimento, ultraestrutura, ciclo celular e perfil lipídico/Kelly Ishida. Rio de Janeiro, 2010, xi, 184 f.:il.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biofísica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2010.

Orientadora: Sonia Rozental.

Co-orientador: Celso Vataru Nakamura.

1. *Candida* spp. 2. Antifúngicos 3. $\Delta^{24(25)}$ -esterol metiltransferase 4. Esqualeno sintase 5. Azasterol 6. Arilquinuclidina – Teses.

I. Rozental, S. (Orientadora). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Título.

Folha de aprovação

KELLY ISHIDA

Atividade antifúngica de diferentes inibidores da biossíntese de esteróis sobre isolados clínicos de *Candida* spp.: efeito sobre o crescimento, ultraestrutura, ciclo celular e perfil lipídico.

Rio de Janeiro, 15 de julho de 2010.

Dra. Sonia Rozental, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Orientadora)

Dr. Celso Vataru Nakamura, Universidade Estadual de Maringá (Co-orientador)

Dra. Rosângela Araújo Soares, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Revisora)

Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta, Universidade Estadual de Londrina (Banca examinadora)

Dra. Celuta Sales Alviano, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Banca examinadora)

Dra. Maria Cristina Machado Motta, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Banca examinadora)

Dr. André Luís Souza dos Santos, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Banca examinadora)

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Dra. Sonia Rozental, pela amizade, confiança depositada em mim, admirável orientação e conselhos que tem me dado durante esses quatro anos de doutorado.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, pelos ensinamentos, amizade e incentivos desde a minha iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Gonzalo Visbal, por ter me recebido e orientado no Laboratorio de Síntesis Orgánica y Productos Naturales, durante o doutorado “sandwich” realizado no Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Venezuela.

Ao Dr. Marcel Lyra Menezes da Cunha, pelas colaborações, discussões e sugestões pertinentes sobre micologia e assuntos afins.

À Profa. Dra. Juliany Cola Fernandes Rodrigues, pelas valiosas sugestões e discussões em cada trabalho desenvolvido na tese.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Celular de Fungos: Caroline Rezende Guerra, Amanda Costa e Silva, Taíssa Vieira Machado Vila, Luana Borba, Talita Ferreira e Raul Leal Faria Luiz, pela boa convivência, amizade e apoio durante o desenvolvimento desta tese.

Aos funcionários Álvaro Alvarez e Willmer do Laboratorio de Síntesis Orgánica y Productos Naturales, pelo apoio técnico e pelos diálogos diários que proporcionaram o meu aprendizado da língua espanhola, durante a minha permanência no IVIC, Venezuela.

À todos os professores, alunos e funcionários do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer pela convivência e apoio técnico durante esses quatro anos.

À Profa. Dra. Narcisa Leal da Cunha-e-Silva; coordenadora do curso de pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica); e à Sandra Azevedo; secretária da pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica); pelas resoluções de questões burocráticas inevitáveis durante o período da tese de doutorado.

Às instituições financiadoras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos auxílios concedidos para a realização deste trabalho.

Em especial, ao Eduardo de Almeida Monteiro Nogueira, pelo amor, companheirismo e constante apoio durante as etapas mais importantes do doutorado.

Aos meus familiares, principalmente, meus pais Amélia e Rubens, pelos conselhos e incentivos constantes. Meus sinceros agradecimentos pela pessoa que sou e pelo meu sucesso.

Aos meus amigos de infância, da faculdade, dos laboratórios por onde passei, das inúmeras repúblicas e da vida, por terem contribuído pela minha formação pessoal.

Por fim, a todos que participaram deste trabalho, direta ou indiretamente, para que pudesse ser realizado.

Este trabalho, em sua maior parte, foi realizado no Laboratório de Biologia Celular de Fungos, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, sob orientação da Profa. Dra. Sonia Rozental, com recursos financeiros do CNPq e FAPERJ.

Os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão e varredura foram realizados no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

Ensaio de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Microbiologia Aplicada a Produtos Naturais e Sintéticos, da Universidade Estadual de Maringá, Brasil.

As análises de lipídios foram realizadas no Laboratorio de Síntesis Orgánica y Productos Naturales, do Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas – IVIC, Venezuela, sob orientação do Prof. Dr. Gonzalo Visbal e recursos financeiros da CAPES.

Resumo

ISHIDA, Kelly. Atividade antifúngica de diferentes inibidores da biossíntese de esteróis sobre isolados clínicos de *Candida* spp.: efeito sobre o crescimento, ultraestrutura, ciclo celular e perfil lipídico. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Espécies de *Candida* são microrganismos comensais de hospedeiros vertebrados que causam uma variedade de infecções, desde as superficiais a invasivas. Embora candidemia seja a manifestação de candidíase invasiva mais comum, invasão de *Candida* pode ocorrer em todos os órgãos do hospedeiro. O objetivo do nosso estudo foi avaliar a atividade antifúngica de inibidores das enzimas $\Delta^{24(25)}$ -esterol metiltransferase (24-SMT) e esqualeno sintase (SQS) sobre isolados clínicos de *Candida* spp., e avaliar as alterações morfológicas e nos perfis lipídicos de leveduras tratadas. Nós analisamos, também, a susceptibilidade dos isolados clínicos à anfotericina B, fluconazol e itraconazol. Todas as cepas usadas neste estudo foram susceptíveis à anfotericina B, entretanto alguns isolados foram resistentes ao fluconazol e ao itraconazol. 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β -20-diol (AZA) e 25-epiminolanosterol (EIL), ambos inibidores da 24-SMT, apresentaram um potente efeito inibitório contra os isolados de *Candida* spp. A mediana dos valores de CI₅₀ foi de 0,5 μ g/mL para AZA e 2 μ g/mL para EIL, enquanto CI₉₀ foi de 2 μ g/mL para ambos inibidores. A maioria das cepas resistentes aos azóis foram espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA), mas algumas delas como *C. guilliermondii*, *C. zeylanoides* e *C. lipolytica*, foram susceptíveis aos inibidores da 24-SMT. A cepa de referência *C. krusei* (ATCC 6258, fluconazol-resistente) foi susceptível ao AZA, mas não ao EIL. Dentre os inibidores da SQS, WSP1267 mostrou melhor atividade antifúngica apresentando medianas de CI₅₀ e CI₉₀ de 2 μ g/mL e 4 μ g/mL, respectivamente. Todos os isolados que apresentaram resistência ao fluconazol e ao itraconazol, com valores de CI₉₀ acima de 64 μ g/mL e >16 μ g/mL, respectivamente, foram susceptíveis ao WSP1267, em concentrações inferiores a 8 μ g/mL. Os inibidores da 24-SMT e SQS apresentaram atividade fungistática, entretanto, a atividade fungicida foi particularmente observada contra isolados de CNA. Interessantemente, somente *C. tropicalis* ATCC 28707 mostrou susceptibilidade a outros inibidores da SQS, E5700 e ER-119884 (CI₅₀=1 μ g/mL para ambos). Tratamento com concentrações sub-inibitórias de AZA, EIL, WSP1267, E5700 e ER-119884 levou a drásticas alterações morfológicas e ultraestruturais, incluindo aumento do tamanho celular, alterações na forma e espessura de parede celular, um pronunciado destacamento da membrana plasmática da parede celular com uma zona elétron-luscente entre as estruturas, inchaço mitocondrial e presença de pequenas vesículas e grandes vacúolos elétron-densos. Microscopia de fluorescência revelou um acúmulo de corpos lipídicos e alterações no ciclo celular com anormalidades nucleares. Adicionalmente, as leveduras tratadas com os inibidores da 24-SMT e SQS apresentaram depleção de ergosterol e como consequência, alterações no perfil de ácidos graxos e fosfolipídios. A seletividade dos inibidores para as células fúngicas versus células de mamíferos foi avaliada pelo ensaio de viabilidade da sulforrodamina B, mostrando que AZA e EIL foram mais seletivos que WSP1267. Concluindo, nossos resultados sugerem que os inibidores da 24-SMT e SQS podem ser uma nova opção para o controle das infecções causadas por *Candida* spp., incluindo àquelas causadas por cepas azol-resistente.

Abstract

ISHIDA, Kelly. Atividade antifúngica de diferentes inibidores da biossíntese de esteróis sobre isolados clínicos de *Candida* spp.: efeito sobre o crescimento, ultraestrutura, ciclo celular e perfil lipídico. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Candida species are commensal microorganisms of vertebrate hosts that can cause infections varying from non-life threatening to invasive illnesses. Although candidemia is the most common manifestation of invasive candidiasis, extensive visceral invasion with *Candida* can occur in all organs. The propose of this study was evaluate the antifungal activity of inhibitors of the $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase (24-SMT) and squalene synthase (SQS), against clinical isolates of *Candida* spp. and analyzing the morphological alterations and lipid profiles. Also, we analyzed the antifungal susceptibility of the clinical isolates to amphotericin B, fluconazole and itraconazole. All strains used in this study were susceptible to amphotericin B, however some isolates were fluconazole- and itraconazole-resistant. 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β -20-diol (AZA) and 25-epiminolanosterol (EIL), both inhibitors of 24-SMT, were found to be potent growth inhibitors of *Candida* spp. isolates. The median IC₅₀ was 0.5 μ g/mL for AZA and 2 μ g/mL for EIL, while the IC₉₀ was 2 μ g/mL for both compounds. Most of the azole-resistant isolates were *Candida non-albicans* (CNA) species but several of them, such as *C. guilliermondii*, *C. zeylanoides* and *C. lipolytica*, were susceptible to 24-SMT inhibitors. Reference strain *C. krusei* (ATCC 6258, fluconazole-resistant) was consistently susceptible to AZA, although not to EIL. Among the SQS inhibitors, WSP1267 showed the better antifungal activity presenting median IC₅₀ and IC₉₀ of 2 μ g/mL and 4 μ g/mL, respectively. All isolates that presented resistance to fluconazole and itrazonazole, with IC₉₀ values above 64 μ g/mL and >16 μ g/mL, respectively, were susceptible to WSP1267 in concentrations lower than 8 μ g/mL. The 24-SMT and SQS inhibitors presented fungistatic activity against clinical isolates, however the fungicidal activity of the inhibitors was particularly observed against some CNA isolates. Interestingly, only *C. tropicalis* ATCC 28707 showed susceptibility to other SQS inhibitors, E5700 and ER11-9884 (IC₅₀=1 μ g/mL). Treatment with sub-inhibitory concentrations of AZA, EIL, WSP1267, E5700 and ER-119884 lead to several morphological and ultrastructural alterations, including increase of cell size, alterations in the cell wall shape and thickness, a pronounced disconnection between the cell wall and cytoplasmic membrane with an electron-lucent zone between them, mitochondrial swelling, and presence of small vesicles and large electron-dense vacuoles. Fluorescence microscopy analyses indicated an accumulation of lipid bodies and alterations in the cell cycle of the yeasts with nuclear abnormalities. In addition, the yeasts treated with 24-SMT and SQS inhibitors presented ergosterol depletion and as consequence, alterations on the fatty acid and phospholipid profiles. The selectivity of the 24-SMT and SQS inhibitors for fungal cells versus mammalian cells was verified by the sulforhodamine B viability assay, showing that AZA and EIL were more selective than WSP1267. Taken together, our results suggest that inhibition of 24-SMT and SQS may be a novel approach to control *Candida* spp. infections including those caused by azole-resistant strains.

Lista de figuras

Figura 1: Macroscopia e microscopia de *Candida albicans*. **A:** Colônias de *C. albicans* em ágar Sabouraud dextrose; **B:** forma leveduriforme; **C:** forma filamentosa; **D:** clamidoconídios (www.doctorfungus.org e www.digitalapoptosis.com/archives/science/Candida.jpg). Acesso: 15 de maio de 2010.-----4

Figura 2: Estrutura molecular do ergosterol e colesterol. Pequenas diferenças estruturais são observadas entre as duas moléculas: duas duplas ligações no anel B, metil em C24 e uma dupla ligação na cadeia lateral alifática em C22(23) na molécula de ergosterol. As setas indicam partes da molécula do ergosterol que parecem ser essenciais para o crescimento dos fungos. Adaptado de De Souza; Rodrigues (2009).-----13

Figura 3: Diagrama esquemático da via biossintética do ergosterol/colesterol a partir de acetil-CoA, mostrando as principais etapas e as enzimas envolvidas. Inibidores podem interferir na síntese do ergosterol, em diferentes etapas. Esquema adaptado de De Souza; Rodrigues (2009).-----15

Figura 4: Via de biossíntese do ergosterol a partir de esqualeno, mostrando algumas etapas importantes, bem como as enzimas envolvidas e seus respectivos genes. Alilaminas, azóis e amorolfina são agentes antifúngicos que inibem as enzimas esqualeno epoxidase, C14- α lanosterol demetilase e Δ 22-desaturase, e C8-isomerase, respectivamente. A enzima C24-esterol metiltransferase (*ERG6*) pode ser inibida por moléculas da classe dos azasteróis, um alvo farmacológico bastante promissor. Adaptado de Veen; Lang (2005).-----17

Figura 5: Principais alvos dos agentes antifúngicos empregados no tratamento de infecções fúngicas: molécula de ergosterol, síntese de ergosterol, parede celular, DNA e RNA. Adaptado da homepage www.doctorfungus.org. Acesso: 15 de maio de 2010.-----19

Figura 6: Estrutura molecular dos agentes poliênicos: anfotericina B e nistatina (ODDS *et al.*, 2003). -----21

Figura 7: Mecanismo de ação da anfotericina B. **A:** Bicamada lipídica com formação de poro devido à complexação da anfotericina B na molécula de ergosterol. **B:** Em maiores detalhes, a figura mostra a ligação do poliênico, pela parte apolar, à molécula de ergosterol. Adaptado de Ghannoum; Rice (1999).-----21

Figura 8: Estrutura química de alguns agentes azólicos: i) cetoconazol (imidazol); ii) fluconazol e itraconazol (triazóis de primeira geração); iii) voriconazol e posaconazol (triazóis de segunda geração); iv) ravuconazol, isavuconazol e albaconazol (novos triazóis) (ODDS *et al.*, 2003; PASQUALOTTO; DENNING, 2008).-----23

Figura 9: Mecanismo de ação da 5-fluorocitosina, um inibidor da síntese de DNA e RNA de fungos. Adaptado da homepage www.doctorfungus.org. Acesso: 15 de maio de 2010.

-----25

Figura 10: Estrutura química das equinocandinas (BAL, 2010).-----28

Figura 11: Complexo enzimático da síntese do polissacarídeo $\beta(1,3)$ glucana ligado a membrana citoplasmática dos fungos. Equinocandinas inibem a enzima Fks1p, interferindo na síntese de parede celular. Adaptado de Odds *et al.* (2003).-----28

Figura 12: Distribuição dos isolados clínicos obtidos de diferentes sítios anatômicos de pacientes. ULP-úlceras de lesão de pele, ND-não determinado.-----41

Figura 13: Substâncias avaliadas para a atividade antifúngica sobre isolados clínicos de *Candida* spp.-----44

Figura 14: Microscopia de contraste de interferência diferencial (A-D) e de fluorescência (E-H) de leveduras de *C. albicans* (isolado 77) sem tratamento (A e E) e tratadas por 48 h, a 35 °C, com CI_{50} de AZA (0,25 $\mu\text{g/mL}$) (B e F), CI_{50} de EIL (1 $\mu\text{g/mL}$) (C e G) e CI_{50} de WSP1267 (1 $\mu\text{g/mL}$) (D e H). Pode-se verificar que leveduras tratadas com os inibidores da 24-SMT (AZA e EIL) e da SQS (WSP1267) possuem marcações pontuais com “nile red”, indicando um acúmulo de lipídeos neutros no citoplasma, ao passo que as leveduras sem tratamento não apresentaram essas marcações. Barras= 5 μm .-----71

Figura 15: Microscopia de contraste de interferência diferencial (A-C) e de fluorescência (D-F) de *C. tropicalis* ATCC 28707 não tratadas (A e D) e tratadas com CI_{50} de E500 (1 $\mu\text{g/mL}$) (B e E) e ER-119884 (1 $\mu\text{g/mL}$) (C e F) por 48 h, a 35 °C. Após o tratamento de *C. tropicalis* ATCC 28707 com ER-119884 (inibidor da esqualeno sintase-SQS) pode ser observado o acúmulo de lipídeos neutros no citoplasma, que estão indicadas pela marcação pontual pelo “nile red” (setas brancas na figura F). Entretanto, essas marcações estiveram ausentes nas células controle (D) e tratada com E5700 (E). Barras= 5 μm .-----73

Figura 16: Microscopia de contraste de interferência diferencial (esquerda) e microscopia de fluorescência (direita) de *Candida albicans* (isolado 77) sem tratamento em diferentes fases do ciclo celular: (I) células sem brotamento e um único núcleo; (II) células com um brotamento e com único núcleo e; (III) células com brotamento e um núcleo em cada célula (A). Leveduras de *C. albicans* quando tratadas com valores de CI_{50} de AZA (0,25 $\mu\text{g/mL}$), EIL (1 $\mu\text{g/mL}$) e WSP1267 (1 $\mu\text{g/mL}$) por 48h, a 35 °C, apresentam alterações no ciclo celular (B). Inibidores da enzima 24-SMT (AZA e EIL) induzem uma drástica diminuição das células nas fases I, II e III do ciclo celular. Já o inibidor da SQS (WSP1267) provoca uma diminuição de células na fase I com concomitante aumento de células nas fases II e III do ciclo celular. Barras = 5 μm .-----76

Figura 17: Microscopia de contraste de interferência diferencial (esquerda) e microscopia de fluorescência (direita) de *Candida albicans* (isolado 77) tratada com valores de CI_{50} de AZA (0,25 $\mu\text{g/mL}$) (A-C), EIL (1 $\mu\text{g/mL}$) (D-F) e WSP1267 (1 $\mu\text{g/mL}$) (G-H) por 48h, a 35 °C, apresentaram as seguintes anormalidades nucleares: (A) presença de células com mais de um núcleo; (B) condensação anormal da cromatina; e (C) células sem núcleo. As porcentagens de leveduras com anormalidades A, B e C em células tratadas com AZA, EIL e WSP1267 em comparação com as células controle podem ser vistas na figura I. Barras = 5 μm .-----78

Figura 18: Porcentagem de leveduras de *Candida tropicalis* ATCC 28707 tratadas e não tratadas (controle) com valores de CI_{50} de E5700 e ER-119884 (1 $\mu\text{g/mL}$) por 48h, a 35 °C, em diferentes fases do ciclo celular e anormalidades nucleares. As leveduras podem apresentar-se em diferentes fases do ciclo celular: (I) células sem brotamento e um único núcleo; (II) células com um brotamento e com único núcleo e; (III) células com brotamento e um núcleo em cada célula. Anormalidades nucleares observadas foram: (A) presença de células com mais de um núcleo; (B) condensação anormal da cromatina; e (C) células sem núcleo.-----79

Figura 19: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura de leveduras de *C. albicans* (isolado 77) controle (A) e tratadas com CI_{50} de AZA (0,25 $\mu\text{g/mL}$) (B) e EIL (1 $\mu\text{g/mL}$) (C-D) por 48h, a 35 °C. Células tratadas apresentaram alterações ultraestruturais como: aumento do tamanho celular, irregularidades da parede celular, rompimento da parede celular (setas brancas nas figuras B-D) e presença de pequenos brotamentos (asteriscos nas figuras B-D). Barras = 5 μm .-----84

Figura 20: Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de *C. albicans* (isolado 77) controle (A-B) e tratado com CI_{50} de AZA (0,25 $\mu\text{g/mL}$) (C-D) e EIL (1 $\mu\text{g/mL}$) (E-H) por 48h, a 35 °C. Células controle apresentaram uma ultraestrutura típica com núcleo (n), nucléolo (nu), membrana plasmática contínua (mp), parede celular homogênea e compacta (PC) com estruturas fibrilares (f) e muitos ribossomos no citoplasma (Figura A-B). Células tratadas apresentaram alterações ultraestruturais como: rompimento da parede celular (setas pretas nas figuras C, E e F); aumento da espessura de parede celular (PC nas figuras D, F e H); pequenas vesículas com brotamentos originados da membrana plasmática (cabeça de seta na figura D); acúmulo de pequenas vesículas na região periplasmática (detalhes na inserção da figura D), no citoplasma (detalhes na inserção da figura F) e associadas com a membrana plasmática (detalhes na figura H); acúmulo de vacúolos elétron-densos (v nas figuras G-H) e inchaço mitocondrial (m nas figuras G-H). Barras em A, C, E e G = 1 μm ; e em B, D, F e H = 0,2 μm . -----86

Figura 21: Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de leveduras de *C. tropicalis* ATCC 28707 não tratadas (A) e tratadas com CI_{50} de AZA (0,03 $\mu\text{g/mL}$) (B-D) por 48 h, a 35 °C. Célula não tratada apresentou uma parede celular compacta (PC), membrana citoplasmática contínua e presença de mitocôndrias. Entretanto, em células tratadas com o inibidor da 24-SMT, houve alterações na ultraestrutura como: aumento da espessura da parede celular (seta na figura D), descolamento da bicamada lipídica (cabeça de seta na figura D), presença de vacúolos elétron-densos (v nas figuras B-D) e inchaço mitocondrial (m nas figuras B-C). Barras = 0,5 μm .-----88

Figura 22: Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* (isolado 77) tratado com CI_{50} de WSP1267 (1 $\mu\text{g/mL}$) por 48h, a 35 °C. A: Controle; B-D: 1 $\mu\text{g/mL}$ de WSP1267. Leveduras tratadas com o inibidor da SQS apresentaram-se com a morfologia alterada e com aspecto de plasmoptise. Barras= 1 μm .-----90

Figura 23: Alterações ultraestruturais de *C. albicans* (isolado 77) tratada com 1 $\mu\text{g/mL}$ de WSP1267 por 48 h, a 35°C, analisadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Levedura não tratada (A) apresentou uma preservada ultraestrutura: estruturas fibrilares (f), membrana plasmática (mp) e uma parede celular compacta (pc). Entretanto, em leveduras

tratadas com WSP1267 (**B-D**) foram observadas alterações como: rompimento de parede celular e a perda da integridade da parede celular da célula em brotamento (seta preta), destacamento da membrana plasmática da parede celular (asteriscos nas figuras B-C), presença de pequenas vesículas na região periplasmática (figuras B-D e detalhes na inserção da figura C) e grandes vacúolos electron-densos (v na figura D). Barras = 1 μ m.---

-----92

Figura 24: Alterações ultraestruturais de *C. tropicalis* ATCC 28707 tratada com 1 μ g/mL de WSP1267 por 48 h, a 35 °C, analisadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Levedura não tratada (A) apresentou uma parede celular (PC) compacta, núcleo (n) e mitocôndrias (m). Por outro lado, células tratadas com o inibidor da SQS apresentaram algumas alterações: aumento da espessura da parede celular (PC nas figuras B e D), presença de vacúolos elétron-densos e elétron-luscentes (v nas figuras B-C), invaginação e descolamento da bicamada lipídica da membrana plasmática (seta na figura D) e ruptura da parede celular e membrana plasmática com consequente extravazamento de material citoplasmático (asterisco na figura D). Barras em A, B e D = 0,5 μ m; Barra em C = 1 μ m.-----

-----94

Figura 25: Aumento do tamanho celular (**A**) e da espessura de parede celular (**B**) de leveduras de *C. albicans* (isolado 77) tratadas com valores de CI_{50} de inibidores da enzima 24-SMT (AZA e EIL) e da SQS (WSP1267) por 48 h, a 35 °C. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.----

-----95

Figura 26: Cortes ultrafinos de leveduras de *Candida tropicalis* ATCC 28707 não tratadas (**A-B**) e tratadas com CI_{50} de inibidores da SQS por 48h, a 35 °C: 1 μ g/mL de E5700 (**C-D**) e 1 μ g/mL de ER-119884 (**E-F**). Células não tratadas apresentaram uma parede celular compacta (PC), membrana plasmática contínua (mp) e um citoplasma homogêneo. Entretanto, células tratadas com inibidores da SQS apresentaram alterações ultraestruturais como: aumento da espessura da parede celular, destacamento da parede celular (seta preta nas figuras D e F), descontinuidade da membrana plasmática (cabeça de seta branca na figura F) e presença de grandes vacúolos elétron-densos (v nas figuras C-E). Barras em A, C e E = 1 μ m; Barras em F = 0,5 μ m; Barras em B e D = 0,2 μ m.-----

-----97

Figura 27: Porcentagem relativa de esqualeno obtido da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). Os lipídeos de *C. tropicalis* ATCC 28707 não tratadas e tratadas com E5700, ER-119884 e terbinafina (TRB) foram extraídos previamente com clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e os lipídeos neutros foram separados pela cromatografia em coluna de ácido silícico e posteriormente analisadas em CG-EM. E5700 e ER-119884 (sub- CI_{50} : 0,25 μ g/mL; CI_{50} : 1 μ g/mL) e TRB (sub- CI_{50} : 0,5 μ g/mL; CI_{50} : 1 μ g/mL). ---

---102

Figura 28: Cromatografia em camada delgada dos fosfolipídios padrão: (1) L- α -fosfatidil-D-L-glicerol (R_f =não detectado), (2) L- α - ácido fosfatídico dipalmitoil (R_f =0), (3) L- α -fosfatidil-N₁N-Dimetil etanolamina dipalmitoil (R_f =0,62), (4) L- α -fosfa-L-serina (R_f =não detectado), (6) L- α -fosfatidilcolina (R_f =0,38), (7) L- α -fosfatidilinositol (R_f =0,21), (8) 3-sn-L- α - ácido fosfatídico (R_f =0,16) e (9) L- α -fosfatidiletanolamina (0,52). Colunas (5) e (10) são misturas dos padrões de fosfolipídios. -----

-----108

Figura 29: Cromatografia em camada delgada da fração polar de lipídeos extraídos de *Candida albicans* (77) tratada com diferentes concentrações de fluconazol, AZA e EIL

diluídas em meio RPMI 1640 por 48 h, a 35 °C. As concentrações que inibiram 50% do crescimento fúngico foram de 0,12, 0,5 e 0,25 µg/mL de fluconazol, AZA e EIL, respectivamente. Podem-se observar os seguintes fosfolipídios: **(1)** L- α - ácido fosfatídico dipalmitoil (Rf=0), **(2)** não identificado (Rf=0,02), **(3)** não identificado (Rf=0,09), **(4)** 3-sn-L- α - ácido fosfatídico (Rf=0,15), **(5)** L- α -fosfatidilinositol (Rf=0,21), **(6)** não identificado (Rf=0,27), **(7)** L- α -fosfatidilcolina (Rf=0,40), **(8)** L- α -fosfatidiletanolamina (Rf=0,56), **(9)** não identificado (Rf=0,75) e **(10)** não identificado (Rf=0,77). Um padrão de fosfolipídios **(P)** foi utilizado. Concentrações das drogas estão em µg/mL.-----110

Figura 30: Cromatografia em camada delgada da fração polar de lipídeos extraídos de leveduras de *Candida tropicalis* (ATCC 28707) tratadas com diferentes concentrações de terbinafina, E5700 e ER-119884 diluídas em meio RPMI 1640, por 48 h, a 35 °C. As concentrações que inibiram 50% do crescimento fúngico foram de 1,0 µg/mL para todas as drogas analisadas. Podem-se observar os seguintes fosfolipídios: **(1)** L- α - ácido fosfatídico dipalmitoil (Rf=0); **(2)** não identificado (Rf=0,02), **(3)** não identificado (Rf=0,07), **(4)** 3-sn-L- α - ácido fosfatídico (Rf=0,13), **(5)** L- α -fosfatidilinositol (Rf=0,18), **(6)** L- α -fosfatidilcolina (Rf=0,40), **(7)** L- α -fosfatidiletanolamina (Rf=0,79), **(8)** L- α -fosfatidil-N₁N-Dimetil etanolamine dipalmitoil (Rf=0,86). Um padrão de fosfolipídios **(P)** foi utilizado. Concentrações das drogas estão em µg/mL. -----112

Lista de tabelas

Tabela 1: Origem dos isolados e o material clínico utilizado para o isolamento das amostras de *Candida* spp. (ULP - úlcera de lesão em pele, HAS - Hospital Adventista Silvestre, ND-não determinado).-----41

Tabela 2: Interpretação dos resultados da determinação da CIM do fluconazol, itraconazol e anfotericina B (CLSI, 2008).-----46

Tabela 3: Susceptibilidade das cepas de referência de *Candida* spp. (ATCC) aos inibidores da enzima $\Delta^{24(25)}$ esterol metil transferase, da esqualeno sintase e aos antifúngicos padrão (anfotericina B-AMB, fluconazol-FLC e itraconazol-ITC), analisados pelo método da microdiluição em caldo. Resultados de CI_{50} e CI_{90} estão expressos em $\mu\text{g/mL}$.-----56

Tabela 4: Susceptibilidade de cepas de *Candida* spp. ATCC e isolados clínicos aos inibidores da $\Delta^{(24)25}$ - esterol metil transferase (AZA e EIL) e esqualeno sintase (WSP1267) e aos antifúngicos padrão (fluconazol, itraconazol e anfotericina B) após 48 h de incubação. CI_{50} e CI_{90} foram determinados pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2008), utilizando um comprimento de onda a 492 nm. -----57

Tabela 5: Leitura visual do ensaio de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima dos inibidores da $\Delta^{(24)25}$ - esterol metil transferase (AZA e EIL) e esqualeno sintase (WSP1267) após 24 e 48 h de incubação. Antifúngicos padrão também foram avaliados.-----60

Tabela 6: Susceptibilidade de 65 isolados clínicos de *Candida* spp. a anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITC), analisados pelo método de microdiluição em caldo, documento M27-A3 (CLSI, 2008). -----63

Tabela 7: Atividade antifúngica de 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β ,20-diol (AZA) e 24 (R,S),25-epiminolanosterol (EIL), ambos inibidores da enzima $\Delta^{24(25)}$ -esterol metil transferase, e WSP1267, um inibidor da enzima esqualeno sintase, contra 65 isolados clínicos de *Candida* spp. avaliados pelo método de microdiluição em caldo, documento M27-A3 (CLSI, 2008).-----64

Tabela 8: Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos inibidores da enzima $\Delta^{(24)25}$ - esterol metil transferase (AZA e EIL) e esqualeno sintase (WSP1267) contra 7 cepas de *Candida* spp. ATCC e 65 isolados clínicos.-----65

Tabela 9: Porcentagem cumulativa dos valores da concentração fungicida mínima (CFM) de AZA (20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β ,20-diol), EIL (24(R,S),25-epiminolanosterol) e WSP1267 contra 65 isolados clínicos de *Candida* spp. -----67

Tabela 10: Porcentagem relativa de esteróis extraídos de *Candida albicans* (77) não tratadas e tratadas com 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β ,20-diol (AZA), 24 (R,S),25-epiminolanosterol (EIL) e com antifúngico padrão (fluconazol-FLC), obtida por meio de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrometro de massas. As concentrações das drogas estão em $\mu\text{g/mL}$. TR: tempo de retenção; ND: não detectado.-----100

Tabela 11: Porcentagem relativa de esteróis extraídos de *Candida tropicalis* ATCC 28707 não tratadas e tratadas com E5700 e ER-119884 e com o antifúngico terbinafina (TBF), obtida por meio de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrometro de massas. As concentrações das drogas estão em µg/mL. TR: tempo de retenção; ND: não detectado.-----101

Tabela 12: Porcentagem relativa de ácidos graxos extraídos de leveduras de *Candida albicans* (77) controle e tratadas com concentrações de AZA e EIL (inibidores da $\Delta^{24(25)}$ esterol metil transferase), e o antifúngico padrão fluconazol (FLC, inibidor da C14 α -demetilase), por 48h, a 35 °C. Os dados foram obtidos por meio de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM).-----103

Tabela 13: Porcentagem relativa de ácidos graxos extraídos de *Candida tropicalis* ATCC 28707 controle e tratadas com E5700, ER-119884 (inibidores da esqualeno sintase) e terbinafina (TBF, inibidor da esqualeno epoxidase), por 48h, a 35 °C. Os dados foram obtidos pela utilização de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (CG-EM).-----104

Tabela 14: Concentração citotóxica de 50 % (CC₅₀) de inibidores da enzima 24-SMT (AZA e EIL) e da SQS (WSP1267) em monocamada de células Vero. Os valores de CC₅₀ foram obtidos para os antifúngicos padrão (anfotericina B, fluconazol e itraconazol) e os índices de seletividade (IS) calculados, como sendo a razão da CC₅₀ pela CI₅₀, concentração que inibe 50% do crescimento fúngico. -----113

Lista de abreviaturas

24-SMT: $\Delta^{24(25)}$ -esterol metiltransferase
5-FC: 5-Fluorocitosina
AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMB: anfotericina B
ASD: Ágar Saburaud dextrose
ATCC: American Type Culture Collection
AZA: 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β -20-diol
CCD: Cromatografia em camada delgada
CFM: Concentração fungicida mínima
CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CI₅₀: Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% do crescimento
CI₉₀: Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% do crescimento
CIM: Concentração inibitória mínima
CNA: *Candida não-albicans*
CVV: Candidíase vulvovaginal
CVVR: Candidíase vulvovaginal recorrente
DMSO: Dimetil sulfóxido
DNA: Ácido desoxiribonucléico
EIL: 24 (R,S),25-epiminolanosterol
FLC: fluconazol
GPI: Glicofosfatidilinositol
HAART: terapia anti-retroviral altamente ativa
HIV: Vírus da imunodeficiência adquirida
ITC: itraconazol
LN: Lipídeos neutros
LP: Lipídeos polares
LT: Lipídeos totais
MET: Microscopia eletrônica de transmissão
MEV: Microscopia eletrônica de varredura
MOPS: Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico
PBS: Salina tamponado com fosfato
RNA: ácido ribonucléico
rpm: Rotação por minuto
Sap: aspartil proteinases secretadas
SFB: Soro fetal bovino
SQS: esqualeno sintase
UFC: Unidade formadora de colônia

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 INFECÇÕES FÚNGICAS	1
1.2 INFECÇÕES FÚNGICAS OPORTUNISTAS.....	2
1.3 CANDIDÍASIS.....	3
1.3.1 O gênero <i>Candida</i>	3
1.3.2 <i>Patogenia</i>	4
1.3.3 <i>Manifestações clínicas</i>	8
1.3.4 <i>Epidemiologia</i>	9
1.4 BIOSÍNTESE DE ESTERÓIS	12
1.4.1 <i>Via biossintética do ergosterol</i>	13
1.5 ANTIFÚNGICOS E MECANISMOS DE AÇÃO	19
1.5.1 <i>Substâncias que atuam na molécula de ergosterol</i>	20
1.5.2 <i>Substâncias que atuam na via biossintética do ergosterol</i>	22
1.5.3 <i>Substâncias que atuam na síntese de ácidos nucleicos</i>	24
1.5.4 <i>Substâncias que atuam na organização dos microtúbulos</i>	25
1.5.5 <i>Drogas que atuam na síntese de parede celular</i>	26
1.6 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS	29
1.6.1 <i>Resistência a agentes azólicos</i>	31
1.6.2 <i>Resistência a poliênicos</i>	33
1.6.3 <i>Resistência a 5-fluorocitosina</i>	34
1.6.4 <i>Resistência a equinocandinas</i>	34
1.7 PERSPECTIVAS PARA NOVOS AGENTES ANTIFÚNGICOS	35
2. OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 MICRORGANISMOS.....	40
3.2 SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS	43
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE INIBIDORES DA SÍNTESE DE ESTERÓIS	45
3.3.1 <i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	45
3.3.2 <i>Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)</i>	46
3.4 MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE INTERFERÊNCIA DIFERENCIAL E FLUORESCÊNCIA CONVENCIONAL	46
3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	47
3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	48
3.7 ANÁLISE DE LIPÍDEOS	48
3.7.1 <i>Extração e separação de lipídeos neutros (LN) e polares (LP)</i>	48
3.7.2 <i>Análise de lipídeos neutros</i>	49
3.7.3 <i>Análise de fosfolipídios</i>	49
3.7.4 <i>Análise de ácidos graxos</i>	50
3.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	50

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
3.9 EDIÇÃO DE IMAGENS	51
4. RESULTADOS	52
4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	52
4.2 CORRELAÇÕES	54
4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	65
4.4 PRESENÇA DE CORPOS LIPÍDICOS EM LEVEDURAS TRATADAS COM INIBIDORES DA SÍNTESE DE ESTERÓIS	69
4.5 ALTERAÇÕES NO CICLO CELULAR E PADRÃO NUCLEAR DE LEVEDURAS TRATADAS COM INIBIDORES DA SÍNTESE DE ESTERÓIS	74
4.6 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS	80
4.7 ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO	98
4.7.1 <i>Análise de Esteróis</i>	98
4.7.2 <i>Análise de Ácidos graxos</i>	102
4.7.3 <i>Análise de fosfolipídios</i>	104
4.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	113
5. DISCUSSÃO	114
6. CONCLUSÕES.....	132
7. PERSPECTIVAS.....	133
8. REFERÊNCIAS	134
9. ANEXOS	148
ANEXO I: MANUSCRITOS PUBLICADOS	149
ANEXO II: MANUSCRITOS EM FASE DE REDAÇÃO	162

1. Introdução

A área da Biologia que estuda os fungos é a Micologia. É estimada a existência de pelo menos 1,5 milhão de diferentes espécies fúngicas, mas somente 75.000 espécies (5% do total) foram descritas e estão distribuídas em diferentes nichos ecológicos. São seres eucariotos (possuindo envoltório nuclear, organelas como aparelho de Golgi, mitocôndria e retículo endoplasmático), quimioheterotróficos e aeróbios obrigatórios ou facultativos, pertencentes ao domínio Eucarya. A maioria dessas espécies é benéfica ao ser humano podendo contribuir para a qualidade de vida, sob diferentes aspectos: degradação e reciclagem de matéria orgânica, área de biotecnologia e engenharia genética, participação na indústria alimentícia, farmacêutica e química. No entanto, algumas espécies fúngicas podem causar doenças em vegetais empregados na agricultura (soja, trigo e milho), levando a grandes perdas econômicas. Adicionalmente, outras espécies estão implicadas em infecções fúngicas humanas, que variam desde quadros assintomáticos a graves e fatais (DEACON, 2006).

1.1 Infecções fúngicas

Didaticamente, as infecções fúngicas humanas são classificadas de acordo com o local da infecção: micoses superficiais, cutâneas, subcutâneas, sistêmicas e oportunistas. No entanto, muitas das infecções podem sobrepor quanto ao tipo, como, por exemplo, serem oportunista e sistêmica, e podem depender de fatores inerentes ao hospedeiro e ao patógeno (MURRAY *et al.*, 2005).

Algumas espécies de fungos são consideradas patógenos primários, ou seja, capazes de subverter os mecanismos de defesa do hospedeiro, devido a vários fatores de virulência.

Dessa maneira, esses fungos são caracterizados por possuir alto poder de adaptação ao tecido do hospedeiro, podem-se multiplicar causando diferentes formas de lesões teciduais. Espécies como *Blastomyces dermatididis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Scedosporium* spp. e outros, são capazes de causar doença fúngica em indivíduos imunocompetentes. No entanto, espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Rhizopus* são patógenos oportunistas, que acometem principalmente indivíduos portadores de uma doença subjacente ou imunocomprometidos (MURRAY *et al.*, 2005).

1.2 Infecções fúngicas oportunistas

Diferentes tipos de micoses oportunistas, especialmente as invasivas, têm-se tornado um importante problema de saúde pública, e sua incidência têm aumentado drasticamente nas últimas décadas. Essas infecções ocorrem, predominantemente, em pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles com leucemia aguda, neutropênicos, transplantados, com neoplasias sólidas e pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (KAUFFMAN, 2006). Outros fatores, também, podem pré-dispor às infecções fúngicas oportunistas, como procedimentos invasivos (cateterização e implantação de próteses), doenças de base (diabetes com aceto-acidose não controlada e alcoolismo), antibioticoterapia de amplo espectro, uso de agentes corticosteróides por período prolongado, uso de anticoncepcionais orais de alta dosagem, imunossupressores, citostáticos, doenças hematológicas (leucemias) e alguns estados fisiológicos do hospedeiro (gravidez, estado nutricional e idade) (KAUFFMAN, 2006).

Embora as bactérias ainda sejam os agentes etiológicos mais comumente isolados em casos de infecções hospitalares, as infecções causadas por fungos ocupam o quarto

lugar entre os agentes etiológicos, precedidos apenas por estafilococos coagulase negativo, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, e estão associadas à elevada taxa de mortalidade e morbidade (COLOMBO *et al.*, 2006). Dentre as infecções fúngicas hospitalares, diferentes espécies de *Candida* são os principais agentes etiológicos, cerca de 80%, seguido por *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus neoformans* (VAZQUEZ *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 1998, KAUFFMAN, 2006).

1.3 Candidíasis

1.3.1 O gênero *Candida*

Leveduras desse gênero foram descritas, em 1844 por Bennett, como agentes causadores de candidíases. *Candida* spp. pertencem ao filo Ascomycota; subfilo Ascomycotina, classe Ascomycetes, Ordem Saccharomycetales e família Saccharomycetaceae. Possuem a forma teleomórfica, formando ascósporos durante a reprodução sexuada. Também, podem se reproduzir por brotamento (HEITMAN, 2006).

Quando as leveduras são cultivadas em meio sólido, as colônias apresentam-se de coloração creme a amarelo-escuro, e a textura vai depender da espécie e da estirpe, podendo ser: úmida ou seca, cremosa ou consistente e rugosa ou lisa. Com relação ao aspecto microscópico, todas as leveduras produzem blastoconídios únicos ou agrupados, e estes podem ser redondos ou alongados. Muitas espécies produzem pseudohifas, podendo ser longas, curvadas e com ramificações, mas algumas são capazes de produzir hifas verdadeiras e clamidoconídios. Diferenças na morfologia macroscópica e microscópica são critérios utilizados na identificação das espécies de *Candida* (LARONE, 1995) (Figura 1).

As espécies de maior incidência e relevância clínica são: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida*

lusitaneae, *Candida guilhiermondii*, *Candida dubliniensis* e *Candida rugosa* (PFALLER; DIEKEMA, 2004). Devido às diferenças moleculares entre as cepas de *C. parapsilosis*, alguns grupos defendem e sugerem duas novas espécies, *Candida metapsilosis* e *Candida orthopsilosis*. Essas três espécies formariam o complexo “*psilosis*” (TAVANTI *et al.*, 2005).



Figura 1: Macroscopia e microscopia de *Candida albicans*. **A:** Colônias de *C. albicans* em ágar Sabouraud dextrose; **B:** forma leveduriforme; **C:** forma filamentosa; **D:** clamidoconídios.

(www.doctorfungus.org e www.digitalapoptosis.com/archives/science/Candida.jpg). Acesso: 15 de maio de 2010.

1.3.2 Patogenia

O estado fisiológico e imunológico do hospedeiro possui importância primária na determinação da patogênese por *Candida* spp. Leveduras desse gênero são consideradas oportunistas e a caracterização da doença ocorre por uma falha ou deficiência da resposta imunológica do hospedeiro. Entretanto, existem alguns fatores relacionados ao microrganismo, que contribuem para a habilidade deste em causar doenças e explicar as diferenças na patogenicidade entre as espécies.

1.3.2.1 Fatores de virulência de *Candida* spp.

Alguns fatores de virulência são importantes para que os microrganismos se estabeleçam no tecido e causem infecção. A habilidade de *Candida* spp. instalar e persistir

no local colonizado e causar infecção tem sido atribuída à capacidade dessas leveduras crescerem em condições fisiológicas extremas, bem como de pH e nutrientes.

Muitas espécies de *Candida* podem ser encontradas na forma de levedura e filamento, fenômeno denominado de dimorfismo. Geralmente, a forma filamentosa está associada ao estabelecimento da doença e a invasão tecidual, enquanto a forma leveduriforme está associada ao estado comensal. Entretanto sabe-se que ambas as formas são capazes de expressar fatores de virulência e têm um papel importante na progressão da doença no hospedeiro. Existem vários fatores que podem contribuir para o dimorfismo: pH do meio, fonte de carbono e nitrogênio, oxigenação, soro e hormônio (estrogênio). Algumas espécies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* podem ser encontrados na forma de levedura elíptica e também filamentosa (hifa ou pseudohifa), mas somente *C. albicans* e *C. tropicalis* são capazes de formar hifa verdadeira. Em contraste, *C. glabrata* cresce somente na forma de levedura pequena, elíptica e unicelular. (CALDERONE; FONZI, 2001; DIGNANI *et al.*, 2009).

Múltiplos mecanismos de aderência são essenciais para o sucesso da colonização de microrganismos na superfície tecidual e inanimada, permitindo a colonização e subsequente proliferação. Essas são etapas extremamente relevantes para a patogênese de muitas doenças infecciosas. Dentre esses mecanismos de aderência e dimorfismo, a expressão de proteína de superfície da hifa (Hwp1) e de outras moléculas são encontradas durante esse processo. Em geral, células na forma de filamento aderem mais que as da forma de levedura. Além disso, *C. albicans* adere mais que *C. tropicalis*, seguida por *C. parapsilosis* (CALDERONE; FONZI, 2001; DIGNANI *et al.*, 2009).

Muitos pesquisadores relatam que a hidrofobicidade de superfície celular de *Candida* spp. está relacionada com capacidade de aderência em superfícies bióticas e

abióticas. A glicosilação de manoproteínas da parede celular pode afetar a hidrofobicidade de superfície celular, interferindo na adesão de *C. albicans* a células epiteliais. Blastoconídios de *C. albicans* são menos hidrofóbicos que o tubo germinativo (DIGNANI *et al.*, 2009).

As manoproteínas, além de contribuir para a hidrofobicidade de superfície celular e aderência, também podem suprimir a resposta imunológica do hospedeiro. Manoproteínas liberadas da parede celular de *C. albicans* podem se ligar a hemácias e causar hemólise (DIGNANI *et al.*, 2009). Adicionalmente, as hifas conseguem se ligar mais fortemente à hemoglobina que as leveduras, pois somente a forma filamentosa usa essa molécula como fonte de ferro. Estudos mostram que espécies de *Candida* produzem enzimas que degradam a hemoglobina, podendo ser considerada um facilitador na disseminação de leveduras (BONASSOLI *et al.*, 2005, DIGNANI *et al.*, 2009).

Produção de outras enzimas extracelulares, tais como: proteinases, fosfolipases, lipases, são importantes fatores de virulência de *Candida* spp. As enzimas mais estudadas são as aspartil proteinases secretadas (SAPs). Essas enzimas produzem proteólise não-específica de proteínas do hospedeiro envolvidas nos mecanismos de defesa. A superfamília de SAPs inclui 10 isoenzimas e diferentes SAPs estão associadas à diferente localização na célula e a diferentes mecanismos de patogênese. A expressão predominante de Sap1-3 tem sido crucial para o estabelecimento de infecções superficiais (candidíase cutânea e mucosa), enquanto que as Sap 4-6 são importantes no estabelecimento das infecções sistêmicas. Já as fosfolipases, como por ex. a fosfolipase B, são essenciais para a virulência de *Candida* spp., e são secretadas pela levedura durante o processo de infecção. Essas enzimas são importantes no controle do crescimento fúngico, remodelagem da

membrana da célula fúngica e invasão pela hidrólise de fosfolipídios dos tecidos do hospedeiro (DIGNANI *et al.*, 2009).

Essas enzimas extracelulares têm contribuído enormemente para o estabelecimento de infecções por *Candida* spp., principalmente, nas etapas relacionadas com o processo invasivo (BARRETT-BEE *et al.*, 1985, IBRAHIM *et al.*, 1995; FEKETE-FORGÁCS *et al.*, 2000; GHANNOUM, 2000; SINGLETON; HAZEN, 2004). Muitos autores têm mostrado que isolados produtores de altas quantidades de fosfolipases e proteinases são capazes de infectar e invadir o tecido com maior facilidade do que àqueles que produzem menor quantidade, corroborando a função dessas enzimas no processo da patogenia (IBRAHIM *et al.*, 1995; DE BERNARDIS *et al.*, 1999; CALDERONE; FONZI, 2001). Ghannoum (2000) verificou que a cepa *knockout* do gene que codifica a enzima fosfolipase FLB1, produz menos enzima que a cepa selvagem, conferindo menor virulência e confirmando a participação dessa enzima nos processos infecciosos por *Candida* spp.

O evento de variação fenotípica de *Candida* spp. pode estar associado a virulência. A taxa de variação fenotípica é maior em isolados de *C. albicans* de infecções sistêmicas quando comparadas aos isolados de infecções superficiais. Vários mecanismos celulares estão associados ao fenômeno de variação fenotípica: formação de hifas, expressão de glicoproteínas de parede celular, secreção de enzimas proteolíticas, menor susceptibilidade a morte pelos neutrófilos e resistência aos azóis. Em adição, esse fenômeno contribui para a sobrevivência de *Candida* spp., invasão tecidual e escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro (CALDERONE; FONZI, 2001; DIGNANI *et al.*, 2009).

1.3.3 Manifestações clínicas

O espectro das candidíases inclui desde infecções superficiais, transitórias, facilmente tratáveis, até as formas invasivas com comprometimento sistêmico. Estes últimos são potencialmente fatais e apresentam pouca probabilidade de sucesso terapêutico. Abaixo estão listadas algumas formas de candidíases e suas principais características (RIPPON, 1988):

1. Candidíase cutânea ocorre, principalmente, em regiões que tendem a ficar mais úmidas, como as axilas, região inferior dos seios e virilha. As lesões são caracterizadas por pápulas, pústulas, rubor e ardor. No caso de neonatos, podem ocorrer exantema por todo o corpo, lesões crostosas e exfoliativas que evoluem para pústulas.
2. Candidíase orofaríngea aparece sob três formas: pseudomembranosa, eritematosa e quelite angular, com o grau decrescente de gravidade. As lesões são caracterizadas por placas esbranquiçadas, processo inflamatório, eritema, ardor e dores.
3. Candidíase vulvovaginal (CVV) é caracterizada por prurido, ardor, dispauremia, e eliminação de um corrimento esbranquiçado. Com frequência, a vulva e a vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas. As lesões podem estender-se pelo períneo, região perianal e inguinal. A infecção pode ocorrer por via endógena ou por transmissão sexual. No caso do homem, a candidíase é chamada de balanite, infecção da glândula, que aparece como pústulas e eritema difuso.
4. Candidíase mucocutânea crônica é caracterizada por ser uma infecção persistente, severa e com lesões difusas. Pode apresentar diferentes

manifestações clínicas, afetando a pele, a mucosa e a unha. A maioria dos casos de onicomicose é causada por fungos dermatófitos, mas espécies de *Candida*, também, podem ser o agente causal. A infecção se inicia na base da unha e se estende para a porção externa, tornando-se rugosa, irregular, convexa, podendo ter hiperqueratose e muitas vezes levando a deformação da unha.

5. Candidíase sistêmica pode apresentar-se sob diferentes formas: endocardites, pleurites, glomeronefrite, candidemias, dentre outras. Em geral, os sintomas são inespecíficos, quadro clínico que pode ser confundido com outras enfermidades.

1.3.4 Epidemiologia

Espécies do gênero *Candida* podem ser encontradas colonizando homens e animais, sobretudo o tegumento e mucosas digestivas, genital e respiratória. Até 80% dos indivíduos pode exibir colonização nesses locais na ausência de doença (CANNON; CHAFFIN, 1999; DIGNANI *et al.*, 2009). No entanto, de microrganismo comensal pode passar a causar infecção em diferentes sítios anatômicos. A espécie mais frequentemente isolada em casos de candidíases é *C. albicans*, e entre as espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) mais comuns e consideradas patógenos estão: *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* e *C. pseudotropicalis* (DIGNANI *et al.*, 2009).

Geralmente, a principal fonte de infecção por *Candida* spp. é o próprio paciente, o que caracteriza uma transmissão endógena. O favorecimento à invasão tecidual e/ou candidemia depende da deficiência do sistema imunológico e/ou de mucosa, que é uma barreira anti-*Candida* do hospedeiro. Leveduras de *Candida* spp., também, podem ser encontradas como contaminantes de água, alimentos e objetos inanimados, como por

exemplo, roupas, superfícies de móveis, escova de dente e materiais médico-hospitalares. Inevitavelmente, *Candida* spp. podem ser transmitidas pelo contato com esses materiais contaminados, como por exemplo uma endoftalmite causada por uma contaminação de soluções oftalmológicas e candidemia pela contaminação de solução de nutrição parenteral, dentre outros. Esse tipo de transmissão é denominada exógena (DIGNANI *et al.*, 2009).

Candida spp. é a quarta causa de morte em infecções nosocomiais (WENZEL, 1995; HUANG *et al.*, 1998; KAUFFMAN, 2006; COLOMBO *et al.*, 2006). Em pacientes com candidemia, a mortalidade ocorre em cerca de 40% dos casos (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004). No Brasil, um estudo multicêntrico envolvendo 11 centros médicos, mostrou que a espécie mais freqüente foi *C. albicans* (40,9 %), seguidas por *C. tropicalis* (20,9 %) e *C. parapsilosis* (20,5 %), sendo a taxa de mortalidade de 54% em pacientes com candidemia (COLOMBO *et al.*, 2006). Dados da América do Norte mostram que *Candida* spp. é, também, o quarto microrganismo isolado de sangue em pacientes hospitalizados. Dentre 2019 casos de candidemia em 23 centros da América do Norte, a espécie *C. albicans* (45,6 %) foi a mais isolada, seguida por *C. glabrata* (26%), *C. parapsilosis* (15,7 %) e *C. tropicalis* (8,1 %) (HORN *et al.*, 2009). Candidemias têm sido observadas, particularmente, em pacientes hospitalizados por longos períodos, que tenham feito antibioticoterapia, nutrição parenteral e/ou múltiplos procedimentos invasivos (COLOMBO *et al.*, 2006; TORTORANO *et al.*, 2006). Pacientes com candidemia por *C. parapsilosis* estão relacionados com menor taxa de mortalidade (23,7 %) e, também, por apresentarem menor neutropenia, menor utilização de corticosteróides e imunossupressivos. Já os pacientes infectados com outras espécies de *Candida* são comumente associadas com a utilização prévia de agentes antifúngicos, doenças hematológicas, transplantes de células-tronco, neutropenia e/ou uso de corticosteróide (HORN *et al.*, 2009). Embora os casos de

candidemias tenham aumentado durante a década de 80, do século passado, estudos desta década mostram que a sua incidência tem estabilizado (MORGAN, 2005).

O achado laboratorial de candidúria traz dilemas em relação a sua interpretação visto que pode refletir uma amplitude de possibilidades clínicas, incluindo colonização, infecção urinária alta ou doença sistêmica por *Candida* spp. A coleta de hemoculturas deve ser indicada em pacientes com candidúria sob risco para desenvolvimento de candidíase hematogênica (COLOMBO; GUIMARÃES, 2007). Em casuísticas de infecções urinárias por leveduras, *C. albicans* tem sido considerada a espécie mais comumente isolada do trato urinário, sendo responsável por cerca de 50 a 70% dos episódios, seguida por *C. glabrata* em 5 a 33 % e outras espécies de CNA que têm sido relatadas em 8 a 28% dos casos (KAUFFMAN *et al*, 2000, COLOMBO; GUIMARÃES, 2007).

Dentre as infecções mucocutâneas, candidíase orofaríngea é a infecção mais comum em pacientes portadores do HIV. Essa manifestação clínica pode ser um primeiro indício de que a imunidade do hospedeiro está comprometida. Leveduras são isoladas de 58 % das amostras de fluido oral coletada, sendo *C. albicans* a espécie mais frequente (93%) (WINGETER *et al.*, 2007). A demasiada utilização do fluconazol como agente antifúngico profilático resultou no aparecimento de cepas de *C. albicans* resistentes e aumento da frequência de CNA, especialmente na fase da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Entretanto, com o surgimento da terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART), a frequência de candidíase oral e o surgimento de cepas resistentes foram drasticamente diminuídos (DIGNANI *et al.*, 2009).

Nos casos de CVV, estima-se que aproximadamente 75% das mulheres já tiveram pelo menos um episódio de CVV durante a sua vida. Uma porcentagem significativa delas pode ter episódios subseqüentes de CVV, e 5% podem desenvolver candidíase

vulvovaginal recorrente (CVVR), que é caracterizada por três ou mais episódios de CVV durante um ano (SOBEL, 2007). Cerca de 90% dos casos de CVV são atribuídos a *C. albicans*. Outras espécies desse gênero como *C. glabrata* e *C. tropicalis* completariam a relação dos agentes etiológicos da CVV (FERRER, 2000; SOBEL, 2007).

Embora *C. albicans* seja a mais incidente, a distribuição das espécies tem sido alterada, caracterizada por uma redução da frequência de *C. albicans* pelo aumento de CNA (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Essa mudança está relacionada com a exposição dos pacientes aos agentes antifúngicos, no caso de profilaxia; como citado no parágrafo anterior; imunossupressão, prematuridade, doença grave, exposição aos antibióticos de largo espectro de ação e pacientes idosos. Adicionalmente, a utilização de cateteres intravenosos e a transmissão pelas mãos de profissionais de saúde têm sido relacionadas com o aumento de infecções por *C. parapsilosis* (DIGNANI *et al.*, 2009).

1.4 Biossíntese de esteróis

Esteróis são constituintes de membrana celular essenciais para a estrutura normal e função. Em células de mamíferos, colesterol é o principal esteroide de membrana, entretanto em outros organismos eucariotos, como fungos e tripanosomatídeos, há a predominância de outros esteróis, incluindo o ergosterol e 24-metil esteróis. Esses esteróis são vitais para a viabilidade e crescimento de células fúngicas e tripanosomatídeos, mas estão ausentes nas células de mamífero (SONG; NES, 2007).

Ergosterol e colesterol são moléculas estruturalmente muito parecidas, diferindo em poucos pontos (Figura 2). Colesterol possui somente uma dupla ligação [$\Delta^5(6)$] no anel B e uma cadeia lateral totalmente saturada e sem grupamento metil em C24. É sabido que algumas partes das moléculas de colesterol e ergosterol são importantes para a atividade da

membrana celular, como o núcleo tetracíclico esteroidal e 3β -OH, entretanto, grupos metil em C4 ou C14 não permitem crescimento celular. Ergosterol (ergosta-5,7,22-trien- 3β -ol) é um esterol anfipático caracterizado por conter uma hidroxila no C3 do anel A da molécula, o que caracteriza a porção polar, e o restante da cadeia alifática é a porção apolar da molécula. Também, possui duas duplas ligações no anel B, e uma dupla ligação na cadeia lateral alifática em C22(23), além de um grupo metil em C24. Essas três últimas características e ausência de metila em C4 e C14 parecem ser essenciais para o crescimento dos fungos (SONG; NES, 2007).

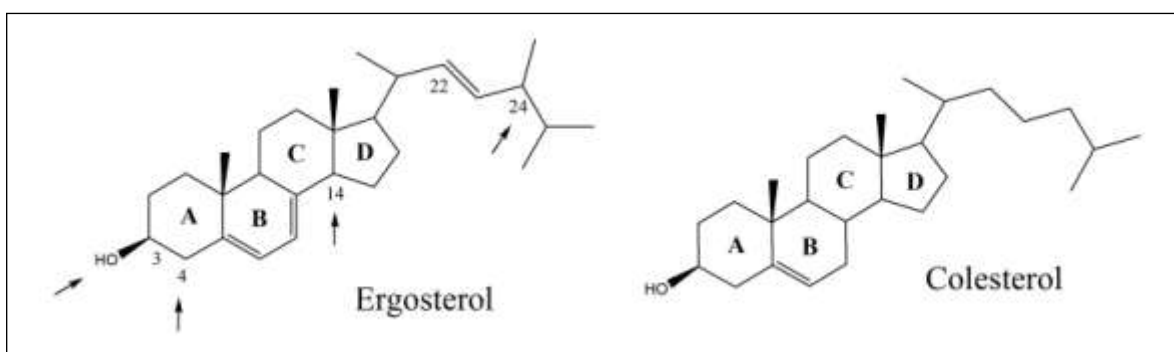


Figura 2: Estrutura molecular do ergosterol e colesterol. Pequenas diferenças estruturais são observadas entre as duas moléculas: duas duplas ligações no anel B, metil em C24 e uma dupla ligação na cadeia lateral alifática em C22(23) na molécula de ergosterol. As setas indicam partes da molécula do ergosterol que parecem ser essenciais para o crescimento dos fungos. Adaptado de De Souza; Rodrigues (2009).

1.4.1 Via biossintética do ergosterol

Na figura 3 podemos ter uma visão geral da via biossintética do ergosterol, sendo uma via comum com a do colesterol até a formação de lanosterol. Após esta fase, a via de biossíntese pode se divergir em rotas distintas para a formação de ergosterol (fungos e tripanosomatídeos) e colesterol (células de mamíferos) (SONG; NES, 2007; DE SOUZA; RODRIGUES, 2009).

Podemos classificar a via biossintética de acetil-CoA até ergosterol, em 4 etapas:

1. Via mevalonato: O esqueleto de carbono dos esteróis é derivado de acetil-CoA, pela condensação de duas unidades de acetil-CoA, seguida da adição de uma terceira molécula de acetil-CoA para formar 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é reduzido pelo NADPH para formar o ácido mevalônico.

2. Via isoprenóide: As moléculas de isoprenóides são as mais diversas e abundantes encontradas na natureza, na qual participam de vários processos biológicos importantes. Primeiramente, o mevalonato é convertido em isopentenil difosfato (IPP) por duas reações de fosforilação e uma de descarboxilação. Em seguida, ocorre uma isomerização de IPP pela isopentenil difosfato isomerase produzindo dimetilalil difosfato (DMAPP). Posteriormente, longas cadeias de isoprenóides são formadas pela condensação de IPP com DMAPP e geranyl difosfato (GPP) para produzir uma molécula de isoprenóide de 15 carbonos (farnesil difosfato – FPP) em duas reações catalisadas pela enzima farnesil difosfato sintase (FPPS). A molécula de FPP é um substrato para a síntese de esteróis, ubiquinonas, dolicolis, grupo Heme A e proteínas preniladas.

3. Formação de esqualeno: A partir dessa etapa, inicia-se a síntese de moléculas de esteróis, onde ocorre a formação do núcleo esteroidal pela ação da esqualeno sintase (SQS). Essa reação é caracterizada pela condensação cabeça-cabeça de duas moléculas de FPP para produção de esqualeno (molécula com 30 carbonos).

4. Via esqualeno-ergosterol – Ocorre a ciclização do esqualeno para a formação do anel esteroidal e posteriormente, várias reações de demetilação, metilação, insaturação e saturação até a formação do ergosterol. As principais etapas consistem em: (1) metilação do carbono C24 do lanosterol; (2) demetilação do carbono C4, seguida da demetilação do carbono C14; (3) transformações das ligações duplas do núcleo Δ^8 para o Δ^5 ; (4) dupla

ligação na cadeia C24(28) e em C22(23) (SONG; NES, 2007).

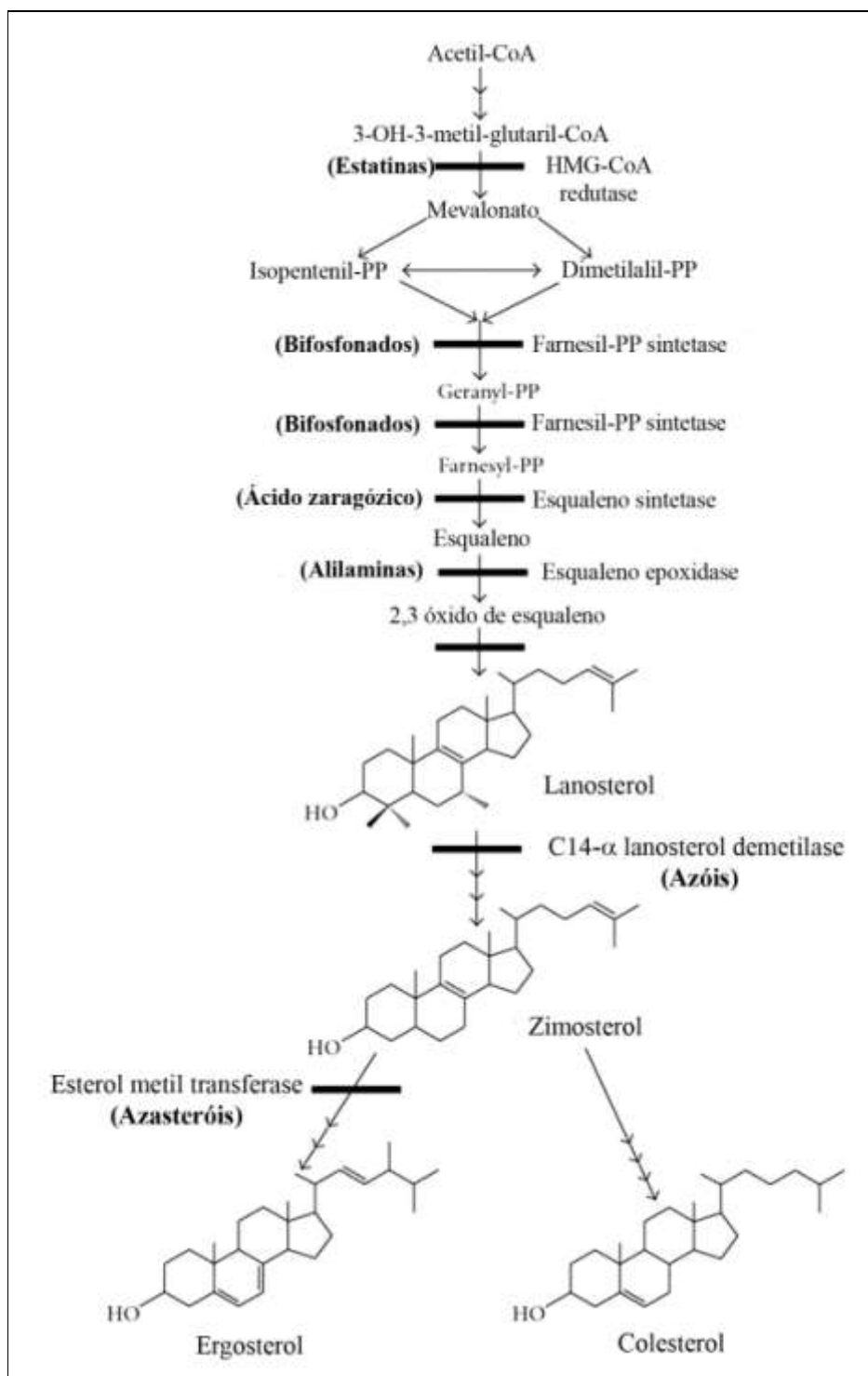


Figura 3: Diagrama esquemático da via biossintética do ergosterol/colesterol a partir de acetil-CoA, mostrando as principais etapas e as enzimas envolvidas. Inibidores podem interferir na síntese do ergosterol, em diferentes etapas. Esquema adaptado de De Souza; Rodrigues (2009).

Mais detalhadamente (Figura 4), após a formação do esqualeno, ocorre uma reação de epoxidação em C2(3) para formação de 2,3 óxido de esqualeno pela ação da enzima esqualeno epoxidase. Esta é a primeira etapa da ciclização do esqualeno para formar o esqueleto de esterol tetracíclico, e que, também, requer molécula de oxigênio. Esta reação é realizada por um complexo microsomal constituído por uma flavoproteína com atividade citocromo C redutase NADPH e uma oxidase terminal, que não pertence à família da citocromo P-450. Posteriormente, ocorre a ciclização de 2,3 óxido de esqualeno para formar lanosterol, e sequências de reações ocorrem a partir de lanosterol para a formação de ergosterol (fungos e tripanossomatídios) e colesterol (células de mamíferos). Algumas dessas reações são comuns entre os eucariotos, enquanto outras são exclusivas para cada organismo (VEEN; LANG, 2005; DE SOUZA; RODRIGUES, 2009).

A primeira etapa pós-lanosterol é uma reação de demetilação em C14 catalizada pela C14 α -lanosterol demetilase (enzima monooxigenase contendo citocromo P-450). Dessa forma, esta reação produz um intermediário insaturado $\Delta^{8(14)}$, com insaturação em C14, que precisa ser removida através de duas reações catalizadas pela $\Delta^{8(14)}$ redutase com NADH como cofator. Em vários fungos, essa remoção da insaturação é essencial, pois as enzimas subsequentes não metabolizam esse intermediário. Entretanto, fungos e tripanosomatídios conseguem metabolizar esse intermediário pela ação de C4-demetilase e Δ^{24} -metenilase para formar Δ^{14} fecosterol (VEEN; LANG, 2005; DE SOUZA; RODRIGUES, 2009). Após a remoção de grupos metilas em C4 e C14 e metenilação na cadeia lateral, a próxima reação é a isomerização de duplas ligações em fecosterol em uma reação reversível catalizada pela Δ^7 - Δ^8 isomerase, que não requer cofator, como NADPH (VEEN; LANG, 2005; DE SOUZA; RODRIGUES, 2009).

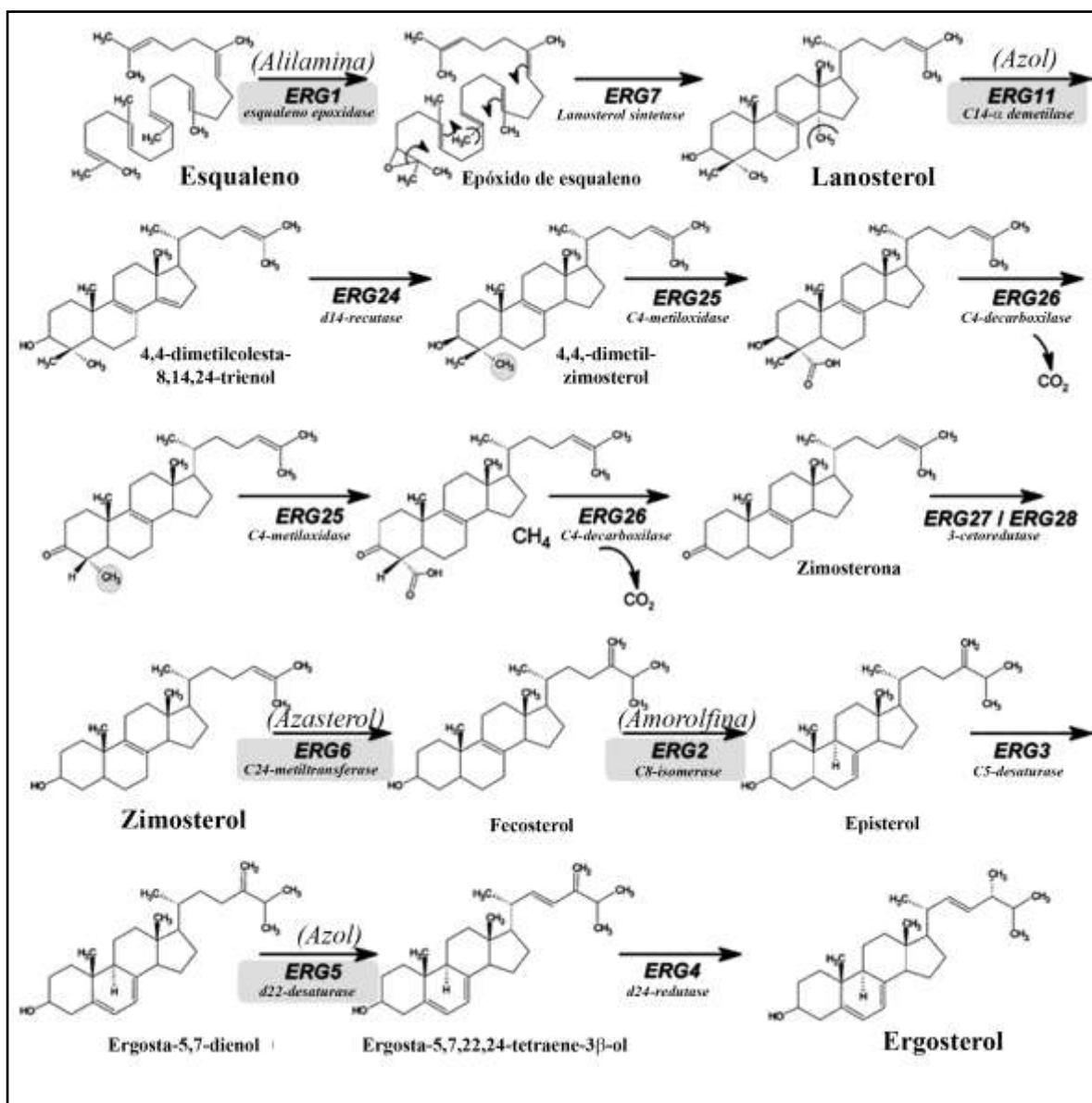


Figura 4: Via de biossíntese do ergosterol a partir de esqualeno, mostrando algumas etapas importantes, bem como as enzimas envolvidas e seus respectivos genes. Alilaminas, azóis e amorolfina são agentes antifúngicos que inibem as enzimas esqualeno epoxidase, C14-α lanosterol demetilase e Δ22-desaturase, e C8-isomerase, respectivamente. A enzima C24-esterol metiltransferase (**ERG6**) pode ser inibida por moléculas da classe dos azasteróis, um alvo farmacológico bastante promissor. Adaptado de Veen; Lang (2005).

Uma das etapas mais importantes na síntese do ergosterol é a metilação em C24 na cadeia lateral, catalizada pela enzima C24-esterol metil transferase (24-SMT). Essa reação pode ocorrer logo após a formação do lanosterol, ou ainda, metilando o intermediário

zimosterol (sem grupo metil em C4 e C14), como encontrado em muitas espécies de fungos. O grupo metil é transferido de S-adenosil-L-metionina (SAM) para C24 para produzir $\Delta^{24(28)}$ -esteróis. A enzima 24-SMT está ligada a uma proteína de membrana presentes em fungos, tripanossomatídeos e plantas, mas ausente em células de mamíferos, o que representa um interessante alvo para a busca e o desenvolvimento de agentes antiparasitários, incluindo os agentes antifúngicos (VEEN; LANG, 2005; DE SOUZA; RODRIGUES, 2009).

Atualmente, existem várias substâncias que interferem na biossíntese de esteróis que já são utilizadas no tratamento de infecções fúngicas, como as alilaminas, morfolinol e agentes azólicos, descritos detalhadamente na sessão posterior. Outras drogas, também podem inibir a síntese de colesterol, sendo algumas delas utilizadas no tratamento de hipercolesterolemia, como as estatinas (atorvastatina), que inibem a HMG-CoA redutase, da via mevalonato. Já os bifosfonatos (alendronato e risedronato), uma classe de substâncias que interfere na síntese de isoprenóides, atuam inibindo a reação catalizada pela farnesil difosfato sintase (FPPS). Os bifosfonados são utilizados no tratamento da reabsorção óssea em diferentes doenças, incluindo osteoporose, doença de Paget, hipercalcemia causada por tumor metastático nos ossos (DE SOUZA; RODRIGUES, 2009) (Figura 3).

Ácidos zaragóxicos e quinuclidinas são substâncias conhecidas como inibidores da esqualeno sintase (SQS), podendo ser um atrativo alvo, já que não interferem na síntese de isoprenóides e intermediários metabólicos. A enzima SQS tem sido alvo de intensa pesquisa no desenvolvimento de fármacos com atividade redutora de níveis de triglicerídeos e colesterol em humanos, como por exemplo, 3-(bifenil-4-yl)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ-OH), E5700 e ER-119884. Por último, a enzima 24-SMT pode ser inibida por substâncias da classe dos azasteróis. Essa inibição parece ser seletiva já que as células de mamíferos

não possuem essa enzima (DE SOUZA; RODRIGUES, 2009) (Figura 3).

1.5 Antifúngicos e mecanismos de ação

As principais classes de antifúngicos comercializadas compreendem os poliênicos, os azóis, os tiocarbamatos, as alilaminas, os derivados morfolínicos, a 5-fluorocitosina, a griseofulvina e as equinocandinas (ODDS *et al.*, 2003). A figura 5 mostra os principais alvos dos agentes antifúngicos empregados no tratamento das infecções fúngicas. No entanto, o tratamento de candidíases é, geralmente, baseado em dois grupos de drogas: os azóis e os poliênicos. Nesta década, as equinocandinas foram inseridas no esquema terapêutico de candidíases (PAPPAS *et al.*, 2004). Além disso, combinação de agentes antifúngicos pode ser utilizada e é recomendada para o tratamento das candidíases invasivas (PAPPAS *et al.*, 2004; MUKHERJEE *et al.*, 2005).

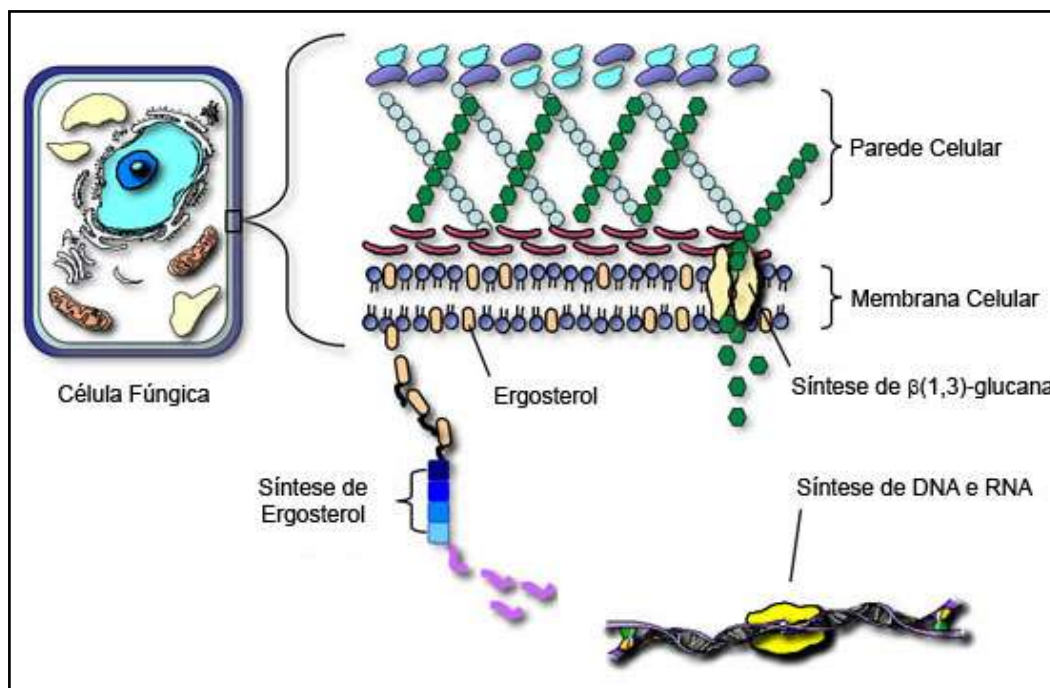


Figura 5: Principais alvos dos agentes antifúngicos empregados no tratamento de infecções fúngicas: molécula de ergosterol, síntese de ergosterol, parede celular, DNA e RNA. Adaptado da homepage www.doctorfungus.org. Acesso: 15 de maio de 2010.

1.5.1 Substâncias que atuam na molécula de ergosterol

Drogas antifúngicas que atuam diretamente sobre a molécula de ergosterol possuem seletividade comprometida, podendo levar a efeitos colaterais indesejáveis no paciente. Isto se deve à grande semelhança química e estrutural que o ergosterol possui com o colesterol.

1.5.1.2 Agentes poliênicos

Os poliênicos, representados pela nistatina e anfotericina B, são antifúngicos empregados no tratamento das candidíases. Anfotericina B é um dos fármacos de escolha na maioria das doenças fúngicas em humanos. Sua ação é fungicida, sendo indicada, em infecções sistêmicas, com administração por infusão endovenosa. Porém, o seu uso tem sido limitado devido ao seu alto grau de toxicidade (nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e hemólise). Já a nistatina é utilizada apenas topicamente, pois é demasiadamente tóxica (Figura 6) (WHITE *et al.*, 1998; ODDS *et al.*, 2003).

Os agentes poliênicos são caracterizados por serem moléculas anfipáticas e a atividade seletiva é devida à alta afinidade por esteróis 24-substituídos, complexando-se com o ergosterol, levando a formação de poros aquosos na membrana das células. Esse processo é caracterizado pela descompensação de íons K^+ e Na^+ , afetando no equilíbrio osmótico celular (Figura 7). A maior afinidade de ligação dos poliênicos pelo ergosterol do que pelo colesterol se dá pelas diferenças conformacionais que essas moléculas possuem (Figura 2). Entretanto, esta seletividade é baixa, sugerindo que os poliênicos teriam potencial tóxico para as células de mamíferos (WHITE *et al.*, 1998; ODDS *et al.*, 2003).

Com o intuito de diminuir a toxicidade desses agentes poliênicos, formulações lipídicas de anfotericina B e nistatina foram desenvolvidas. A tecnologia lipossomal foi empregada na produção da anfotericina B lipossomal (L-AMB), diminuindo drasticamente os efeitos adversos da anfotericina deoxicolato, entretanto estudos mostram que a eficácia

terapêutica é similar a anfotericina deoxicolato. L-AMB é composto de anfotericina B complexado com fosfatidilcolina de soja hidrogenada, distearoilfosfatidilglicerol e colesterol, caracterizando um verdadeiro composto de lipossomas unilamelares (Ambisome, Astellas). Além da L-AMB, outras formulações lipídicas também foram desenvolvidas, como o complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet, Enzon) e anfotericina B dispersão coloidal (Amphotec, Three Rivers). Também, está sendo desenvolvida a nistatina lipossomal para uso sistêmico (Nyotran, Aronex Pharmaceuticals) (ODDS *et al.*, 2003; THE MEDICAL LETTER, 2009). No entanto, a forma lipossomal é muito mais cara que as formas paternas, custando cerca de 20 vezes mais que a anfotericina B deoxicolato, o que pode restringir a sua utilização em centros médicos públicos, (THE MEDICAL LETTER, 2009).

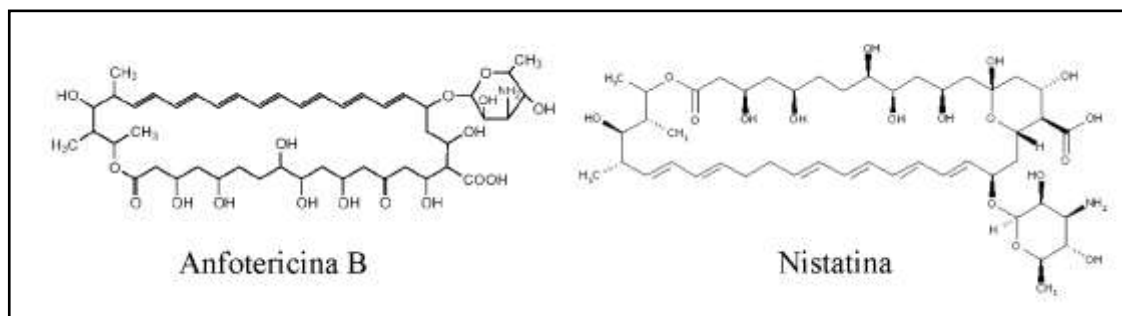


Figura 6: Estrutura molecular dos agentes poliênicos: anfotericina B e nistatina (ODDS *et al.*, 2003).

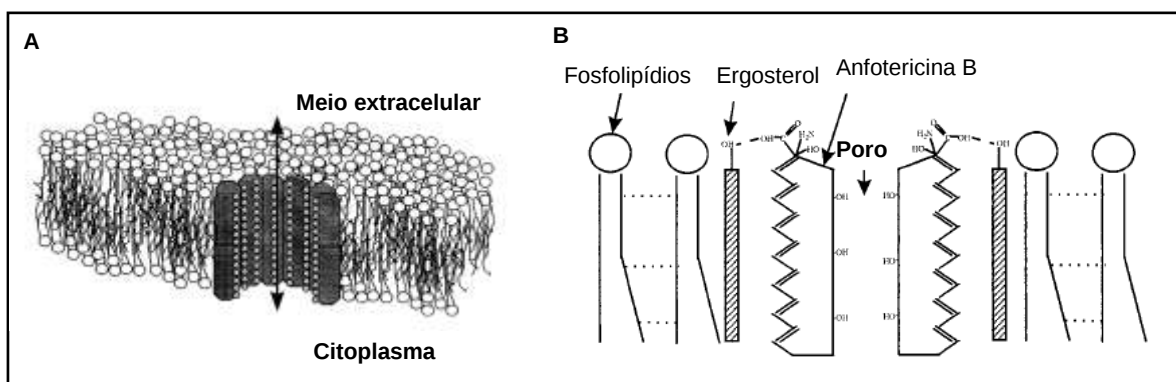


Figura 7: Mecanismo de ação da anfotericina B. **A:** Bicamada lipídica com formação de poro devido à complexação da anfotericina B na molécula de ergosterol. **B:** Em maiores detalhes, a figura mostra a ligação do poliênico, pela parte apolar, à molécula de ergosterol. Adaptado de Ghannoum; Rice (1999).

1.5.2 Substâncias que atuam na via biossintética do ergosterol

1.5.2.1 Agentes azólicos

A utilização de agentes antifúngicos azólicos foi uma das alternativas encontradas para tratar infecções fúngicas tanto superficiais quanto sistêmicas, diminuindo os efeitos tóxicos dos poliênicos. Os azóis podem ser classificados de acordo com sua estrutura química, como imidazóis e triazóis. Os imidazóis são caracterizados pelo anel imidazol (contendo 2 átomos de nitrogênio) enquanto os triazóis, pelo anel triazol (contendo 3 átomos de nitrogênio) (ODDS *et al.*, 2003) (Figura 8).

O principal efeito dos azóis é inibir a 14 α -demetilação da molécula de lanosterol. A enzima alvo envolvida neste processo é C14 α -lanosterol demetilase, possuindo atividade de uma citocromo P450 monooxigenase (Erg11p) que catalisa uma remoção oxidativa do grupo metil do lanosterol. Esta proteína contém um grupo protoporfirínico localizado no sítio ativo da enzima, onde os azóis se ligam ao átomo de ferro por meio dos átomos de nitrogênio do núcleo imidazol ou triazol. Adicionalmente, em algumas espécies de fungos, essas substâncias, também, podem atuar na enzima Δ 22-desaturase (Figura 4). Dessa maneira, há uma depleção de ergosterol na membrana citoplasmática dos fungos e o acúmulo de esteróis tóxicos (do tipo 14 α -metil-3,6-diol) alterando a permeabilidade e fluidez, o que acarreta uma interferência na fisiologia do fungo, e consequentemente, a inibição de seu crescimento (ODDS *et al.*, 2003).

Os imidazóis surgiram na década de 1980 e foram os primeiros agentes azólicos a serem lançados no mercado. Os mais comuns são cetoconazol e o miconazol, e na época tornaram-se drogas muito promissoras para o tratamento de infecções sistêmicas. Atualmente, substâncias da classe dos imidazóis são comumente utilizadas em formulações tópicas e orais (ODDS *et al.*, 2003).

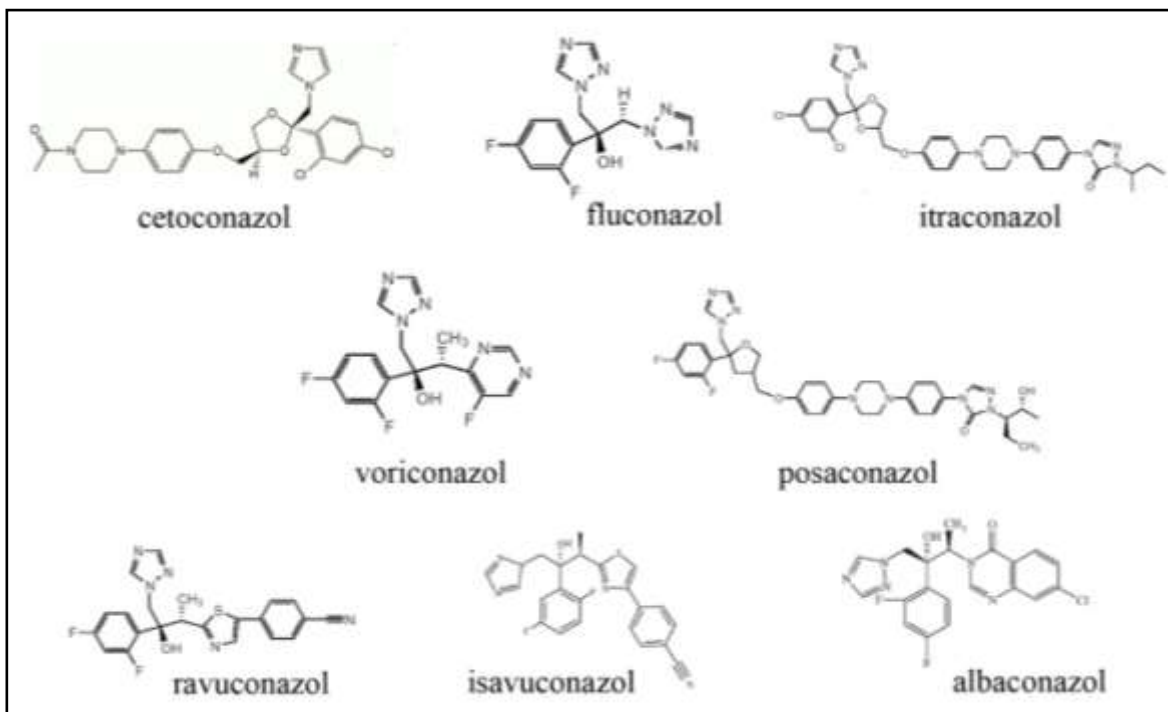


Figura 8: Estrutura química de alguns agentes azólicos: i) cetoconazol (imidazol); ii) fluconazol e itraconazol (triazóis de primeira geração); iii) voriconazol e posaconazol (triazóis de segunda geração); iv) ravuconazol, isavuconazol e albaconazol (novos triazóis) (ODDS *et al.*, 2003; PASQUALOTTO; DENNING, 2008).

O surgimento dos triazóis, na década de 1990, ocorreu pela substituição do núcleo imidazol pelo triazol no centro farmacofórico ativo das moléculas, aumentando a especificidade na ligação no citocromo P450 do fungo. Os triazóis de primeira geração são o fluconazol e o itraconazol, e os de segunda geração são o voriconazol e posaconazol, originados de uma modificação estrutural dos triazóis de primeira geração. A inclusão do grupo α -O-metil na molécula do fluconazol conferiu atividade antifúngica do voriconazol contra *Aspergillus* spp. e outros fungos filamentosos, ampliando o espectro de ação (ODDS *et al.*, 2003). Outros novos triazóis estão em fase de testes *in vivo*, como ravuconazol, albaconazol e isavuconazol (PASQUALOTTO; DENNING, 2008). Essas modificações estruturais e o desenvolvimento de novos triazóis proporcionaram a obtenção de antifúngicos de maior espectro de ação e menor efeito colateral. Além de essas substâncias possuírem formulações tópicas e orais, também estão nas formulações endovenosas,

possibilitando a utilização destes azóis no tratamento de infecções sistêmicas.

1.5.2.2 Alilaminas

Representada pela terbinafina, são inibidores da enzima esqualeno epoxidase, um passo inicial da via biossintética do ergosterol (Figura 3), levando ao efeito fungicida em algumas espécies de fungos. O efeito fungicida resulta da depleção de ergosterol na membrana e do excesso de esqualeno acumulado, provocando o efeito tóxico na célula fúngica (ODDS *et al.*, 2003). A terbinafina é indicada no tratamento das onicomicoses causadas por fungos dermatófitos, pois a droga se acumula na pele, unha e tecido adiposo. Embora a terbinafina não seja indicada para o tratamento de micoses sistêmicas, existe um interesse grande na combinação com outros inibidores da síntese de ergosterol para alcançar um efeito sinérgico (MUKHERJEE *et al.*, 2005).

1.5.2.3 Morfolinos

A classe dos morfolinos (amorolfina) afeta três alvos moleculares, Δ^{14} -redutase, Δ^7, Δ^8 -isomerase e óxido-esqualeno ciclase, acarretando na inibição da síntese do ergosterol (Figura 4). A amorolfina pode ser usada no tratamento de infecções fúngicas superficiais causadas por fungos dermatófitos (ODDS *et al.*, 2003).

1.5.3 Substâncias que atuam na síntese de ácidos nucleicos

Flucitosina (5-fluorocitosina, 5-FC, 4-amino-5-fluoro-2-pirimidona) é um análogo de pirimidina e um antimetabólito. A 5-FC atua na célula fúngica inibindo a síntese de DNA e RNA. No interior da célula, a citosina deaminase converte a 5-FC em 5-fluouracil, um análogo de nucleotídeo, sendo incorporado durante o processo de transcrição do RNAm, pela substituição do uracil, inibindo a síntese de proteínas. Adicionalmente, esse análogo inibe a timidilato sintase, inibindo por consequência a síntese de DNA. A ação

seletiva contra os fungos ocorre pela presença da enzima citosina permease presente na membrana citoplasmática do fungo, responsável pela translocação da droga para o interior da célula fúngica (Figura 9). Fungos leveduriformes (*Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.) e alguns filamentosos (*Aspergillus* spp., *Phialophora* spp. e *Cladosporium* spp.) são susceptíveis a 5-FC, entretanto a utilização isolada deste antifúngico no tratamento das infecções fúngicas, frequentemente resulta no aparecimento de resistência. Assim, 5-FC é quase sempre administrado em combinação com anfotericina B ou fluconazol (ODDS *et al.*, 2003).

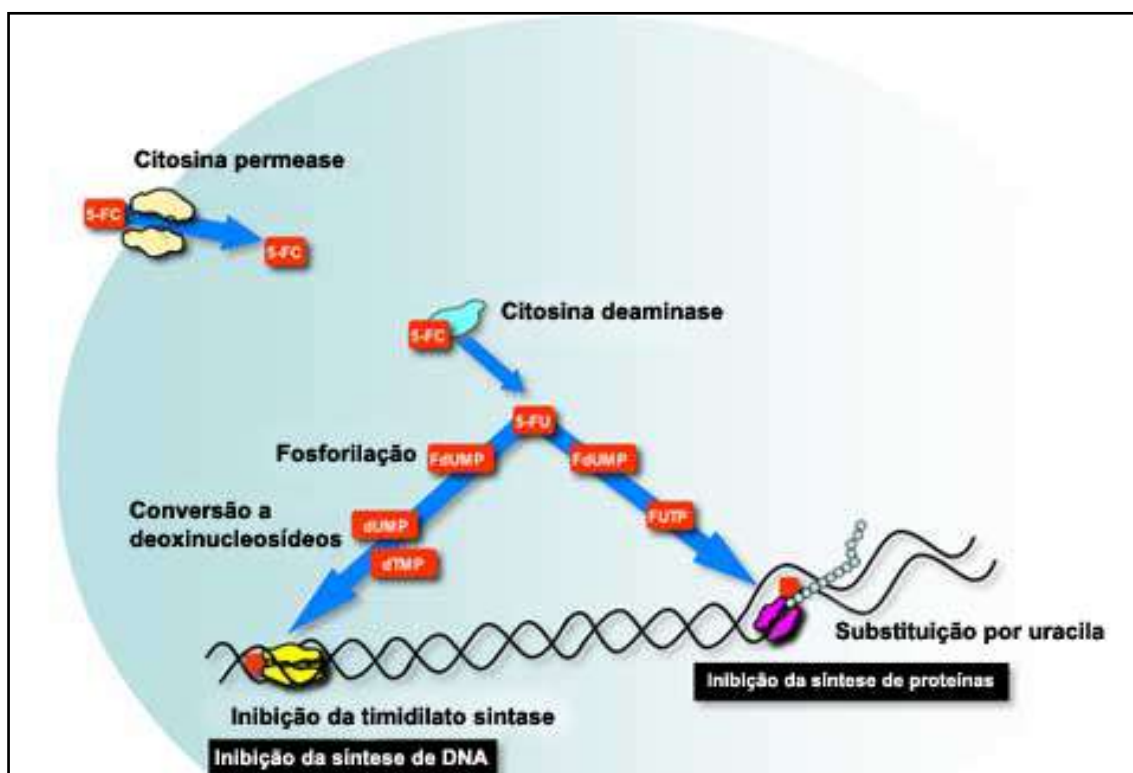


Figura 9: Mecanismo de ação da 5-fluorocitosina, um inibidor da síntese de DNA e RNA de fungos. Adaptado da homepage www.doctorfungus.org. Acesso: 15 de maio de 2010.

1.5.4 Substâncias que atuam na organização dos microtúbulos

O mecanismo de ação da griseofulvina não é bem conhecido, mas estudos têm demonstrado a atuação na organização dos microtúbulos, interferindo na polimerização da

tubulina durante a formação do fuso mitótico em fungos. Os efeitos podem ser alteração na parede celular, na síntese de ácidos nucleicos e no processo de divisão celular, o que caracteriza seu efeito fungicida. A toxicidade seletiva da griseofulvina é moderada, apresentando efeito hepatotóxico no paciente e seu espectro de ação é restrito aos fungos dermatófitos (ODDS *et al.*, 2003).

1.5.5 Drogas que atuam na síntese de parede celular

1.5.5.1 Parede celular

A parede celular fúngica é uma estrutura dinâmica que, além de promover a sustentação e a forma da célula, a protege das mudanças de pressão osmótica e outros estresses ambientais, bem como permite a interação da célula fúngica com o ambiente. Também, participa ativamente da fisiologia do fungo e mecanismos de patogênese em um hospedeiro (BOWMAN; FREE, 2006).

A parede celular de fungo possui uma espessura de 70-250 nm e representa aproximadamente 70% do peso seco de uma levedura/hifa. É constituída, principalmente, por polissacarídeos (α - e β - glucanas e quitina), carboidratos do tipo glucanas e mananas, que podem estar ligadas às proteínas, formando as glicoproteínas. Os polissacarídeos compõem mais que 90% da parede celular, sendo os principais polímeros de glucana (β 1,3 e β 1,6) que estão ligadas a quitina por meio de ligação β 1,4. As glicoproteínas presentes na parede celular estão ligadas aos carboidratos por ligação do tipo N- e O- dos resíduos de aminoácidos, e muitas proteínas estão ligadas diretamente à membrana plasmática por meio de uma ancora de GPI. Os sistemas enzimáticos para a síntese de quitina (quitina sintase) e glucanas (glucana sintase) se encontram na membrana citoplasmática dos fungos. Especificamente, a glucana sintase é um complexo enzimático constituído por duas sub-

unidades Fksp (Fks1p e Fks2) e Rho1p, onde a primeira é responsável pela adição de moléculas de glicose nas cadeias de glucanas e a segunda, é uma subunidade regulatória GTPase (BOWMAN; FREE, 2006).

A parede celular é absolutamente essencial para a sobrevivência; mutações ou drogas que afetam a síntese dos componentes de parede celular podem resultar em células fúngicas inviáveis ao crescimento e ao estabelecimento de infecção. A célula fúngica dispõe de uma maquinaria específica para a síntese dos componentes de parede celular e que não são encontrados em humanos, representando uma rica fonte de alvos para novas drogas. Entretanto, atualmente dispomos, somente, de uma classe de substâncias-equinocandinas, que está sendo utilizada no tratamento e profilaxia das infecções fúngicas (SELITRENNIKIFF; NAKATA, 2003).

1.5.5.2 Equinocandinas

O surgimento de uma classe de drogas que atua na síntese de parede celular de fungos representou grande avanço para comunidade científica. Um novo alvo terapêutico que abriu caminhos para o tratamento das infecções fúngicas, uma vez que a quimioterapia antifúngica restringia-se, basicamente, ao alvo molecular ergosterol e na sua biossíntese.

Drogas da classe das equinocandinas foram originadas de metabólitos secundários de fungos; como a pneumocandina B0 isolada de *Glarea lozoyensis*. Essas substâncias são caracterizadas por um hexapeptídeo cíclico ligado a uma cadeia lipídica, responsável pela atividade antifúngica. A equinocandina B e a aculeacina foram descobertos na década de 70, no entanto as pesquisas foram abandonadas. Nos últimos anos, as equinocandinas, inibidores da síntese de parede celular, têm sido inseridas no arsenal terapêutico das infecções fúngicas invasivas. Em 2002, a primeira equinocandina, caspofungina, foi aprovada pelo FDA e atualmente mais duas foram aprovadas – anidulafungina e

micafungina (ODDS *et al.*, 2003; BAL, 2010). (Figura 10).

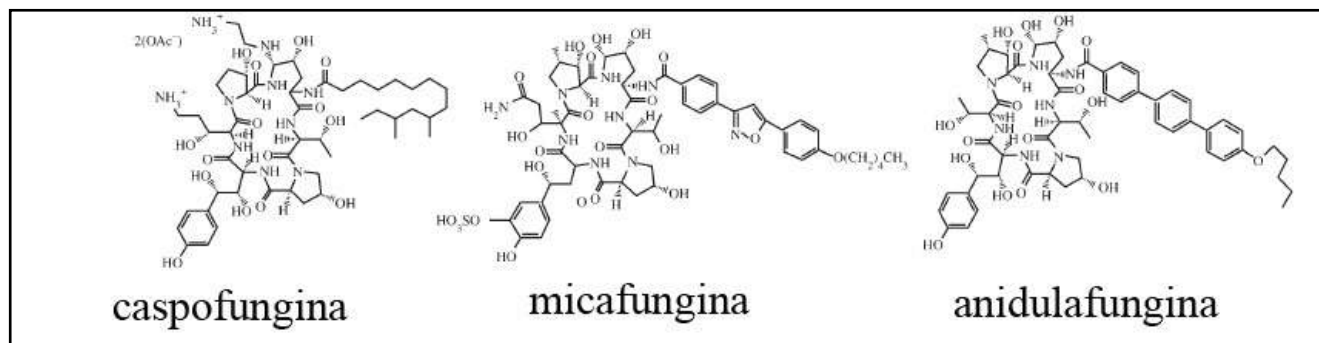


Figura 10: Estrutura química das equinocandinas (BAL, 2010).

O alvo farmacológico dessas substâncias consiste em um complexo de proteínas [$\beta(1,3)$ glucana sintase] responsável pela síntese do polissacarídeo $\beta(1,3)$ glucana da parede celular. As equinocandinas são inibidores não-competitivos que se ligam à proteína Fks1p, bloqueando a ligação de UDP-glicose ao sítio ativo, e conseqüentemente, inibindo o desenvolvimento da cadeia de (1,3) glucana, promovendo o efeito fungicida (Figura 11) (ODDS *et al.*, 2003; BAL, 2010).

O espectro de ação das equinocandinas é restrito ao tratamento de candidíases e aspergiloses, e também na profilaxia dessas infecções fúngicas. Possuem pouca atividade contra fungos do gênero *Fusarium*, *Scedosporium*, *Coccidioides*, *Blastomyces* e *Histoplasma*, enquanto *Zigomicetos*, *Trichosporum* spp. e *Cryptococcus* spp. são naturalmente resistentes (BAL, 2010).

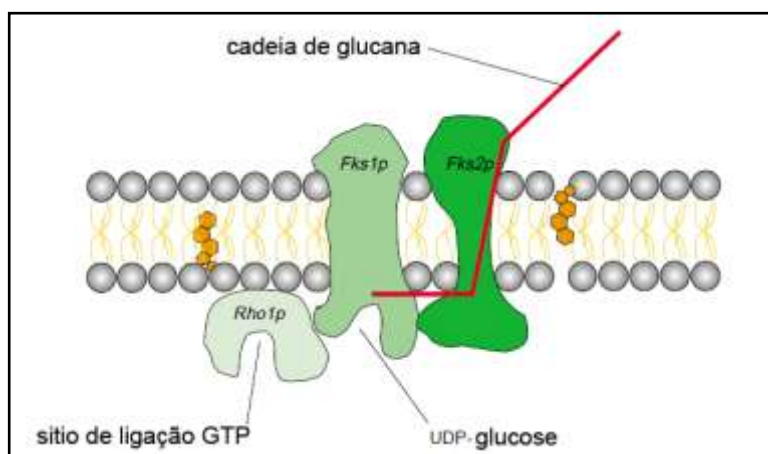


Figura 11: Complexo enzimático da síntese do polissacarídeo $\beta(1,3)$ glucana ligado a membrana citoplasmática dos fungos. Equinocandinas inibem a enzima Fks1p, interferindo na síntese de parede celular. Adaptado de Odds *et al.* (2003).

1.6 Resistência aos antifúngicos

A falha terapêutica das micoses pode estar relacionada ao paciente, ao microrganismo e ao antifúngico. Com relação ao hospedeiro, fatores como, estado imunológico, sítio da infecção, presença de abscesso não drenado, presença de objetos estranhos (por ex., cateter), podem influenciar no sucesso do tratamento. Já em relação ao microrganismo, a resistência ao antifúngico e a densidade fúngica são os fatores mais importantes. Adicionalmente, a farmacocinética da droga (absorção, distribuição e metabolismo), interações medicamentosas, dose inapropriada e ação fungistática podem ser os principais fatores que contribuem para a falha do tratamento de infecções fúngicas (CANUTO; RODERO, 2002).

É importante discernir os termos resistência microbiológica de resistência clínica. A resistência microbiológica se refere a não susceptibilidade do fungo ao agente antifúngico utilizando testes de susceptibilidade *in vitro*, em que o valor de concentração inibitória mínima (CIM) da droga exceda o valor de “breakpoint” estabelecido para a espécie fúngica. Isto ocorre, pois o fungo dispõe de mecanismos capazes de driblar a ação do antifúngico, mecanismos estes, descritos mais adiante. A resistência microbiológica pode ser intrínseca (primária) ou adquirida (secundária). A intrínseca pode ser encontrada naturalmente em certos fungos, como por ex., *C. krusei* ao fluconazol e *C. neoformans* as equinocandinas. Já a resistência adquirida é caracterizada por uma alteração na expressão gênica, quando em presença do agente antifúngica. Por outro lado, a resistência clínica diz respeito à falha do tratamento, mesmo que o teste de susceptibilidade *in vitro* caracterize sensibilidade à droga, e está relacionada com fatores inerentes ao hospedeiro e ao antifúngico. Embora resistência clínica nem sempre possa ser prevista, estes fatores devem ser levados em consideração para individualizar o tratamento com base na situação clínica (SANGLARD; ODDS, 2002;

KANAFANI; PERFECT, 2008).

Muitos clínicos recomendam que se faça um antifungigrama para a indicação do melhor antifúngico a ser utilizado no tratamento. Muitas técnicas podem ser utilizadas para avaliar a susceptibilidade de *Candida* spp. aos agentes antifúngicos, mas a técnica padrão ouro é a macro- e microdiluição em caldo, padronizada e descrita pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), como pode ser vista no documento M27-A3 (CLSI, 2008). O “European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing”, também, tem publicado manuais para testes de susceptibilidade para *Candida* (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2005). Algumas espécies de *Candida*, quando tratadas com fluconazol, itraconazol e voriconazol, são capazes de apresentar efeito “trailing”, fenômeno que consiste em um crescimento residual do microrganismo em todas as concentrações da droga testada, particularmente após 48 horas de incubação (ARTHINGTON-SKAGGS *et al.*, 2000). Dessa forma, a análise criteriosa dos resultados deve ser realizada para determinar o perfil de susceptibilidade de *Candida* spp. aos antifúngicos, evitando erros na interpretação. O que se recomenda é fazer a leitura do teste de susceptibilidade nos tempos de 24 e 48h de incubação. Algumas modificações desse método foram propostas para minimizar o efeito “trailing”, como: variação de pH, tempo de incubação, tamponamento do meio e adição de glicose ao meio (RODRIGUEZ-TUDELA *et al.*, 1996; TORNATORE *et al.*, 1997; MARR *et al.*, 1999).

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de relacionar a ação de antifúngicos *in vitro* com o sucesso/insucesso do tratamento, determinando, assim, pontos de corte, podendo classificar os fungos como susceptível, susceptível dose-dependente e resistente para uma determinada droga. Para algumas drogas antifúngicas, os valores obtidos de teste de susceptibilidade *in vitro*, em isolados de *Candida*, se correlacionam com

os dados obtidos na prática clínica (NGUYEN *et al.*; 1998; PFALLER *et al.*, 2006a). No entanto, um microrganismo susceptível à droga não é sinônimo de sucesso terapêutico, mas no caso de resistência é muito provável que haja insucesso (REX; PFALLER, 2002). Assim, *Candida* spp. dispõem de vários mecanismos de resistência aos antifúngicos, que estão descritas abaixo.

1.6.1 Resistência a agentes azólicos

Os agentes azólicos são rotineiramente utilizados no tratamento de micoses e na profilaxia em pacientes imunocomprometidos. Estudos mostram o aumento da resistência de isolados de *C. albicans* em pacientes HIV positivos com candidíase orofaríngea e esofágica, e a grande utilização de fluconazol e itraconazol tem sido um fator importante para a emergência de resistência. Por outro lado, podemos verificar que em outros tipos de candidíase, a resistência é menos comum, como por ex., no caso de candidíase vulvovaginal (KANAFANI; PERFECT, 2008). No entanto, a evidência para a emergência de algumas espécies de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos pode ser confundida com os métodos de teste de susceptibilidade e de definições de resistência não padronizados (SANGLARD; ODDS, 2002). Nesta mesma revisão, os autores comentam que muitos estudos de vigilância antifúngica realizados com isolados sanguíneos de *Candida* spp., baseados em metodologias padronizadas, não sustentam a idéia de que a resistência antifúngica constitui em um problema terapêutico crescente ou significativo.

Os índices de amostras resistentes aos agentes azólicos, geralmente são baixos, no entanto, estudos mostram que *C. krusei* e *C. glabrata* são as espécies menos sensível a essas drogas (HAZEN *et al.*, 2003; COLOMBO *et al.*, 2003; COLOMBO *et al.*, 2006). Hazen *et al.* (2003) compararam a susceptibilidade de isolados de *Candida* spp., obtidos de

35 países, ao fluconazol e voriconazol, por um período de 3 anos. No ano de 2001, a porcentagem de resistência ao fluconazol para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* foi de 1%, 18,3%, 3,1% e 4%, respectivamente. Neste estudo, o Brasil contribuiu com 440 isolados de *Candida* spp. e não foi observada resistência ao fluconazol. No entanto, nos anos de 1999 e 2000, o índice de resistência no Brasil foi de 1,4% e 5,3% para o fluconazol, respectivamente. Outros estudos mostram que esse perfil se mantém (COLOMBO *et al.*, 2003; COLOMBO *et al.*, 2006). No caso do voriconazol, estes estudos demonstram que os isolados de *Candida* spp. são sensíveis, inclusive *C. glabrata*, que teve o maior índice de resistência ao fluconazol (HAZEN *et al.*, 2003).

São vários os mecanismos moleculares de resistência de *Candida* aos azóis, que incluem, alteração da molécula alvo, aumento da expressão do alvo, presença de via biossintética do ergosterol alternativa e aumento de escoamento de droga da célula por meio de bombas de efluxo. Alguns genes estão envolvidos no mecanismo de resistência. Muitas alterações genéticas têm sido identificadas, e estão associadas com o gene *ERG11* de *C. albicans*, que codifica a enzima C14 α -lanosterol demetilase, incluindo mutações pontuais, aumento da expressão e amplificação do gene. Expressões aumentadas do gene *ERG3*, que codifica C5-esterol desaturase, reduzem a susceptibilidade aos azóis por prevenir o acúmulo de 14 α -metil-3,6-diol de 14 α -metilfecosterol, permitindo o crescimento fúngico. Outros genes que codificam enzimas que participam da via biossintética do ergosterol, também, estão relacionados com a resistência aos azóis. Alguns estudos relatam a dependência de expressão do gene *ERG3* e *ERG11*, ou seja, há um aumento da expressão do gene *ERG3*, quando a depleção do gene *ERG11* é observada, e vice-versa. Além disso, a presença de bombas de efluxo resulta na diminuição da concentração da droga no interior da célula. Isto é caracterizado pelo aumento da expressão de genes que codificam bombas

de efluxo, e tem sido amplamente observado em leveduras resistentes aos azóis. Bombas de efluxo são codificadas por duas famílias de transportadores: genes *CDR* da superfamília cassete de ligação ao ATP e genes *MDR* (WHITE *et al.*, 1998; SANGULARD; ODDS, 2002).

Além dos mecanismos moleculares de resistência, também existem os celulares, que podem compreender resistência intrínseca à droga, seleção natural de estirpes resistentes, expressão de gene transitório para resistência (resistência epigenética) e alteração no tipo celular. Outro aspecto relevante é a atividade fungistática da maioria dos antifúngicos e a administração prolongada, permitindo a seleção de mutantes (WHITE *et al.*, 1998).

1.6.2 Resistência a poliênicos

Embora a resistência de isolados de *Candida* aos poliênicos seja rara, estudos mostram o aumento dos valores de CIMs de anfotericina B em amostras de *C. krusei* e *C. glabrata* (KANAFANI; PERFECT, 2008). Em adição, algumas espécies de *Candida* possuem resistência intrínseca (*C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*). A resistência a anfotericina B parece ser espécie dependente, podendo emergir durante os tratamentos com antifúngicos, ocorrendo com maior frequência em espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* (ELLIS, 2002). A ocorrência de resistência a anfotericina B e a nistatina em amostras de isolados clínicos é baixa e, frequentemente, ocorre pela diminuição ou modificação da molécula alvo (ergosterol), diminuindo a afinidade pelos poliênicos. Muitos isolados clínicos resistentes aos poliênicos têm demonstrado uma alteração em *ERG2* e *ERG3* e na taxa de esterol/fosfolipídios. Geralmente, um isolado resistente a um poliênico, também, é resistente a outros da mesma forma (WHITE *et al.*, 1998). Colombo *et al.* (2006) mostraram que dentre 291 isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C.*

glabrata, todos foram susceptíveis à anfotericina B, e somente dois isolados apresentaram resistência (*C. pelliculosa* e *C. ohmeri*).

1.6.3 Resistência a 5-fluorocitosina

Resistência primária a 5-FC é comum em espécies de CNA. No entanto, estima-se que cerca de 10% dos isolados de *C. albicans* são intrinsicamente resistentes e que 30% desenvolverão resistência secundária. Os mecanismos moleculares envolvidos na resistência a 5-FC é a perda da atividade da citosina permease, citosina deaminase e diminuição da atividade uracil fosforibosil transferase (converte 5-fluorouracila em 5-fluorouridina monofosfato) (WHITE *et al.*, 1998).

1.6.4. Resistência a equinocandinas

Poucos trabalhos têm descrito a resistência de *Candida* as equinocandinas. No entanto, a resistência pode ocorrer pela mutação do gene *FKS1*, pelo aumento do efluxo da droga pela bomba de efluxo Cdr2p e degradação da droga (SCHUETZER-MUEHLBAUER *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2005; MOUDGAL *et al.*, 2005; KANAFANI; PERFECT, 2008). Pfaller *et al.* (2006b) mostraram que em um período de quatro anos, o perfil de susceptibilidade de *Candida* spp. à caspofungina se manteve, apresentando valores de CIM baixos (<0,5 µg/mL) para todos os isolados analisados. Interessantemente, *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. susceptíveis a caspofungina apresentam crescimento *in vitro* em concentrações acima à CIM, fenômeno denominado de efeito paradoxal. Este efeito tem sido relacionado ao aumento da quitina de parede celular, entretanto, a administração de doses mais altas de caspofungina em pacientes não tem mostrado este fenômeno. Também, a agregação da droga pode resultar em uma menor atividade, o que contribui para o efeito paradoxal (PERLIN 2007; KANAFANI; PERFECT, 2008).

1.7 Perspectivas para novos agentes antifúngicos

Até a década de 80 do século passado, a terapia antifúngica consistia em agentes poliênicos e 5-FC (MEDOFF *et al.*, 1983). No entanto, com advento da AIDS e procedimentos invasivos com consequente aumento das micoses sistêmicas, houve a necessidade da busca de novos agentes antifúngicos. A partir deste momento surgiram duas novas classes de drogas com diferentes alvos farmacológicos, como os inibidores da síntese do ergosterol e do polissacarídeo $\beta(1,3)$ glucana, da parede celular, para aumentar o arsenal terapêutico no tratamento das infecções fúngicas (ODDS *et al.*, 2003). Neste sentido, fez-se necessário à intensificação de estudos de novas estratégias para o tratamento das infecções fúngicas, como a busca de novas moléculas com atividade antifúngica.

Produtos naturais sejam de origem vegetal, animal ou mineral, são fontes de moléculas com potencial antifúngico. As plantas medicinais são importantes não somente quando seus constituintes são utilizados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas farmacêuticas ou fontes de moléculas líderes para obtenção de novas estruturas químicas. Muitos trabalhos têm demonstrado que extratos brutos, subfrações, óleos essenciais e moléculas isoladas de plantas medicinais possuem atividade antimicrobiana, em especial antifúngica (COWAN, 1999; MESA ARANGO *et al.*, 2004; ISHIDA *et al.*, 2006; ABAD *et al.*, 2007; ISHIDA *et al.*, 2009).

Outra fonte de moléculas com atividade antifúngica são os microrganismos, haja vista que muitos antibióticos comercializados atualmente foram, primeiramente, isolados de fungos e bactérias (TORTORA *et al.*, 2003), como por exemplo, agentes poliênicos e equinocandinas, drogas utilizadas na prática clínica no tratamento das infecções fúngicas. Vicente *et al.* (2003) descreveram em uma revisão algumas moléculas produzidas por microrganismos com atividade antifúngica com diferentes mecanismos de ação: inibidores

da síntese de polissacarídeo β 1,3 ou β 1,6 glucana de parede celular dos fungos (pneumocandinas e papulocandinas), de quitina (nicomicinas e polioxinas, felisina A), de manoproteínas, de esfingolipídeos, e inibidores de síntese de proteínas (sordarinas).

Adicionalmente, produtos sintéticos são moléculas bastante promissoras no estudo da atividade antifúngica. Desde a década de 70, além dos agentes azólicos, novas moléculas inibidoras da síntese de ergosterol têm sido sintetizadas. Hays *et al.* (1977a, 1977b) e Taylor *et al.* (1983) verificaram que o 15-azasterol (15-aza-24-metilene-D-homocolesta-8,14-dien-3 β -ol) inibia o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, em concentrações de 1 ng/mL, acumulando um esterol, ergosta-8,14-dien-3 β -ol. Também, foi verificado que esta molécula seria um inibidor competitivo das enzimas Δ^{24} -esterol metiltransferase (24-SMT) e 24(28) metileno redutase, que fazem parte da via biossintética do ergosterol. Outros azasteróis, inibidores competitivos com S-adenosil-L-metionina (SAM) pela enzima 24-SMT, também apresentaram atividade inibitória contra *S. cerevisiae*, com o consequente acúmulo de zimosterol e diminuição de ergosterol na célula fúngica, demonstrando que a enzima 24-SMT tem um papel importante no metabolismo do fungo (OEHLSCHLAGER *et al.*, 1984). Em 1987, Georgopapadakou *et al.* demonstraram que o 15-azasterol inibia a síntese de lipídeos e interferia na integridade da membrana citoplasmática de *C. albicans*. Ator *et al.* (1989) demonstraram o mecanismo e inibição da enzima 24-SMT de *C. albicans* e *C. tropicalis* pelos análogos de esteróis. Outros trabalhos têm demonstrado a ação inibitória de azasteróis sobre *Pneumocystis carinii* (URBINA *et al.*, 1997) e *P. brasiliensis* (VISBAL *et al.*, 2003; VISBAL *et al.*, 2005). Em 2003, Burbiel e Bracher revisaram a atividade antifúngica dos azasteróis, em específico, àqueles que contêm um átomo de nitrogênio no anel esteroidal, em diferentes espécies fúngicas. Azasteróis que apresentam

átomo de enxofre na cadeia lateral inibiam a 24-SMT de *C. albicans* causando a inibição da síntese de ergosterol, do crescimento e da filamentação (KANAGASABAI *et al.*, 2004).

Autores têm demonstrado atividade antiprotzoário, contra *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*, de alguns inibidores da 24-SMT (22,26 azasterol, 25-epiminolanosterol, IMI e PYR) (HAUGHAN *et al.*, 1995; RODRIGUES *et al.*, 2002, LORENTE *et al.*, 2004; GRANTHON *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2007). De Souza *et al.* (2002) descreveram alterações marcantes na ultraestrutura de tripanossomatídeos tratados com inibidores da síntese de esterol, mostrando que essa via biossintética é essencial para o metabolismo dos parasitas. Azasteróis, também, foram ativos contra *Toxoplasma gondii* (DANTAS-LEITE *et al.*, 2004) e *Giardia lamblia* (MAIA *et al.*, 2007).

Inibidores sintéticos da esqualeno sintase, têm demonstrado atividade inibitória para a enzima esqualeno sintase. Atualmente, SQS tem sido intensamente investigada para o desenvolvimento de moléculas que apresentam atividade anti-hipercolesterolemia e anti-hipertrigliceridemia em células de mamíferos (TAVRIDOU; MANOLOPOUCOS, 2009). Adicionalmente, essas moléculas têm apresentado atividade contra parasitas, como protozoários e fungos: (1) arilquinuclidinas têm sido descrito como potentes inibidores da síntese de colesterol com significativo efeito *in vitro* e em animais, e também apresentam potente atividade em concentrações de nanomolares a subnanomolares contra parasitas como *T. cruzi*, *Leishmania* e *T. gondii* (URBINA *et al.*, 2002; URBINA *et al.*, 2004; MARTINS-DUARTE *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2008); e, (2) ácido zaragózico, um produto natural extraído de fungos, apresenta alta atividade contra diferentes espécies de fungos (BERGSTROM *et al.*, 1993).

O entendimento da biologia do agente etiológico da micose e o estudo de novas moléculas com potencial antifúngico são importantes na abertura de caminhos para o

desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Estes trabalhos citados nesta sessão demonstram a importância de se estudar novos alvos, como 24-SMT e SQS. Adicionalmente, muitas moléculas sintéticas e isoladas de produtos naturais mostraram-se interessantes inibidores das enzimas 24-SMT e SQS, podendo ser fontes para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas, podendo atuar em novos alvos, diferentes aos dos antifúngicos utilizados na prática clínica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Esta tese teve como objetivo geral avaliar a atividade antifúngica de inibidores da Δ^{24} -esterol metil transferase (24-SMT) e esqualeno sintase (SQS), enzimas que participam da via biossintética do ergosterol, sobre isolados clínicos de *Candida* spp.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de susceptibilidade de isolados clínicos de *Candida* spp. aos antifúngicos comerciais utilizados no tratamento de candidíases: fluconazol, itraconazol e anfotericina B, pela utilização da técnica de microdiluição em caldo.
- Avaliar o efeito dos inibidores da síntese de esteróis (inibidores de 24-SMT e SQS) sobre o crescimento celular de isolados clínicos de *Candida* spp., pela técnica de microdiluição em caldo.
- Averiguar o efeito fungistático/fungicida dos inibidores da síntese de esteróis sobre isolados clínicos de *Candida* spp.
- Verificar alterações morfológicas e ultraestruturais de leveduras de *Candida* spp. tratadas com os inibidores da síntese de esteróis pelas técnicas de microscopia óptica, eletrônica de transmissão e de varredura.
- Analisar os efeitos dos inibidores da síntese de esteróis no ciclo celular de *Candida* spp. por microscopia de fluorescência.
- Avaliar o efeito dos inibidores da síntese de esteróis sobre o perfil lipídico de leveduras pelas técnicas de microscopia de fluorescência e métodos cromatográficos.

- Avaliar os efeitos citotóxicos dos inibidores da 24-SMT e SQS em células de mamíferos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos

Cepas de *Candida* spp. da American Type Culture Collection (ATCC), cedidas gentilmente pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil): *Candida albicans* ATCC 24433, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 28707 e *Candida tropicalis* ATCC 13803, foram utilizadas para uma triagem da atividade antifúngica dos inibidores da síntese de esteróis.

Os inibidores que apresentaram efeito inibitório sobre as cepas ATCC foram, posteriormente, avaliados em 65 isolados clínicos de *Candida* spp.: *Candida albicans* (21), *Candida parapsilosis* (19), *Candida tropicalis* (14), *Candida guilliermondii* (3), *Candida glabrata* (2), *Candida krusei* (1), *Candida lusitaneae* (1), *Candida zeylanoides* (1), *Candida rugosa* (1), *Candida dubliniensis* (1) e *Candida lipolytica* (1). Estes isolados foram obtidos de diferentes sítios anatômicos: sangue (35%), urina (26%) e outros materiais clínicos (fluido vaginal, fezes, escarro, líquido pleural, abscessos, pele e unha) (39%) (Figura 12 e Tabela 1). As estirpes foram isoladas no período de 2002 a 2006, identificadas por procedimentos de diagnóstico de rotina nos Serviços de Micologia do Instituto de Biologia do Exército (IBEx), HEMORIO e Hospital Central do Exército (HCE) e, gentilmente, cedidas por Ribeiro (2006).

As amostras de isolados clínicos e ATCC de *Candida* spp. foram estocadas em água destilada estéril e em ágar Sabouraud dextrose (ASD) recobertos com óleo mineral, em

temperatura ambiente. As amostras foram, também, mantidas em ASD a 4-8°C, e subcultivadas em meio Sabouraud dextrose, a 35°C, por pelo menos 48h, para a obtenção de colônias isoladas, para serem utilizadas nos experimentos descritos nas próximas sessões.

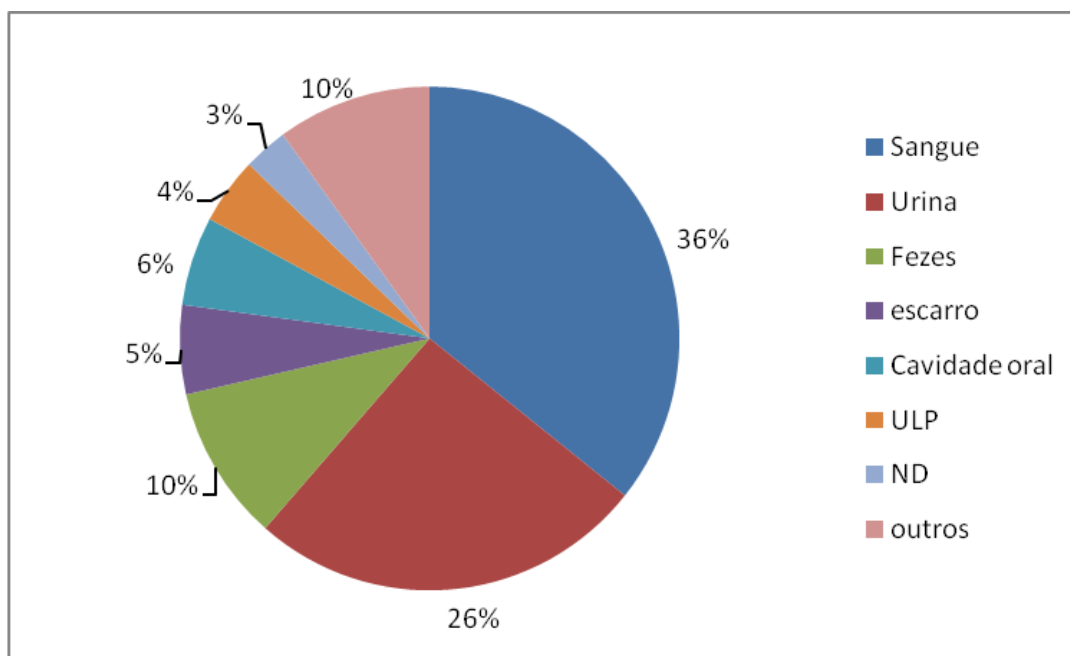


Figura 12: Distribuição dos isolados clínicos obtidos de diferentes sítios anatômicos de pacientes. ULP-úlceras de lesão de pele, ND-não determinado.

Tabela 1: Origem dos isolados e o material clínico utilizado para o isolamento das amostras de *Candida* spp. (ULP - úlcera de lesão em pele, HAS - Hospital Adventista Silvestre, ND-não determinado).

no. amostras	Amostras	Material clínico	Origem (instituição)
1	<i>C. albicans</i> 44A	ND	ND
2	<i>C. albicans</i> 78	Escarro	Hemorio
3	<i>C. albicans</i> 2A	ND	ND
4	<i>C. albicans</i> 2	Sangue	Hemorio
5	<i>C. albicans</i> 9	Sangue	Hemorio
6	<i>C. albicans</i> 11	Sangue	Hemorio
7	<i>C. albicans</i> 12	Fezes	Hemorio
8	<i>C. albicans</i> 53	Urina	Hemorio
9	<i>C. albicans</i> 58	Sangue	Hemorio
10	<i>C. albicans</i> 60	Úlcera peniana	Hemorio
11	<i>C. albicans</i> 63A	Urina	Hemorio
12	<i>C. albicans</i> 63B	Urina	Hemorio
13	<i>C. albicans</i> 77	Escarro	Hemorio

14	<i>C. albicans</i> 79	Fezes	Hemorio
15	<i>C. albicans</i> 115	ND	HAS
16	<i>C. albicans</i> 116	Urina	HAS
17	<i>C. albicans</i> 117	Urina	HAS
18	<i>C. albicans</i> 118	Urina	HAS
19	<i>C. albicans</i> 119	Ponta de catéter	HAS
20	<i>C. albicans</i> 120	Ponta de catéter	HAS
21	<i>C. albicans</i> 123	Urina	HAS
22	<i>C. parapsilosis</i>	Cavidade oral	ND
23	<i>C. parapsilosis</i> 35	Urina	Hemorio
24	<i>C. parapsilosis</i> 14	Sangue	Hemorio
25	<i>C. parapsilosis</i> 20	Sangue	Hemorio
26	<i>C. parapsilosis</i> 4	ULP	Hemorio
27	<i>C. parapsilosis</i> 7	Sangue	Hemorio
28	<i>C. parapsilosis</i> 13	ULP	Hemorio
29	<i>C. parapsilosis</i> 17	Sangue	Hemorio
30	<i>C. parapsilosis</i> 18	Sangue	Hemorio
31	<i>C. parapsilosis</i> 21	Sangue	Hemorio
32	<i>C. parapsilosis</i> 23	Sangue	Hemorio
33	<i>C. parapsilosis</i> 25	Mãos	Hemorio
34	<i>C. parapsilosis</i> 28	Sangue	Hemorio
35	<i>C. parapsilosis</i> 29A	Líquido pleural	Hemorio
36	<i>C. parapsilosis</i> 34	Sangue	Hemorio
37	<i>C. parapsilosis</i> 41	sangue	Hemorio
38	<i>C. parapsilosis</i> 64	Sangue	Hemorio
39	<i>C. parapsilosis</i> 66	Sangue	Hemorio
40	<i>C. parapsilosis</i> 81	Sangue	Hemorio
41	<i>C. tropicalis</i> 50	Sangue	Hemorio
42	<i>C. tropicalis</i> 5	Fezes	Hemorio
43	<i>C. tropicalis</i> 6	Urina	Hemorio
44	<i>C. tropicalis</i> 16	Abcesso	Hemorio
45	<i>C. tropicalis</i> 19	Urina	Hemorio
46	<i>C. tropicalis</i> 22	Fezes	Hemorio
47	<i>C. tropicalis</i> 42	Urina	Hemorio
48	<i>C. tropicalis</i> 51	Urina	Hemorio
49	<i>C. tropicalis</i> 56	Urina	Hemorio
50	<i>C. tropicalis</i> 57	Sangue	Hemorio
51	<i>C. tropicalis</i> 59	ND	Hemorio
52	<i>C. tropicalis</i> 62	Urina	Hemorio
53	<i>C. tropicalis</i> 75	Sangue	Hemorio
54	<i>C. tropicalis</i> 82	Fezes	Hemorio
55	<i>C. glabrata</i>	Cavidade oral	ND
56	<i>C. glabrata</i> 24	Sangue	Hemorio
57	<i>C. krusei</i>	Cavidade oral	ND
58	<i>C. guilliermondii</i> 01	Fezes	Hemorio
59	<i>C. guilliermondii</i> 03	ULP	Hemorio
60	<i>C. guilliermondii</i> 54	Urina	Hemorio

61	<i>C. dubliniensis</i>	Cavidade oral	ND
62	<i>C. lusitaniae</i> 33	Urina	Hemorio
63	<i>C. lipolytica</i> 43	Sangue	Hemorio
64	<i>C. rugosa</i> 55	Sangue	Hemorio
65	<i>C. zeylanoides</i> 76	Sangue	Hemorio

3.2 Substâncias antifúngicas

Os inibidores da síntese de esteróis, que atuam sobre as enzimas: **(i)** $\Delta^{24(25)}$ esterolmetiltransferase (24-SMT) - 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β -20-diol (22,26 azasterol ou AZA) e 24 (R,S),25-epiminolanosterol (EIL), e **(ii)** esqualeno sintase (SQS) - BPQ-OH, E5700 e ER-119884, WSP1261, WSP1262, WSP1263, WSP1264, WSP1265, WSP1266, WSP 1267, WSP1268 e WSP1269, foram cedidos pelo Dr. Julio A. Urbina (consultor do DNDi, Estados Unidos) e pelo Dr. Ian Gilbert (Dundee University, Cardiff, UK) (Figura 13). As drogas foram diluídas em dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma Chemical Co., Missouri, USA) e em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) para obter uma concentração final de 64 μ g/mL. A concentração final do DMSO não excedeu a 1%, concentração esta que não influencia no crescimento de *Candida* spp.

Fluconazol (FLC) (Pfizer, Brasil) e itraconazol (ITC) (Sigma Chemical Co., Missouri, USA) e anfotericina B (AMB) (Sigma Chemical Co., Missouri, USA) (Figura 13) foram utilizadas como antifúngicos padrão para os testes de susceptibilidade. As substâncias foram diluídas em DMSO e meio RPMI 1640, obtendo soluções estoques de 512, 64 e 32 μ g/mL, respectivamente.

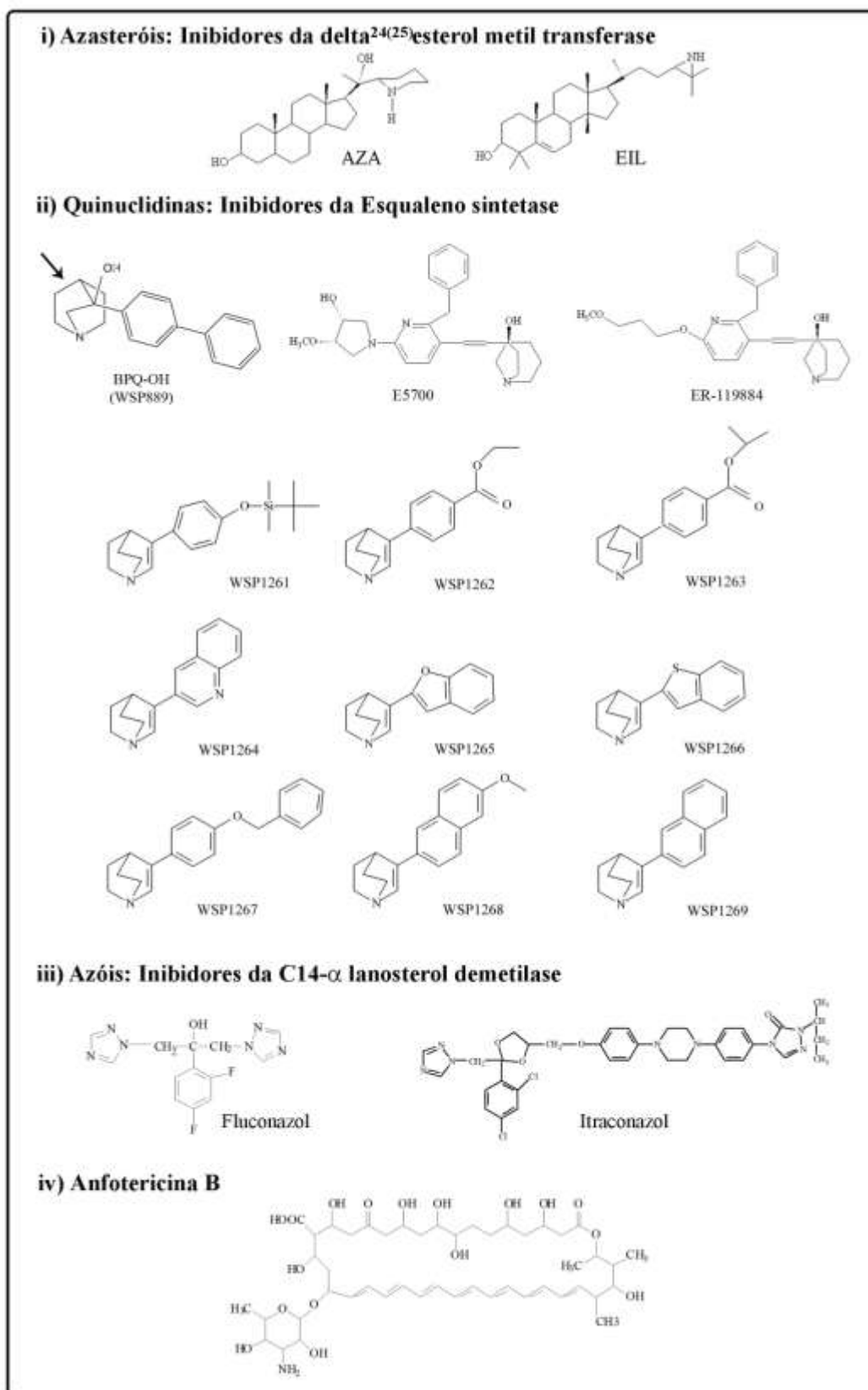


Figura 13: Substâncias avaliadas para a atividade antifúngica sobre isolados clínicos de *Candida* spp.

3.3 Avaliação da atividade antifúngica de inibidores da síntese de esteróis

3.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM de inibidores da síntese de esteróis (inibidores da 24-SMT, SQS e C14 α -lanosterol demetilase) e AMB foi realizada utilizando a técnica de microdiluição em caldo, preconizado pelo “Clinical Laboratory Standards Institute”, documento M27-A3 (CLSI, 2008). De acordo com este documento, FLC deve ser testada nas concentrações de 0,12 a 128 $\mu\text{g/mL}$, e a AMB, nas concentrações de 0,015 a 8 $\mu\text{g/mL}$. Para os novos triazóis, é recomendada a utilização de concentrações entre 0,03 e 16 $\mu\text{g/mL}$. Dessa maneira, concentrações de 0,03 a 16 $\mu\text{g/mL}$ foram escolhidas para avaliar a atividade antifúngica dos inibidores da 24-SMT e SQS.

Em microplacas de 96 poços, as drogas antifúngicas foram diluídas, seriadamente, em meio RPMI 1640 (com glutamina e sem bicarbonato, Sigma Chemical Co., Missouri, USA), tamponado com MOPS (Sigma Chemical Co., Missouri, USA) 0,165 M, pH 7,0. Uma suspensão de leveduras foi padronizada de acordo com a turbidez da escala 0,5 Mc Farland ($1-5 \times 10^6$ UFC/mL), diluída 1:50 e, posteriormente, 1:20 em meio RPMI 1640. Uma alíquota de 100 μL foi dispensada em poços da microplaca de 96 poços para obter uma concentração fúngica final de $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL. As microplacas foram incubadas em estufa a 35 °C, por 24 e 48 h, em uma câmara umidecida e escura. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos foi obtida pela observação visual da ausência de crescimento na menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento fúngico *in vitro*, nos tempos 24 e 48h. A leitura visual serviu de suporte técnico na detecção do efeito “trailling”. Adicionalmente, as CI₅₀ e CI₉₀ (concentração inibitória mínima de 50% e 90% do crescimento fúngico, respectivamente) foram determinadas através da

leitura da densidade óptica da suspensão em comprimento de onda de 492 nm, após 48 h de incubação. A CIM dos agentes azólicos é considerada como sendo a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico (CI₅₀). No entanto, para a AMB, a CIM é definida como sendo a menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento fúngico (CI₉₀). A análise dos resultados de CIM e a determinação do perfil de susceptibilidade das cepas de *Candida* spp. foi baseada no documento M27-A3 (Tabela 2).

Tabela 2: Interpretação dos resultados da determinação da CIM do fluconazol, itraconazol e anfotericina B (CLSI, 2008).

Antifúngicos	Concentração (µg/mL)		
	Susceptível (S)	Susceptível dose-dependente (SDD)	Resistente (R)
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Itraconazol	≤ 0,125	0,25-0,5	≥ 1
Anfotericina B	< 2	-	≥ 2

3.3.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Após a determinação da CIM dos inibidores da 24-SMT e SQS, uma alíquota de 10 µL das suspensões fúngicas tratadas com as concentrações inibitórias foi semeada em uma superfície de ASD, incubadas a 35 °C, por 48 h. A CFM é definida como sendo a menor concentração da droga em que foi observada a ausência do crescimento fúngico (ISHIDA *et al.*, 2006). O efeito fungicida foi considerado quando a CFM for igual ou até 4 vezes o valor da CIM (PFALLER *et al.*, 2004).

3.4 Microscopia de contraste de interferência diferencial e fluorescência convencional

Leveduras de *C. albicans* (isolado 77) foram tratadas com a CI₅₀ dos inibidores da 24-SMT (AZA e EIL) e SQS (WSP1267) por 48h, a 35°C, e então lavadas em PBS, pH 7,2

e fixadas em paraformaldeído 4 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 30 min. Em seguida, as células foram aderidas em lamínulas revestidas com poli-L-lisina por 20 min, incubadas com DAPI (Sigma Chemical Co., Missouri, USA) a 1 µg/mL, por 10 min, para a marcação de DNA celular, e com "Nile Red" (Fluka, USA) a 5 µg/mL, por 30 min, para a marcação de corpos lipídicos. As lamínulas foram montadas sobre lâminas com solução de N-propilgalato e observadas em microscópio de fluorescência (Axioplan, Zeiss) equipado com filtros rodamina ("Nile red") e DAPI, e as imagens foram capturadas com uma câmera Hamamatsu C5810. As alterações das leveduras foram avaliadas em pelo menos 300 células e o tamanho da célula fúngica foi medida utilizando o programa SemAfore 5.0 (Jeol, Japan).

3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Leveduras de *C. albicans* (isolado 77) tratadas com CI₅₀ de AZA, EIL e WSP1267, e *C. tropicalis* ATCC 28707 com CI₅₀ de AZA, WSP1267, E5700 e ER-119884 tratadas com CI₅₀, foram coletadas por centrifugação a 3.000 g por 10 min, e fixadas em glutaraldeído 2,5 % e paraformaldeído a 4% diluídos em tampão cacodilato 0,1 M, por 2 h, a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas no mesmo tampão, contrastada em tetróxido de ósmio 1%, contendo ferrocianeto de potássio 1,25% e CaCl₂ durante 2 h, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (15, 30, 50, 70, 80, 90, 100% e etanol ultra seco), durante 30 min, em cada concentração, e incluídas em resina de spurr. Cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrotomo Reichert-Jung Supernova, coletados em grades de cobre com 300 "mesh", contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900 equipada com uma câmera CCD Camera (Modelo Mega view III, Soft Image System, Alemanha). As

imagens foram processadas com o programa iTEM (Soft Image System, Alemanha). A espessura de parede celular e a dimensão das vesículas de leveduras tratadas e não tratadas foram medidas utilizando o programa SemAfore 5.0 (Jeol, Japan).

3.6 Microscopia eletrônica de varredura

Leveduras de *C. albicans* (isolado 77) tratadas com valores de CI_{50} de AZA, EIL e WSP1267, por 48h, a 35 °C, foram coletadas por centrifugação a 3.000 g, por 10 min, e fixadas em glutaraldeído 2,5 % e paraformaldeído a 4 % diluídos em tampão cacodilato 0,1 M, por 2 h, a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas no mesmo tampão e aderidas em lamínulas revestidas com poli-L-lisina. Em seguida, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (15, 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100% e etanol ultra-seco), durante 30 min, em cada um. As amostras foram secas, em ponto crítico de CO₂, metalizadas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6340F.

3.7 Análise de lipídeos

3.7.1 Extração e separação de lipídeos neutros (LN) e polares (LP)

Leveduras de *C. albicans* (isolado 77) foram tratadas com AZA, EIL e FLC; e de *C. tropicalis* ATCC 28707 com E5700, ER-119884 e terbinafina, em diferentes concentrações das drogas previamente diluídas em meio RPMI 1640, tamponado com MOPS, por 48h, a 35°C. Os lipídeos totais de membrana de leveduras foram extraídos com uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v), filtrados e concentrados à pressão reduzida. As amostras de lipídeos foram ressuspensas em clorofórmio e aplicadas em uma coluna de ácido silícico (100 mesh, Sigma Aldrich), previamente ativado a 100 °C, por 24 h. Os lipídeos neutros

(LN) e polares (LP) foram eluídos utilizando clorofórmio e uma mistura de clorofórmio:metanol (1:1, v/v), respectivamente (BLIGH; DYER, 1959). Depois da eluição, as frações contendo os LN e LP foram secas por pressão reduzida e armazenados a -70 °C, até as próximas análises, como descrito a seguir.

3.7.2 Análise de lipídeos neutros

As frações de LN foram analisadas por cromatografia gás-líquido de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para a análise quantitativa e estrutural dos lipídeos (VISBAL; SAN-BLAS, 2007). Os LN foram analisados em uma coluna capilar de alta resolução HP-5 ultra 2 (25 m de comprimento, 0,20 mm de diâmetro interno, 5% difenil e 95 % dimetil polisiloxano com 0,33 mm de espessura) em um cromatógrafo a gás modelo CG 5890 series II (Hewlett Packard) equipado com um detector de massas HP5972 (Hewlett Packard). Brevemente, os LN foram diluídos em clorofórmio e injetados em uma coluna, que foi mantida a 50 °C, por 1 min, em seguida, foi realizado um aumento crescente da temperatura até alcançar 280 °C em uma velocidade de 25 °C/min, e finalmente, um aumento a 300 °C na velocidade de 1 °C/min. O fluxo da fase móvel gasosa (hélio) foi mantido constante a 0,6 mL/min e as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250 °C e 280 °C, respectivamente.

3.7.3 Análise de fosfolipídios

A fração de LP, que contém principalmente fosfolipídios, foi ressuspensa em 50 µL de uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e um volume de 10 µL da amostra foi aplicado em uma placa sílica gel de dimensões de 10 x 20 cm (fase estacionária). As amostras foram eluídas da placa de sílica gel usando uma mistura de clorofórmio:metanol:32% hidróxido de amônio p/v (17:7:1, por volume) (fase móvel)

(CUZNER; DAVINSON, 1967). Paralelamente às amostras, foram aplicados padrões de fosfolipídios (todos da Sigma Aldrich): L- α -fosfatidil-DL-glicerol, L- α -ácido fosfatídico dipalmitoil, L- α -fosfatidil-N₁N-dimetil etanolamina dipalmitoil, L- α -fosfatidil-L-serina, L- α -fosfatidilcolina, L- α -fosfatidilinositol, 3-sn- L- α -ácido fosfatídico e L- α -fosfatidiletanolamina. Os fosfolipídios eluídos por cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel foram revelados com iodo, e o fator de retenção (Rf) de cada substância foi calculado, sendo a razão da distância do percurso da substância (cm) e a distância do percurso da fase móvel (cm).

3.7.4 Análise de ácidos graxos

Para a análise de ácidos graxos esterificados, a fração de LP foi dissolvida em 200 μ L de clorofórmio, e uma alíquota de 50 μ L de cada fração foi transmetilada pela adição de 200 μ L de H₂SO₄ 5% em metanol, em um banho-maria a 60°C, por 1h. Posteriormente, a reação foi parada adicionando 200 μ L de água destilada (GUCKERT *et al.*, 1985). Os ácidos graxos esterificados foram extraídos com éter de petróleo, secos e quantitativamente analisados pelo CG-MS, como descrito anteriormente para análise de LN.

3.8 Ensaio de citotoxicidade

Células de rim de macaco verde (Vero) foram mantidas em ‘Dulbecco’s modified Eagle’s medium’ (DMEM, Gibco Invitrogen Corporation, New York, USA) suplementado com L-glutamina 2 mM, soro fetal bovino inativado a 10 % e gentamicina 50 μ g/mL, a 37 °C em uma atmosfera de CO₂ a 5 %. Em uma microplaca de 96 poços, 2,5 x 10⁴ células/poço foi dispensado e incubado por 24 h para formação de uma monocamada de células. Posteriormente, a monocamada foi tratada com diferentes concentrações de inibidores da biossíntese de esteróis (AZA, EIL e WSP1267) por 48 h, a 37 °C, em CO₂ 5

%. Antifúngicos padrão (AMB, FLC e ITC), também, foram avaliadas nesse modelo de ensaio de citotoxicidade. Após a incubação, as células foram fixadas em ácido tricloroacético 10 % por 1 h, a 4 °C, e coradas com sulforrodamina B por 30 min, a 4 °C, e as densidades óticas foram obtidas em comprimento de onda a 530 nm (LIN *et al*, 1999). A concentração citotóxica de 50 % (CC₅₀) e o índice de seletividade (IS = CC₅₀/CI₅₀) foram calculados.

3.9 Análise Estatística

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas por meio do software Statistica 6.0 (Statsoft, Inc., Oklahoma city, Okla, USA), e o intervalo de confiança considerado foi de 95%.

Para a análise dos valores de CI₅₀ e CI₉₀ dos antifúngicos padrão e das substâncias testes, teste de Pearson foi realizado para correlacionar os resultados de CIs, determinando-se o coeficiente de correlação de Pearson (r), onde r=1 significa uma correlação positiva perfeita entre duas variáveis e, r=-1 significa uma correlação negativa perfeita entre duas variáveis.

Para análise comparativa entre resultados dos grupos de leveduras sem tratamento e com tratamento, foram realizados testes t-student.

3.9 Edição de Imagens

As imagens obtidas de microscopia de contraste de interferência diferencial, fluorescência, eletrônica de transmissão e de varredura foram editadas em programa Photoshop CS3.

4. Resultados

4.1 Determinação da concentração inibitória mínima

Inibidores da biossíntese de esteróis (azasteróis e quinuclidinas) foram avaliados para a atividade antifúngica, primeiramente, contra cepas referência (ATCC) de diferentes espécies de *Candida*. Na tabela 3 podemos observar que os inibidores da enzima 24-SMT (AZA e EIL) apresentaram efeito inibitório, em concentrações bem inferiores a 16 µg/mL, exceto *C. albicans* ATCC 10231. *C. krusei* (ATCC 6258, FLC-resistente) e *C. tropicalis* ATCC 28707 (FLC-, ITC- e AMB-resistente) foram susceptíveis ao AZA em CI_{50} de 0,5 µg/mL e 0,03 µg/mL, respectivamente. Por outro lado, EIL não apresentou atividade para *C. krusei* ATCC 6258 e *C. glabrata* ATCC 2001. Dentre as substâncias da classe das quinuclidinas (inibidores da enzima SQS), somente o análogo WSP1267 apresentou relevante atividade antifúngica com CI_{50} variando de 0,5 µg/mL a 8 µg/mL. WSP1267 mostrou ter atividade contra as cepas ATCC, incluindo *C. krusei* ATCC 6258 (CI_{50} =1 µg/mL) e *C. tropicalis* ATCC 28707 (CI_{50} =0,5 µg/mL) e menos ativo para *C. albicans* ATCC 24433 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Interessantemente, outros inibidores da SQS (E5700 e ER-119884) apresentaram atividade antifúngica somente para *C. tropicalis* ATCC 28707, uma cepa resistente a AMB, FLC e ITC (Tabela 3).

Testes de susceptibilidade aos agentes antifúngicos padrão (AMB, FLC e ITC) e substâncias testes que apresentaram atividade para as cepas ATCC (AZA, EIL e WSP1267) foram realizados sobre isolados clínicos de *Candida* spp. Determinação das CI_{50} e CI_{90} foram obtidas pela determinação da absorbância da suspensão fúngica a 492 nm após 48 h de incubação (Tabela 4). Além disso, foram, também, realizadas leituras

visuais nos tempos de 24 e 48 h para avaliar o efeito “trailing” que algumas espécies de *Candida* apresentam frente aos agentes azólicos (Tabela 5).

Todos os isolados clínicos foram susceptíveis à AMB, com a mediana dos valores de CI_{50} variando de 0,015 a 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e de CI_{90} de 0,12 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6). Entretanto, três isolados (dois *C. tropicalis* e um *C. guilliermondii*) apresentaram valores de CI_{90} mais elevados (1 $\mu\text{g/mL}$). Susceptibilidade ao FLC foi observada em 92% dos isolados, embora 26 % apresentaram efeito “trailing”. Três isolados foram resistentes ao FLC (dois *C. tropicalis* e um *C. krusei*). Quarenta e cinco por cento dos isolados foram susceptíveis em concentrações de 0,25-0,50 $\mu\text{g/mL}$ (CI_{50}) e 37 % em 0,50-1 $\mu\text{g/mL}$ (CI_{90}). Por outro lado, 75% dos isolados foram susceptíveis ao ITC e 16% apresentaram efeito “trailing”. Resistência ao ITC foi observada em seis isolados (três *C. tropicalis*, um *C. albicans*, um *C. glabrata*, e um *C. krusei*). A maioria dos isolados apresentaram valores de CI_{50} e CI_{90} para ITC $\leq 0,03 \mu\text{g/mL}$ (62 % e 41 %, respectivamente). Os isolados de *C. krusei* foram menos susceptíveis aos antifúngicos padrão, apresentando CI_{90} de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para AMB, $> 128 \mu\text{g/mL}$ para FLC e 2 $\mu\text{g/mL}$ para ITC (Tabela 4 e 6).

Os inibidores da enzima 24-SMT (AZA and EIL) foram avaliadas contra isolados clínicos de *Candida* spp., e os valores de CIs revelaram uma importante atividade antifúngica (Tabela 4 e 7). Para AZA, os valores de CI_{50} e CI_{90} inferiores a 2 $\mu\text{g/mL}$ foram observados em 86% e 52% dos isolados, respectivamente. Já para EIL, foram verificados em 92% and 63% dos isolados. *C. zeylanoides* e *C. lipolytica* (CNA menos frequente) apresentaram $CI_{50-90} \leq 0,03 \mu\text{g/mL}$ para AZA e EIL, respectivamente. EIL também apresentou atividade contra *C. zeylanoides* ($CI_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 7). Finalmente, isolados de *C. guilliermondii*, resistente ao FLC e ao ITC, foram susceptíveis ao AZA, com

CI₅₀₋₉₀ de 0,06 a 0,25 µg/mL. Entretanto, ambos isolados de *C. krusei* e *C. lipolytica* não foram sensíveis ao AZA (CI₅₀₋₉₀ ≥ 16 µg/mL) (Tabela 7).

O inibidor da SQS (WSP1267) também foi avaliado contra os 65 isolados clínicos de *Candida* spp. As medianas dos valores de CI₅₀ e de CI₉₀ para todos os isolados foram de 2 e 4 µg/mL, respectivamente (Tabela 7). Os valores de CI₅₀ e CI₉₀ inferiores a 2 µg/mL foram observados em aproximadamente 40% e 15% dos isolados clínicos, respectivamente. De modo geral, os valores de CI₅₀ e CI₉₀ apresentaram poucas variações dentre os isolados (Tabela 4). No entanto, nota-se que alguns isolados de *Candida* spp. apresentaram menor susceptibilidade ao WSP1267 (valores de CI₅₀ ≥ 8 µg/mL): *C. albicans* (3), *C. tropicalis* (5), *C. parapsilosis* (1), *C. glabrata* (1), *C. dubliniensis* (1) e *C. lipolytica* (1). Em contraste, todos os isolados que apresentaram resistência ao FLC e ao ITC; com CI₉₀ de 64 µg/mL e >16 µg/mL, respectivamente; foram susceptíveis ao WSP1267 em concentrações inferiores a 8 µg/mL (Tabela 4).

4.2 Correlações

Correlações positivas dos valores de CI₅₀ foram observadas entre AZA e AMB (r=0,47), AZA e EIL (r=0,46), e FLC e ITC (r=0,79). Entre os valores de CI₉₀ foram observados correlações positivas entre FLC e ITC (r=0,71) e também, entre EIL e WSP1267. Por outro lado, nenhuma correlação significativa foi observada entre os agentes azólicos/AMB e os inibidores da 24-SMT e SQS

Alguns isolados clínicos que apresentaram efeito “trailing” ao FLC (n=17) e ITC (n=11) também apresentaram crescimento residual em altas concentrações de AZA (16 µg/ml) de 58% (10/17) e 54% (6/11) dos isolados, respectivamente. Em contraste, nenhum

crescimento residual foi observado no tratamento dos isolados clínicos com EIL e com WSP1267.

Tabela 3: Susceptibilidade das cepas de referência de *Candida* spp. (ATCC) aos inibidores da enzima $\Delta^{24(25)}$ esterol metil transferase, da esqualeno sintase e aos antifúngicos padrão (anfotericina B-AMB, fluconazol-FLC e itraconazol-ITC), analisados pelo método da microdiluição em caldo. Resultados de CI_{50} e CI_{90} estão expressos em $\mu\text{g/mL}$.

Drogas	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. albicans</i> ATCC 24433		<i>C. glabrata</i> ATCC 2001		<i>C. krusei</i> ATCC 6258		<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803		<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	
	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{90}
AMB	0,12	0,25	0,12	0,25	0,03	0,12	0,25	0,25	0,03	0,06	0,007	0,25	2	2^R
FLC	1	>128 ^T	2	>128 ^T	4	>128 ^T	32	64^R	2	4	0,25	2	>128	>128 ^R
ITC	0,5	>16 ^T	0,06	>16 ^T	0,12	4 ^T	0,12	0,25	≤0,03	0,06	≤0,03	0,03	>16	>16 ^R
AZA	>16	>16	8	>16	1	2	0,5	1	0,25	4	0,25	4	0,03	0,12
EIL	1	>16	2	>16	>16	>16	>16	>16	2	4	1	2	2	>16
BPQ-OH	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
ER-119884	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	1	4
E5700	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	1	4
WSP 1261	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
WSP 1262	8	>16	16	>16	8	>16	8	>16	>16	>16	8	>16	4	8
WSP 1263	16	>16	>16	>16	>16	>16	16	>16	>16	>16	8	>16	8	8
WSP 1264	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
WSP 1265	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
WSP 1266	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
WSP 1267	1	4	8	8	0,5	1	1	1	8	8	0,5	0,5	0,5	2
WSP 1268	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	16	>16	8	>16
WSP 1269	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	8	>16
WSP 1270	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16

T – efeito “trailing”, R – resistência.

Tabela 4: Susceptibilidade de cepas de *Candida* spp. ATCC e isolados clínicos aos inibidores da $\Delta^{(24)25}$ -esterol metil transferase (AZA e EIL) e esqualeno sintase (WSP1267) e aos antifúngicos padrão (fluconazol, itraconazol e anfotericina B) após 48 h de incubação. CI₅₀ e CI₉₀ foram determinados pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2008), utilizando um comprimento de onda a 492 nm.

N °	Amostras	Concentração (µg/mL)											
		AZA		EIL		WSP1267		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
		CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀
1	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	>16	>16	1	>16	1	4	1	>128 ^T	0,5	>16 ^T	0,12	0,25
2	<i>C. albicans</i> ATCC 24433	8	>16	2	>16	8	8	2	>128 ^T	0,06	>16 ^T	0,12	0,25
3	<i>C. albicans</i> 44A	0,25	1	2	4	8	8	1	4	0,12	0,5 ^{SDD}	0,06	0,12
4	<i>C. albicans</i> 78	0,06	0,06	2	2	8	8	1	4	0,12	0,25 ^{SDD}	0,06	0,12
5	<i>C. albicans</i> 2A	0,25	8	2	2	8	8	1	>128	0,25	>16 ^T	0,25	0,5
6	<i>C. albicans</i> 2	1	>16	2	4	2	4	2	>128	0,06	>16 ^T	0,25	0,25
7	<i>C. albicans</i> 9	1	4	1	2	1	2	0,25	0,5	<0,03	0,03	0,03	0,03
8	<i>C. albicans</i> 11	0,25	2	1	2	0,5	2	0,25	>128	0,06	>16 ^T	0,25	0,25
9	<i>C. albicans</i> 12	0,5	1	1	2	4	8	0,5	>128	0,03	0,25 ^{SDD}	0,12	0,25
10	<i>C. albicans</i> 53	0,06	1	1	2	1	4	<0,25	>128 ^T	<0,03	>16 ^T	0,015	0,06
11	<i>C. albicans</i> 58	2	>16	2	4	8	8	1	>128 ^T	>16	>16 ^R	0,06	0,5
12	<i>C. albicans</i> 60	0,25	>16	0,5	1	2	2	0,25	0,5	<0,03	0,03	0,015	0,12
13	<i>C. albicans</i> 63A	0,25	1	1	2	2	4	0,25	1	<0,03	0,03	0,06	0,25
14	<i>C. albicans</i> 63B	8	>16	1	2	1	2	0,25	>128 ^T	0,03	>16 ^T	0,06	0,25
15	<i>C. albicans</i> 77	0,25	2	1	1	1	2	<0,25	0,5	<0,03	<0,03	0,03	0,06
16	<i>C. albicans</i> 79	0,5	2	2	2	2	4	<0,25	0,5	<0,03	<0,03	0,03	0,06
17	<i>C. albicans</i> 115	2	16	2	2	4	4	0,25	1	<0,03	<0,03	0,06	0,12
18	<i>C. albicans</i> 116	2	>16	2	2	2	4	0,25	>128 ^T	<0,03	<0,03	0,03	0,12
19	<i>C. albicans</i> 117	1	16	2	4	2	4	0,25	1	<0,03	<0,03	0,03	0,12
20	<i>C. albicans</i> 118	1	>16	4	4	2	4	0,25	0,5	<0,03	<0,03	0,06	0,12
21	<i>C. albicans</i> 119	0,5	4	2	4	1	2	<0,25	0,25	<0,03	<0,03	0,007	0,015
22	<i>C. albicans</i> 120	2	>16	4	8	1	2	<0,25	8	<0,03	0,03	0,03	0,06
23	<i>C. albicans</i> 123	2	>16	1	2	2	4	0,25	>128 ^T	<0,03	>16 ^T	0,03	0,06
24	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,25	4	2	4	8	8	2	4	0,03	0,06	0,03	0,06
25	<i>C. parapsilosis</i>	1	>16	1	1	2	4	2	>128 ^T	1	>16 ^T	0,12	0,25

N °	Amostras	Concentração (µg/mL)											
		AZA		EIL		WSP1267		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
		CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀
26	<i>C. parapsilosis</i> 35	1	4	0,5	1	2	4	<0,25	0,5	0,015	0,015	0,12	0,25
27	<i>C. parapsilosis</i> 14	0,25	0,5	1	4	1	4	0,5	>128 ^T	0,06	0,25 ^{SDD}	0,12	0,25
28	<i>C. parapsilosis</i> 20	0,25	0,5	1	1	2	8	0,5	>128 ^T	0,03	0,06	0,06	0,25
29	<i>C. parapsilosis</i> 4	0,06	0,25	2	4	2	8	0,25	0,5	<0,03	0,03	0,015	0,03
30	<i>C. parapsilosis</i> 7	0,25	1	2	4	4	8	0,5	1	<0,03	<0,03	0,015	0,06
31	<i>C. parapsilosis</i> 13	0,5	2	2	8	8	8	0,5	1	<0,03	0,03	0,015	0,06
32	<i>C. parapsilosis</i> 17	0,12	0,5	1	4	4	4	<0,25	<0,25	<0,03	<0,03	0,015	0,06
33	<i>C. parapsilosis</i> 18	0,12	0,5	2	4	2	4	<0,25	<0,25	<0,03	<0,03	0,03	0,12
34	<i>C. parapsilosis</i> 21	0,06	0,25	1	2	2	4	0,25	0,5	<0,03	<0,03	0,015	0,06
35	<i>C. parapsilosis</i> 23	0,06	0,5	1	2	0,5	1	<0,25	<0,25	<0,03	<0,03	<0,015	0,015
36	<i>C. parapsilosis</i> 25	0,12	0,5	1	1	2	4	<0,25	<0,25	<0,03	0,03	0,06	0,25
37	<i>C. parapsilosis</i> 28	0,06	0,12	1	2	2	4	0,5	<0,25	<0,03	<0,03	0,06	0,25
38	<i>C. parapsilosis</i> 29A	0,25	1	2	4	4	4	1	1	<0,03	0,06	0,06	0,25
39	<i>C. parapsilosis</i> 34	0,06	0,5	1	2	2	4	<0,25	0,5	<0,03	<0,03	0,03	0,12
40	<i>C. parapsilosis</i> 41	0,06	0,12	1	2	2	4	1	4	<0,03	0,03	0,015	0,12
41	<i>C. parapsilosis</i> 64	4	>16	1	2	2	4	0,25	0,5	<0,03	>0,03	0,25	0,5
42	<i>C. parapsilosis</i> 66	0,25	0,5	2	4	4	8	0,5	1	<0,03	<0,03	0,015	0,06
43	<i>C. parapsilosis</i> 81	0,12	0,25	2	2	4	8	1	2	0,03	0,06	0,015	0,03
44	<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	0,03	0,12	2	>16	0,5	2	>128	>128 ^R	>16	>16 ^R	2	2 ^R
45	<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	0,25	4	1	2	0,5	0,5	0,25	2	<0,03	0,03	0,007	0,25
46	<i>C. tropicalis</i> 50	0,12	4	1	1	2	2	0,25	0,5	0,12	0,25 ^{SDD}	0,03	0,25
47	<i>C. tropicalis</i> 5	0,25	8	1	1	2	4	0,5	1	0,03	0,12	0,015	0,06
48	<i>C. tropicalis</i> 6	0,06	0,5	2	8	16	>16	0,5	1	<0,03	<0,03	0,03	0,12
49	<i>C. tropicalis</i> 16	0,06	0,5	2	8	2	4	<0,25	<0,25	<0,03	<0,03	0,015	0,12
50	<i>C. tropicalis</i> 19	4	8	1	1	2	4	0,5	1	0,03	0,06	0,06	0,12
51	<i>C. tropicalis</i> 22	0,12	8	1	2	4	8	1	64 ^R	0,03	2 ^R	0,015	0,5
52	<i>C. tropicalis</i> 42	0,12	2	1	2	2	4	0,5	8	0,03	0,5 ^{SDD}	0,06	0,25
53	<i>C. tropicalis</i> 51	1	4	1	1	2	4	0,25	0,5	<0,03	>16 ^T	0,06	0,25
54	<i>C. tropicalis</i> 56	2	>16	2	2	2	8	0,5	1	<0,03	<0,03	0,06	0,5

N °	Amostras	Concentração (µg/mL)											
		AZA		EIL		WSP1267		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
		CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀	CI ₅₀	CI ₉₀
55	<i>C. tropicalis</i> 57	0,25	16	2	2	8	16	0,5	>128 ^T	0,03	>16 ^T	0,03	0,5
56	<i>C. tropicalis</i> 59	4	16	1	2	8	8	>128	>128 ^R	>16	>16 ^R	0,12	0,5
57	<i>C. tropicalis</i> 62	1	16	1	2	8	8	1	>128 ^T	0,06	>16 ^T	0,06	1 ^R
58	<i>C. tropicalis</i> 75	4	16	8	8	8	8	4	>128 ^T	0,25	>16 ^R	0,5	1 ^R
59	<i>C. tropicalis</i> 82	2	8	2	2	4	8	4	>128 ^T	0,12	>16 ^T	0,12	0,25
60	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	1	2	>16	>16	0,5	1	4	>128	0,12	4 ^R	0,03	0,12
61	<i>C. glabrata</i>	16	>16	2	4	8	16	8	>128	1	4 ^R	0,25	0,5
62	<i>C. glabrata</i> 24	0,12	0,25	0,5	1	2	4	0,25	0,5	0,03	0,25 ^{SDD}	0,015	0,06
63	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0,5	1	>16	>16	1	1	32	64	0,12	0,25 ^{SDD}	0,25	0,25
64	<i>C. krusei</i>	16	>16	8	8	2	2	16	>128 ^R	0,5	2	0,25	0,5
65	<i>C. guilhermondii</i> 01	0,03	0,25	1	2	4	8	0,12	0,25	0,125	0,5 ^{SDD}	0,015	0,015
66	<i>C. guilhermondii</i> 03	0,12	0,25	1	4	4	8	4	16 ^{SDD}	0,12	0,25 ^{SDD}	1	1
67	<i>C. guilhermondii</i> 54	0,06	0,5	2	4	4	8	4	4	0,06	0,12	0,015	0,06
68	<i>C. dubliniensis</i>	0,5	2	2	8	8	8	0,25	0,5	0,06	0,12	0,12	0,25
69	<i>C. lusitaniae</i> 33	0,06	0,5	0,5	2	2	4	0,5	1	0,03	0,12	0,06	0,12
70	<i>C. lipolytica</i> 43	>16	>16	<0,03	>0,03	8	16	0,5	1	0,25	0,5 ^{SDD}	0,12	0,25
71	<i>C. rugosa</i> 55	0,25	1	1	2	4	4	0,5	0,5	<0,03	<0,03	0,03	0,12
72	<i>C. zeylanoides</i> 76	<0,03	<0,03	1	2	2	4	4	16 ^{SDD}	0,06	0,12	0,06	0,12

T – efeito “trailing”, SDD – susceptível dose-dependente, R – resistente.

Tabela 5: Leitura visual do ensaio de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima dos inibidores da $\Delta^{(24)25}$ -esterol metil transferase (AZA e EIL) e esqualeno sintase (WSP1267) após 24 e 48 h de incubação. Antifúngicos padrão também foram avaliados.

N °	Amostras	Concentração (µg/mL)											
		22,26 azasterol		EIL		WSP1267		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
1	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	8	>16	1	1	4	4	0,5	1		0,25		0,06
2	<i>C. albicans</i> ATCC 24433	8	>16	1	2	4	8	1	2		0,12		0,25
3	<i>C. albicans</i> 44A	0,06	0,25	2	4	8	18	1	1	0,06	0,12	0,12	0,12
4	<i>C. albicans</i> 78	1	1	2	4	8	16	1	1	0,12	0,12	0,015	0,25
5	<i>C. albicans</i> 2A	0,12	0,25	2	4	8	16	1	1	<0,03	0,25	0,12	0,5
6	<i>C. albicans</i> 2	0,5	2	2	8	4	4	1	16	0,12	2	0,12	0,25
7	<i>C. albicans</i> 9	1	4	2	2	1	2	1	1	<0,03	<0,03	0,015	0,06
8	<i>C. albicans</i> 11	4	16	2	2	1	2	2	>128	<0,03	>16	0,25	0,5
9	<i>C. albicans</i> 12	0,5	1	2	2	4	16	1	2	<0,03	0,06	0,12	0,5
10	<i>C. albicans</i> 53	0,5	2	2	2	2	4	<0,25	>128	<0,03	>16	0,06	0,06
11	<i>C. albicans</i> 58	4	>16	4	4	8	16	>128	>128	>16	>16	0,12	0,5
12	<i>C. albicans</i> 60	1	>16	1	1	2	2	<0,25	>128	<0,03	>16	0,06	0,25
13	<i>C. albicans</i> 63A	0,06	1	1	4	2	4	<0,25	1	<0,03	<0,03	<0,007	0,5
14	<i>C. albicans</i> 63B	8	>16	2	4	2	4	>128	>128	<0,03	>16	0,06	0,25
15	<i>C. albicans</i> 77	0,5	4	1	2	2	4	<0,25	2	<0,03	0,06	0,06	0,12
16	<i>C. albicans</i> 115	2	16	1	2	4	4	1	>128	<0,03	>16	0,06	0,12
17	<i>C. albicans</i> 116	1	>16	1	2	4	8	<0,25	>128	<0,03	>16	0,06	0,12
18	<i>C. albicans</i> 117	2	16	2	4	4	4	1	8	<0,03	0,12	0,06	0,12
19	<i>C. albicans</i> 118	0,25	>16	1	2	4	4	<0,25	>128	<0,03	>16	0,06	0,12
20	<i>C. albicans</i> 119	0,5	8	4	4	2	2	<0,25	0,25	<0,03	0,03	<0,007	0,06
21	<i>C. albicans</i> 120	8	>16	8	16	2	2	<0,25	>128	<0,03	>16	0,06	0,06
22	<i>C. albicans</i> 123	4	>16	1	2	2	4	<0,25	>128	<0,03	>16	0,06	0,06
23	<i>C. albicans</i> 79	0,25	8	1	2	2	4	<0,25	1	<0,03	<0,03	0,06	0,06
24	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,12	4	2	4	4	8	1	2		0,5		0,12
25	<i>C. parapsilosis</i> 64	2	>16	1	2	2	4	<0,25	>128	<0,03	>16	0,25	0,5

N °	Amostras	Concentração (µg/mL)											
		22,26 azasterol		EIL		WSP1267		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
26	<i>C. parapsilosis</i> 66	0,12	0,5	1	4	4	8	1	2	<0,03	0,06	0,03	0,25
27	<i>C. parapsilosis</i> 23	0,06	1	2	4	0,5	1	<0,25	<0,25	<0,03	<0,03	<0,015	<0,015
28	<i>C. parapsilosis</i> 25	0,12	1	1	2	2	4	<0,25	0,5	<0,03	<0,03	0,06	0,25
29	<i>C. parapsilosis</i> 28	0,25	1	1	4	2	4	<0,25	0,5	<0,03	<0,03	0,06	0,25
30	<i>C. parapsilosis</i> 29A	0,5	1	2	4	4	4	1	1	0,03	0,12	0,06	2
31	<i>C. parapsilosis</i> 34	0,12	1	1	4	2	4	<0,25	1	<0,03	<0,03	0,06	0,12
32	<i>C. parapsilosis</i> 41	0,25	0,25	1	4	2	4	1	4	0,12	0,12	0,06	0,12
33	<i>C. parapsilosis</i> 81	0,12	0,25	1	2	2	8	1	2	0,12	0,12	<0,007	0,12
34	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	2	1	8	2	4	2	4	0,5	1	0,12	0,25
35	<i>C. parapsilosis</i> 35	2	4	1	1	2	4	<0,25	0,5	<0,03	<0,03	0,25	0,5
36	<i>C. parapsilosis</i> 14	0,25	2	1	4	2	8	0,5	0,5	<0,03	<0,03	0,12	1
37	<i>C. parapsilosis</i> 20	0,5	1	1	2	2	8	1	2	<0,03	0,06	0,06	0,25
38	<i>C. parapsilosis</i> 4	0,03	0,5	1	8	4	8	0,5	1	<0,03	<0,03	<0,015	0,06
39	<i>C. parapsilosis</i> 7	0,12	1	2	4	4	8	1	2	<0,03	<0,03	<0,015	0,06
40	<i>C. parapsilosis</i> 13	0,5	2	2	8	4	8	0,5	1	<0,03	0,12	<0,015	0,06
41	<i>C. parapsilosis</i> 17	0,06	0,5	1	4	2	4	<0,25	1	<0,03	<0,03	<0,015	0,06
42	<i>C. parapsilosis</i> 18		0,5	0,5	2	2	4		0,5		<0,03		0,12
43	<i>C. parapsilosis</i> 21		0,25	1	2	2	8		0,5		<0,03		0,06
44	<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	0,12	4	0,5	2	0,5	1	>128	>128	>16	>16	2	4
45	<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	4	8	1	2	1	2	<0,25	>128	<0,03	>16	0,12	0,25
56	<i>C. tropicalis</i> 59	2	16	2	2	8	16	>128	>128	>16	>16	0,12	0,5
47	<i>C. tropicalis</i> 62	2	16	2	2	8	16	1	>128	0,06	>16	0,12	1
48	<i>C. tropicalis</i> 75	4	16	8	16	8	16	1	>128	0,12	>16	0,5	1
49	<i>C. tropicalis</i> 82	2	8	2	2	1	8	<0,25	>128	<0,03	>16	0,12	0,25
50	<i>C. tropicalis</i> 50	0,12	1	1	2	4	4	0,5	2	0,06	0,25	0,06	0,12
51	<i>C. tropicalis</i> 5	0,12	8	1	2	1	4	0,5	1	<0,03	0,5	<0,015	0,06
52	<i>C. tropicalis</i> 6	0,06	0,5	1	16	4	>16	0,5	1	<0,03	<0,03	<0,015	0,12
53	<i>C. tropicalis</i> 16	<0,03	0,5	1	2	2	4	<0,25	<0,25	<0,03	<0,03	<0,015	0,06
54	<i>C. tropicalis</i> 19	2	8	1	2	2	8	<0,25	0,5	<0,03	0,06	0,06	0,12

N °	Amostras	Concentração (µg/mL)											
		22,26 azasterol		EIL		WSP1267		Fluconazol		Itraconazol		Anfotericina B	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
55	<i>C. tropicalis</i> 22	0,5	8	2	2	8	8	2	4	0,12	>16	0,12	0,5
56	<i>C. tropicalis</i> 42	1	4	1	4	2	4	2	32	1	>16	0,25	0,5
57	<i>C. tropicalis</i> 51	0,5	4	1	4	4	4	<0,25	>128	<0,03	>16	0,12	0,25
58	<i>C. tropicalis</i> 56	8	>16	1	2	2	16	0,5	>128	<0,03	>16	0,12	0,5
59	<i>C. tropicalis</i> 57	8	>16	4	4	8	16	0,5	>128	<0,03	>16	0,12	0,5
60	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	1	2	16	>16	2	2	32	64	0,25	0,25	0,12	1
61	<i>C. krusei</i>	2	16	4	16	1	2	4	16	0,5	1	0,25	0,5
62	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	4	4	16	>16	1	2	8	>128	0,5	2	0,12	0,12
63	<i>C. glabrata</i>	4	16	2	4	16	16	4	8	0,5	1	0,12	0,5
64	<i>C. glabrata</i> 24	0,25	1	0,5	1	2	4	0,5	1	<0,03	0,03	0,03	0,25
65	<i>C. guilliermondii</i> 54	0,12	1	2	>16	4	8	4	8	0,12	0,25	0,015	0,06
66	<i>C. guilliermondii</i> 01	<0,03	0,25	1	8	2	4	1	2	<0,03	0,06	<0,015	0,25
67	<i>C. guilliermondii</i> 03	0,25	8	1	8	4	8	16	64	0,25	1	1	1
68	<i>C. zeylanoides</i> 76	<0,03	<0,03	1	2	2	4	8	16	0,12	0,25	0,06	0,25
69	<i>C. rugosa</i> 55	0,5	1	1	4	2	4	0,5	0,5	<0,03	0,06	0,03	0,25
70	<i>C. dubliniensis</i>	0,06	2	2	8	4	8	0,5	0,5	<0,03	0,12	0,03	0,12
71	<i>C. lipolytica</i> 43	>16	>16	>16	>16	16	>16	4	4	0,25	0,5	0,5	1
72	<i>C. lusitaniae</i> 33	0,12	0,5	1	4	2	4	1	1	<0,03	0,06	0,06	0,25

Tabela 6: Susceptibilidade de 65 isolados clínicos de *Candida* spp. a anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC) e itraconazol (ITC), analisados pelo método de microdiluição em caldo, documento M27-A3 (CLSI, 2008).

Agente antifúngico	Espécies (no. de isolados)	Concentração (µg/mL)			Susceptibilidade no. de isolados (%)	
		Intervalo das CIs	⁺ CI ₅₀	⁺ CI ₉₀	SDD	R
AMB	Todas espécies (65)	≤0,007 - 1	0,06	0,12	-	
	<i>Candida albicans</i> (21)	≤0,007 - 0,5	0,06	0,12	-	
	<i>Candida parapsilosis</i> (19)	0,015 - 0,5	0,03	0,12	-	
	<i>Candida tropicalis</i> (14)	0,015 - 1	0,06	0,25	-	
	<i>Candida glabrata</i> (2)	0,015-0,5	0,12	0,25	-	
	<i>Candida krusei</i> (1)	0,25 - 0,5	0,25	0,5	-	
	<i>Candida lusitaneae</i> (1)	0,06 - 0,12	0,06	0,12	-	
	<i>Candida guilliermondii</i> (3)	0,015 - 1	0,015	0,06	-	
	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	0,06 - 0,12	0,06	0,12	-	
	<i>Candida rugosa</i> (1)	0,03 - 0,12	0,03	0,12	-	
	<i>Candida dubliniensis</i> (1)	0,12 - 0,25	0,12	0,25	-	
	<i>Candida lipolytica</i> (1)	0,12 - 0,25	0,12	0,25	-	
FLC	Todas espécies (65)	≤0,25 - >128*	0,5	1	2 (3,07)	3 (4,62)
	<i>Candida albicans</i> (21)	≤0,25 - >128*	0,25	4		
	<i>Candida parapsilosis</i> (19)	≤0,25- >128*	0,5	0,5		
	<i>Candida tropicalis</i> (14)	≤0,25- >128*	0,5	4,5		2 (14,29)
	<i>Candida glabrata</i> (2)	≤0,25 - >128*	4	64		
	<i>Candida krusei</i> (1)	16 - >128	16	>128		1 (100)
	<i>Candida lusitaneae</i> (1)	0,5 - 1	0,5	1		
	<i>Candida guilliermondii</i> (3)	0,12 - 16	4	4	1 (33,33)	
	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	4 - 16	4	16	1 (100)	
	<i>Candida rugosa</i> (1)	0,5	0,5	0,5		
	<i>Candida dubliniensis</i> (1)	≤0,25 - 0,5	≤0,25	0,5		
	<i>Candida lipolytica</i> (1)	0,5 - 1	0,5	1		
ITC	Todas espécies (65)	≤0,03 - >16**	≤0,03	0,12	10 (15,38)	6 (9,23)
	<i>Candida albicans</i> (21)	≤0,03 - >16**	≤0,03	≤0,03	3 (14,28)	1 (4,76)
	<i>Candida parapsilosis</i> (19)	≤0,03 - >16**	≤0,03	≤0,03	1 (5,26)	
	<i>Candida tropicalis</i> (14)	≤0,03 - >16**	≤0,03	1,25	2 (14,28)	3 (21,43)
	<i>Candida glabrata</i> (2)	≤0,03 - 4	0,5	2	1 (50,00)	1 (50,00)
	<i>Candida krusei</i> (1)	0,12 - 2	0,5	2		1 (100)
	<i>Candida lusitaneae</i> (1)	≤0,03 - 0,12	≤0,03	0,12		
	<i>Candida guilliermondii</i> (3)	0,06 - 0,5	0,12	0,25	2 (66,66)	
	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	0,06 - 0,12	0,06	0,12		
	<i>Candida rugosa</i> (1)	≤0,03	≤0,03	≤0,03		
	<i>Candida dubliniensis</i> (1)	0,06 - 0,12	0,06	0,12		
	<i>Candida lipolytica</i> (1)	0,25 - 0,5	0,25	0,5	1 (100)	

SDD – susceptível dose-dependente, R – resistente; -Não determinado, ⁺Resultados de CIs são medianas; *Efeito “trailing” para o fluconazol [*C. albicans* (9), *C. tropicalis* (4), *C. parapsilosis* (3) and one *C. glabrata*(1)]; **Efeito “trailing” para o itraconazol [*C. albicans* (6), *C. tropicalis* (4) and *C. parapsilosis* (1)].

Tabela 7: Atividade antifúngica de 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β ,20-diol (AZA) e 24 (R,S),25-epiminolanosterol (EIL), ambos inibidores da enzima $\Delta^{24(25)}$ -esterol metil transferase, e WSP1267, um inibidor da enzima esqueleto sintase, contra 65 isolados clínicos de *Candida* spp. avaliados pelo método de microdiluição em caldo, documento M27-A3 (CLSI, 2008).

Drogas	Espécies (no. de isolados)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		
		Intervalo das CIs	⁺ CI ₅₀	⁺ CI ₉₀
AZA	Todas espécies (65)	$\leq 0,03$ - >16	0,5	2
	<i>Candida albicans</i> (21)	0,06 - >16	0,5	8
	<i>Candida parapsilosis</i> (19)	0,06 - >16	0,12	0,5
	<i>Candida tropicalis</i> (14)	0,06 - >16	0,62	8
	<i>Candida glabrata</i> (2)	0,12 - >16	1	2
	<i>Candida krusei</i> (1)	16 - >16	16	>16
	<i>Candida lusitaneae</i> (1)	0,06 - 0,5	0,06	0,5
	<i>Candida guilliermondii</i> (3)	$\leq 0,03$ - 0,5	0,06	0,25
	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$
	<i>Candida rugosa</i> (1)	0,25 - 1	0,25	1
	<i>Candida dubliniensis</i> (1)	0,5 - 2	0,5	2
	<i>Candida lipolytica</i> (1)	>16	>16	>16
EIL	Todas espécies (65)	$\leq 0,03$ - >16	2	2
	<i>Candida albicans</i> (21)	0,5 - 8	2	2
	<i>Candida parapsilosis</i> (19)	0,5 - 8	1	2
	<i>Candida tropicalis</i> (14)	1 - 8	1	2
	<i>Candida glabrata</i> (2)	0,5 - 4	1	2
	<i>Candida krusei</i> (1)	8	8	8
	<i>Candida lusitaneae</i> (1)	0,5 - 2	0,5	2
	<i>Candida guilliermondii</i> (3)	1 - 4	1	4
	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	1 - 2	1	2
	<i>Candida rugosa</i> (1)	1 - 2	1	2
	<i>Candida dubliniensis</i> (1)	2 - 8	2	8
	<i>Candida lipolytica</i> (1)	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$
WSP1267	Todas espécies (65)	0,5 - 16	2	4
	<i>Candida albicans</i> (21)	0,5 - 8	2	4
	<i>Candida parapsilosis</i> (19)	0,5 - 8	2	4
	<i>Candida tropicalis</i> (14)	2 - 16	2	8
	<i>Candida glabrata</i> (2)	2 - 16	4	8
	<i>Candida krusei</i> (1)	2	2	2
	<i>Candida lusitaneae</i> (1)	2 - 4	2	4
	<i>Candida guilliermondii</i> (3)	4 - 8	4	8
	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	2 - 4	2	4
	<i>Candida rugosa</i> (1)	4	4	4
	<i>Candida dubliniensis</i> (1)	8	8	8
	<i>Candida lipolytica</i> (1)	4	4	4

⁺valores de CIs são medianas.

4.3 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

A CFM para aproximadamente 50% dos isolados clínicos de *Candida* spp. foi $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ para AZA, EIL e WSP1267, revelando predominantemente um efeito fungistático dos inibidores da síntese de esteróis. Interessantemente, em 4 isolados de CNA (*C. glabrata*, *C. lusitaneae*, *C. zeylanoides* e *C. rugosa*) não foi observado crescimento celular em concentrações inferiores a $4 \mu\text{g/mL}$, indicando uma possível atividade fungicida, especialmente para AZA. Por outro lado, *C. albicans* revelou menor susceptibilidade ao AZA que as outras espécies (Tabela 8 e 9).

Tabela 8: Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos inibidores da enzima $\Delta^{(24)25}$ -esterol metil transferase (AZA e EIL) e esqualeno sintase (WSP1267) contra 7 cepas de *Candida* spp. ATCC e 65 isolados clínicos.

N°	Amostras	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		
		AZA	EIL	WSP1267
1	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	>16	>16	4
2	<i>C. albicans</i> ATCC 24433	>16	>16	8
3	<i>C. albicans</i> 44A	>16	>16	>16
4	<i>C. albicans</i> 78	>16	16	>16
5	<i>C. albicans</i> 2A	>16	4	>16
6	<i>C. albicans</i> 2	>16	>16	16
7	<i>C. albicans</i> 9	>16	16	2
8	<i>C. albicans</i> 11	>16	8	4
9	<i>C. albicans</i> 12	>16	>16	16
10	<i>C. albicans</i> 115	>16	16	8
11	<i>C. albicans</i> 116	>16	>16	8
12	<i>C. albicans</i> 117	>16	16	4
13	<i>C. albicans</i> 118	>16	16	8
14	<i>C. albicans</i> 119	>16	16	>16
15	<i>C. albicans</i> 120	>16	>16	4
16	<i>C. albicans</i> 123	>16	>16	8
17	<i>C. albicans</i> 63A	2	>16	16
18	<i>C. albicans</i> 63B	>16	16	4
19	<i>C. albicans</i> 77	>16	>16	4
20	<i>C. albicans</i> 79	>16	8	4
21	<i>C. albicans</i> 53	8	8	4
22	<i>C. albicans</i> 58	>16	4	>16
23	<i>C. albicans</i> 60	>16	8	8
24	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	>16	16	8
25	<i>C. parapsilosis</i>	16	16	8
26	<i>C. parapsilosis</i> 35	>16	2	8
N°	Amostras	AZA	EIL	WSP1267

27	<i>C. parapsilosis</i> 14	4	>16	>16
28	<i>C. parapsilosis</i> 20	16	2	>16
29	<i>C. parapsilosis</i> 4	2	>16	16
30	<i>C. parapsilosis</i> 7	4	>16	16
31	<i>C. parapsilosis</i> 13	8	>16	>16
32	<i>C. parapsilosis</i> 17	8	>16	8
33	<i>C. parapsilosis</i> 18	4	16	8
34	<i>C. parapsilosis</i> 21	8	16	16
35	<i>C. parapsilosis</i> 23	2	4	1
36	<i>C. parapsilosis</i> 25	1	8	16
37	<i>C. parapsilosis</i> 28	8	16	16
38	<i>C. parapsilosis</i> 29A	8	8	16
39	<i>C. parapsilosis</i> 41	>16	>16	8
40	<i>C. parapsilosis</i> 64	>16	16	4
41	<i>C. parapsilosis</i> 66	2	16	>16
42	<i>C. parapsilosis</i> 81	2	>16	8
43	<i>C. parapsilosis</i> 34	8	16	16
44	<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	16	>16	2
45	<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	16	>16	8
56	<i>C. tropicalis</i> 22	16	8	16
47	<i>C. tropicalis</i> 19	8	16	>16
48	<i>C. tropicalis</i> 50	8	8	8
49	<i>C. tropicalis</i> 5	16	2	16
50	<i>C. tropicalis</i> 6	8	>16	>16
51	<i>C. tropicalis</i> 16	16	>16	8
52	<i>C. tropicalis</i> 42	8	>16	>16
53	<i>C. tropicalis</i> 51	8	8	8
54	<i>C. tropicalis</i> 56	>16	>16	>16
55	<i>C. tropicalis</i> 59	>16	>16	>16
56	<i>C. tropicalis</i> 62	>16	>16	>16
57	<i>C. tropicalis</i> 75	>16	>16	16
58	<i>C. tropicalis</i> 82	16	8	8
59	<i>C. tropicalis</i> 57	>16	>16	>16
60	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	2	>16	16
61	<i>C. krusei</i>	>16	>16	16
62	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	>16	>16	2
63	<i>C. glabrata</i>	>16	4	>16
64	<i>C. glabrata</i> 24	2	>16	>16
66	<i>C. guilhermondii</i> 01	2	>16	16
67	<i>C. guilhermondii</i> 03	16	>16	16
68	<i>C. guilhermondii</i> 54	16	>16	8
71	<i>C. zeylanoides</i> 76	0,03	2	4
70	<i>C. rugosa</i> 55	4	>16	8
65	<i>C. dubliniensis</i>	>16	>16	16
69	<i>C. lipolytica</i> 43	>16	>16	>16
72	<i>C. lusitaniae</i> 33	>16	4	8

Tabela 9: Porcentagem cumulativa dos valores da concentração fungicida mínima (CFM) de AZA (20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β ,20-diol), EIL (24(R,S),25-epiminolanosterol) e WSP1267 contra 65 isolados clínicos de *Candida* spp.

Espécies (no. de isolados)	Drogas	Porcentagem cumulativa da CFM ($\mu\text{g/mL}$)						
		0,03	1	2	4	8	16	>16
Todas espécies (65)	AZA	1,52	3,04	12,16	16,72	34,96	44,08	100
	EIL			6,08	15,20	30,40	51,68	100
	WSP1267			3,07	16,92	44,15	69,23	100
<i>Candida albicans</i> (21)	AZA			4,76	4,76	9,52	9,52	100
	EIL				9,52	28,57	61,98	100
	WSP1267			4,76	38,09	61,90	71,43	100
<i>Candida parapsilosis</i> (19)	AZA		5,26	26,31	36,87	68,42	68,42	100
	EIL			10,52	15,79	26,31	63,15	100
	WSP1267			5,26	10,52	42,10	78,95	100
<i>Candida tropicalis</i> (14)	AZA					35,71	64,28	100
	EIL			7,17	7,17	35,71	42,87	100
	WSP1267				7,17	28,57	57,14	100
<i>Candida glabrata</i> (2)	AZA			50	50	50	50	100
	EIL				50	50	50	100
	WSP1267							100
<i>Candida krusei</i> (1)	AZA							100
	EIL							100
	WSP1267							100
<i>Candida lusitaneae</i> (1)	AZA							100
	EIL				100	100	100	100
	WSP1267					100	100	100
<i>Candida guilliermondii</i> (3)	AZA							100
	EIL							100
	WSP1267					33,33	100	100
<i>Candida zeylanoides</i> (1)	AZA	100	100	100	100	100	100	100
	EIL			100	100	100	100	100
	WSP1267				100	100	100	100
<i>Candida rugosa</i> (1)	AZA				100	100	100	100
	EIL							100
	WSP1267					100	100	100

Para uma análise mais aprofundada dos efeitos dos inibidores da biossíntese de esteróis testes: AZA, EIL, WSP1267, E5700 e ER-119884, duas cepas de *Candida* (*C. albicans* isolado 77 e *C. tropicalis* ATCC 28707) foram selecionadas para a avaliação do ciclo celular pela microscopia de fluorescência, da morfologia e da ultraestrutura pelas técnicas de MET e MEV e análise do perfil lipídico pela microscopia de fluorescência e métodos cromatográficos. A cepa de *C. albicans* (isolado 77) apresentou-se susceptível a todos os antifúngicos padrão usados neste trabalho (AMB, FLC e ITC) e foi, também, susceptível em valores de CI_{50} de AZA (0,25 $\mu\text{g/mL}$), EIL (1 $\mu\text{g/mL}$) e WSP1267 (1 $\mu\text{g/mL}$) mais frequentes na população de isolados clínicos de *Candida* spp. estudada. Já *C. tropicalis* ATCC 28707 mostrou ser uma cepa bastante interessante por apresentar resistência à AMB, FLC e ITC, e susceptível aos inibidores da SQS (WSP1267, E5700 e ER-119884) e 24-SMT (AZA e EIL).

4.4 Presença de corpos lipídicos em leveduras tratadas com inibidores da síntese de esteróis

Leveduras de *C. albicans* (isolado 77) tratadas com CI_{50} de inibidores da biossíntese de esteróis - AZA e EIL (inibidores da 24-SMT) e WSP1267 (inibidor da SQS) - apresentaram marcações pontuais com o marcador fluorescente “nile red” (Figuras 14F-H), enquanto as leveduras não tratadas, essas marcações não foram observadas (Figura 14E). Estas marcações indicam o acúmulo de lipídeos neutros no citoplasma celular. Aparentemente, a marcação pontual com “nile red” foi mais evidente e com pontos maiores em células tratadas com AZA (Figura 14F) e WSP1267 (Figura 14H), enquanto que em células tratadas com EIL essa marcação pontual apresenta-se menor e em menor evidência (Figura 14G).

Em leveduras de *C. tropicalis* ATCC 28707, somente ER-119984 foi capaz de induzir o acúmulo de lipídeos neutros no citoplasma (Figura 15F), enquanto as células tratadas com E5700 não apresentaram marcações com “nile red” (Figura 15E), assim como as células controle (Figura 15D).

Figura 14: Microscopia de contraste de interferência diferencial (**A-D**) e de fluorescência (**E-H**) de leveduras de *C. albicans* (isolado 77) sem tratamento (**A e E**) e tratadas por 48 h, a 35 °C, com CI_{50} de AZA (0,25 µg/mL) (**B e F**), CI_{50} de EIL (1 µg/mL) (**C e G**) e CI_{50} de WSP1267 (1 µg/mL) (**D e H**). Pode-se verificar que leveduras tratadas com os inibidores da 24-SMT (AZA e EIL) e da SQS (WSP1267) possuem marcações pontuais com “nile red”, indicando um acúmulo de lipídeos neutros no citoplasma, ao passo que as leveduras sem tratamento não apresentaram essas marcações. Barras= 5 µm.

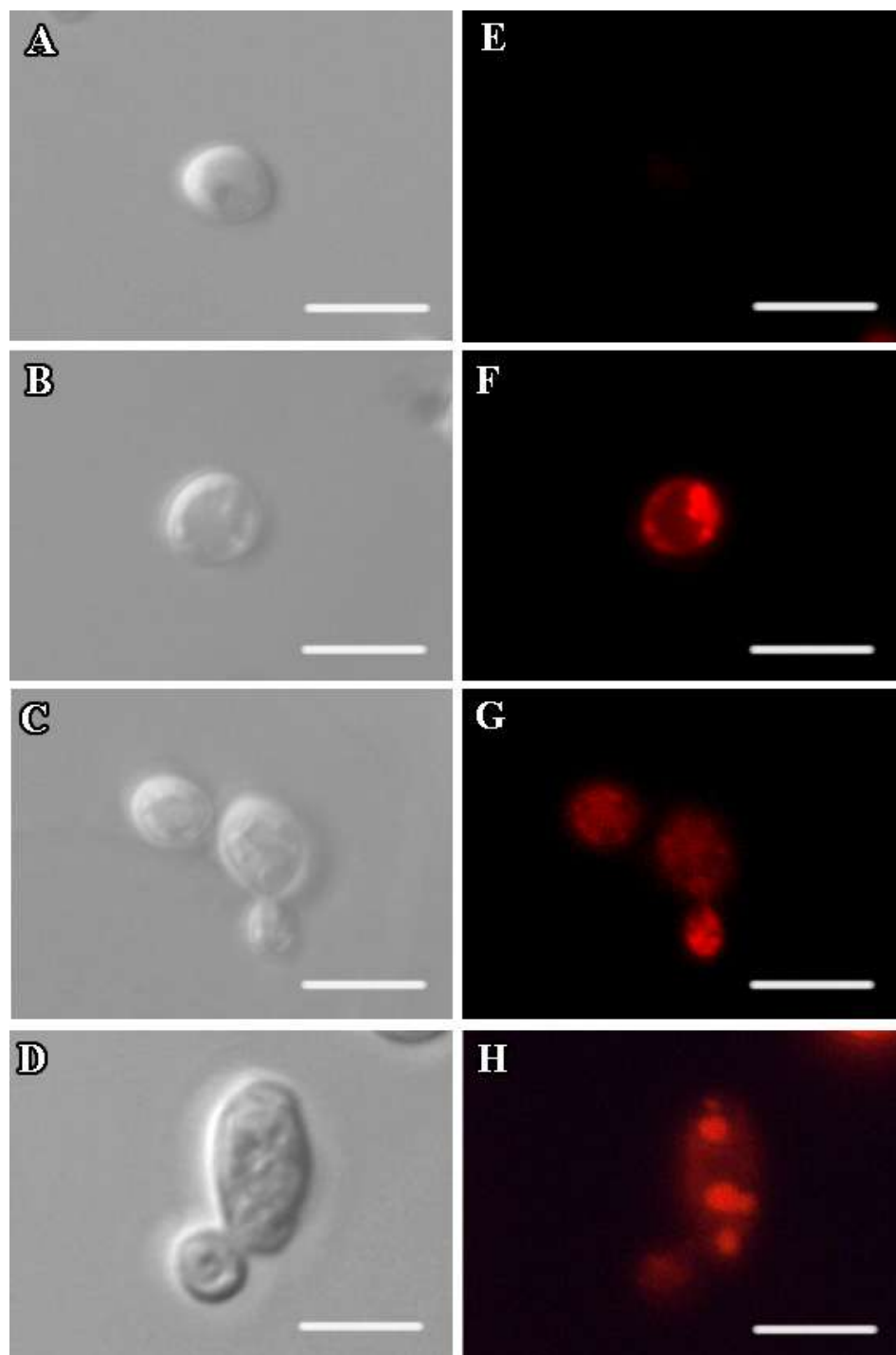
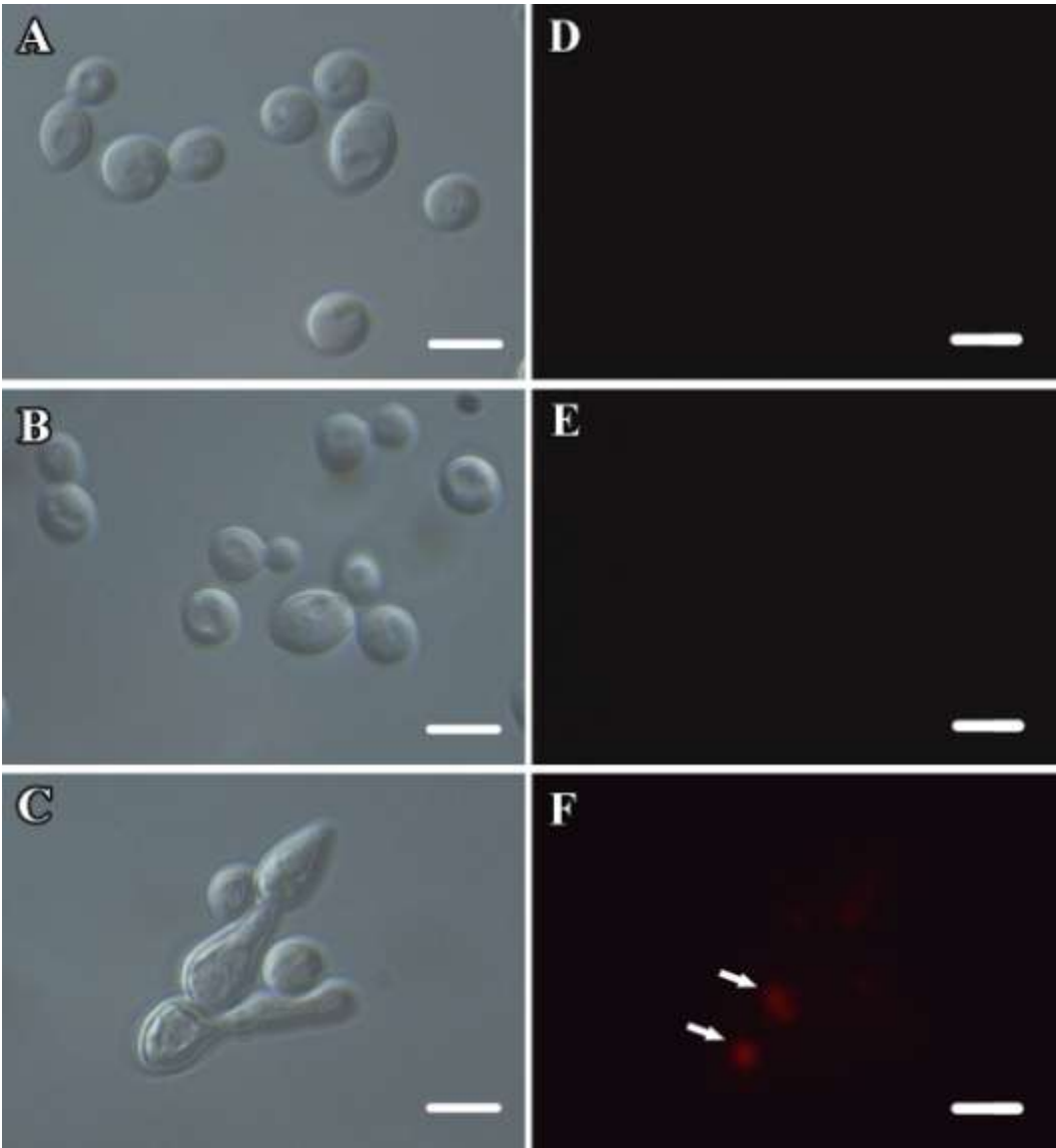


Figura 15: Microscopia de contraste de interferência diferencial (**A-C**) e de fluorescência (**D-F**) de *C. tropicalis* ATCC 28707 não tratadas (**A e D**) e tratadas com CI_{50} de E500 (1 $\mu\text{g/mL}$) (**B e E**) e ER-119884 (1 $\mu\text{g/mL}$) (**C e F**) por 48 h, a 35 °C. Após o tratamento de *C. tropicalis* ATCC 28707 com ER-119884 (inibidor da esqualeno sintase-SQS) pode ser observado o acúmulo de lipídeos neutros no citoplasma, que estão indicadas pela marcação pontual pelo “nile red” (setas brancas na figura F). Entretanto, essas marcações estiveram ausentes nas células controle (D) e tratada com E5700 (E). Barras= 5 μm .

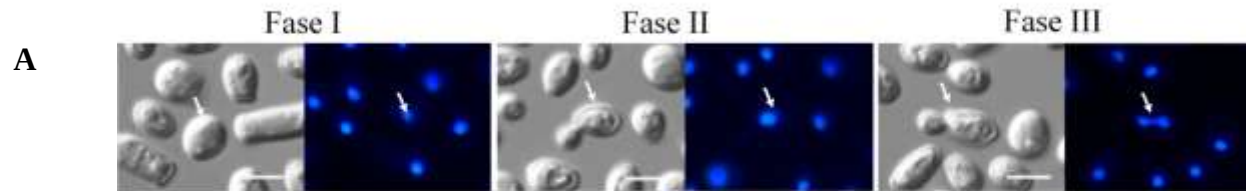


4.5 Alterações no ciclo celular e padrão nuclear de leveduras tratadas com inibidores da síntese de esteróis

A coloração com DAPI, para a marcação do DNA nuclear de leveduras de *C. albicans* (isolado 77) tratadas com inibidores da enzima 24-SMT (AZA e EIL) e SQS (WSP1267), revelou uma importante alteração no ciclo celular (Figura 16). Para quantificar essas alterações, diferentes fases do ciclo celular foram consideradas: (I) células com um único núcleo; (II) células com brotamento e com um único núcleo e; (III) células com brotamento e dois núcleos (um em cada célula) (Figura 16A). Na figura 16B podemos verificar uma redução drástica de células nas fases I a III em leveduras tratadas com AZA e EIL. Por outro lado, WSP1267 foi caracterizado por induzir uma drástica diminuição de células na fase I com concomitante aumento das fases II e III do ciclo celular. Depois do tratamento de *C. albicans* com CI_{50} s de AZA, EIL e WSP1267, diferentes alterações no núcleo foram observadas e classificadas como: (A) presença de células com mais de um núcleo; (B) células apresentando condensação anormal da cromatina; e (C) células sem núcleo (Figuras 17A-H). Células tratadas com AZA e EIL apresentaram alterações nucleares (A) a (C), enquanto que células tratadas com WSP1267 apresentou somente as alterações (B) e (C) (Figura 17). Na Figura 17I podemos observar um importante aumento de células com a condensação anormal da cromatina, de aproximadamente 66 % em leveduras tratadas com AZA e EIL. Adicionalmente, 4,68 % e 6,47 % das células tratadas com AZA e EIL, respectivamente, apresentaram células sem núcleo, enquanto que somente células tratadas com AZA apresentaram células com mais de um núcleo. Já em leveduras tratadas com WSP1267, pouquíssimas células foram observadas com mais de um núcleo, enquanto que em 10,98 % e 9,21 % apresentaram anormalidade na condensação da cromatina e ausência de núcleo, respectivamente.

Figura 16: Microscopia de contraste de interferência diferencial (esquerda) e microscopia de fluorescência (direita) de *Candida albicans* (isolado 77) sem tratamento em diferentes fases do ciclo celular: **(I)** células sem brotamento e um único núcleo; **(II)** células com um brotamento e com único núcleo e; **(III)** células com brotamento e um núcleo em cada célula **(A)**. Leveduras de *C. albicans* quando tratadas com valores de CI_{50} de AZA (0,25 $\mu\text{g/mL}$), EIL (1 $\mu\text{g/mL}$) e WSP1267 (1 $\mu\text{g/mL}$) por 48h, a 35 °C, apresentam alterações no ciclo celular **(B)**. Inibidores da enzima 24-SMT (AZA e EIL) induzem uma drástica diminuição das células nas fases I, II e III do ciclo celular. Já o inibidor da SQS (WSP1267) provoca uma diminuição de células na fase I com concomitante aumento de células nas fases II e III do ciclo celular. Barras = 5 μm .

Fases do ciclo celular



B

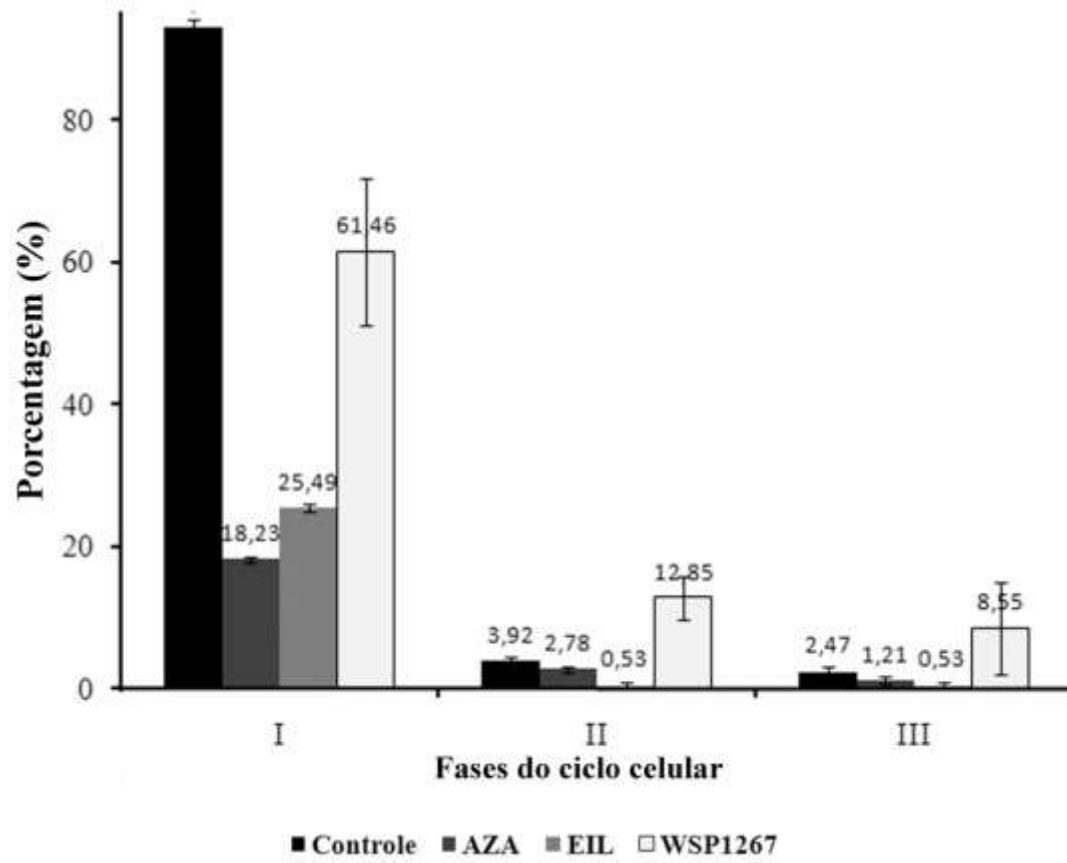
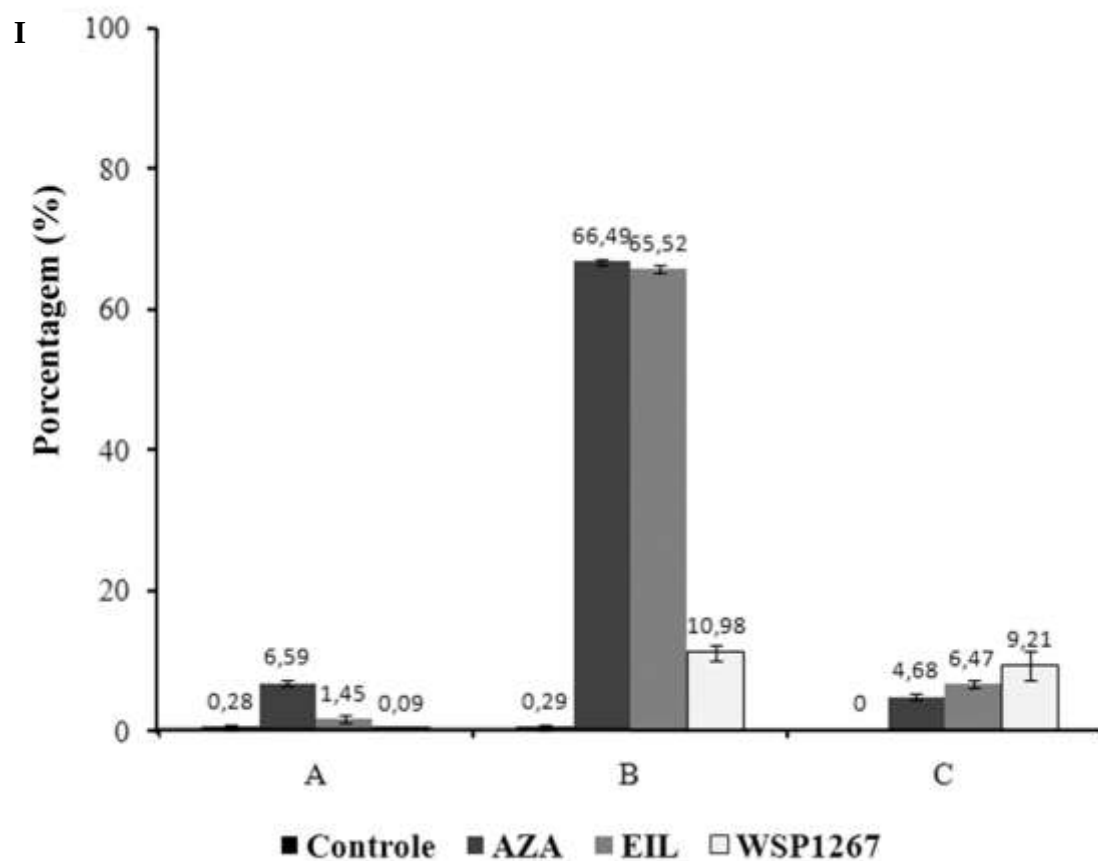
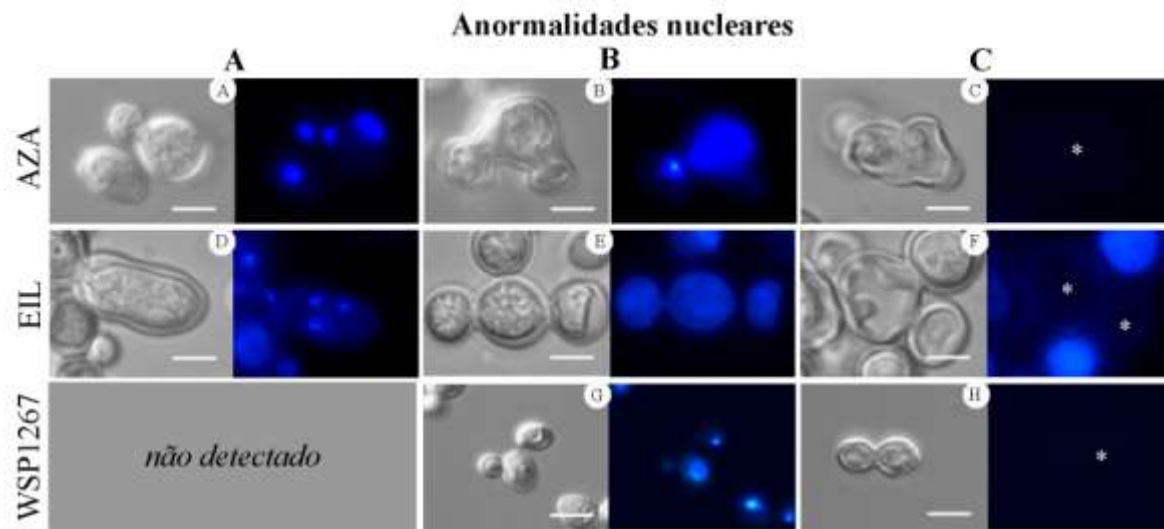


Figura 17: Microscopia de contraste de interferência diferencial (esquerda) e microscopia de fluorescência (direita) de *Candida albicans* (isolado 77) tratada com valores de CI_{50} de AZA (0,25 $\mu\text{g/mL}$) (**A-C**), EIL (1 $\mu\text{g/mL}$) (**D-F**) e WSP1267 (1 $\mu\text{g/mL}$) (**G-H**) por 48h, a 35 °C, apresentaram as seguintes anormalidades nucleares: (A) presença de células com mais de um núcleo; (B) condensação anormal da cromatina; e (C) células sem núcleo. As porcentagens de leveduras com anormalidades A, B e C em células tratadas com AZA, EIL e WSP1278 em comparação com as células controle podem ser vistas na figura I. Barras = 5 μm .



Outros inibidores da SQS, E5700 e ER-119884, também, foram capazes de alterar o ciclo celular de leveduras de *C. tropicalis* ATCC 28707, levando o aumento do número de células na fase II e III do ciclo celular com a redução de células na fase I do ciclo celular. Além disso, esses inibidores causaram anormalidades a nível nuclear, como presença de células com a condensação da cromatina atípica e células sem núcleo (Figura 18).

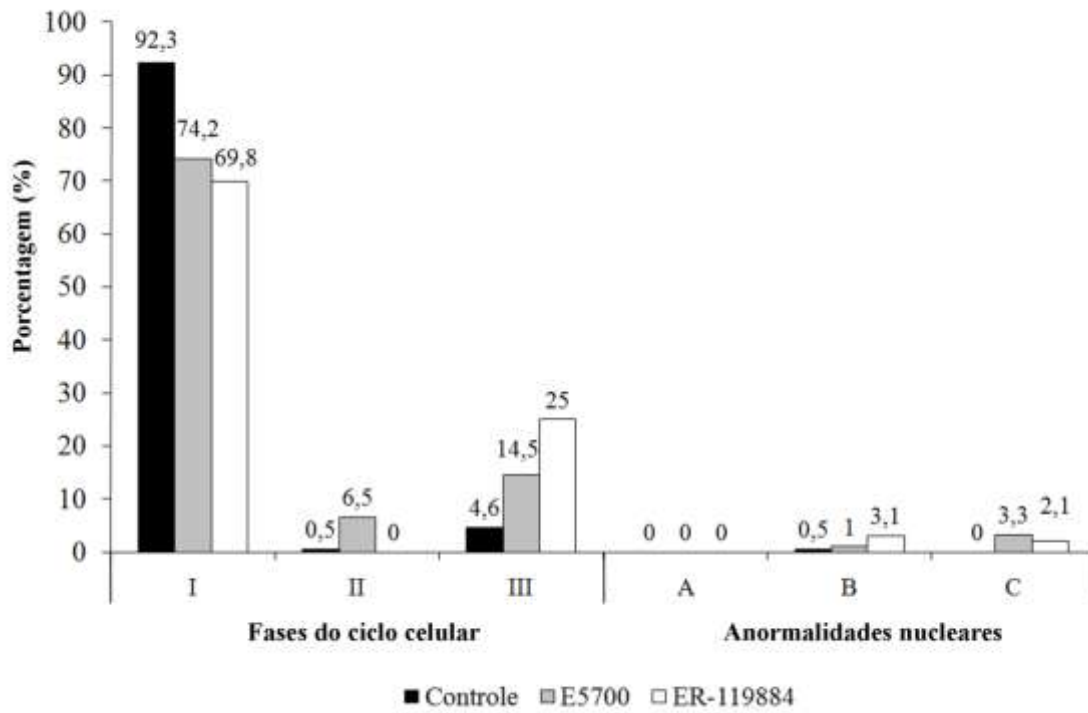


Figura 18: Porcentagem de leveduras de *Candida tropicalis* ATCC 28707 tratadas e não tratadas (controle) com valores de CI_{50} de E5700 e ER-119884 (1 μ g/mL) por 48h, a 35 °C, em diferentes fases do ciclo celular e anormalidades nucleares. As leveduras podem apresentar-se em diferentes fases do ciclo celular: (I) células sem brotamento e um único núcleo; (II) células com um brotamento e com único núcleo e; (III) células com brotamento e um núcleo em cada célula. Anormalidades nucleares observadas foram: (A) presença de células com mais de um núcleo; (B) condensação anormal da cromatina; e (C) células sem núcleo.

4.6 Alterações morfológicas e ultraestruturais

Células de *C. albicans* (isolado 77) tratadas com valores de CI_{50} de AZA (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e EIL (1 $\mu\text{g/mL}$), ambos inibidores da 24-SMT, foram avaliadas pela microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (Figuras 19 e 20). A morfologia de leveduras de *C. albicans* não tratadas pode ser observada nas Figuras 19A e 20A, mostrando que a forma das células pode variar de esférica a oval com um diâmetro médio de $4,90 \pm 0,49 \mu\text{m}$ (Fig. 19A). Micrografias obtidas de microscopia eletrônica de transmissão revelaram que a espessura média da parede celular, em células controle, foi de $233 \pm 25 \text{ nm}$ (Figuras 20A-B), incluindo uma fina camada elétron-densa na camada mais externa da parede com uma estrutura fibrilar delicada (f na Figura 20B). As células apresentaram uma membrana plasmática (mp) contínua, citoplasma homogêneo contendo ribossomos elétron-densos, núcleo (n) e nucléolo (nu) (Figuras 20A-B).

Por outro lado, o tratamento de *C. albicans* (isolado 77) com CI_{50} dos inibidores da 24-SMT (0,25 $\mu\text{g/mL}$ de AZA e 1,00 $\mu\text{g/mL}$ de EIL) induziu alterações morfológicas significantes. Tanto o AZA quanto o EIL provocou aumento significativo no tamanho da célula leveduriforme (Figuras 19B-D e Figura 25). As células com alterações morfológicas foram quantificadas e apareceram em 34,79 % e 55,17 % das células tratadas com AZA e EIL, respectivamente. As alterações ultraestruturais mais freqüentemente observadas em leveduras tratadas com AZA e EIL foram: (i) presença de pequenos brotamentos (asteriscos nas figuras 19B-D); (ii) irregularidade da superfície da parede celular (Figuras 19B e 20C-D); (iii) perda da integridade da parede celular com aparente extravazamento dos componentes celulares (setas brancas nas figuras 19C-D e setas pretas nas figuras 20E-F); (iv) aumento significativo de 2-3 vezes da espessura da parede celular quando comparado com as células controle (Figuras 20D, 20F e 20H e figura 25). A membrana plasmática também apresentou várias alterações nas células tratadas,

como invaginações, descontinuidade e destacamento da parede celular (Figuras 20C-D); brotamentos de pequenas vesículas que podem estar migrando para a região periplasmática (cabeça de seta preta nas Figuras 20C-D), pequenas vesículas acumuladas no citoplasma (Figuras 20E-F e detalhes na figura inserida na 20F) ou estar associadas à membrana plasmática (Figuras 20G-H e detalhes na figura inserida na 20H). O diâmetro dessas vesículas variou de 40-80 nm para AZA e de 40-220 nm para EIL. Adicionalmente, inchaço mitocondrial (m nas figuras 20G-H) e acúmulo de vacúolos elétron-densos (v nas figuras 20G-H) foram observados, principalmente, nas células tratadas com EIL.

C. tropicalis ATCC 28707, também, foram tratadas com CI_{50} de AZA (0,03 $\mu\text{g/mL}$) e processadas para a microscopia eletrônica de transmissão. Alterações ultraestruturais de *C. tropicalis* ATCC 28707 foram semelhantes às encontradas em *C. albicans* (isolado 77) tratadas com AZA. As principais alterações foram: (i) acúmulo de vacúolos elétron-densos (v nas Figuras 21B-C), (ii) inchaço mitocondrial (m nas Figuras 21B-C), (iii) descontinuidade e descolamento da bicamada lipídica (cabeça de seta na Figura 21D), (iv) aparente aumento da espessura de parede celular (Figura 21D), quando comparado com a célula não tratada com a droga, que se apresenta com a parede celular compacta, membrana plasmática contínua e citoplasma elétron-denso e homogêneo (Figura 21A).

Já o inibidor da SQS – WSP1267 – alterou a ultraestrutura de *C. albicans* (isolado 77), que pode ser observada nas figuras 22 e 23. As leveduras tratadas com CI_{50} do WSP1267 (1 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram-se com a forma alterada, caracterizada pelo aspecto de plasmoptise (Figuras 22B-C) e por uma drástica irregularidade da parede celular causando a alteração no formato da célula (Figura 22D). Secções ultrafinas de *C. albicans* (isolado 77) sem tratamento revelaram uma ultraestrutura preservada, como já descrito anteriormente (Figura 23A). Após o tratamento de leveduras com WSP1267, alterações ultraestruturais foram observadas, que

incluem: (i) destacamento da membrana plasmática da parede celular (asteriscos nas Figuras 23B-C), (ii) membrana plasmática irregular e presença de invaginações (Figuras 23B-C), (iii) presença de pequenas vesículas na região periplasmática (detalhes na figura inserida na 23C), (iv) acúmulo de grandes vacúolos elétron-densos no citoplasma (v na Figura 23D), (v) rompimento da parede celular (seta preta na Figura 23D) e (vi) perda da integridade da parede celular do brotamento (seta preta na Figura 23B). Adicionalmente, o diâmetro celular e a espessura de parede celular aumentaram significativamente quando comparados com as células não tratadas (Figura 25).

Alterações similares foram observadas em *C. tropicalis* ATCC 28707 tratadas com CI_{50} de WSP1267 (Figuras 24B-D): (i) presença de vacúolos elétron-densos e elétron-luscentes (v nas Figuras 24B-C), (ii) invaginações e descolamento da bicamada lipídica (seta na Figura 24D), (iii) aumento da espessura de parede celular (PC nas Figuras 24B e 24D) e (iv) ruptura da parede celular e membrana plasmática com o extravazamento de conteúdo celular (asterisco na Figura 24D).

Outros inibidores da SQS (E5700 e ER-119884) afetaram a ultraestrutura de *C. tropicalis* ATCC 28707 (Figura 26). Leveduras tratadas com valores de CI_{50} de E5700 (1 μ g/mL) e de ER-119884 (1 μ g/mL) sofreram alterações ultraestruturais quando comparado com as células não tratadas (Figura 26A), como: (i) um aparente aumento da espessura de parede celular e de seu destacamento (setas nas Figuras 26D e 26F); (ii) invaginações da membrana plasmática (cabeça de seta branca na Figura 26F), que em algumas células também podem apresentar-se com descontinuidade e (iii) presença de grandes vacúolos elétron-densos (v nas Figuras 26C-E).

Figura 19: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura de leveduras de *C. albicans* (isolado 77) controle **(A)** e tratadas com CI_{50} de AZA (0,25 $\mu\text{g/mL}$) **(B)** e EIL (1 $\mu\text{g/mL}$) **(C-D)** por 48h, a 35 °C. Células tratadas apresentaram alterações ultraestruturais como: aumento do tamanho celular, irregularidades da parede celular, rompimento da parede celular (setas brancas nas figuras B-D) e presença de pequenos brotamentos (asteriscos nas figuras B-D). Barras = 5 μm .

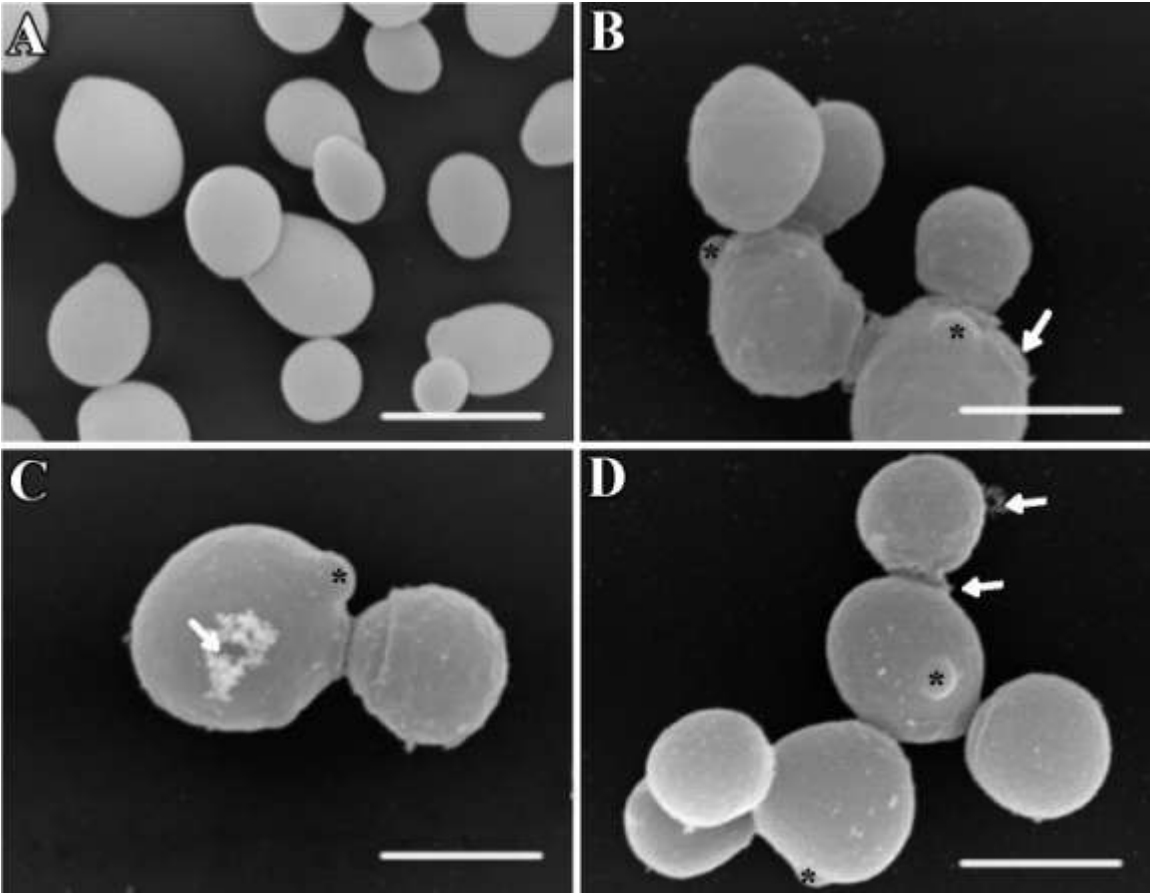


Figura 20: Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de *C. albicans* (isolado 77) controle **(A-B)** e tratado com CI_{50} de AZA (0,25 $\mu\text{g/mL}$) **(C-D)** e EIL (1 $\mu\text{g/mL}$) **(E-H)** por 48h, a 35 °C. Células controle apresentaram uma ultraestrutura típica com núcleo (n), nucléolo (nu), membrana plasmática contínua (mp), parede celular homogênea e compacta (PC) com estruturas fibrilares (f) e muitos ribossomos no citoplasma (Figura A-B). Células tratadas apresentaram alterações ultraestruturais como: rompimento da parede celular (setas pretas nas figuras C, E e F); aumento da espessura de parede celular (PC nas figuras D, F e H); pequenas vesículas com brotamentos originados da membrana plasmática (cabeça de seta na figura D); acúmulo de pequenas vesículas na região periplasmática (detalhes na inserção da figura D), no citoplasma (detalhes na inserção da figura F) e associadas com a membrana plasmática (detalhes na figura H); acúmulo de vacúolos elétron-densos (v nas figuras G-H) e inchaço mitocondrial (m nas figuras G-H). Barras em A, C, E e G = 1 μm ; e em B, D, F e H = 0,2 μm .

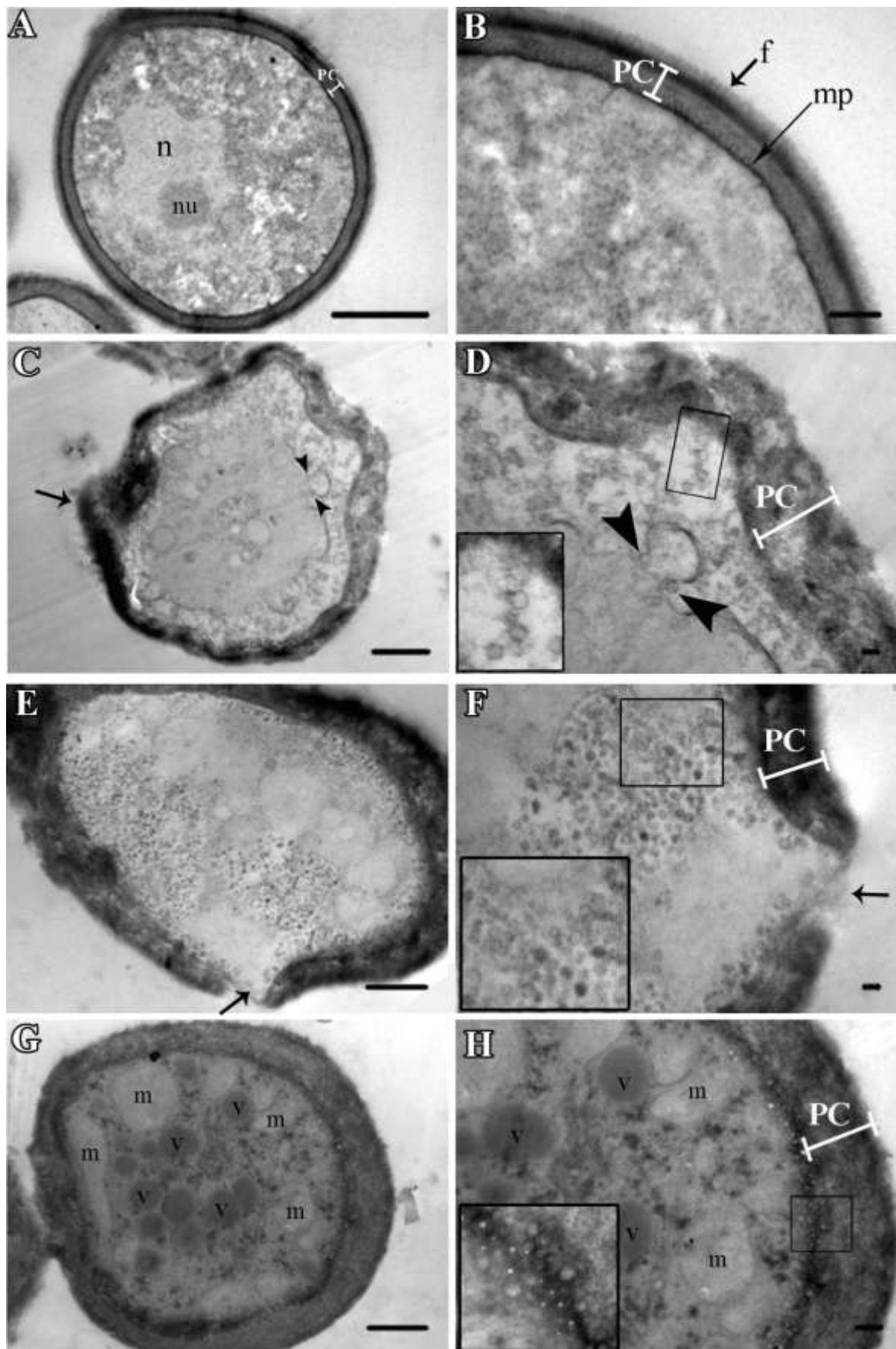


Figura 21: Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de leveduras de *C. tropicalis* ATCC 28707 não tratadas (**A**) e tratadas com CI_{50} de AZA (0,03 $\mu\text{g/mL}$) (**B-D**) por 48 h, a 35 °C. Célula não tratada apresentou uma parede celular compacta (PC), membrana citoplasmática contínua e presença de mitocôndrias. Entretanto, em células tratadas com o inibidor da 24-SMT, houve alterações na ultraestrutura como: aumento da espessura da parede celular (seta na figura D), descolamento da bicamada lipídica (cabeça de seta na figura D), presença de vacúolos elétron-densos (v nas figuras B-D) e inchaço mitocondrial (m nas figuras B-C). Barras = 0,5 μm .

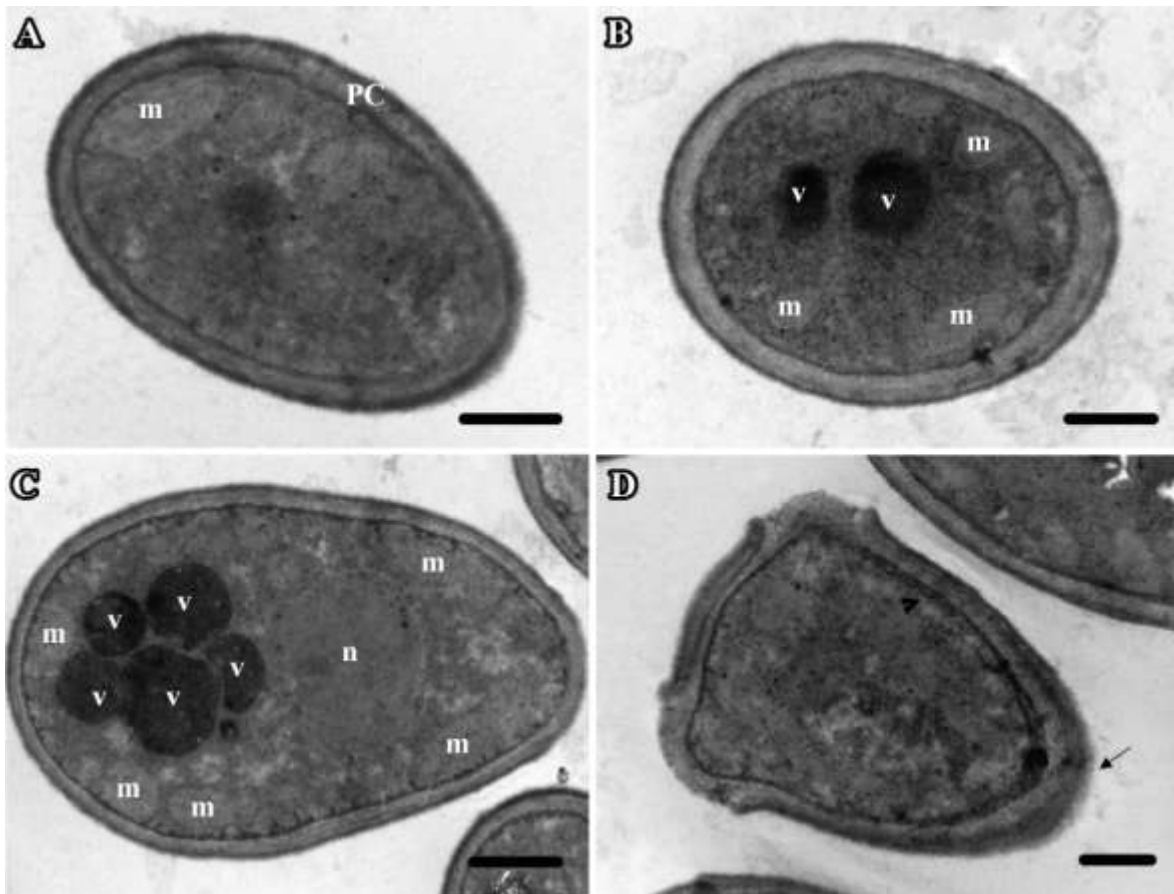


Figura 22: Microscopia eletrônica de varredura de *C. albicans* (isolado 77) tratado com CI_{50} de WSP1267 (1 $\mu\text{g/mL}$) por 48h, a 35 °C. **A:** Controle; **B-D:** 1 $\mu\text{g/mL}$ de WSP1267. Leveduras tratadas com o inibidor da SQS apresentaram-se com a morfologia alterada e com aspecto de plasmoptise. Barras= 1 μm .

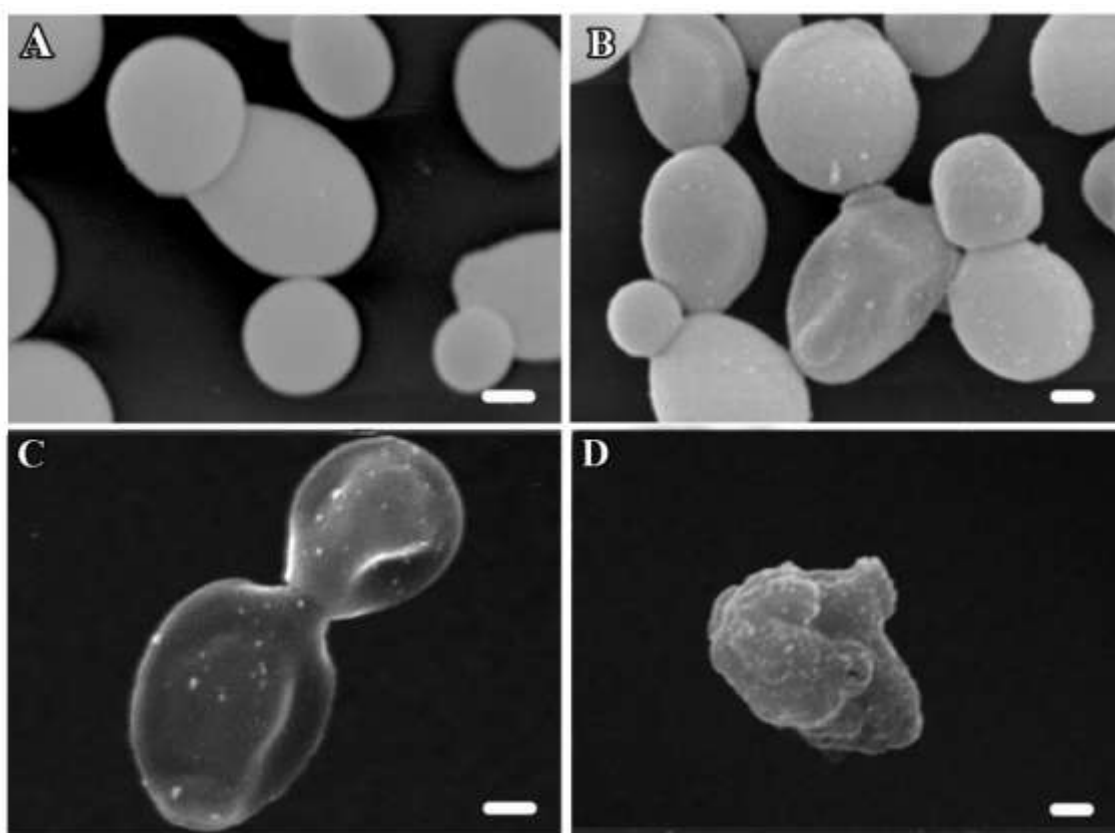


Figura 23: Alterações ultraestruturais de *C. albicans* (isolado 77) tratada com 1 µg/mL de WSP1267 por 48 h, a 35°C, analisadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Levedura não tratada **(A)** apresentou uma preservada ultraestrutura: estruturas fibrilares (f), membrana plasmática (mp) e uma parede celular compacta (pc). Entretanto, em leveduras tratadas com WSP1267 **(B-D)** foram observadas alterações como: rompimento de parede celular e a perda da integridade da parede celular da célula em brotamento (seta preta), destacamento da membrana plasmática da parede celular (asteriscos nas figuras B-C), presença de pequenas vesículas na região periplasmática (figuras B-D e detalhes na inserção da figura C) e grandes vacúolos electron-densos (v na figura D). Barras = 1 µm.

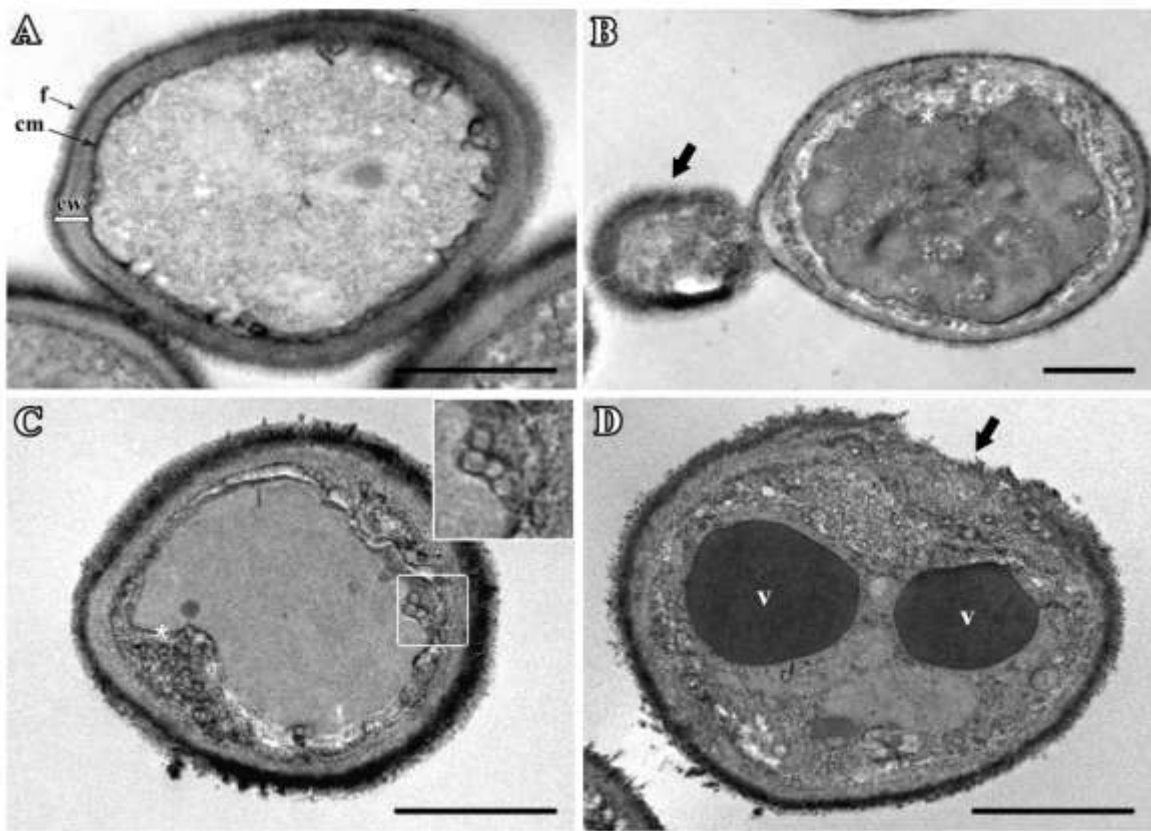
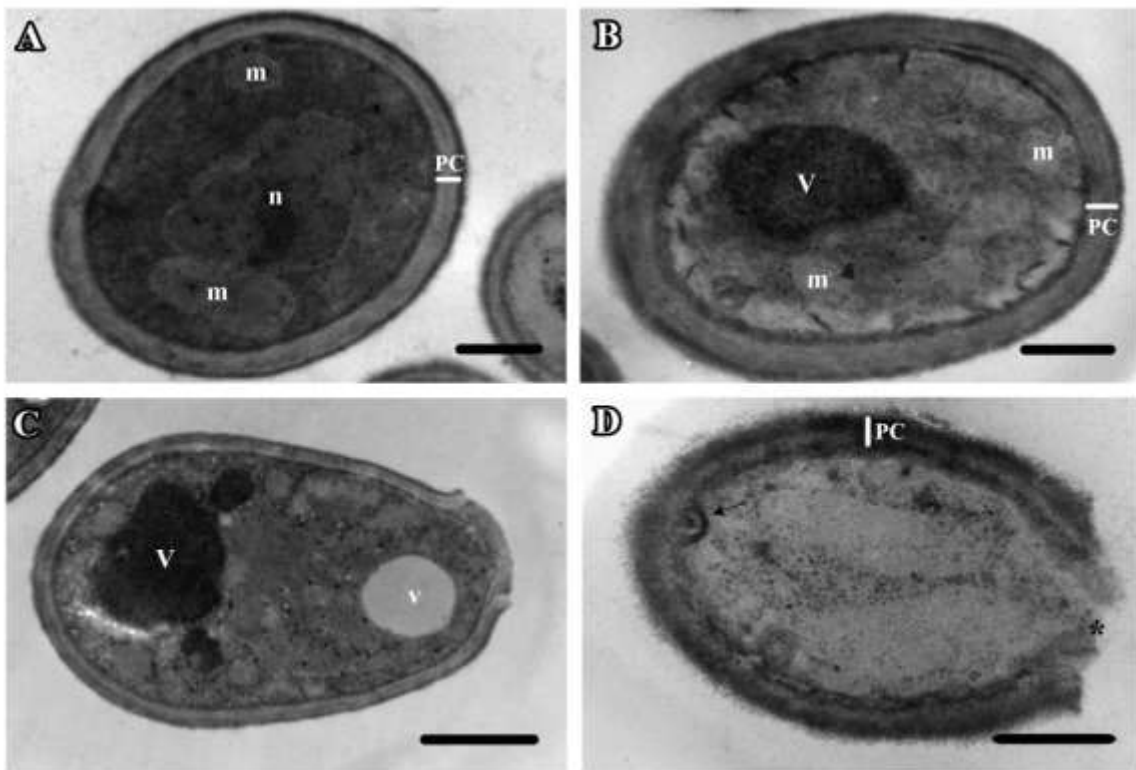


Figura 24: Alterações ultraestruturais de *C. tropicalis* ATCC 28707 tratada com 1 µg/mL de WSP1267 por 48 h, a 35 °C, analisadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Levedura não tratada (A) apresentou uma parede celular (PC) compacta, núcleo (n) e mitocôndrias (m). Por outro lado, células tratadas com o inibidor da SQS apresentaram algumas alterações: aumento da espessura da parede celular (PC nas figuras B e D), presença de vacúolos elétron-densos e elétron-luscentes (v nas figuras B-C), invaginação e descolamento da bicamada lipídica da membrana plasmática (seta na figura D) e ruptura da parede celular e membrana plasmática com consequente extravazamento de material citoplasmático (asterisco na figura D). Barras em A, B e D = 0,5 µm; Barra em C = 1 µm.



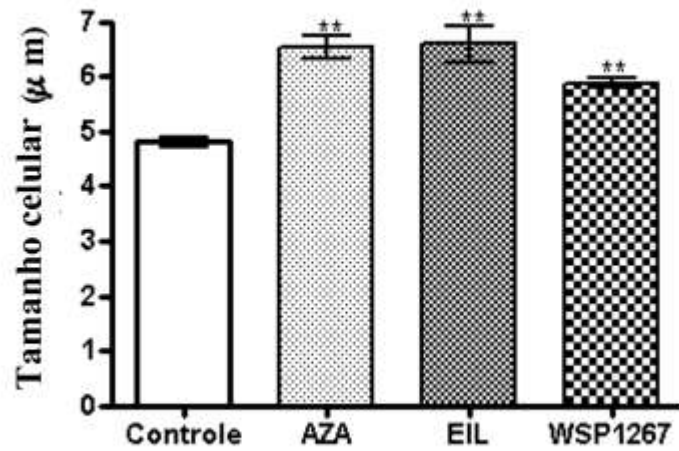
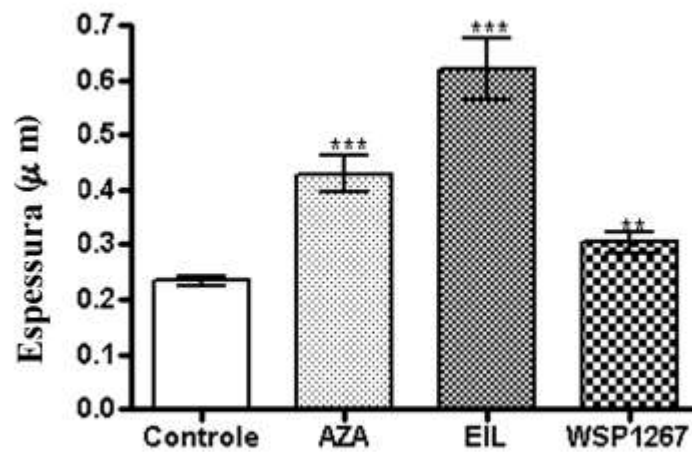
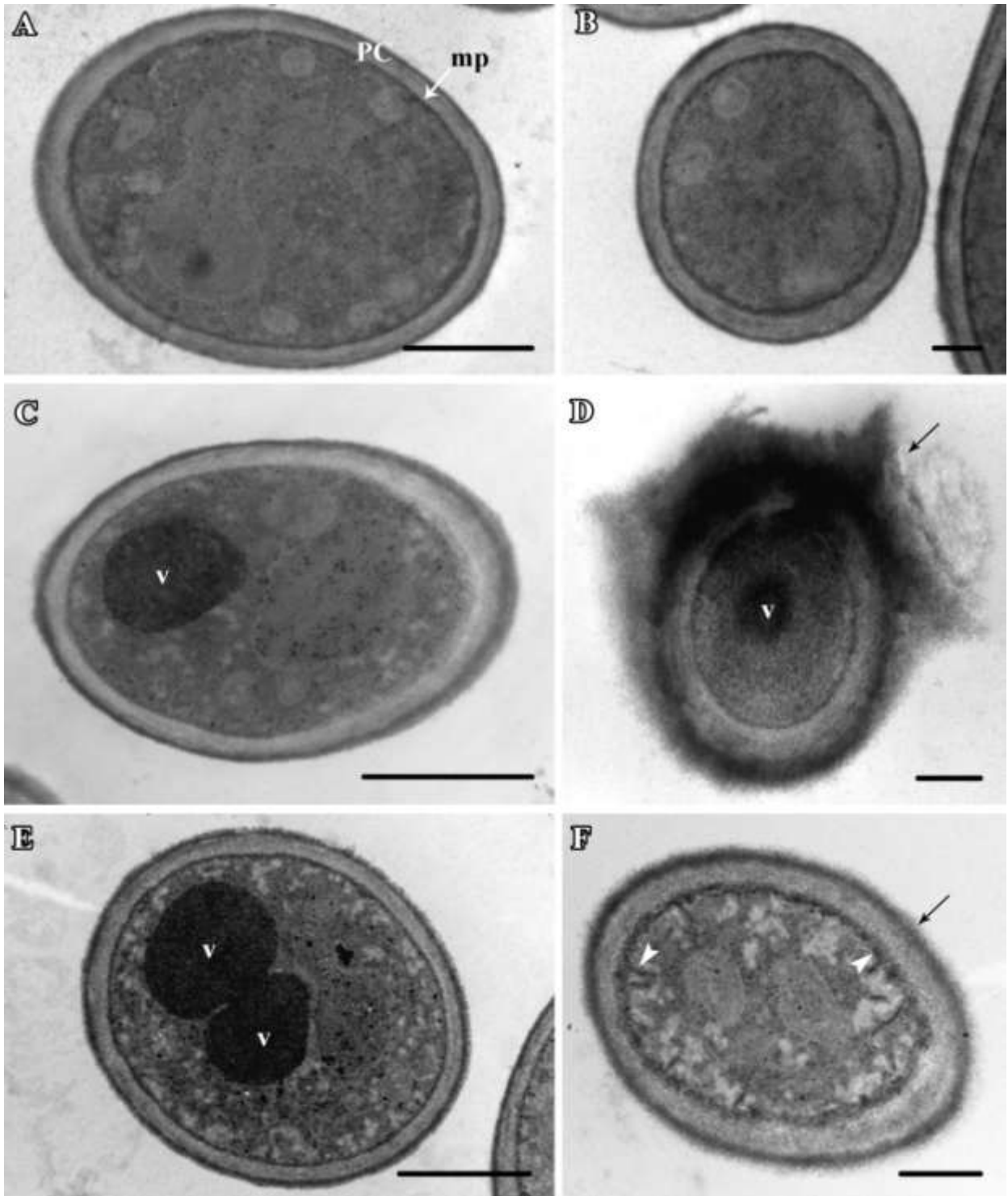
A**B**

Figura 25: Aumento do tamanho celular (**A**) e da espessura de parede celular (**B**) de leveduras de *C. albicans* (isolado 77) tratadas com valores de CI_{50} de inibidores da enzima 24-SMT (AZA e EIL) e da SQS (WSP1267) por 48 h, a 35 °C. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 26: Cortes ultrafinos de leveduras de *Candida tropicalis* ATCC 28707 não tratadas (**A-B**) e tratadas com CI_{50} de inibidores da SQS por 48h, a 35 °C: 1 $\mu\text{g/mL}$ de E5700 (**C-D**) e 1 $\mu\text{g/mL}$ de ER-119884 (**E-F**). Células não tratadas apresentaram uma parede celular compacta (PC), membrana plasmática contínua (mp) e um citoplasma homogêneo. Entretanto, células tratadas com inibidores da SQS apresentaram alterações ultraestruturais como: aumento da espessura da parede celular, destacamento da parede celular (seta preta nas figuras D e F), descontinuidade da membrana plasmática (cabeça de seta branca na figura F) e presença de grandes vacúolos elétrondensos (v nas figuras C-E). Barras em A, C e E = 1 μm ; Barras em F = 0,5 μm ; Barras em B e D = 0,2 μm .



4.7 Análise do perfil lipídico

4.7.1 Análise de Esteróis

Os lipídeos de *C. albicans* (isolado 77) não tratadas e tratadas com inibidores da 24-SMT (AZA e EIL) e da C14 α -lanosterol demetilase (FLC) foram extraídos previamente com clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e os lipídeos neutros foram analisados por cromatografia em coluna de ácido silícico e, posteriormente, analisadas em CG-EM. *C. albicans* (isolado 77) apresentou ergosterol (**E**) (11,81%) seguido do colesterol (**B**) (9,75%) (Tabela 10). Esqualeno (**A**), um importante intermediário da síntese de esteróis, apresentou-se como a molécula majoritária na fração de lipídeos neutros (78,43%). O tratamento com AZA inibiu a síntese de ergosterol e colesterol, mas induziu o aparecimento de intermediários como, colest-5,7,22-trien-3 β -ol (**C**) (em pequenas quantidades) e zimosterol (**D**) (aproximadamente 26% nas concentrações de 0,5 e 2 μ g/mL). As células tratadas com EIL foram observadas, ainda, a presença de colesterol, mas o aparecimento do intermediário colest-5,7,22-trien-3 β -ol (**C**) (Tabela 10). Já o inibidor da C14 α -lanosterol demetilase (FLC) induz o aparecimento de outros esteróis intermediários, tais como, obtusifoliol (**F**), lanosterol (**G**) e 24-metileno dihidrolanosterol (**H**) (Tabela 10).

C. tropicalis ATCC 28707 não tratadas apresentaram o 14 α -metil-ergosta-8,24(28)-dien-3 β -ol (**B**) como esteroide majoritário (37,5 %), seguido por 24-metileno dihidrolanosterol (**E**) (17,2 %), obtusifoliol (**C**) (11,2 %) e lanosterol (**D**) (2,1 %) (Tabela 11). Adicionalmente, esqualeno (**A**) (um intermediário metabólito da biossíntese de esteróis) esteve presente em uma importante proporção na composição de lipídeos neutros (31,9 %). Interessantemente, ergosterol não foi detectado. Em células de *C. tropicalis* ATCC 28707 tratadas com E5700 ou ER-119884 induziram uma drástica redução a níveis não detectáveis dos esteróis **B**, **C**, **D** e **E**, enquanto que o

esqualeno (**A**) apresentou como o único lipídeo neutro detectado na fração de lipídeos neutros (Tabela 10). Pelo cálculo da área do pico de esqualeno no cromatograma obtido pelo CG-EM, foi observado uma redução dose-dependente de esqualeno (>40%) em leveduras tratadas em relação às não tratadas (Figura 27). Por outro lado, o tratamento com a terbinafina induziu um aumento na quantidade de esqualeno acumulado (3-6X) quando comparado as células controle. (Figura 27).

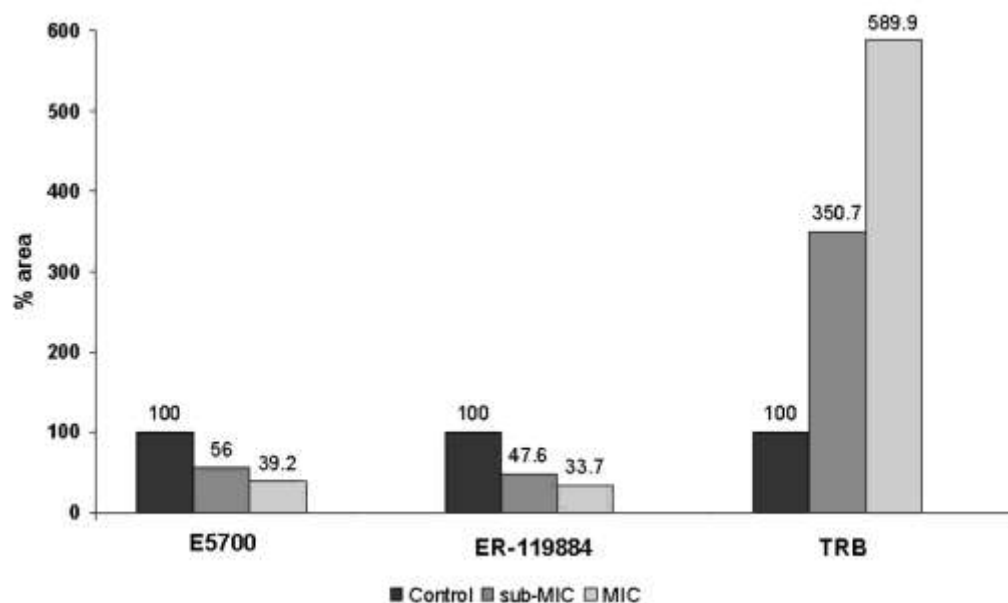


Figura 27: Porcentagem relativa de esqualeno obtido da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). Os lipídeos de *C. tropicalis* ATCC 28707 não tratadas e tratadas com E5700, ER-119884 e terbinafina (TRB) foram extraídos previamente com clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e os lipídeos neutros foram separados pela cromatografia em coluna de ácido silícico e posteriormente analisadas em CG-EM. E5700 e ER-119884 (sub- CI_{50} : 0,25 μ g/mL; CI_{50} : 1 μ g/mL) e TRB (sub- CI_{50} : 0,5 μ g/mL; CI_{50} : 1 μ g/mL).

4.7.2 Análise de Ácidos graxos

C. albicans (isolado 77) controle apresentaram ácido palmítico (C16:0), ácido linolênico (C18:3) e ácido oleico (C18:1) como principais ácidos graxos. Por outro lado, as células tratadas com FLC, AZA e EIL apresentaram este perfil de ácidos graxos alterado (Tabela 12). Células tratadas com AZA apresentaram um aumento na produção de ácidos graxos do tipo de C16 e uma diminuição de C18. Em contraste, o tratamento com EIL e FLC levou a um aumento drástico de ácido linolênico (C18:3) e diminuição de C16 e outros ácidos graxos C18 (C18:2, C18:1 e C18:0) (Tabela 12).

O perfil de ácidos graxos de *C. tropicalis* ATCC 28707 não tratadas revelou a presença predominante de ácido palmítico (C16:0), ácido oleico (C18:1) e de ácido linolênico (C18:3) (Tabela 13). O tratamento com E5700, ER-119884 e terbinafina apresentou uma importante alteração no perfil de ácidos graxos. Todos os tratamentos levaram a um aumento de C:18 em relação a C:16, com um drástico aumento de ácido linolênico (C18:3). Por outro lado, pode-se observar uma diminuição do ácido palmitoleico (C16:1), ácido palmítico (C16:0), ácido linoleico (C18:2), ácido oleico (C18:1) e ácido esteárico (C18:0) (Tabela 13).

Tabela 12: Porcentagem relativa de ácidos graxos extraídos de leveduras de *Candida albicans* (77) controle e tratadas com concentrações de AZA e EIL (inibidores da $\Delta^{24(25)}$ esterol metil transferase), e o antifúngico padrão fluconazol (FLC, inibidor da C14 α -demetilase), por 48h, a 35 °C. Os dados foram obtidos por meio de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM).

Ácidos Graxos		C16:1	C16:0	C18:3	C18:2	C18:1	C18:0
Tempo de retenção (min)		17,74	18,14	18,76	22,31	22,46	23,09
Controle		4,4	23,5	31,7	9,1	20,5	10,5
AZA (µg/mL)	0,12	8,8	19,7	37,5	10,3	16,6	7,04
	0,5	11,4	31,1	24,5	10,5	15,2	7,3
EIL (µg/mL)	0,12	6,2	21,9	42,0	4,5	15,0	10,2
	0,25	6,5	19,9	45,2	4,5	14,0	9,7
FLC (µg/mL)	0,03	3,9	18,1	36,9	12,8	20,2	7,8
	0,12	3,2	18,2	50,7	6,3	14,9	6,6

C16:1 (ácido palmitoleico), C16:0 (ácido palmítico), C18:3 (ácido linolênico), C18:2 (ácido linoleico), C18:1 (ácido oleico), C18:0 (ácido esteárico).

Tabela 13: Porcentagem relativa de ácidos graxos extraídos de *Candida tropicalis* ATCC 28707 controle e tratadas com E5700, ER-119884 (inibidores da esqualeno sintase) e terbinafina (TBF, inibidor da esqualeno epoxidase), por 48h, a 35 °C. Os dados foram obtidos pela utilização de um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (CG-EM).

Ácidos graxos		C16:1	C16:0	C18:3	C18:2	C18:1	C18:0
Tempo de retenção (min)		17,69	18,10	18,72	22,25	22,42	23,02
Controle		9,7	26,3	24,8	10,9	23,4	4,7
E5700 (µg/mL)	0,25	5,2	25,9	46,8	4,3	11,7	6,0
	1,0	ND	22,6	47,2	4,8	14,4	10,9
	2,0	1,6	21,6	45,8	9,7	11,0	10,2
ER-119884(µg/mL)	0,25	4,9	25,2	41,9	7,3	15,1	5,6
	1,0	4,2	19,0	55,4	7,3	8,4	5,6
	2,0	2,2	21,6	53,31	6,1	9,9	6,9
TRB (µg/mL)	0,5	ND	52,9	9,1	ND	18	19,9
	1,0	ND	25,6	62,8	ND	7,7	3,8
	2,0	ND	20,2	59,5	3,6	8,6	8,1
C16:1 (ácido palmitoleico), C16:0 (ácido palmitico), C18:3 (ácido linolênico), C18:2 (ácido linoleico), C18:1 (ácido oleico), C18:0 (ácido esteárico). ND=não detectado.							

4.7.3 Análise de fosfolipídios

Na figura 28 pode-se observar a separação dos padrões de fosfolipídios por meio de uma cromatografia em camada delgada de sílica gel: **(1)** L- α -fosfatidil-D-L-glicerol (banda não detectada), **(2)** L- α - ácido fosfatídico dipalmitoil ($R_f=0$), **(3)** L- α - fosfatidil-N₁N-

dimetil etanolamina dipalmitoil ($R_f=0,62$), **(4)** L- α -fosfa-L-serina (banda não detectada), **(6)** L- α -fosfatidilcolina ($R_f=0,38$), **(7)** L- α -fosfatidilinositol ($R_f=0,21$), **(8)** 3-sn- L- α - ácido fosfatídico ($R_f=0,16$) e **(9)** L- α -fosfatidiletanolamina (0,52). As colunas **(5)** e **(10)** representam uma mistura dos padrões de fosfolipídios. Esses valores de R_f foram utilizados para identificar as bandas encontradas em cromatograma de amostras de lipídeos polares analisadas a seguir.

Uma análise qualitativa do perfil de fosfolipídios extraídos de leveduras tratadas com diferentes drogas pode ser avaliada por meio de uma CCD. Qualitativamente, foi detectado alterações no perfil de fosfolipídios em *C. albicans* (isolado 77) tratadas com AZA, EIL e FLC (Figura 29). *C. albicans* (isolado 77) não tratada apresentou os seguintes fosfolipídios: **(1)** L- α - ácido fosfatídico dipalmitoil ($R_f=0$), **(2)** não identificado ($R_f=0,02$), **(3)** não identificado ($R_f=0,09$), **(4)** 3-sn- L- α - ácido fosfatídico ($R_f=0,15$), **(5)** L- α - fosfatidilinositol ($R_f=0,21$), **(6)** não identificado ($R_f=0,27$), **(7)** L- α -fosfatidilcolina ($R_f=0,40$), **(8)** L- α -fosfatidiletanolamina ($R_f=0,56$), **(9)** não identificado ($R_f=0,75$) e **(10)** não identificado ($R_f=0,77$). Qualitativamente, FLC parece não afetar drasticamente a síntese de fosfolipídios, porém observa-se que em 0,12 $\mu\text{g/mL}$ houve aumento da banda **(3)**, enquanto que em 0,5 $\mu\text{g/mL}$, diminui drasticamente as bandas **(3)**, **(4)** e **(6)**. Interessantemente, alterações no perfil de fosfolipídios podem ser observadas em leveduras tratadas com AZA e EIL. A diminuição dose-dependente da intensidade das bandas dos fosfolipídios pode estar relacionada com o efeito inibitório do crescimento celular dose-dependente da droga, exceto para a concentração de 2,0 $\mu\text{g/mL}$ de AZA, onde houve um aumento de L- α -fosfatidilinositol **(5)**. Já em leveduras tratadas com diferentes concentrações de EIL, os efeitos da biossíntese de fosfolipídios foram mais drásticos comparados com o AZA e o FLC. Podemos detectar a ausência de 3-sn-L- α -ácido

fosfatídico **(4)**, diminuição de L- α -ácido fosfatídico dipalmitoil **(1)** e da banda **(3)**, e um aumento de L- α -fosfatidilcolina **(7)**.

A análise de fosfolipídios da fração polar extraída de *C. tropicalis* ATCC 28707 foi realizada por meio de CCD. As células controle apresentaram as seguintes bandas: **(1)** L- α -ácido fosfatídico dipalmitoil ($R_f=0$); **(2)** não identificado ($R_f=0,02$), **(3)** não identificado ($R_f=0,07$), **(4)** 3-sn- L- α - ácido fosfatídico ($R_f=0,13$) , **(5)** L- α -fosfatidilinositol ($R_f=0,18$), **(6)** L- α -fosfatidilcolina ($R_f=0,40$), **(7)** L- α -fosfatidiletanolamina ($R_f=0,79$), **(8)** L- α -fosfatidil-N₁N-Dimetil etanolamine dipalmitoil ($R_f=0,86$) (Figura 30). Em células tratadas com diferentes concentrações de terbinafina, E5700 e ER-119884 parecem não afetar com a síntese de fosfolipídios, apesar de observarmos uma diminuição qualitativa dose-dependente das bandas, que pode estar relacionada com uma diminuição do número de células induzida pelo efeito inibitório dose-dependente das substâncias (Figura 30).

Figura 28: Cromatografia em camada delgada dos fosfolipídios padrão: **(1)** L- α -fosfatidil-D-L-glicerol (Rf=não detectado), **(2)** L- α - ácido fosfatídico dipalmitoil (Rf=0), **(3)** L- α -fosfatidil-N₁N-Dimetil etanolamina dipalmitoil (Rf=0,62), **(4)** L- α -fosfa-L-serina (Rf=não detectado), **(6)** L- α -fosfatidilcolina (Rf=0,38), **(7)** L- α -fosfatidilinositol (Rf=0,21), **(8)** 3-sn-L- α - ácido fosfatídico (Rf=0,16) e **(9)** L- α -fosfatidiletanolamina (0,52). Colunas **(5)** e **(10)** são misturas dos padrões de fosfolipídios.

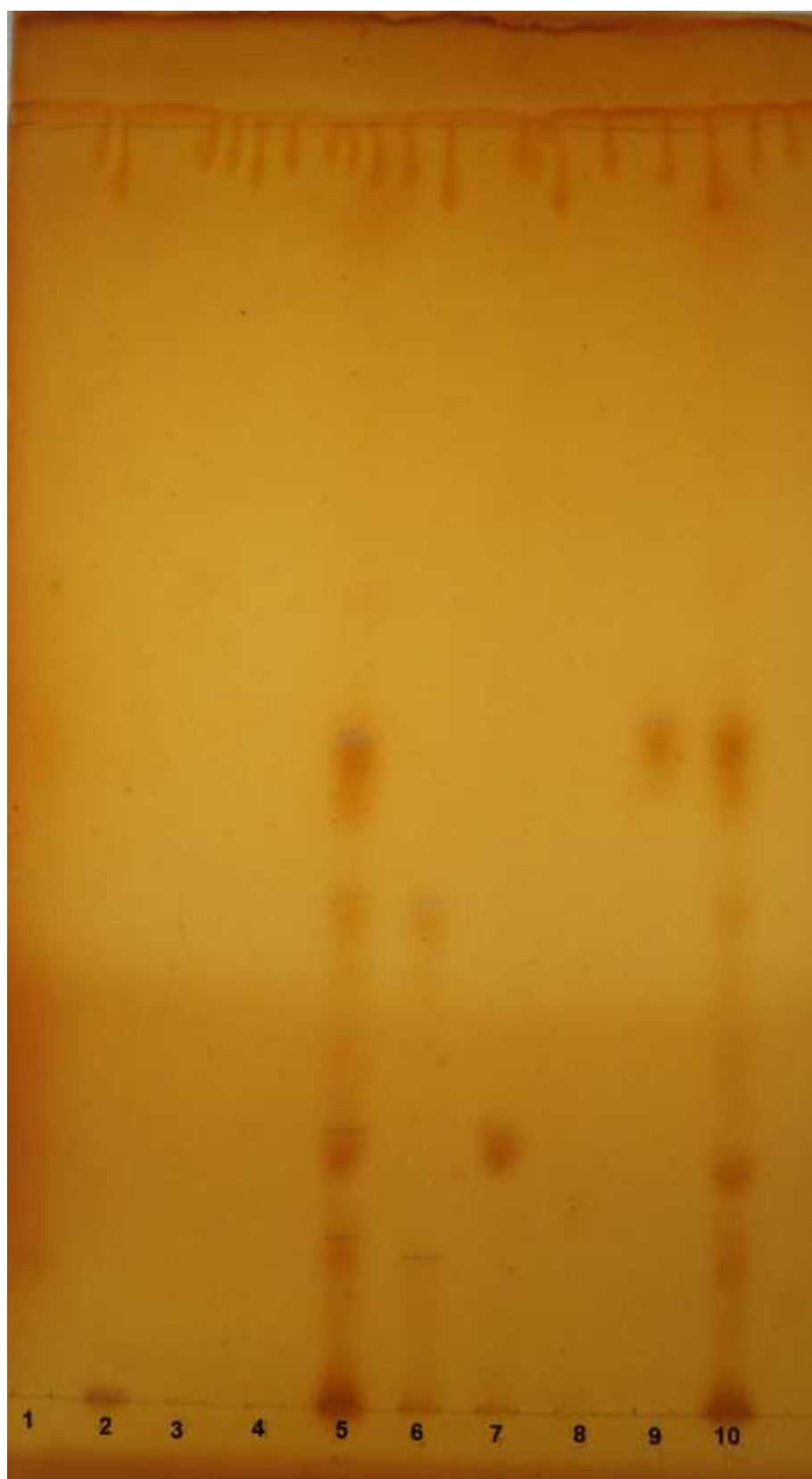


Figura 29: Cromatografia em camada delgada da fração polar de lipídeos extraídos de *Candida albicans* (77) tratada com diferentes concentrações de fluconazol, AZA e EIL diluídas em meio RPMI 1640 por 48 h, a 35 °C. As concentrações que inibiram 50% do crescimento fúngico foram de 0,12, 0,5 e 0,25 µg/mL de fluconazol, AZA e EIL, respectivamente. Podem-se observar os seguintes fosfolipídios: **(1)** L- α - ácido fosfatídico dipalmitoil (Rf=0), **(2)** não identificado (Rf=0,02), **(3)** não identificado (Rf=0,09), **(4)** 3-sn-L- α - ácido fosfatídico (Rf=0,15), **(5)** L- α -fosfatidilinositol (Rf=0,21), **(6)** não identificado (Rf=0,27), **(7)** L- α -fosfatidilcolina (Rf=0,40), **(8)** L- α -fosfatidiletanolamina (Rf=0,56), **(9)** não identificado (Rf=0,75) e **(10)** não identificado (Rf=0,77). Um padrão de fosfolipídios **(P)** foi utilizado. Concentrações das drogas estão em µg/mL.

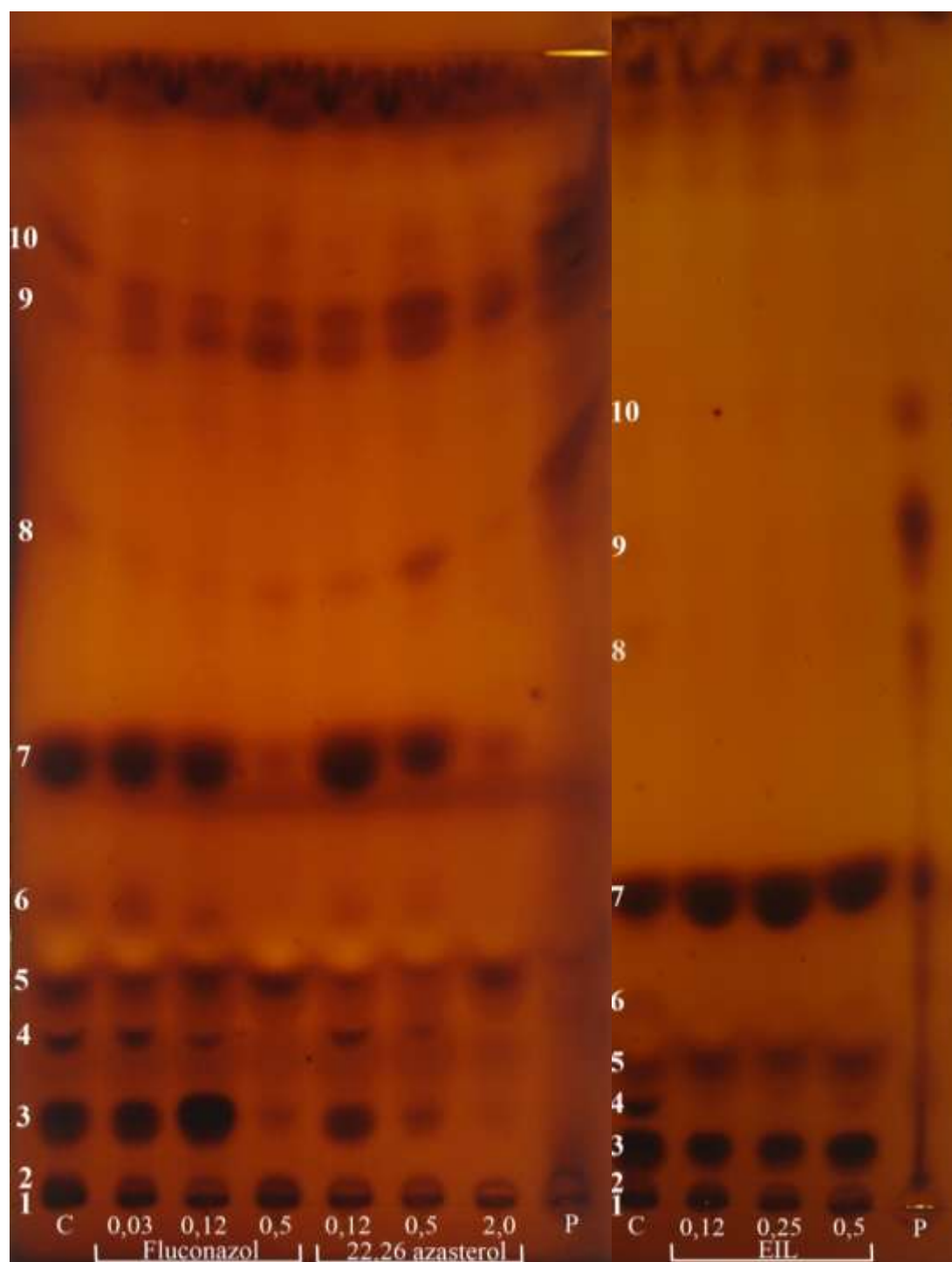
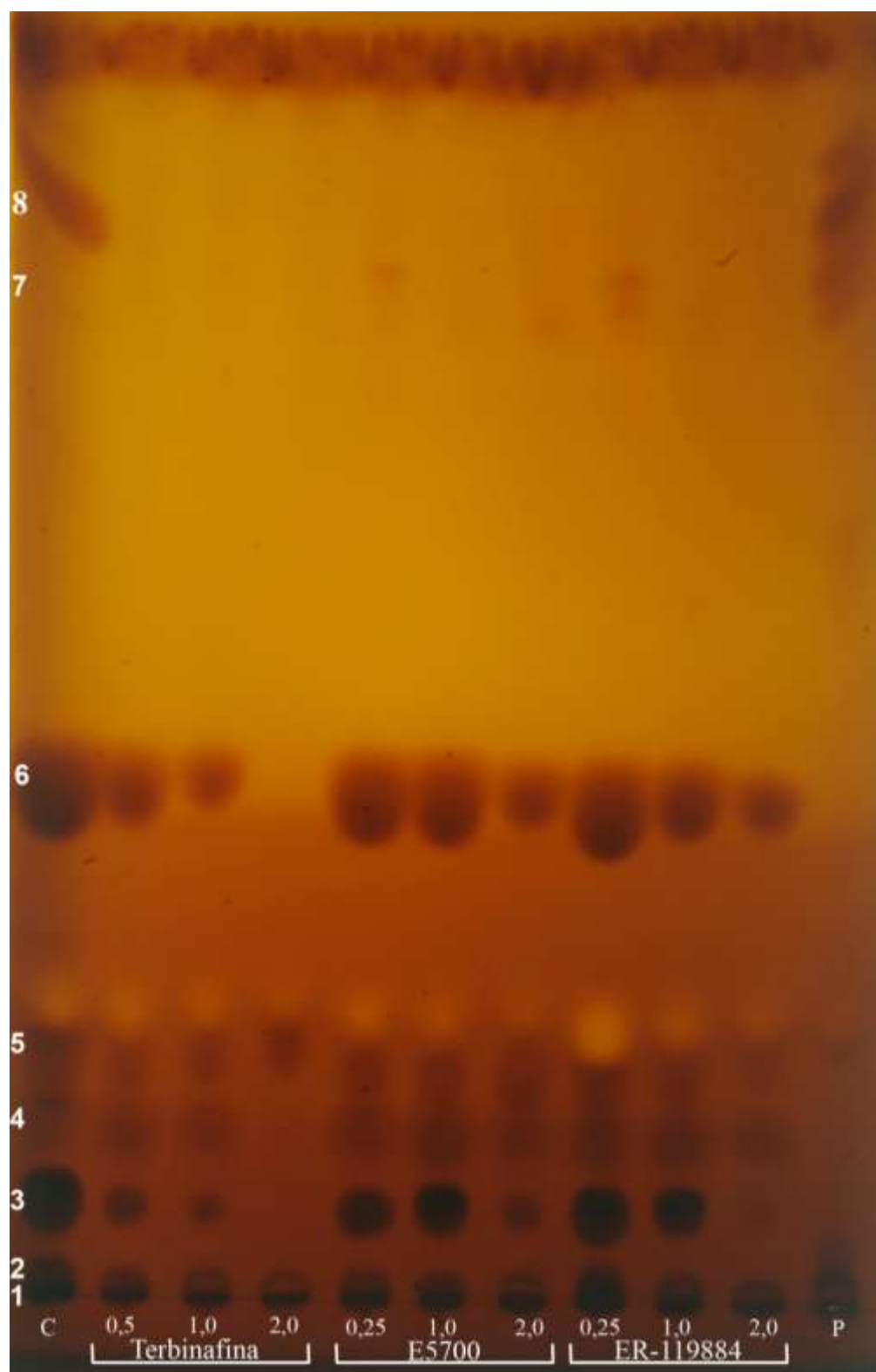


Figura 30: Cromatografia em camada delgada da fração polar de lipídeos extraídos de leveduras de *Candida tropicalis* (ATCC 28707) tratadas com diferentes concentrações de terbinafina, E5700 e ER-119884 diluídas em meio RPMI 1640, por 48 h, a 35 °C. As concentrações que inibiram 50% do crescimento fúngico foram de 1,0 µg/mL para todas as drogas analisadas. Podem-se observar os seguintes fosfolipídios: **(1)** L- α - ácido fosfatídico dipalmitoil (Rf=0); **(2)** não identificado (Rf=0,02), **(3)** não identificado (Rf=0,07), **(4)** 3-sn-L- α - ácido fosfatídico (Rf=0,13), **(5)** L- α -fosfatidilinositol (Rf=0,18), **(6)** L- α -fosfatidilcolina (Rf=0,40), **(7)** L- α -fosfatidiletanolamina (Rf=0,79), **(8)** L- α -fosfatidil-N₁N-Dimetil etanolamine dipalmitoil (Rf=0,86). Um padrão de fosfolipídios **(P)** foi utilizado. Concentrações das drogas estão em µg/mL.



4.8 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade dos inibidores da enzima 24-SMT (AZA e EIL) e da SQS (WSP1267) foi avaliada em monocamadas de células de rim de macaco verde (Vero) utilizando o ensaio colorimétrico da sulforrodamina B. Para ambos os inibidores da 24-SMT, a CC_{50} foi de 40 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde ao índice de seletividade médio de 80 para AZA e 20 para EIL (Tabela 14). A substância WSP1267 apresentou efeito citotóxico maior que AZA e EIL, com valor de CC_{50} de 12,1 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 6,05. Para as drogas antifúngicas padrão, AMB apresentou CC_{50} de 28,2 e seletividade para leveduras de *Candida* spp. de 470, enquanto que o FLC e ITC apresentaram IS superiores a 800 (Tabela 14).

Tabela 14: Concentração citotóxica de 50 % (CC_{50}) de inibidores da enzima 24-SMT (AZA e EIL) e da SQS (WSP1267) em monocamada de células Vero. Os valores de CC_{50} foram obtidos para os antifúngicos padrão (anfotericina B, fluconazol e itraconazol) e os índices de seletividade (IS) calculados, como sendo a razão da CC_{50} pela CI_{50} , concentração que inibe 50% do crescimento fúngico.

Drogas	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS
AZA	40	0,5	80
EIL	40	2	20
WSP1267	12,1	2	6,05
AMB	28,2	0,06	470
FLC	>400	0,5	>800
ITC	>400	0,03	>800

5. Discussão

Importante aumento da incidência de espécies de *Candida* resistentes aos agentes antifúngicos, especialmente, agentes azólicos (FLC e ITC) tem sido descrito, sendo mais elevado na América do Norte (10,2%), e similar ao continente europeu (5,2 %) quando comparada com o Brasil (5,7 %) (OSTROSKY-ZEICHNER, 2003, ALMIRANTE *et al.*, 2005, COLOMBO *et al.*, 2006).

Trabalhos prévios têm descrito uma alta susceptibilidade de isolados de *C. albicans* a agentes azólicos e a AMB. No entanto, espécies de CNA são geralmente menos susceptíveis por serem intrinsicamente resistente ao FLC e ITC, como *C. krusei* e *C. glabrata* (GODOY *et al.*, 2003; TORTORANO *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2006; BORG-VON ZEPELIN *et al.*, 2007). Como demonstrado por outros autores (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2003; ALMIRANTE *et al.*, 2005; COLOMBO *et al.*, 2006), nenhum dos nossos isolados clínicos foi resistente a AMB ($CI_{90} \leq 1 \mu\text{g/mL}$). Valores de CIM encontrados para FLC e ITC foram similares aos encontrados por outros trabalhos (GODOY *et al.*, 2003; TORTORANO *et al.*, 2006; COLOMBO *et al.*, 2006; BORG-VON ZEPELIN *et al.*, 2007). Entretanto, nosso trabalho revelou que cepas de *Candida* resistentes ao FLC foram somente observadas em espécies de CNA (6,8% dos isolados). Além disso, um isolado de *C. albicans* (1,5 %) e cinco CNA (7,7 %) demonstraram resistência ao ITC.

A observação de alta correlação positiva entre os valores de CIs do FLC e ITC ($r=0,79$ para CI_{50} e $r=0,71$ para CI_{90}), nosso trabalho, sugere que resistência cruzada entre FLC e ITC pode ocorrer. Este resultado corrobora com outros já demonstrados, inclusive

resistência cruzada entre os antigos e os novos triazóis (por ex. FLC e ITC versus voriconazol e posaconazol) (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

O uso de inibidores de outras etapas da via biossintética do ergosterol é, também, uma alternativa para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos. Muitos inibidores da via mevalonato e isoprenóide, bem como inibidores de etapas exclusivamente da via de síntese de ergosterol, têm sido extensivamente estudados contra fungos (LÓRÁND; KOCSIS, 2007) e protozoários (DE SOUZA; RODRIGUES, 2009). Por exemplo, fluvastatina, um inibidor sintético da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, desenvolvido como agente hipocolesterolemia, apresentou efeito sinérgico e fungicida em combinação com FLC e ITC contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *Cryptococcus neoformans*, incluindo cepas FLC resistentes (CHIN *et al.*, 1997). Os ácidos zaragózicos, inibidores competitivos do farnesil pirofosfato, inibem a enzima SQS levando a inibição do crescimento fúngico, como por ex. *C. albicans* (BERGSTROM *et al.*, 1993; HORNBY *et al.*, 2003). Outro alvo bastante interessante da via biossintética dos esteróis é a enzima 24-SMT, que cataliza a reação de incorporação do grupo metil na posição 24 da cadeia lateral de esterol em fungos e tripanossomatídeos e está ausente em células de mamíferos. Algumas substâncias inibem a enzima 24-SMT e apresentam potente efeito inibitório contra diferentes espécies de fungos (BURBIEL; BRACHER, 2003). Neste trabalho, mostramos a atividade antifúngica de inibidores da 24-SMT e da SQS contra diferentes espécies de *Candida*.

Nossos resultados mostram que os inibidores da 24-SMT (AZA e EIL) foram ativos contra isolados clínicos de *Candida* spp., com valores de CI_{50} menores que 2 $\mu\text{g/mL}$ para 73 % e 88% dos isolados após tratamento com AZA e EIL, respectivamente. Interessantemente, algumas cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC e ao ITC foram

susceptíveis aos inibidores da 24-SMT. Entretanto, crescimento residual de *Candida* depois do tratamento com AZA foi similar àqueles observados para o FLC e ITC. Por outro lado, esse fenômeno não foi observado para o EIL. Outro dado relevante foi que nenhuma correlação entre os valores de CI dos agentes azólicos com os inibidores da 24-SMT foi observada. Por outro lado, uma correlação positiva foi observada entre AZA e EIL, podendo existir uma grande possibilidade de resistência cruzada entre esses dois inibidores da 24-SMT.

Com relação ao efeito fungistático/fungicida dos inibidores da 24-SMT, para mais de 50% dos isolados clínicos, os inibidores da 24-SMT apresentaram efeito fungistático. No entanto, foi observado um possível efeito fungicida em amostras de CNA. Uma concentração de 4,0 µg/mL de 24-SMT foi o suficiente para matar 100% de *C. lusitanae*, *C. zeylanoides* e *C. rugosa* e 50% de *C. glabrata*.

Estudos prévios têm mostrado que derivados azasteróis tem atividade antifúngica contra diferentes espécies de fungos (BURBIEL; BRACHER, 2003). O 15-azasterol, em concentrações variando de 0,01 µg/mL a 4,08 µg/mL, inibe o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e *C. albicans*, com um acúmulo de moléculas intermediárias da síntese de esteróis (HAYS *et al.*, 1977a,b; GEORGOPAPADAKOU *et al.*, 1987). Já os análogos do 15-azasterol são fungistáticos em concentrações de 0,8 a 3,1 µg/mL e fungicidas de 3,1 a 6,3 µg/mL (BURBIEL; BRACHER, 2003), valores similares aos que foram encontrados no nosso estudo.

Nosso grupo de pesquisa, recentemente, mostrou que EIL possuiu ação antifúngica contra *C. neoformans* e *C. gatti* similar ao encontrado contra *Candida* spp., correspondendo a medianas de CI₅₀ de 1 e 2 µg/mL, respectivamente (GUERRA, 2009; COSTA, 2009). Por outro lado, AZA mostrou-se menos ativo para *Cryptococcus* spp. (CI₅₀=8 µg/mL) que

Candida spp ($CI_{50}=0,5 \mu\text{g/mL}$) (GUERRA, 2009; COSTA, 2009). Outros trabalhos têm mostrado atividade antifúngica de AZA contra *P. brasiliensis* (VISBAL *et al.*, 2003) e *P. carinii* (URBINA *et al.*, 1997). A concentração de $5 \mu\text{M}$ ($2,05 \mu\text{g/mL}$) foi efetiva para inibir 100% do crescimento de *P. brasiliensis*, enquanto para *P. carinii* foi de $0,3 \mu\text{M}$ ($0,12 \mu\text{g/mL}$), resultados muito próximos ao obtidos em isolados de *Candida* spp.

Adicionalmente, outros estudos têm mostrado atividade antiprotozoária de AZA e EIL contra as formas epimastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* (URBINA *et al.*, 1995), promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (URBINA *et al.*, 1995; RODRIGUES *et al.*, 2002), *Toxoplasma gondii* (DANTAS-LEITE *et al.*, 2004) e *Giardia lamblia* (MAIA *et al.*, 2007), com valores de CIM abaixo de micromolar a submicromolar. Para os protozoários, EIL apresentou ser mais ativo que AZA. Em contraste, nós observamos, nesse estudo, uma maior atividade do AZA que EIL contra isolados clínicos de *Candida* spp.

Neste trabalho, nós decidimos investigar, também, os efeitos dos inibidores da SQS, da classe das quinuclidinas, como uma estratégia alternativa em potencial para o tratamento de candidíases, baseado em estudos prévios dessas moléculas contra tripanossomatídeos (DE SOUZA; RODRIGUES, 2009).

BPQ-OH foi a primeira molécula de quinuclidina a ser desenvolvida como agente hipocolesterolemiantes que apresentou potente atividade contra a enzima SQS recombinante de *Leishmania major* (LORENTE *et al.*, 2005), bloqueando a biossíntese de esteróis e o crescimento de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* em baixas concentrações, de nanomolar a subnanomolar (URBINA *et al.*, 2002; URBINA *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2008). Entretanto, BPQ-OH não apresentou nenhuma atividade antifúngica sobre *Candida* spp. (ATCC) ($CI>16 \mu\text{g/mL}$).

Posteriormente, nós decidimos avaliar as moléculas derivadas de BPQ-OH da série 3 de síntese, já que eles mostraram alta atividade e seletividade para a enzima SQS de *L. major* (CAMMERER *et al.*, 2007). Dentre estas moléculas arilquinuclidinas, somente WSP1267 apresentou atividade antifúngica contra isolados clínicos de *Candida* spp. com valores de mediana de CI_{50} e CI_{90} de 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Dado da literatura revelou que esta atividade inibitória do WSP1267 foi, também, observada na enzima SQS de *L. major* e em células de *L. major*, e foi relacionada à presença de uma substituição hidrofóbica no anel aromático (CAMMERER *et al.*, 2007). Além disso, para a atividade antiprotozoário foi-se necessário a presença do grupo aromático ligado diretamente ao grupo funcional quinuclidina (CAMMERER *et al.*, 2007). Ambas as moléculas, BPQ-OH e WSP1267, possuem o grupo aromático contendo dois grupos fenil e estão diretamente ligados ao anel quinuclidina, mas os grupos fenil da molécula WSP1267 estão separados por três ligações, enquanto que no BPQ-OH são separados por somente uma ligação (Figura 13). Essa observação pode sugerir que a distância de mais de uma ligação entre o grupo fenil da cadeia lateral do anel quinuclidina é requerido para a atividade antifúngica sobre *Candida* spp.

Estudos de citotoxicidade do AZA e EIL revelaram que para ambos os inibidores da 24-SMT, a CC_{50} foi de 40 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde ao índice de seletividade médio de 80 para AZA e 20 para EIL. Por outro lado, WSP1267 apresentou efeito citotóxico maior que AZA e EIL, com valor de CC_{50} de 12,1 $\mu\text{g/mL}$ sobre células Vero. Resultados obtidos por Cammerer *et al.* (2007) foram similares ao encontrado em nosso trabalho, revelando que a CC_{50} de WSP1267 para células L-6 foi de 13,7 $\mu\text{g/mL}$ (47,2 μM).

Interessantemente, as moléculas E5700 e ER-119884, inibidores da enzima SQS apresentou alta atividade antifúngica somente contra *C. tropicalis* ATCC 28707, uma cepa

resistente ao FLC, ITC e AMB e susceptível a terbinafina. Trabalhos realizados por Cammerer *et al.* (2007) e Rodrigues *et al.* (2008) mostraram que derivados quinuclidinas BPQ-OH, E5700 e ER-119884 foram ativos para SQS recombinante de *L. major*, e células de *Leishmania* sp., *Trypanosoma brucei* e *Plasmodium falciparum* em concentrações submicromolares.

Terbinafina (inibidor da esqualeno epoxidase) é ativo contra vários fungos patogênicos, principalmente dermatófitos, fungos dimórficos, e algumas leveduras, porém alguns estudos indicam baixa atividade contra *C. albicans*. Adicionalmente, não apresenta atividade sobre *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. tropicalis* (CIM > 128 µg/mL) (RYDER *et al.*, 1998). Embora esta droga apresente baixa atividade contra *Candida*, *C. tropicalis* ATCC 28707 foi susceptível a terbinafina (CI₅₀ = 1 µg/mL). Adicionalmente, neste trabalho foi realizado teste de susceptibilidade da terbinafina contra outros isolados clínicos de *C. tropicalis* (n=14), mas nenhum deles foi susceptível em concentrações inferiores ou igual a 32 µg/mL (dados não mostrados).

C. tropicalis ATCC 28707 foi isolada de um paciente com pielonefrite, que foi tratada primeiramente, com AMB, onde no início do tratamento foi susceptível ao antifúngico (CIM = 0,098 µg/mL). Entretanto, após três meses de tratamento, o fungo apresentou resistência a AMB (CIM = 50 µg/mL). O paciente foi, então, tratado com 5-FC e curado (WOODS *et al.*, 1974). Nosso trabalho descreve pela primeira vez, que além da resistência a AMB, *C. tropicalis* ATCC 28707 é também resistente ao FLC e ITC *in vitro*.

Análise prévia do perfil de esteróis de isolados de *C. tropicalis* resistente e sensível ao FLC não revela nenhuma diferença qualitativa entre os perfis lipídicos entre as cepas, todas apresentaram ergosterol como estero principal (78,9% a 92,5%) (VANDEPUTTE *et al.*, 2005). Esses autores sugerem que a superexpressão do gene *ERG11* poderia ser

responsável pela resistência adquirida aos azóis. Resultados similares, também, foram publicado por Sanati *et al.* (1997).

Em contraste, Woods *et al.* (1974) mostraram que *C. tropicalis* ATCC 28707 não produz ergosterol, acumulando três intermediários da síntese de esteróis, porém não identificados pelos autores. Nós mostramos, neste trabalho, que leveduras de *C. tropicalis* ATCC 28707, não sintetizaram ergosterol, mas acumulam esqualeno e 14 α -metil esteróis, com um grupo metileno na cadeia lateral, principalmente 14 α -metil-ergosta-8,24(28)-dien-3 β -ol (B), 24-metilenodihidrolanosterol (E) e obtusifoliol (C) (Tabela 10). Provavelmente, os esteróis B, E e C identificados pelo nosso trabalho, se referem àqueles três intermediários não identificados por Woods *et al.* (1974).

Trabalhos prévios têm demonstrado que a ausência de ergosterol na membrana plasmática de *C. albicans* pode ser a causa de resistência à AMB (VAN DEN BOSSCHE *et al.*, 1998). Adicionalmente, autores têm demonstrado que leveduras de *C. albicans* tratadas com FLC que acumulam 14 α -metil-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol, devido a um defeito na enzima $\Delta^{5,6}$ -desaturase (codificada pelo gene *ERG3*), são frequentemente resistentes aos agentes azólicos (KELLY *et al.*, 1995). Como consequência da mutação do gene *ERG3*, estas células não produzem ergosterol, e a ausência deste fornece um mecanismo causando resistência cruzada à AMB (LUPETTI *et al.*, 2002). Adicionalmente, um defeito na C14 α -lanosterol demetilase (codificada pelo gene *ERG11*) pode resultar em um acúmulo de 14 α -metil esteróis, especialmente 14 α -metil-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol e 14 α -metil fecosterol (LUPETTI *et al.*, 2002). Com base nesses trabalhos, podemos sugerir que a resistência de *C. tropicalis* ATCC 28707 à AMB, ao FLC e ao ITC pode ser resultado de alterações de enzimas como, $\Delta^{5,6}$ -desaturase e C14 α -lanosterol demetilase, que fazem parte da via de biossíntese do ergosterol.

Para avaliar as alterações morfológicas em leveduras de *C. albicans* (isolado 77) e *C. tropicalis* ATCC 28707 tratadas com inibidores da síntese de esteróis, duas diferentes abordagens foram utilizadas neste trabalho: (i) marcação de lipídeos neutros e DNA com corantes fluorescentes específicos (“nile red” e DAPI, respectivamente) e (ii) observação das alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

Tratamento de leveduras de *C. albicans* (isolado 77) tratadas com AZA, EIL e WSP1267 causaram drásticas alterações na sua ultraestrutura celular. Os principais efeitos destes inibidores incluem aumento do tamanho celular e da espessura de parede celular, um pronunciado descolamento da membrana plasmática da parede celular, presença de pequenas vesículas na região periplasmática, no citoplasma e também associadas à membrana, presença de vacúolos eletrôn-densos e inchaço mitocondrial. Efeitos mais drásticos foram encontrados, como anormalidades nucleares, células colapsadas e rompimento da membrana plasmática. Alterações similares foram encontradas em leveduras de *C. tropicalis* ATCC 28707 tratadas com WSP1267, E5700 e ER-119884.

Essas alterações foram similares aos resultados previamente descritos em *Candida* spp. após tratamento com diferentes azóis (BORGES; VAN DE VEN, 1987; BELLANGER *et al.*, 1997; KOUL *et al.*, 1999; HAZEN *et al.*, 2000). Borges e Van de Ven (1987) demonstraram que a exposição de *C. albicans* ao ITC leva a alterações de parede celular e presença de vacúolos no citoplasma, que poderiam ser inclusões lipídicas. Essas mudanças celulares, freqüentemente, estavam acompanhadas com o volume celular aumentado e com a divisão celular prejudicada. Adicionalmente, estudos realizados por Hazen *et al.* (2000) revelaram que *Candida* tratada com FLC possui uma importante retração da membrana plasmática da parede celular. Por outro lado, *C. albicans* tratada com baixas concentrações de AMB leva a condensação e marginalização da cromatina,

separação do envelope nuclear e a fragmentação nuclear, característicos de células em apoptose (PHILLIPS *et al.*, 2003). Altas concentrações de AMB induzem alterações celulares características de necrose, com presença de grandes vacúolos apoptóticos (PHILLIPS *et al.*, 2003).

Bahmed *et al.* (2005) mostraram que o aumento da espessura de parede celular de *Candida* pode estar relacionada com alterações na composição de parede celular induzida pelo tratamento com AMB. A presença de vesículas no citoplasma e brotando da membrana plasmática para o espaço periplasmático, encontradas no nosso trabalho, foram similares as vesículas presentes nos corpos multi-vesiculares e estrutura de mielina-like encontrados em *Leishmania* (RODRIGUES *et al.*, 2002; 2007) e *T. cruzi* (VIVAS *et al.*, 1996) tratados com AZA e EIL.

Coloração com “nile red” revelou a presença de acúmulo de lipídeos neutros no citoplasma celular após o tratamento com inibidores de 24-SMT e SQS em *C. albicans* (isolado 77) e *C. tropicalis* ATCC 28707, confirmando que essas substâncias podem induzir uma perturbação na biossíntese de lipídeos. A presença de marcações lipídicas em leveduras tratadas, observadas por microscopia de fluorescência, pode ser correlacionada com os vacúolos elétron-densos observados por microscopia eletrônica de transmissão, indicando que o tratamento com esses inibidores induziu o acúmulo de lipídeos no citoplasma, o que poderia estar interferindo diretamente com o crescimento fúngico. Observações similares foram descritos em *L. amazonensis* tratada com 24-SMT e derivados quinuclidinas, que induziram muitas anormalidades no conteúdo lipídico com o acúmulo de moléculas intermediárias da síntese de esteróis em células tratadas com inibidores da 24-SMT (RODRIGUES *et al.*, 2002) e pela depleção total de esteróis endógenos e

concomitante acúmulo de colesterol exógeno, que não foi o suficiente para manter a viabilidade dos parasitas tratados com inibidores da SQS (RODRIGUES *et al.*, 2008).

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão revelaram importantes alterações na integridade da parede celular e da membrana plasmática, que poderiam estar relacionada com a depleção de esteróis endógenos necessários para manutenção da estrutura e função celular. Adicionalmente, foi observada a presença de pequenas vesículas na região periplasmática, e o acúmulo de vacúolos elétron-densos que são coerentes com as imagens obtidas por microscopia de fluorescência. Essas alterações são claramente relacionadas com o bloqueio da biossíntese de ergosterol como observado em *L. amazonensis* após tratamento com azasteróis (inibidores da 24-SMT) e outros derivados quinuclidinas (inibidores da SQS) (RODRIGUES *et al.*, 2005; 2007; 2008).

Em adição, a marcação do DNA com DAPI indicou uma profunda alteração no ciclo celular de *C. albicans* tratadas com AZA e EIL. Leveduras de *C. albicans* produziram brotamentos, que permaneceram associadas à célula mãe sem núcleo ou vários núcleos. O núcleo celular apareceu com a forma alterada e com a condensação da cromatina anormal quando comparada com as células controle. Essas características podem estar associadas com a morte celular por apoptose, como previamente descrito em *C. albicans* tratadas com AMB (PHILLIPS *et al.*, 2003); e também após tratamento de *Tritrichomonas foetus* com peróxido de hidrogênio (MARIANTE *et al.*, 2003). A presença de células com um ou mais núcleos pode indicar que os inibidores da 24-SMT podem estar interferindo no processo de citocinese.

Interessantemente, leveduras tratadas com inibidores da SQS, como *C. albicans* (77) tratada com WSP1267 e/ou *C. tropicalis* ATCC 28707 tratada com E5700 e ER-119884, apresentaram alteração no ciclo celular diferentes das alterações observadas em *C. albicans*

(77) tratada com inibidores da 24-SMT. Em leveduras tratadas com inibidores 24-SMT, foi observada grande quantidade de células com anormalidades nucleares, ao passo que em células tratadas com inibidores da SQS, houve alterações nas fases do ciclo celular, quando comparado com as células não tratadas: redução do número de células contendo somente um núcleo (fase I), com concomitante aumento de células na fase II e III, ou seja, células com brotamento e um núcleo e células com brotamento e dois núcleos (um em cada células), respectivamente. Para estes fenótipos podem existir duas explicações: (i) as células não conseguem terminar a divisão nuclear reproduzindo leveduras com brotamento, entretanto sem núcleo e/ou (ii) as células não completam o término da divisão celular (citocinese).

Algumas imagens de microscopia de fluorescência sugerem que leveduras tratadas com inibidores da SQS apresentam condensação anormal da cromatina, que é característico de morte celular por apoptose. Este dado é coerente com um trabalho que demonstrou que a deleção do gene SQS em *Sacharomyces cerevisiae* leva a morte celular por apoptose devido à interrupção da síntese de ergosterol (JENNINGS *et al.*, 1991).

Derivados quinuclidinas e inibidores da 24-SMT induzem um efeito similar no ciclo celular de formas promastigostas de *L. amazonensis* (RODRIGUES *et al.*, 2008). De fato, estudos prévios demonstram que esteróis modulam a atividade de proteína kinase como a pp60v-src e também os níveis de AMPc, ambas relacionadas diretamente com o controle do ciclo celular (DAHL *et al.*, 1987; SARDARI *et al.*, 2003).

Além disso, outros estudos têm mostrado que drogas como a griseofulvina e nodoconazol podem interferir com a polimerização dos componentes do citoesqueleto induzindo alterações no ciclo celular e morte por apoptose (SHAW *et al.*, 1997; PACCHIEROTTI *et al.*, 2002; PANDA *et al.*, 2005;).

Nossos resultados de análise de lipídeos neutros extraídos de *C. albicans* (isolado 77) não tratada mostraram a presença majoritária de esqualeno, seguida de esteróis como ergosterol e colesterol. O resultado que nos surpreendeu foi a presença de colesterol. Entretanto, estudos prévios têm demonstrado que *C. albicans* (cepa ATCC 10231), na forma filamentosa, apresenta, além de esteróis como zimosterol, ergosterol, 24,28-dihidroergosterol, 3- β -hidroxi-24-metilcolest-5,7-diene e 4,4-dimetilzimosterol, também apresenta colesterol, em uma porcentagem relativa de 37,8% (GHANNOUM *et al.*, 1986). No nosso trabalho, porém, não separamos a forma filamentosa da leveduriforme, sendo observada nesta mistura celular, a presença de 9,75 % de colesterol. Alguns organismos, como os tripanossomatídeos, são capazes de incorporar o colesterol do meio de cultura quando há a depleção de esteróis endógenos para a composição de membrana (DE SOUZA; RODRIGUES, 2009). Interessantemente, alguns isolados clínicos de *C. glabrata* tem se mostrado dependentes de colesterol para garantir o crescimento *in vitro*. Estes isolados apresentaram resistência à AMB e ao FLC (CIM=64 μ g/mL), mostrando a dificuldade de diagnóstico utilizando meio de cultura padrão e, também, no tratamento da infecção com antifúngicos que atuam diretamente no ergosterol e/ou na sua via biossintética (HAZEN *et al.*, 2005).

Outro dado interessante foi a presença, em grandes proporções, de esqualeno em células de *C. albicans* (isolado 77). Sabemos que, para a epoxidação da molécula de esqualeno é necessário a presença de oxigênio no sistema de cultivo. Dessa forma, experimentos comparativos de culturas de *C. albicans*, em RPMI 1640, com e sem agitação foram realizados para a confirmação dos nossos resultados (dados não mostrados). Os dados obtidos sugerem que *C. albicans* (isolado 77), independentemente do crescimento na

presença de agitação, leva ao acúmulo de esqualeno, em grandes quantidades na célula, sem causar danos na morfologia e ultraestrutura.

Leveduras de *C. albicans* (isolado 77) tratadas com inibidores da 24-SMT (AZA e EIL) revelaram importantes alterações na biossíntese de esteróis, causando uma depleção de ergosterol com o concomitante aparecimento de zimosterol, em células tratadas com AZA, e colest-5,7,22-trien-3 β -ol em células tratadas com EIL. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que AZA e EIL estejam, provavelmente, interferindo na biossíntese de esteróis em *Candida* spp. como previamente descrito em *C. albicans* (GEORGOPAPADAKOU *et al.*, 1987), *P. brasiliensis* (VISBAL *et al.*, 2003), *P. carinii* (URBINA *et al.*, 1997), *T. cruzi* (URBINA *et al.*, 1995) e *L. amazonensis* (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Adicionalmente, observamos a depleção da síntese de esteróis em *C. tropicalis* ATCC 28707 tratada com 0,25 μ g/mL e 1 μ g/mL de E5700 ou ER-119884, em comparação com leveduras não tratadas, ocorrendo a detecção somente de esqualeno e um total desaparecimento de outros intermediários da síntese de esteróis. Pesquisadores têm mostrado que inibidores da SQS aumentam níveis de farnesol e ácidos carboxílicos derivados do farnesol, devido o aumento de níveis de farnesil pirofosfato e consumo deste por outras enzimas do metabolismo isoprenóides (BERGSTROM *et al.*, 1993; AMIN *et al.*, 1997). Embora nós não detectamos intermediários de isoprenóides por CG-EM, em leveduras tratadas com inibidores da SQS, a presença de grandes vacúolos elétron-densos observados pela MET e marcações por “nile red” visto pela microscopia de fluorescência podem sugerir o acúmulo de isoprenóides e/ou outro lipídeo no citoplasma.

Cammerer *et al.* (2007) e Rodrigues *et al.* (2008) mostraram que derivados quinuclidinas BPQ-OH, E5700 e ER-119884 levam a uma completa depleção de esteróis

endógenos (C24 esterol alquilados) e ao acúmulo de colesterol exógeno em promastigotas de *L. mexicana* e *L. amazonensis*, que estão associados com o aumento de inclusões citoplasmáticas observadas por microscopia eletrônica de transmissão.

Por outro lado, nós também não excluimos a possibilidade de que esses inibidores da 24-SMT e SQS possam agir em outros alvos celulares, incluindo algum efeito secundário que poderia estar relacionado com o acúmulo de outros lipídeos. Dessa forma, resolvemos realizar análises do perfil de ácidos graxos e de fosfolipídios em *C. albicans* (isolado 77) tratado com AZA e EIL, e em *C. tropicalis* ATCC 28707 tratado com E5700 e ER-119884.

Fosfolipídios tem um papel essencial para o funcionamento da membrana plasmática das células. Em eucariotos, fosfatidilcolina é o fosfolipídeo majoritário e possui um papel importante na transdução de sinais e na regulação do ciclo celular (WRIGHT *et al.*, 2004). Em *C. albicans*, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e fosfatidilinositol são os fosfolipídios majoritários (HITCHCOCK *et al.*, 1986). Em nosso trabalho, podemos observar por meio de CCD em sílica gel, a grande presença de fosfatidiletanolamina **(8)**, fosfatidilcolina **(7)**, ácido fosfatídico **(1)** e a banda **(3)** em células de *C. albicans* (isolado 77). Entretanto, o tratamento com AZA e EIL acarretou em modificações no perfil de fosfolipídio de *C. albicans* (isolado 77). Em células tratadas com AZA, houve um aparente aumento de fosfatidilinositol **(5)** quando tratadas com a concentração de 2,0 µg/mL. Já em leveduras tratadas com diferentes concentrações de EIL, os efeitos da biossíntese de fosfolipídios foram mais drásticos comparados com o AZA. Podemos detectar a ausência de 3-sn-L- α -ácido fosfatídico **(4)**, diminuição de L- α -ácido fosfatídico dipalmitoil **(1)** e banda **(3)**, e um aumento de L- α -fosfatidilcolina **(7)**.

Além de alterações em fosfolipídios, AZA e EIL, também, induziram alterações em ácidos graxos de *C. albicans* (isolado 77). As células tratadas com AZA apresentaram um aumento na produção de ácidos graxos do tipo de C16 e uma diminuição de C18. Em contraste, o tratamento com EIL levou a um aumento drástico de ácido linolênico (C18:3) e diminuição de C16 e outros ácidos graxos C18 (C18:2, C18:1 e C18:0). Esses dados sugerem que essas mudanças no perfil de fosfolipídios e ácidos graxos em leveduras tratadas com os inibidores da 24-SMT refletem um mecanismo celular para manter a homeostase da membrana citoplasmática e o funcionamento de eventos celulares essenciais para a sobrevivência de um organismo.

Interessantemente, *C. tropicalis* ATCC 28707 tratadas com E5700 e ER-119884 apresentaram perfis de ácidos graxos totalmente alterados, com o aumento drástico de ácido linolênico (C18:3). Por outro lado, não observamos claramente nenhuma alteração no perfil de fosfolipídios em *C. tropicalis* ATCC 28707 tratado com esses inibidores da SQS. As análises desses resultados indicam que células tratadas com WSP1267 podem apresentar alterações na síntese de ácido graxo.

Estudos prévios têm mostrado a interferência dos inibidores da 24-SMT e SQS em outros alvos celulares, que não a biossíntese de esteróis. *Crithidia deanei* tratado com AZA apresentou uma drástica redução de 24-álquil esteróis, além de estar associado com uma redução de fosfatidilcolina e concomitante aumento de fosfatidiletanolamina (PALMIÉ-PEIXOTO *et al.*, 2006). Interessantemente, Dantas-Leite *et al.* (2004) e Martins-Duarte *et al.* (2006) mostraram a atividade dos inibidores AZA, EIL, E5700 e ER-119884 contra *Toxoplasma gondii*, um parasita que não sintetiza esteróis, sugerindo que essas drogas possam interferir com outros alvos celulares, como os ácidos graxos. Esta hipótese, também, foi consistente com os resultados de estudos em células de mamíferos mostrando

que moléculas quinuclidinas também interferem com a síntese de ácidos graxos (HIYOSHI *et al.*, 2003).

Adicionalmente, as vias de síntese de lipídeos estão correlacionadas. Trabalhos anteriores têm demonstrado uma conexão entre os esteróis e a produção de esfingolipídios, mostrando que inibidores da HMG-CoA redutase (lovastatina) levou a uma diminuição do ergosterol e, também, uma diminuição de ceramidas (VEEN; LANG, 2005). Ácido graxo sintase, codificada pelo gene *FAS*, é uma enzima multifuncional da biossíntese de ácidos graxos e é regulada pelos níveis de esteróis na célula. Essa regulação pelos esteróis é mediada por proteínas como SREBP e Sp1, que atuam sinergicamente ativando o promotor do gene *FAS* em células de *Drosophila*. A depleção de mevalonato e seus derivados levam ao aumento da síntese de ácidos graxos. Por outro lado, a presença de mevalonato e seus derivados isoprenóides (farnesil pirofosfato) previne este aumento (BENNETT *et al.*, 1995; MURTHY *et al.*, 2005).

Esteróis são componentes estruturais e regulatórios essenciais de membrana celular de células fúngicas e de mamíferos, e muitos intermediários são importantes metabólitos para processos celulares vitais. Esses eventos incluem crescimento, diferenciação, apoptose, sinalização intracelular e intercelular. Como por exemplo, diacilglicerol derivados de esfingolipídios induz a expressão de fatores de virulência App1 de *C. neoformans*, responsável pela inibição da fagocitose, bem como a ativação de proteína kinase C, promovendo a estabilidade de parede celular e produção de melanina (SHEA; DEL POETA, 2006). Também, esteróis regulam positivamente a proteína kinase em *S. cerevisiae*, uma proteína envolvida no processo de divisão celular (DAHL *et al.*, 1987). Desta forma, a intervenção da via de biossíntese de esteróis, resultaria em alterações na

síntese de fosfolipídios e ácidos graxos, que implicaria na perda de algumas funções celulares vitais para a sobrevivência do fungo.

Podemos sugerir, com bases nos nossos resultados e o exposto na discussão, duas explicações para o efeito inibitório do crescimento de *Candida* spp. pela alteração do ciclo celular: (i) a depleção do ergosterol e outros lipídeos, que são essenciais para a manutenção da membrana plasmática e também, reguladores chaves do ciclo celular, e/ou (ii) alterações na estrutura do citoesqueleto podem afetar no processo de citocinese.

Embora existam muitos inibidores da biossíntese de esteróis usados no campo da agricultura e médico, um número limitado dessa classe de droga é utilizado no tratamento de infecções fúngicas em humanos. Assim, outros alvos da via de biossíntese de esteróis podem ser utilizados como alternativas no desenvolvimento de novos fármacos para o controle de uma infecção fúngica.

Os resultados apresentados nesta tese demonstram o potencial antifúngico dos inibidores da 24-SMT (AZA e EIL) e inibidores da SQS (WSP1267, E5700 e ER-119884) contra isolados de *Candida* spp. Essas moléculas inibem efetivamente o crescimento de *Candida* spp., incluindo algumas cepas resistentes aos azóis. A depleção da síntese de esteróis e as alterações de outros lipídeos como os ácidos graxos e fosfolipídios, podem resultar na inibição do crescimento, alterações na ultraestrutura e no ciclo celular de leveduras de *Candida*.

Interessantemente, E5700 e ER119884 foram ativos contra uma cepa tripla-resistente, *C. tropicalis* ATCC 28707, um interessante modelo biológico para o estudo bioquímico e da biologia celular, áreas biológicas importantes para o entendimento dos mecanismos de resistência a drogas, e na pesquisa de novos alvos para o desenvolvimento de agentes antifúngicos.

Deste modo, nossos resultados e os descritos na literatura indicam que moléculas como AZA, EIL (inibidores da 24-SMT), WSP1267, E5700 e ER-119884 (inibidores da SQS) podem ser consideradas potenciais drogas para o desenvolvimento de agentes antifúngicos.

6. Conclusões

- Os isolados clínicos de *Candida* spp. foram todos susceptíveis à AMB, e o perfil de resistência/susceptibilidade aos azóis, FLC e ITC, foram consistentes com os dados da literatura;
- *C. tropicalis* ATCC 28707 foi caracterizado pela primeira vez, neste trabalho, como sendo uma cepa tripla resistente à AMB, ao FLC e ao ITC;
- Os inibidores da enzima 24-SMT, AZA e EIL, apresentaram atividade antifúngica contra isolados de *Candida* spp., incluindo àqueles resistentes aos agentes azólicos;
- Dentre os derivados arilquinuclidinas, inibidores da enzima SQS, somente o WSP1267 inibiu o crescimento dos isolados clínicos de *Candida* spp. Interessantemente, somente *C. tropicalis* ATCC 28707 foi susceptível às moléculas E5700 e ER119884;
- Os inibidores da biossíntese de esteróis testados apresentam, principalmente, efeito fungistático sobre *Candida* spp.;
- Os inibidores da síntese de esteróis (inibidores da 24-SMT e SQS) induziram a alterações na morfologia de *Candida*, sendo as principais: aumento do volume celular, aumento da espessura de parede celular, rompimento de parede celular e membrana plasmática, descontinuidade e irregularidade da membrana plasmática, presença de vesículas, vacúolos elétron-densos e/ou elétron-luscentes e inchaço mitocondrial;
- Células tratadas com os inibidores induzem ao acúmulo de lipídeos neutros, observados pela coloração com “nile red”;

- O tratamento das células com os inibidores altera o ciclo celular de *Candida* gerando anormalidades nucleares, como a presença de células sem núcleo e células com a condensação da cromatina anormal;
- Leveduras de *C. albicans* tratadas com AZA e EIL apresentaram acúmulo de intermediários da síntese de esteróis, como o zimosterol e colest-5,7,22-trien-3 β -ol, e a depleção de ergosterol. Além disso, observamos alterações no perfil de fosfolipídios e de ácidos graxos;
- Em *C. tropicalis* ATCC 28707 tratada com E5700 e ER-119884 observamos depleção da síntese de esteróis e uma diminuição na produção de esqualeno dose-dependente. Também, verificamos alterações no perfil de ácidos graxos, mas aparentemente, não houve alteração no perfil de fosfolipídios;
- WSP1267 apresentou menos seletivo às células de mamífero que AZA e EIL.

7. Perspectivas

Nossos resultados indicam que os inibidores da 24-SMT e SQS analisados, podem ser candidatos para o desenvolvimento de um agente antifúngico, mas a otimização para a seletividade, e propriedades farmacocinéticas e farmacológicas são requeridas para o emprego destas moléculas como candidatas a agentes antifúngicos.

Diante do exposto, é importante a continuidade deste estudo, uma vez que esses inibidores atuam em pontos enzimáticos chaves na via de biossíntese de esteróis, diferentes do alvo dos agentes azólicos (C14 α -lanosterol demetilase), o que caracteriza novas opções no controle de infecções fúngicas. Assim, estudos para avaliar melhor os mecanismos de ação dos inibidores, como a caracterização da correlação entre a depleção do ergosterol e o

ciclo celular e melhor análise da alteração do perfil de fosfolipídios devem ser realizados, bem como, estudos *in vivo* para avaliar a efetividade no tratamento de candidíases ou/e outra infecção fungica.

Adicionalmente, essas moléculas podem ser protótipos para a síntese racional de novas moléculas com melhor atividade antifúngica, mais seletivas e conseqüentemente, menos tóxicas.

8. Referências

ABAD, M.A.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. **Active antifungals from natural sources.** *Arkivoc*, p. 116-145, 2007.

ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A. **Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2000 to 2003.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 1829–1835, 2005.

AMIN, D.; RUTLEDGE, R.Z.; NEEDLE, S.N.; GALCZENSKI, H.F.; NEUENSCHWANDER, K.; SCOTese, A.C.; MAGUIRE, M.P.; BUSH, R.C.; HELE, D.J.; BILDER, G.E.; PERRONE, M.H. **RPR 107393, a potent squalene synthase inhibitor and orally effective cholesterol-lowering agent: comparison with inhibitors of HMG-CoA reductase.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 281, p. 746–752, 1997.

ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; WARNOCK, D.W.; MORRISON, C.J. **Quantification of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between *in vitro* antifungal susceptibility test results and *in vivo* outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, p. 2081-2085, 2000.

ATOR, M.A.; SCHMIDT, S.J.; ADAMS, J.L.; DOILE, R.E. **Mechanism and inhibition of $\Delta 24$ -sterol methyltransferase from *Candida albicans* and *Candida tropicalis*.** *Biochemistry*, v. 28, p. 9633-9640, 1989.

BAHMED, K.; BONALY, R.; BENALLAOUA, S.; COULON, J. **Effect of sub-inhibitory concentrations of amphotericin B on the yeast surface and phagocytic killing activity.** *Process Biochemistry*, v. 40, p. 759-765, 2005.

BAL, AM. **The echinocandin: three useful choices or three too many?** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 35, p. 13-18, 2010.

BARRETT-BEE, K. Y.; HAYES, Y.; WILSON, R. G. RYLEY, J. F. **A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts.** *Journal of Gynecology Microbiology*, v. 131, p. 1217-1221, 1985.

BELLANGER, P.; NAST, C.C.; FRATTI, R.; SANATI, H.; GHANNOUM, M. **Voriconazole (UK-109,496) inhibits the growth and alters the morphology of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida* species.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 1840-1842, 1997.

BENNETT, J.H. **On the parasite vegetable structures found growing in living animals.** *Transactions of the Royal Society of Edinburgh: earth sciences*, v. 15, p. 277-294, 1844.

BENNETT, M.K.; LOPEZ, J.M.; SANCHEZ, H.B.; OSBORNE, T.F. **Sterol Regulation of Fatty Acid Synthase Promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 25578–25583, 1995.

BERGSTROM, J. D., KURTZ, M. M.; REW, D. J.; AMEND, A. M.; KARKAS, J. D.; BOSTEDOR, R. G.; BANSAL, V. S.; DUFRESNE, C.; VANMIDDLESWORTH, F. L.; HENSENS, O. D.; LIESCH, J. M.; ZINK, D. L.; WILSON, K. E.; ONISHI, J.; MILLIGAN, J. A.; BILLS, G.; KAPLAN, L.; OMSTEAD, M. N.; JENKINS, R. G.; HUANG, L.; MEINZ, M. S.; QUINN, L.; BURG, R. W.; KONG, Y. L.; MOCHALES, S.; MOJENA, M.; MARTIN, I.; PELAEZ, F.; DIEZ, M. T.; ALBERTS, A. W. **Zaragozic acids—a family of fungal metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, p. 80–84, 1993.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Canadian Journal Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 910-917, 1959.

BONASSOLI, L.A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T.I.S. **High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts.** *The Journal of Hospital Infection*, v. 59, p. 159-162, 2005.

BORGES, M.; VAN DE VEN, M.A. **Degenerative changes after itraconazole treatment.** *Reviews of Infectious Diseases*, v. 9, S33-42, 1987.

BORG-VON ZEPPELIN, M.; KUNZ, L.; RÜCHEL, R.; REICHARD, U.; WEIG, M.; GROß, U. **Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from**

July to August 2005. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v. 60, p. 424-428, 2007.

BOWMAN, S.M.; FREE, S.J. **The structure and synthesis of the fungal cell wall.** *BioEssays*, v. 28, p. 799-808, 2006.

BURBIEL, J.; BRACHER, F. **Azasteroids as antifungal.** *Steroids*, v. 68, p. 587-594, 2003.

CALDERONE R.A.; FONZI, W.A. **Virulence factors of *Candida albicans*.** *TRENDS in Microbiology*, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

CAMMERER, S.B.; JIMENEZ, C.; JONES, S.; GROS, L.; LORENTE, S.O.; RODRIGUES, C.; RODRIGUES, J.C.F.; CALDERA, A.; PEREZ, L.M.R.; DE SOUZA, W.; KAISER, M.; BRUN, R.; URBINA, J.A.; PACANOWSKA, D.G.; GILBERT, I.H. **Quinuclidine derivatives as potential antiparasitics.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 4049-4061, 2007.

CANNON, R.; CHAFFIN, W. L. **Oral colonization by *Candida albicans*.** *Critical Reviews Oral Biology Medicine*, v. 10, p. 359-383, 1999.

CANUTO, M.M.; RODERO, F.G. **Antifungal drug resistance to azoles and polyenes.** *The Lancet Infectious Diseases*, v.2, p. 550-563, 2002.

CHIN, N-X.; WEITZMAN, I.; DELLA-LATTA, P. **In Vitro Activity of Fluvastatin, a Cholesterol-Lowering Agent, and Synergy with Fluconazole and Itraconazole against *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 850-852, 1997.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** Approved standard M27-A3. National committee for clinical laboratory standards, Villanova, Pa. 2008.

COLOMBO, A.; GUIMARÃES, T. **Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, p.332-337, 2007.

COLOMBO, A.L.; NAKAGAWA, Z.; VALDETARO, F.; BRANCHINI, M. L. M.; KUSSANO, E. J. U.; NUCCI, M. **Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp. collected from Brazilian tertiary care hospitals.** *Medical Mycology*, v. 41, p. 235-239, 2003.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUE´R, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.A.; WARNOCK, D. MORGAN, J. **Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers.** *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, p. 2816-2823, 2006.

COSTA, A.S. **Estudo Epidemiológico da Criptococcose em pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho e Avaliação antifúngica de Inibidores na busca de novos quimioterápicos contra *Cryptococcus gattii***. Dissertação de mestrado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

COWAN, M.M. **Plant products antimicrobial agents**. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUZNER, M.L.; DAVINSON, A.N. **Quantitative thin layer chromatography of lipids**. *Journal of Chromatography*, v. 27, p. 388-97, 1967.

DAHL, C.E.; BIEMANN, H.P.; DHAL, J.S. **A protein kinase antigenically related to pp60v-src possible involved in yeast cell cycle control: positive *in vivo* regulation by sterol**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, p. 4012-4016, 1987.

DANTAS-LEITE, L.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W.; VOMMARO, R.C. **Selective anti-*Toxoplasma gondii* activities of azasterols**. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.23, p. 620-626, 2004.

DE BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; SCARAVELLI, G.; PACHI, A.; GIROLAMO, A.; AGATENSI, L.; CASSONE, A. **High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women**. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p. 1376-1380, 1999.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C.F. **Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Antitrypanosomatid Drugs**. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2009, p. 642502-642521, 2009.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C.F.; URBINA, J.A. **Effects of inhibitors of the ergosterol biosynthesis on the structural organization of trypanosomatids**. *Recent Research Developments in Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 5, p. 79-97, 2002.

DEACON, J. **Fungal Biology**. 4a. Edição. Blackwell Publishing, 371p., 2006.

DIGNANI, M.C.; SLOMOKIN, J.S.; ANAÏSSIE, E.J. **Candida**. In: ANAÏSSIE, E.J.; MCGINNIS, M.R.; PFALLER, M.A. **Clinical Mycology**, 2a. ed., Elsevier, 2009.

ELLIS, D. **Amphotericin B: spectrum and resistance**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 49, suppl. S1, p. 7-10, 2002.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PFALLER, M.A.; RINALDI, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; VERWEIJ, P.E. **International and Multicenter Comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 Broth Microdilution Methods for Testing Susceptibilities of *Candida* spp. to Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 3884-3889, 2005.

FEKETE-FORGÁCS, K.; GYURE, L.; LENKEY, B. **Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*.** *Mycoses*, v. 43, p. 273-279, 2000.

FERRER, J. **Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors.** *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, v. 71, p. S21-S27, 2000.

GEORGOPAPADAKOU, N.H.; DIX, B.A.; SMITH, S.A.; FREUDENBERGER, J.; FUNKE, P.T. **Effect of antifungal agents on lipid biosynthesis and membrane integrity in *Candida albicans*.** *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, v. 31, n.1, p. 46-51, 1987.

GHANNOUM, M.A. **Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis.** *Clinical Microbiology Review*, v. 13, p. 122-143, 2000.

GHANNOUM, M.A.; JANINI, G.; KHAMIS, L.; RADWAN, S.S. **Dimorphism-associated Variations in the Lipid Composition of *Candida albicans*.** *Journal of General Microbiology*, v. 132, p. 2367-2375, 1986.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. **Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n.4, p. 501-517, 1999.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I.N.; SEVERO, L.C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L.P.; DA MATTA, D.A.; COLOMBO, A.L. **Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 401-405, 2003.

GRANTHON, A.C.; BRAGA, M.V.; RODRIGUES, J.C.F.; CAMMERER, S.; LORENTE, S.O.; GILBERT, I.H.; URBINA, J.A.; SOUZA, W. **Alterations on the growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* induced by squalene synthase inhibitors.** *Veterinary Parasitology*, v. 146, p. 25-34, 2007.

GUCKERT, J.B.; ANTWORTH, C.P.; NICHOLS, P.D.; WHITE, D.C. **Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments.** *FEMS Microbiology and Ecology*, v. 31, p. 147-158, 1985.

GUERRA, C.R. **Avaliação da Atividade de Inibidores da Síntese de Ergosterol em isolados de *Cryptococcus neoformans*.** Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

HAUGHAN, P.A.; CHANCE, M.L.; GOAD, L.J. **Effects of an azasterol inhibitor on sterol 24-transmethylation on sterol biosynthesis and growth of *Leishmania donovani* promastigotes.** *The Biochemical Journal*; v. 308, p. 31-38, 1995.

HAYS, P.R.; NEAL, W.D.; PARKS, L.W. **Physiological effects of an antimycotic azasterol on culture of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 12, p. 185-191, 1977a.

HAYS, P.R.; PARKS, L.W.; PIERCE, H.D.; OEHLISCHLAGER, A.C. **Accumulation of ergosta-8,14-dien-3 β -ol by *Saccharomyces cerevisiae* cultured with an azasterol antimycotic agent.** *Lipids*, v.12, p. 666-668, 1977b.

HAZEN, K.C.; BARON, E.J.; COLOMBO, A.L.; GIRMENIA, C.; SANCHEZ-SOUSA, A.; PALACIO, A.; BEDOUT, C.; GIBBS, D.L.; and The Global Antifungal Surveillance Group. **Comparison of the susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-year global evaluation using disk diffusion.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n.12, p. 5623–5632, 2003

HAZEN, K.C.; MANDELL, G.; COLEMAN, E.; WU, G. **Influence of fluconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 183, p. 89-94. 2000.

HAZEN, K.C.; STEI, J.; DARRACOTT, C.; BREATHNACH, A.; MAY, J.; HOWELL, S.A. **Isolation of cholesterol-dependent *Candida glabrata* from clinical specimens.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 52, p. 35–37, 2005.

HEITMAN, J. **Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens.** *Current Biology*, v.16, p.R711-R725, 2006.

HITCHCOCK, C.A.; BARRETT-BEE, K.J.; RUSSELL, N.J. **The Lipid Composition of Azole-sensitive and Azole-resistant Strains of *Candida albicans*.** *Journal of General Microbiology*, v. 132, p. 2421-2431, 1986.

HIYOSHI, H.; YANACHIMACHI, M.; ITO, M.; YASUDA, N.; OKADA, T.; IKUTA, H.; SHINMYO, D.; TANAKA, K.; KURUSU, N.; YOSHIDA, I.; ABE, S.; SAEKI, T.; TANAKA, H. **Squalene synthase inhibitors suppress triglyceride biosynthesis through the farnesol pathway in rat hepatocytes.** *Journal of Lipid Research*, v. 44, p. 128–135, 2003.

HORN, D.L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E.J.; FISHMAN, J.A.; STEINBACH, W.J.; OLYAEI, A.J.; MARR, K.A.; PFALLER, M.A.; CHANG, C.H.; WEBSTER, K.M. **Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, p. 1695–703, 2009.

HORNBY, J.M.; KEBARA, B.W.; NICKERSON, K.W. **Farnesol Biosynthesis in *Candida albicans*: Cellular Response to Sterol Inhibition by Zaragozic Acid B.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v 47, p. 2366–2369, 2003.

HUANG, Y.C.; LIN, T.Y.; LEU, H.S.; WU, J.L.; WU, J.H. **Yeast carriage on hands of hospital personnel working in intensive care units.** *The Journal Hospital Infection*, v. 39, p. 47-51, 1998.

IBRAHIM, A.S.; MIRBOD, F.; FILLER, S.G.; BANNO, Y.; COLE, G.T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS, J.E.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M.A. **Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*.** *Infection and Immunity*, v. 63, p. 1993-1998, 1995.

ISHIDA, K.; MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V. **Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*.** *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v. 58, n. 5, p. 942-949, 2006.

ISHIDA, K.; ROZENTAL, S.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. **Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation.** *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v.8, p. 29-39, 2009.

JENNINGS, S.M.; TSAY, Y.H.; FISCH, T.M.; ROBINSON, G.W. **Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene syntase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, p. 6038-6042, 1991.

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

KANAGASABI, R.; ZHOU, W.; LIU, J.; NGUYEN, T.T.M.; VEERAMACHANENI, P.; NES, D. **Disruption of ergosterol biosynthesis, growth, and the morphological transition in *Candida albicans* by sterol methyltransferase inhibitors containing surfur at C-25 in the sterol side chain.** *Lipids*, v. 39, p. 737-746, 2004.

KAUFFMAN, C.A. **Fungal infections.** *Proceedings of the American Thoracic Society*, v.3, p. 35-40, 2006.

KAUFFMAN, C.A.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. **Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 30, p. 14-18, 2000.

KELLY, S.; LAMB, D.C.; CORRAN, A.J.; BALDWIN, B.C.; KELLY, D.E. **Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14- α -methylergosta-8,24(28) dien-3- β ,6- α -diol.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 207, p. 910-915, 1995.

KOUL, A.; VITULLO, J.; REYES, G.; GHANNOUM, M. **Effects of voriconazole on *Candida glabrata* in vitro.** *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, v. 44, p. 109-112, 1999.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: A guide to identification.** Third edition, Washington: AMS Press, 1995.

LIN, Z.; HOULT, J.; RAMAN, A. **Sulforhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo.** *Journal of ethnopharmacology*, v. 66, p. 141-150, 1999.

LÓRÁND, T.; KOCSIS, B. **Recent advances in antifungal agents.** *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 7, p. 900-911, 2007.

LORENTE, S.O.; GOMEZ, R.; JIMENEZ, C.J.; CAMMERER, S.; YARDLEY, V.; DE LUCA-FRADLEY, K.; CROFT, S.L.; RUIZ-PEREZ, L.M.; URBINA, J.A.; GONZALEZ-PACANOWSKA, D.; GILBER, I.H. **Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 3519-3529, 2005.

LORENTE, S.O.; RODRIGUES, J.C.F.; JIMENEZ, C.J.; JOYCE MENEKSE, M.; RODRIGUEZ, C.; CROFT, S.L.; YARDLEY, V.; LUCA FRADLEY, K.; RUIZ PEREZ, L.M.; URBINA, J.A.; SOUZA, W. ; PACANOWSKA, D.G.; GILBERT, I.H. **Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 8, p. 2937-2950, 2004.

LUPETTI, A.; DANESI, R.; CAMPA, M.; DEL TACCA, M.; KELLY, S. **Molecular basis of resistance to azole antifungals.** *Trends in Molecular Medicine*, v. 8, p. 76-81, 2002.

MAIA, C.; ATTIAS, M.; URBINA, J.A.; GILBERT, I.; MAGARACI, F.; SOUZA, W. **Azasterols impair *Giardia lamblia* proliferation and induces encystation.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 363, p. 310-316, 2007.

MARIANTE, R.M.; GUIMARÃES, C.A.; LINDEN, R.; BENCHIMOL, M. **Hydrogen peroxide induces caspase activation and programmed cell death in the amitochondrial *Tritrichomonas foetus*.** *Histochemistry and Cell Biology*, v. 120, p. 129-141, 2003.

MARR, K.A.; RUSTAD, T.G.; REX, J.H.; WHITE, T.C. **The trailing endpoint phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, p. 1383-1386, 1999.

MARTINS-DUARTE, E.S.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W.; VOMMARO, R.C. **Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, p. 59-65, 2006.

MENDOFF, G.; BRAJTBURG, J.; KOBAYASHI, G.S. **Antifungal agents useful in therapy of systemic infections.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 23, p. 303-330, 1983.

MESA ARANGO, A.C.; BUENO SÁNCHEZ, J.B.; BETANCUR GALVIS, L.A. **Productos naturales com actividad antimicótica.** *Revista Española de Quimioterapia*, v.17, n.4, p.325-331, 2004.

MORGAN, J. **Global trends in candidemia: review of reports from 1995–2005.** *Current Infectious Disease Reports*, v.7, p. 429–439, 2005.

MOUDGAL, V.; LITTLE, T.; BOIKOV, D.; VAZQUEZ, J.A. **Multiechinocandin- and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.49, n.2, p. 767–769, 2005.

MUKHERJEE, P.K.; SHEEHAN, D.J.; HITCHCOCK, A.; GHANNOUM, M.A. **Combination treatment of invasive fungal infections.** *Clinical Microbiology Reviews*, v.18, n.1, p. 163-194, 2005.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica.** 5a. Ed. Rio de Janeiro/RJ: Elsevier, 2005.

MURTHY, S.; TONG, H.; HOHL, R.J. **Regulation of Fatty Acid Synthesis by Farnesyl Pyrophosphate.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 41793–41804, 2005.

NGUYEN, M.H.; CLANCY, C.J.; YU, V.L.; YU, Y.C.; MORRIS, A.J.; SNYDMAN, D.R.; SUTTON, D.A.; RINALDI, M.G. **Do *in vitro* susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia.** *The Journal of Infectious Diseases*, v.177, p.425–30, 1998.

ODDS, F.C.; BROWN, A.J.; GOW, N.A. **Antifungal agents: Mechanism of action.** *TRENDS in microbiology*, v. 11, p. 272-279. 2003.

OEHLSCHLAGER, A.C; ANGUS, R.H.; PIERCE, A.M.; SRINIVASAN, R. **Azasterol inhibition of $\Delta 24$ -sterol methyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochemistry*, v. 23, p. 3582-3589, 1984.

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

PACCHIEROTTI, F.; BASSANI, B.; MARCHETTI, F.; TIVERON, C: **Griseofulvin induces mitotic delay and aneuploidy in bone marrow cells of orally treated mice.** *Mutagenesis*, v.17, p. 219-222, 2002.

PALMIÉ-PEIXOTO, I.V.; ROCHA, M.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W.; EINICKER-LAMAS, M.; MOTTA, M.C: **Effects of sterol biosynthesis inhibitors on endosymbiont-bearing trypanosomatids.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 255, p. 33-42, 2006.

PANDA, D.; RATHINASAMY, K.; SANTRA, M.K.; WILSON, L. **Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: Implications for its possible use in the treatment of cancer.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, p. 9878–9883, 2005.

PAPPAS, P.G.; REX, J.H.; SOBEL, J.D.; FILLER, S.G.; DISMUKES, W.E.; WALSH, T.J.; EDWARDS, J.E. **Guidelines of treatment of candidiasis.** *Clinical Infectious Diseases*, v.38, p. 161-189, 2004.

PARK, S.; KELLY, R.; KAHN, J.N.; ROBLES, J.; HSU, M.J.; REGISTER, E.; LI, W.; VYAS, V.; FAN, H.; ABRUZZO, G.; FLATTERY, A.; GILL, C.; CHREBET, G.; PARENT, S. A.; KURTZ, M.; TEPLER, H.; DOUGLAS, C. M.; PERLIN;D.S. **Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n.8, p. 3264–3273, 2005.

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

PERLIN, D.S. **Resistance to echinocandin-class antifungal drugs.** *Drug Resistance Updates*, v. 10, p. 121-130, 2007.

PFALLER M.A.; DIEKEMA D. J. **Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, p. 133–163, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D. J.; SHEEHAN, D. J. **Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, p. 435–447, 2006a.

PFALLER, M.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; MESSER, S.A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. ***In vitro* susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: Four years of global surveillance.** *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, p. 760–763, 2006b.

PFALLER, M.A.; DIKEMA, D.J. **Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 10 (Suppl.1), p. 11-23, 2004.

PFALLER, M.A.; SHEEHAN, D.J.; REX, J.H. **Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 2. p. 268–280, 2004.

PHILLIPS, A.; SUDBERY, I.; RAMSDALE, M: **Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, p. 14327–14332, 2003.

REX, J.H.; PFALLER, M.A. **Has antifungal susceptibility testing come of age?** *Clinical Infectious Diseases*, v. 35, p. 982-989, 2002.

RIBEIRO, M.D. **Análise comparativa por diferentes metodologias do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos de leveduras isoladas de espécimes clínicos.** Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

RIPPON, J. **Medical Micology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes.** 3a. ed., W.B. Saunders Company, 1988.

RODRIGUES, J.C.F.; ATTIAS, M.; RODRIGUEZ, C.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W. **Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 2, p. 487-499, 2002.

RODRIGUES, J.C.F.; BERNARDES, C.F.; VISBAL, G.; URBINA, J.A.; VERCESI, A.E.; SOUZA, W. **Sterol methenyl transferase inhibitors alter the ultrastructure and function of the *Leishmania amazonensis* mitochondrion leading to potent growth inhibition.** *Protist*, 2007, v. 158, p. 447-456, 2007.

RODRIGUES, J.C.F.; CONCEPCION, J.L.; RODRIGUES, C.; CALDERA, A.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W. **In Vitro Activities of ER-119884 and E5700, Two Potent Squalene Synthase Inhibitors, against *Leishmania amazonensis*: Antiproliferative, Biochemical, and Ultrastructural Effects.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 11, p. 4098-4114, 2008.

RODRIGUES, J.C.F.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W. **Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene sybthase, on *Leishmania amazonensis*.** *Experimental Parasitology*, v.111, n.4, p. 230-238, 2005.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; BEREBUGUER, J.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.; SANCHEZ, R. **Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratoty Standards reference macrodilution method M27-P for *in vitro* susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, p.1998-2003, 1996.

RYDER, N.S.; WAGNER, S.; LEITNER, I. **In Vitro Activities of Terbinafine against Cutaneous Isolates of *Candida albicans* and Other Pathogenic Yeasts.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 1057-1061, 1998.

SANATI, H.; BELANGER, P.; FRATTI, R.; GHANNOUM, M.A. **New Triazole, Voriconazole (UK-109,496), Blocks Sterol Biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 2492-2496, 1997.

SANGLARD, D.; ODDS, F.C. **Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 73-84, 2002.

SARDARI, S.; MORI, Y.; KUROSAWA, T.; DANESHTALAB, M. **Modulatory effect of cAMP on fungal ergosterol level and inhibitory activity of azole drugs.** *Canadian Journal of Microbiology*, v. 49, p. 344-349, 2003.

SCHUETZER-MUEHLBAUER, M.; WILLINGER, B.; KRAPF, G.; ENZINGER, S.; PRESTERL, E.; KUCHLER, K. **The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin.** *Molecular Microbiology*, v. 48, p. 225-235, 2003.

SELITRENNIKOFF, C.P.; NAKATA, M. **New cell wall targets for antifungal drugs.** *Current Opinion in Investigational Drugs*, v. 4, n. 2, p. 200-205, 2003.

SHAW, S.L.; YEH, E.; MADDOX, P.; SALMON, E.D.; BLOOM, K. **Astral microtubule dynamics in yeast: A microtubule-based searching mechanism for spindle orientation and nuclear migration into the bud.** *The Journal of Cell Biology*, v. 139, p. 985-994, 1997.

SHEA, J.M.; DEL POETA, M. **Lipid signaling in pathogenic fungi.** *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, p.352–358, 2006.

SINGLETON, D.R.; HAZEN, K.C. **Differential surface localization and temperature-dependent expression of the *Candida albicans* CSH1 protein.** *Microbiology*, v. 150, p. 285-292, 2004.

SOBEL, J.D. **Vulvovaginal Candidosis.** *Lancet*, v. 369, p. 1961–1971, 2007.

SONG, Z.; NES, W.D. **Sterol biosynthesis inhibitors: potencial for transition state analogs and mechanism-based inactivators targeted at sterol methyltransferase.** *Lipids*, v. 42, p. 15-33, 2007.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A.D.; GOW, N.A.R.; MAIDEN, M.C.J.; ODDS, F.C. ***Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* Groups II and III.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n.1., p. 284-292, 2005.

TAVRIDOU, A.; MANOLOPOULOS, V.G. **EP2300 compounds: focusing on the antiatherosclerotic properties of squalene synthase inhibitors.** *Current Pharmaceutical Designer*, v. 15, p. 3167-3178, 2009.

TAYLOR, F.R.; RODRIGUEZ, R.J.; PARKS, L.W. **Relationship between antifungal activity and inhibition of sterol biosynthesis in miconazole, clotrimazole, and 15-azasterol.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 23, p. 515-521, 1983.

THE MEDICAL LETTER. **Treatment Guidelines. Antifungal Drugs.** *The Medical Letter*, v.7, n. 88, p.95-102, 2009.

TORNATORE, M.A.; NOSKIN, G.A.; HACEK, D.M.; OBIAS, A.A.; PETERSON, L.R.L. **Effects of incubation time and buffer concentration on *in vitro* activities of antifungal agents against *Candida albicans*.** *Journal of Clinical Microbiology*, v.35, p. 1473-1476, 1997.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 6^a. Ed., Porto Alegre/RS: Editora Artmed, 2003.

TORTORANO, A.M.; KIBBLER, C.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L; GRILLOT, R. **Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 27, p 359–366, 2006.

URBINA, J.A.; CONCEPCION, J.L.; CALDERA, A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; OTOMO, T.; HIYOSHI, H. ***In vitro* and *In vivo* Activities of E5700 and ER-119884, Two Novel Orally Active Squalene Synthase Inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 2379–2387, 2004.

URBINA, J.A.; CONCEPCION, J.L.; RANGEL, S.; VISBAL, G.; LIRA, R. **Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania Mexicana*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 125, p. 35-45, 2002.

URBINA, J.A.; VIVAS, J.; VISBAL, G.; CONTRERAS, L.M. **Modification of the composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by $\Delta^{24(25)}$ sterol methyltransferase inhibitors and their combinations with ketoconazole.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 73, p. 199-210, 1995.

URBINA, J.A; VISBAL,G.; CONTRERAS, L.M.; MCLAUGHLIN, G.; DOCAMPO, R. **Inhibitors of D24(25) sterol methyltransferase block sterol synthesis and cell proliferation in *Pneumocystis carinii*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.41, 1428–1432, 1997.

VAN DEN BOSSCHE, H.; DROMER, F.; IMPROVISI, I.; LOZANO-CHIU, M.; REX, J.; SANGLARD, D. **Antifungal drug resistance in pathogenic fungi.** *Medical Mycology*, v. 36, p. 119-128, 1998.

VANDEPUTTE, P.; LARCHER, G.; BERGÈS, T.; RENIER, G.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J.P. **Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 4608-4615, 2005.

VASQUEZ, J.A.; SANCHEZ, V.; DMUCHOWSKI, C.; DEMBRY, L.M.; SOBEL, J.D.; ZERVOS, M.J. **Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: An epidemiologic study.** *The Journal Infectious Diseases*, v. 168, p. 195-201, 1997.

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

VICENTE, M.F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; PELÁEZ, F. **Microbial natural products as a source of antifungals.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 9, p. 15-32, 2003.

VISBAL, G.; ALVAREZ, A.; MORENO, B.; SAN-BLAS, G. **S-adenosyl-L-methionine inhibitors Δ 24-sterol methyltransferase and Δ 24(28)-sterol methylreductase as possible agents against *Paracoccidioides brasiliensis*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 2966–2970, 2003.

VISBAL, G.; SAN-BLAS, G. **Análisis de la composición de esteroides libres em hongos por CG y EM.** In: Zacchino, S.A., Gupta, M.P. Manual de técnicas *in vitro* para la detección de compuestos antifúngicos. 1ª Ed. – Rosario: Corpus Editorial y Distribuidora, 2007.

VISBAL, G.; SAN-BLAS, G.; MALDONADO, A.; MURGICH, J.; FRANCO, H. **Sterol-hydrazine derivates, as inhibitors of Δ 24 sterol methyltransferase.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Brazil*, oct 2005.

VIVAS, J.J; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W. **Ultrastructural alterations in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* induced by $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitors and their combinations with ketoconazole.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 7, p. 235-240, 1996.

WENZEL, R.P. **Nosocomial candidiasis: risk factors and attributable mortality.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 20, p. 1531-1734, 1995.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. **Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance.** *Clinical Microbiolpgy Reviews*, v. 11, p. 382-402, 1998.

WINGETER, M.A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C.S.; TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T.I.E. **Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 30, p. 272-276, 2007.

WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S.M.; SEIFERT, H.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. **Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 39, p. 309–317, 2004.

WRIGHT, M.M.; HOWE, A.G.; ZAREMBERG, V. **Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues.** *Biochemistry and Cell Biology*, v. 82, p. 18–26, 2004.

WOODS, R.A.; BARD, M.; JACKSON, I.E.; DRUTZ, D.J. **Resistance to Polyene Antibiotics and Correlated Sterol Changes in Two Isolates of *Candida tropicalis* from a Patient with an Amphotericin B-resistant Funguria.** *The Journal of Infectious Diseases*, v. 129, p. 53-57, 1974.

9. Anexos

Anexo I: Manuscrito publicado

Growth inhibition and ultrastructural alterations induced by $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitors *Candida* spp. isolates, including non-*albicans* organisms.

Research article

Open Access

Growth inhibition and ultrastructural alterations induced by $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitors in *Candida* spp. isolates, including non-*albicans* organisms

Kelly Ishida¹, Juliany Cola Fernandes Rodrigues², Marcos Dornelas Ribeiro^{3,4}, Taíssa Vieira Machado Vila¹, Wanderley de Souza², Julio A Urbina⁵, Celso Vataru Nakamura⁶ and Sonia Rozental^{*1}

Address: ¹Laboratório de Biologia Celular de Fungos, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, Brazil, ²Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, Brazil, ³Instituto de Biologia do Exército – IBEX, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Instituto Estadual de Hematologia – Hemorio, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵Laboratório de Química Biológica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas 1020, Venezuela and ⁶Laboratório de Microbiologia Aplicada a Produtos Naturais e Sintéticos, Universidade Estadual de Maringá/PR, Brazil

Email: Kelly Ishida - ishidakelly@biof.ufrj.br; Juliany Cola Fernandes Rodrigues - julycola@biof.ufrj.br; Marcos Dornelas Ribeiro - mrdornellas@yahoo.com.br; Taíssa Vieira Machado Vila - taissa@globocom; Wanderley de Souza - wsouza@biof.ufrj.br; Julio A Urbina - jurbina@mac.com; Celso Vataru Nakamura - cvmakamura@uem.br; Sonia Rozental* - rozental@biof.ufrj.br

* Corresponding author

Published: 20 April 2009

Received: 26 November 2008

BMC Microbiology 2009, 9:74 doi:10.1186/1471-2180-9-74

Accepted: 20 April 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/74>

© 2009 Ishida et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Although *Candida* species are commensal microorganisms, they can cause many invasive fungal infections. In addition, antifungal resistance can contribute to failure of treatment.

The purpose of this study was to evaluate the antifungal activity of inhibitors of $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase (24-SMTI), 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β -20(R)-diol (AZA), and 24(R,S),25-epiminolanosterol (EIL), against clinical isolates of *Candida* spp., analysing the ultrastructural changes.

Results: AZA and EIL were found to be potent growth inhibitors of *Candida* spp. isolates. The median MIC₅₀ was 0.5 μ g.ml⁻¹ for AZA and 2 μ g.ml⁻¹ for EIL, and the MIC₉₀ was 2 μ g.ml⁻¹ for both compounds. All strains used in this study were susceptible to amphotericin B; however, some isolates were fluconazole- and itraconazole-resistant. Most of the azole-resistant isolates were *Candida non-albicans* (CNA) species, but several of them, such as *C. guilliermondii*, *C. zeylanoides*, and *C. lipolytica*, were susceptible to 24-SMTI, indicating a lack of cross-resistance. Reference strain *C. krusei* (ATCC 6258, FLC-resistant) was consistently susceptible to AZA, although not to EIL. The fungicidal activity of 24-SMTI was particularly high against CNA isolates. Treatment with sub-inhibitory concentrations of AZA and EIL induced several ultrastructural alterations, including changes in the cell-wall shape and thickness, a pronounced disconnection between the cell wall and cytoplasm with an electron-lucent zone between them, mitochondrial swelling, and the presence of electron-dense vacuoles. Fluorescence microscopy analyses indicated an accumulation of lipid bodies and alterations in the cell cycle of the yeasts. The selectivity of 24-SMTI for fungal cells versus mammalian cells was assessed by the sulforhodamine B viability assay.

Conclusion: Taken together, these results suggest that inhibition of 24-SMT may be a novel approach to control *Candida* spp. infections, including those caused by azole-resistant strains.

Background

Candida species are commensal microorganisms of vertebrate hosts that can cause infections ranging from non-life-threatening to invasive illnesses. Although candidemia is the most common manifestation of invasive candidiasis, extensive visceral invasion with *Candida* can occur in all organs. The eyes, brain, liver, spleen, and kidneys are the most commonly affected [1]. Candidiasis is the fourth most common cause of nosocomial bloodstream infections in Brazil and the U.S.A., with a mortality rate of approximately 40% [1,2]. A progressive increase in the number and severity of candidiasis over the past two decades has been observed worldwide, especially in immunocompromised patients and also in patients hospitalised with serious underlying diseases, during immunosuppressive therapy, or parenteral nutrition, as well as among patients exposed to invasive medical procedures. Yeasts of *Candida albicans* are the most frequently implicated in cases of invasive candidiasis infections. However, nowadays *Candida non-albicans* (CNA) species such as *Candida glabrata*, *Candida krusei*, and *Candida parapsilosis* have increased in importance and number among fungal infections [1].

Currently, the mainstay of chemotherapy employed for the treatment of fungal infections comprises drugs that affect the function or biosynthesis of membrane sterols [3]. The polyenes (such as amphotericin B) were the first antifungal class used to treat invasive fungal infections. The primary mechanism of amphotericin B is its binding to the signature 24-alkyl sterols present in fungal cell membranes, leading to a perturbation of the membrane selective permeability and, consequently, loss of the cellular content. Despite the specific fungicidal effect of polyenes, they display significant toxicity to mammalian cells [4]. Another important antifungal class comprises the azoles, such as ketoconazole, fluconazole (FLC), itraconazole (ITC), posaconazole, and voriconazole, which are the compounds most frequently used today, and whose specific target is the cytochrome P-450-dependent C14 α -demethylase, a key enzyme of the ergosterol biosynthesis pathway [4]. Although azoles are one of the main classes of drugs used in the treatment of fungal infections, these drugs present several problems such as their fungistatic rather than fungicidal activity, variable drug bioavailability, lack of intravenous preparations, large number of drug-drug interactions, development of resistance, and potential cross-resistance between different azoles [5].

During the last two decades, some studies have described a new class of antifungals called azasterols, which are inhibitors of the $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase (24-SMT), another key enzyme of the ergosterol biosynthesis pathway, which is absent in the mammalian host cells [6-8]. This enzyme catalyses the S-adenosylmethionine-

mediated incorporation of methyl groups at position 24 in sterols, which is an essential step for the biosynthesis of fungal sterols [6,8]. 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β -20(R)-diol (AZA) and 24(R,S),25-epiminolanosterol (EIL) are steroid compounds with a nitrogen atom in the side chain (azasterols, Fig. 1), and are known inhibitors of 24-SMT in fungi [9], *Trypanosoma cruzi* [10], and *Leishmania amazonensis* [11,12]. Antifungal activities of these inhibitors were also described against *Pneumocystis carinii* [13] and *Paracoccidioides brasiliensis* [14].

The purpose of the present study was to (i) examine the susceptibilities of a collection of 70 yeasts of the genus *Candida* to AZA and EIL; (ii) determine the fungicidal activities of these compounds; and (iii) detect the main morphology and ultrastructural alterations of the yeasts after drug treatment.

Results

Antifungal susceptibility of *Candida* isolates

The MICs obtained for the ATCC strains to standard drugs (AMB, FLC, and ITC) and to the experimental compounds (AZA and EIL) are listed in Table 1. Interestingly, *C. krusei* (ATCC 6258, FLC-resistant) has AZA MIC₅₀ of 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ and MIC₉₀ of 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. On the other hand, EIL did not inhibit the growth of the FLC- and ITC-resistant strains. All clinical isolates were susceptible to AMB, with the median MIC₅₀ values ranging from 0.015 to 0.25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ and the MIC₉₀ from 0.12 to 0.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Table 2). However, three isolates (two *C. tropicalis* and one *C. guilhermondii*) showed MIC₉₀ values higher than 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Susceptibility to FLC was observed in 92% of the isolates, although 26% showed a trailing effect. Clear resistance to FLC was detected in three isolates (two *C. tropicalis* and one *C. krusei*). 45% of the strains showed MIC₅₀ of 0.25–0.50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ and 37% showed MIC₉₀ of 0.50–1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. On the other hand, 75% of the isolates were susceptible to ITC, and 16% showed a trailing effect. Resistance to ITC was detected in 6 isolates (3 *C. tropicalis*, 1 *C. albicans*, 1 *C. glabrata*, and 1 *C. krusei*). Most of the isolates had MIC₅₀ and MIC₉₀ for ITC lower than 0.03 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (62%, and

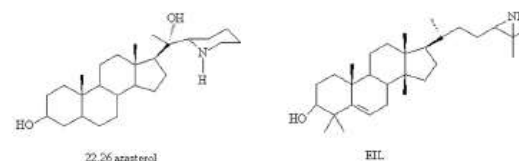


Figure 1
Molecular structures of 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β ,20-diol (22,26-azasterol, AZA) and 24 (R,S),25-epiminolanosterol (EIL).

Table 1: Susceptibility of ATCC strains to $\Delta^{24(25)}$ sterol methyl transferase inhibitors, 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β , 20-diol (AZA) and 24 (R,S), 25-epiminolanosterol (EIL), and standard antifungals (FLC, ITC, and AMB) by the broth microdilution method.

Strains	AZA		EIL		FLC		ITC		AMB	
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	> 16	> 16	1	> 16	1	> 128 ^T	0.5	> 16 ^T	0.12	0.25
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0.25	4	2	4	2	4	0.03	0.06	0.03	0.06
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	0.25	4	1	2	0.25	2	< 0.03	0.03	0.007	0.25
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0.05	1	> 16	> 16	32	64 ^R	0.12	0.25	0.25	0.25
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	1	2	> 16	> 16	4	> 128 ^T	0.12	4 ^T	0.03	0.12

^TTrailing Effect, ^RResistantThe values are expressed in $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

41%, respectively). Only *C. krusei* isolates were less susceptible to all standard drugs, showing a MIC₉₀ of 0.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ for AMB, > 128 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ for FLC, and 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ for ITC (Table 2).

When the MIC values for 24-SMTI (AZA and EIL) were analysed, we observed important antifungal activity for almost all *Candida* spp. isolates (Table 3). For AZA, MIC₅₀ and MIC₉₀ values lower than 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ were observed in 86% and 52% of the isolates, respectively. For EIL, MIC₅₀ and MIC₉₀ values lower than 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ were observed in 92% and 63% of the isolates, respectively. *C. zeylanoides* and *C. lipolytica* (a rarely observed CNA) showed MIC₅₀₋₉₀ values of $\leq 0.03 \mu\text{g.ml}^{-1}$ for both inhibitors, whilst *C. krusei* was resistant to EIL, with MIC₅₀₋₉₀ values of 8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Table 3). However, both *C. krusei* and *C. lipolytica* were resistant to AZA (MIC₅₀₋₉₀ $\geq 16 \mu\text{g.ml}^{-1}$) (Table 3). Finally, *C. guilliermondii* isolates, FLC- and ITC-resistant, were susceptible to AZA, with MIC₅₀₋₉₀ values of 0.06 – 0.25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Correlations between MIC values

Positive correlations of the MIC₅₀ values were observed between AZA and AMB ($r = 0.47$), AZA and EIL ($r = 0.46$), and FLC and ITC ($r = 0.79$). In addition, positive correlations were observed between the MIC₉₀ values of the FLC and ITC ($r = 0.71$). On the other hand, no significant correlations were observed between the MIC values for azoles and 24-SMTI. Some clinical isolates with a trailing effect for FLC ($n = 17$) and ITC ($n = 11$) also showed residual growth at higher concentrations of AZA (16 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) of 58% (10/17) and 54% (6/11) of the isolates, respectively. Residual growth was not observed in the isolates after treatment with EIL.

Minimum fungicidal concentration (MFC) of AZA and EIL

The MFCs obtained for half of our isolates were higher than 16 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, revealing a predominant fungistatic activity of the SMTI. Interestingly, 4 CNA isolates (*C. glabrata*, *C. lusitanae*, *C. zeylanoides*, and *C. rugosa*) showed MFCs lower than 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, indicating a remarkable fungicidal

activity, especially for AZA (Table 4). On the other hand, AZA killed a negligible number of the *C. albicans* isolates at concentrations lower than 16 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Ultrastructural effects

The general morphology of untreated *C. albicans* was observed using scanning (Figure 2a) and transmission (Figure 2b–c) electron microscopy. The shape of *C. albicans* varies from spherical ($4.90 \pm 0.49 \mu\text{m}$ diameter) to oval cells when viewed by scanning electron microscopy (Figure 2a). Transmission electron microscopy revealed the presence of normal cell walls with a thickness of $233 \pm 25 \text{ nm}$ (Figure 2b–c), including a thin electron-dense outer layer with delicate fibrillar structures clearly visible (f in Figure 2c). A continuous cytoplasmic membrane (cm) lining a homogeneous and electron-dense cytoplasm containing ribosomes, nucleus (n), and nucleoli (nu) could also be observed (Figure 2b–c). Treatment of *C. albicans* with MIC₅₀ of AZA (0.25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) and EIL (1.00 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) induced significant morphological changes, which ranged from discrete alterations to total destruction of the fungal cells. A common alteration observed after the treatment with AZA and EIL was a significant increase in cell size, from 5 μm to 7 μm in diameter (Figure 2d, g, j, and 2m). The number of altered cells was counted, and the morphological alterations appeared in 34.79% and 55.17% of the cells after treatment with AZA and EIL, respectively. Among the most frequently observed ultrastructural alterations were: (i) presence of small buds (asterisks in Figure 2d, g and 2j); (ii) irregular cell-wall surfaces (arrows in Fig. 2D and 2E); (iii) loss of cell-wall integrity, with an apparent shedding of cell components (Fig. 2G–J, white and black arrows); and (iv) a two- to three-fold increment of the cell wall thickness was observed after treatment with AZA and EIL, respectively (Figure 2f, i, l, and 2n). The cytoplasmic membrane of treated cells also showed several changes, such as the presence of evaginations, discontinuity, detachment from the cell wall (Figure 2e–f); budding of small vesicles that could migrate through the periplasmic region (Figure 2e–f, black arrowhead), accumulate in the cytoplasm (Fig-

Table 2: Antifungal susceptibilities of 65 clinical isolates of *Candida* spp. to amphotericin B (AMB), fluconazole (FLC), and itraconazole (ITC) by the CLSI reference broth microdilution method.

Antifungal	Species (no. of isolates)	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			Susceptibility no. isolates (%)		
		range of the MICs	*MIC ₅₀	*MIC ₉₀	S	SDD	R
AMB	All species (65)	$\leq 0.007 - 1$	0.06	0.12	65 (100)	-	
	<i>Candida albicans</i> (21)	$\leq 0.007 - 0.5$	0.06	0.12	21 (100)	-	
	<i>Candida parapsilosis</i> (19)	0.015 - 0.5	0.03	0.12	19 (100)	-	
	<i>Candida tropicalis</i> (14)	0.015 - 1	0.06	0.25	14 (100)	-	
	<i>Candida glabrata</i> (2)	0.015-0.5	0.12	0.25	2 (100)	-	
	<i>Candida krusei</i> (1)	0.25 - 0.5	0.25	0.5	1 (100)	-	
	<i>Candida lusitaneae</i> (1)	0.06 - 0.12	0.06	0.12	1 (100)	-	
	<i>Candida guilliermondii</i> (3)	0.015 - 1	0.015	0.06	3 (100)	-	
	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	0.06 - 0.12	0.06	0.12	1 (100)	-	
	<i>Candida rugosa</i> (1)	0.03 - 0.12	0.03	0.12	1 (100)	-	
	<i>Candida dubliniensis</i> (1)	0.12 - 0.25	0.12	0.25	1 (100)	-	
	<i>Candida lipolytica</i> (1)	0.12 - 0.25	0.12	0.25	1 (100)	-	
FLC	All species (65)	$\leq 0.25 - > 128^*$	0.5	1	60 (92.31)	2 (3.07)	3 (4.62)
	<i>Candida albicans</i> (21)	$\leq 0.25 - > 128^*$	0.25	4	21 (100)		
	<i>Candida parapsilosis</i> (19)	$\leq 0.25 - > 128^*$	0.5	0.5	19 (100)		
	<i>Candida tropicalis</i> (14)	$\leq 0.25 - > 128^*$	0.5	4.5	12 (85.71)		2 (14.29)
	<i>Candida glabrata</i> (2)	$\leq 0.25 - > 128^*$	4	64	2 (100)		
	<i>Candida krusei</i> (1)	16 - > 128	16	> 128			1 (100)
	<i>Candida lusitaneae</i> (1)	0.5 - 1	0.5	1	1 (100)		
	<i>Candida guilliermondii</i> (3)	0.12 - 16	4	4	2 (66.67)	1 (33.33)	
	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	4 - 16	4	16		1 (100)	
	<i>Candida rugosa</i> (1)	0.5	0.5	0.5	1 (100)		
	<i>Candida dubliniensis</i> (1)	$\leq 0.25 - 0.5$	≤ 0.25	0.5	1 (100)		
	<i>Candida lipolytica</i> (1)	0.5 - 1	0.5	1	1 (100)		
ITC	All species (65)	$\leq 0.03 - > 16^{**}$	≤ 0.03	0.12	49 (75.38)	10 (15.38)	6 (9.23)
	<i>Candida albicans</i> (21)	$\leq 0.03 - > 16^{**}$	≤ 0.03	≤ 0.03	17 (80.95)	3 (14.28)	1 (4.76)
	<i>Candida parapsilosis</i> (19)	$\leq 0.03 - > 16^{**}$	≤ 0.03	≤ 0.03	18 (94.74)	1 (5.26)	
	<i>Candida tropicalis</i> (14)	$\leq 0.03 - > 16^{**}$	≤ 0.03	1.25	9 (64.28)	2 (14.28)	3 (21.43)
	<i>Candida glabrata</i> (2)	$\leq 0.03 - 4$	0.5	2		1 (50)	1 (50)
	<i>Candida krusei</i> (1)	0.12 - 2	0.5	2			1 (100)
	<i>Candida lusitaneae</i> (1)	$\leq 0.03 - 0.12$	≤ 0.03	0.12	1 (100)		
	<i>Candida guilliermondii</i> (3)	0.06 - 0.5	0.12	0.25	1 (33.33)	2 (66.66)	
	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	0.06 - 0.12	0.06	0.12	1 (100)		
	<i>Candida rugosa</i> (1)	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	1 (100)		
	<i>Candida dubliniensis</i> (1)	0.06 - 0.12	0.06	0.12	1 (100)		
	<i>Candida lipolytica</i> (1)	0.25 - 0.5	0.25	0.5		1 (100)	

-Not determinate; *MIC results are medians; *Trailing effect to FLC [*C. albicans* (9), *C. tropicalis* (4), *C. parapsilosis* (3) and one *C. glabrata*(1)];

**Trailing effect to ITC [*C. albicans* (6), *C. tropicalis* (4) and *C. parapsilosis* (1)].

ure 2h-i, details in box), or remain close to the cell membrane (Figure 2k-l, details in box). Vesicle sizes ranged from 40-80 nm for AZA and 40-220 nm for EIL. Mitochondrial swelling and electron dense vacuoles accumulation was also observed (m, Figure 2k-l). CNA cells treated with MIC₅₀ of 24-SMTI showed similar ultrastructural changes (data not shown).

Presence of lipid bodies

Treatment with MIC₅₀ of AZA and EIL induced an accumulation of lipid bodies in the cytoplasm, which can be characterised by the presence of small dots labelled with

Nile Red (Figure 3b-c), which were absent in the untreated yeasts (Figure 3a). These lipid bodies seen by fluorescence microscopy can be correlated with the small, electron-dense vacuoles seen by transmission electron microscopy (see above, ultrastructural effects).

Effect of 24-SMT inhibitors on the cell cycle

DAPI staining used to label the DNA revealed that the treatment of *C. albicans* with AZA and EIL induced important alterations in the cell cycle (Figure 4). To quantitatively assess these alterations, different stages of the untreated yeasts were considered, such as: (1) cells con-

Table 3: Antifungal activity of 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β ,20-diol (AZA) and 24 (R,S),25-epiminolanosterol (EIL), $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyl transferase inhibitors, against 65 clinical isolates of *Candida* spp. by the CLSI reference broth microdilution method.

Drugs	Species (no. of isolates)	Concentration ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)		
		range of the MICs	*MIC ₅₀	*MIC ₉₀
AZA	All species (65)	$\leq 0.03 - > 16$	0.5	2
	<i>Candida albicans</i> (21)	0.06 - > 16	0.5	8
	<i>Candida parapsilosis</i> (19)	0.06 - > 16	0.12	0.5
	<i>Candida tropicalis</i> (14)	0.06 - > 16	0.62	8
	<i>Candida glabrata</i> (2)	0.12 - > 16	1	2
	<i>Candida krusei</i> (1)	16 - > 16	16	> 16
	<i>Candida lusitaneae</i> (1)	0.06 - 0.5	0.06	0.5
	<i>Candida guilliermondii</i> (3)	$\leq 0.03 - 0.5$	0.06	0.25
	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03
	<i>Candida rugosa</i> (1)	0.25 - 1	0.25	1
	<i>Candida dubliniensis</i> (1)	0.5 - 2	0.5	2
	<i>Candida lipolytica</i> (1)	> 16	> 16	> 16
EIL	All species (65)	$\leq 0.03 - > 16$	2	2
	<i>Candida albicans</i> (21)	0.5 - 8	2	2
	<i>Candida parapsilosis</i> (19)	0.5 - 8	1	2
	<i>Candida tropicalis</i> (14)	1 - 8	1	2
	<i>Candida glabrata</i> (2)	0.5 - 4	1	2
	<i>Candida krusei</i> (1)	8	8	8
	<i>Candida lusitaneae</i> (1)	0.5 - 2	0.5	2
	<i>Candida guilliermondii</i> (3)	1 - 4	1	4
	<i>Candida zeylanoides</i> (1)	1 - 2	1	2
	<i>Candida rugosa</i> (1)	1 - 2	1	2
	<i>Candida dubliniensis</i> (1)	2 - 8	2	8
	<i>Candida lipolytica</i> (1)	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03

*MIC results are medians.

taining one nucleus, (II) cells with a bud and one nucleus, and (III) cells with a bud and two nuclei (one in each cell). After treatment with the MIC₅₀s of AZA and EIL, different alterations in the nucleus were observed, and these were classified as: (A) cells with more than one nucleus, (B) cells showing abnormal chromatin condensation, and (C) cells without a nucleus. Counting the number of abnormal cells revealed that approximately 66% of the yeasts showed abnormal chromatin condensation, whereas 6.6% of AZA-treated and 1.5% of EIL-treated cells contained more than one nucleus, and approximately 6% of the cells treated with both compounds had no nucleus (Figure 4).

Cytotoxicity evaluation

Cytotoxicity of 24-SMTI was evaluated against mammalian cells (Vero) using the sulforhodamine B viability assay. For both AZA and EIL the CC₅₀ was 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, which corresponds to a mean selectivity index of 80 for AZA and 20 for EIL.

Discussion

Although *C. albicans* is the predominant species in candidiasis, CNA species have increased in frequency in recent

years. The reasons for the emergence of CNA species are not fully understood, but some medical conditions may frequently run the risk of developing candidaemia due to the CNA species: *C. parapsilosis* has been associated with vascular catheters and parenteral nutrition; *C. tropicalis* with cancer and neutropenia; and *C. krusei* and *C. glabrata* with previous treatments with FLC and ITC [2].

Previous studies have described a high susceptibility of *C. albicans* isolates to azoles and AMB, whereas CNA isolates are usually less susceptible and may be intrinsically resistant to FLC and ITC [2,15-17]. As reported by other investigators [2,18,19], none of our *Candida* isolates showed MIC $\geq 2 \mu\text{g.ml}^{-1}$ for AMB. MIC values found for ITC and FLU were similar to those previously reported by different groups [2,15-17]. However, in the present study, FLC-resistant *Candida* strains were only observed among CNA species (6.8% of the isolates). However, ITC-resistance was found in *C. albicans* (1.5%) and CNA isolates (7.7%).

The observation of a high positive correlation between MIC values of FLC and ITC ($r = 0.79$ for MIC₅₀ and $r = 0.71$ for MIC₉₀), in this study, suggests that cross-resistance may be occurring. However, no correlation was observed

Table 4: Cumulative MFC profile of 65 clinical isolates of *Candida* spp. treated with 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β ,20-diol (AZA) and 24(R,S),25-epiminolanosterol (EIL).

Species (no. isolates)	Drugs	Cumulative MFC* ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)						
		0.03	1	2	4	8	16	> 16
All species (65)	AZA	1.52	3.04	12.16	16.72	34.96	44.08	100
	EIL			6.08	15.20	30.40	51.68	100
<i>Candida albicans</i> (21)	AZA			4.76	4.76	9.52	9.52	100
	EIL				9.52	28.57	61.98	100
<i>Candida parapsilosis</i> (19)	AZA		5.26	26.31	36.87	68.42	68.42	100
	EIL			10.52	15.79	26.31	63.15	100
<i>Candida tropicalis</i> (14)	AZA					35.71	64.28	100
	EIL			7.17	7.17	35.71	42.87	100
<i>Candida glabrata</i> (2)	AZA			50	50	50	50	100
	EIL				50	50	50	100
<i>Candida krusei</i> (1)	AZA							100
	EIL							100
<i>Candida lusitanae</i> (1)	AZA							100
	EIL				100	100	100	100
<i>Candida guilliermondii</i> (3)	AZA							100
	EIL							100
<i>Candida zeylanoides</i> (1)	AZA	100	100	100	100	100	100	100
	EIL			100	100	100	100	100
<i>Candida rugosa</i> (1)	AZA				100	100	100	100
	EIL							100

* data is expressed in percentual of isolates.

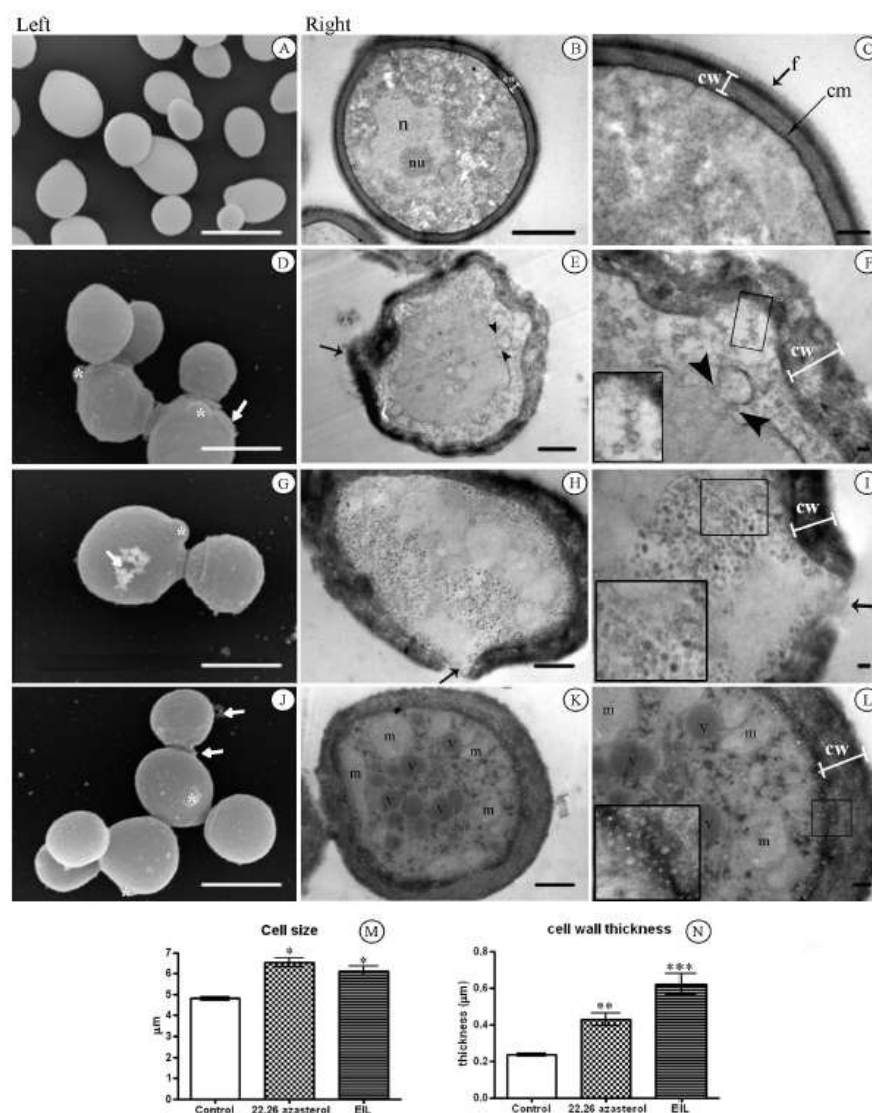
between MIC values of the azoles and 24-SMTI, indicating lack of possible cross-resistance.

The general finding for our *Candida* spp. isolates was that they were mostly susceptible to AZA and EIL, because the MIC₅₀s were lower than 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ for 73% and 88% of the isolates after treatment with AZA and EIL, respectively. Interestingly, some FLC- and ITC-resistant strains were susceptible to 24-SMTI. However, residual growth of *Candida* after treatment with AZA was similar to that observed for FLC and ITC. No residual growth was observed after treatment with EIL. The fungicidal action of 24-SMTI was more prominent against CNA species than against *C. albicans* isolates. A concentration of 4.0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ of 24-SMTI was enough to kill 100% of *C. lusitanae*, *C. zeylanoides*, and *C. rugosa*, and 50% of *C. glabrata*. In contrast, this same concentration killed only 4.7% and 9.5% of *C. albicans* isolates, considering AZA and EIL respectively.

Previous studies have shown that azasterol derivatives have antifungal activity against a variety of species [7]. 15-azasterol, in concentrations ranging from 0.01 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ to 4.08 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *C. albicans*, with a concomitant accumulation of sterol intermediate molecules [20,21]. The range of MIC and MFC values for 15-azasterol analogues against these fungal species varied from 0.8 to 3.1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ and 3.1 to 6.3 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, respectively [7] and are similar to the values obtained in the present study.

Other azasterol derivatives have been shown to inhibit *S. cerevisiae* 24-SMT, leading to the accumulation of zymosterol [22]. Recent work demonstrated that AZA displays antifungal activity against *Paracoccidioides brasiliensis* [14] and *Pneumocystis carinii* [13]. Concentrations of 5 μM (2.05 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) inhibited 100% of the growth in *P. brasiliensis*, and the treatment of *P. carinii* with the IC₅₀ of 0.3 μM (0.12 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) led to growth arrest and accumulation of 24-desakyl sterols, indicating an inhibition of 24-SMT [13]. In addition, previous studies have also shown an anti-protozoan activity of AZA and EIL on *T. cruzi* epimastigotes and intracellular amastigotes [10], *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes [11,12], *Toxoplasma gondii* [23], and *Giardia lamblia* [24], with MICs in the low μM to sub- μM range. For protozoans, EIL was reported to be more active than AZA. In contrast, we found in this study that AZA was more active than EIL against *Candida* spp. isolates.

Treatment of *C. albicans* yeasts with AZA and EIL caused dramatic changes in their cellular and sub-cellular structure. The main alterations included changes in the cell wall shape and thickness, a pronounced disconnection between the cell wall and cytoplasm, with the presence of an electron-lucent zone between them, cell collapse and release of cellular content, mitochondrial swelling, and abnormalities in the nuclear structure. These findings are similar to those previously reported after treatment of *Candida* spp. with different azoles [25-28]. Borges and co-

**Figure 2**

Scanning electron microscopy (left column) and transmission electron microscopy (two right columns) micrographs of *C. albicans* (isolate 77) untreated (Fig. A-C) and treated with MIC₅₀ of AZA (0.25 μg.ml⁻¹) (Fig. D-F) and EIL (1 μg.ml⁻¹) (Fig. G-L) for 48 h at 35°C. Control cells have a normal ultrastructure, with nucleus (n), nucleoli (nu), continuous cytoplasmic membrane (cm), compact cell wall (cw) with fibrillar structures (f), and several ribosomes in the cytoplasm (Fig. A-C). Treated cells show ultrastructural alterations, such as: presence of small buds (asterisks in Fig. 2D, G and J); cell-wall disruption (black and white arrows in Fig. D-J), and increased thickness (cw in Fig. I and L); budding of small vesicles coming from the intracellular membranes (arrowhead in Fig. F); accumulation of small vesicles in the periplasmic region (inset in Fig. F), in cytoplasm (inset in Fig. I), and in close association with the cytoplasmic membrane (inset in Fig. L); accumulation of electron-dense vacuoles (v in Fig. K) and mitochondrial swelling (m in Fig. K). The effect of 24-SMT inhibitors on cell size and on cell wall thickness was measured and statistically analysed (Fig. M and N, respectively). Bars in A, D, G, and J = 5 μm; B, E, H, and K = 1 μm; C, F, I, and L = 0.2 μm. * p < 0.01; **p < 0.001; ***p < 0.0001.

workers [27] reported that exposure of *Candida albicans* to ITC leads to primary alterations at the cell periphery and the appearance of vacuoles in the cytoplasm, which may be lipid inclusions. These changes were usually accompanied by an increase in the cell volume and impaired cell division. In addition, studies by Hazen and co-workers [28] revealed that *Candida* treated with FLC shows a distinct retraction of the membrane from the cell wall. On the other hand, *C. albicans* treated with low concentrations of AMB shows chromatin condensation and margination, separation of the nuclear envelope, and nuclear fragmentation [29]. High concentrations of AMB induce cellular changes characteristic of necrosis, showing many large vacuoles [29]. Additionally, Bahmed and co-workers [30] demonstrated an increase in cell wall thickness of *Candida* yeasts, which may be related to alterations in the cell wall composition induced by the treatment with AMB.

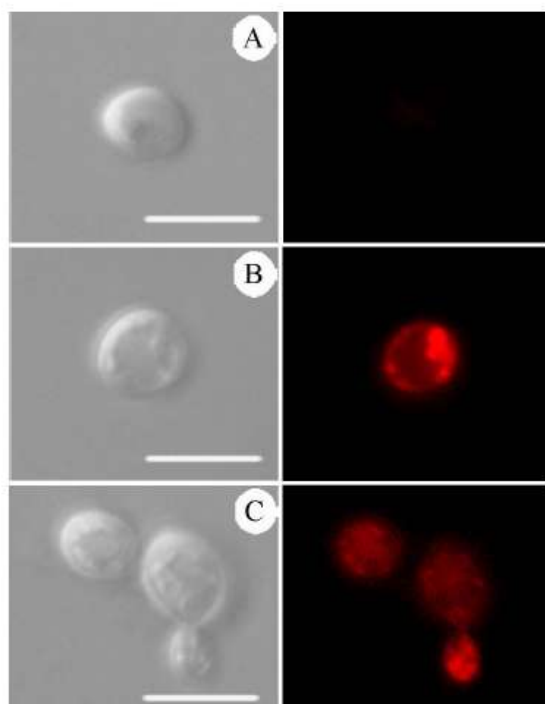


Figure 3
Differential Interference Contrast (DIC) microscopy (left) and fluorescence microscopy with Nile Red (right) of *C. albicans* (isolate 77) control (A), treated with MIC₅₀ of AZA (0.25 μg.ml⁻¹) (B) and EIL (1 μg.ml⁻¹) (C) for 48 h at 35°C, showing the presence of lipid droplets. Bars = 5 μm.

In addition, similar to our findings, the appearance of multivesicular bodies and myelin-like structures were reported after treatment of *Leishmania* [11,12] and *T. cruzi* [31] with AZA and EIL.

Staining with Nile Red revealed the presence of lipid accumulation in the cytoplasm after treatment with 24-SMTI, confirming that these compounds induce a perturbation in lipid biosynthesis. Similar observations have recently been made as the result of treatment of *Leishmania amazonensis* with 24-SMTI, which induced several abnormalities in the lipid content, with the accumulation of steroid intermediate molecules [12].

In addition, staining of DNA with DAPI indicates a profound alteration in the cell cycle after treatment with AZA and EIL. *Candida* yeasts produced unfertile buds that remained closely associated with the mother cell, and appeared with or without various nuclei. The nucleus may also have an altered shape and/or with abnormal chromatin condensation that might be associated with apoptosis cell death, as previously described after treatment of *C. albicans* with AMB [29]; and also after treatment of *Tritrichomonas foetus* with hydrogen peroxide [32]. The presence of many cells with more than one nucleus may also indicate that ergosterol biosynthesis inhibitors are interfering with cytokinesis. In fact, it was previously found that ergosterol levels modulate the activity of protein kinases such as pp60v-src and also the levels of cAMP, both of which are directly related to the control of the cell cycle [33,34].

In addition, some studies have shown that drugs such as griseofulvin and nocodazole, which interfere with the assembly of cytoskeleton components, induce alterations in the cell cycle and apoptosis cell death [35-37]. Thus, there are two possible explanations for the alterations in the cell cycle: (a) the depletion of ergosterol and other lipids, which are essential for the maintenance of the cytoplasmic membrane structure and are also important key regulators of the cell cycle; and/or (b) alterations in the cytoskeleton structure, which can affect the cytokinesis process. The results obtained here suggest that AZA and EIL are probably interfering with sterol biosynthesis in *Candida* spp., as previously described for *C. albicans* [20], *P. carinii* [13], *T. cruzi* [3], and *L. amazonensis* [12]. On the other hand, we cannot exclude the possibility that these compounds may be acting in other pathways, inducing some secondary effects that could be related to the accumulation of other lipids or, as demonstrated in *Crithidia deanei*, that AZA can interfere with phospholipid biosynthesis [38]. Further studies are necessary to characterise the correlation between the depletion of ergosterol and the cell cycle in *C. albicans*.

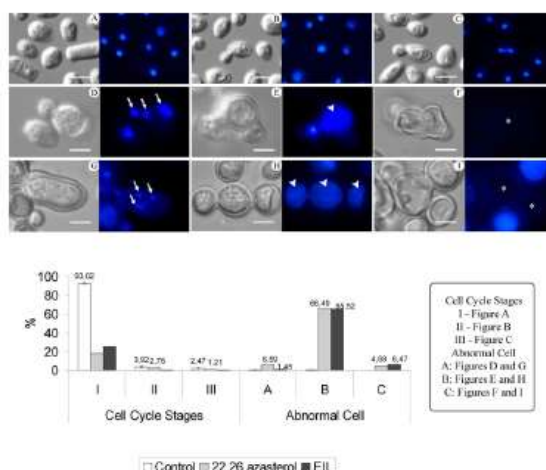


Figure 4
Differential Interference Contrast (DIC) microscopy (left) and fluorescence microscopy with DAPI (right) of *C. albicans* (isolate 77) control and treated with MIC₅₀ of AZA and EIL, showing alterations in the cell cycle such as the presence of cells with multiple nuclei (arrows in Fig. D and G), abnormal chromatin condensation (arrowheads in Fig. E and H), and cells without a nucleus (asterisk in Fig. F and I). A-C: control cells in different stages of the cell cycle; D-F: 0.25 µg.ml⁻¹ AZA; G-I: 1 µg.ml⁻¹ EIL; J: Percentage of *C. albicans* cells, untreated and treated with 24-SMT inhibitors, showing different cell cycle stages: (I) cells with no bud and one nucleus, (II) cells with a bud and one nucleus, and (III) cells with a bud and two nuclei (one in each cell); and alterations of cell cycles: (A) cells with more than one nucleus, (B) cells showing abnormal chromatin condensation, and (C) cells without a nucleus. Bar = 5 µm.

Conclusion

The results presented herein demonstrate the potential usefulness of the 24-SMT inhibitors AZA and EIL as antifungal agents, including azole-resistant *Candida* strains. The specific *in vitro* and *in vivo* antifungal and antiprotozoal activity of azasterols has been known for years, and in most cases has been linked to their specific inhibition of 24-SMT, an enzyme absent in mammals [10-14,39]. However, other studies have found that these compounds are also active against parasitic protozoa that lack endogenous sterol biosynthesis, such as *T. gondii* [23,40] and *Trypanosoma brucei* [41], indicating that they may have other biochemical targets. Taken together, these results indicate azasterols as useful leads for novel antifungal agents, but optimisation of their selectivity, ADME, PK, and toxicological properties is required for their further advancement as drug candidates.

Methods

Microorganisms

Antifungal assays were performed against 70 yeasts of the genus *Candida*. Five standard strains from the American Type Culture Collection (ATCC): *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, and *Candida tropicalis* ATCC 13803; and 65 clinical isolates: *Candida albicans* (21), *Candida parapsilosis* (19), *Candida tropicalis* (14), *Candida guilliermondii* (3), *Candida glabrata* (2), *Candida krusei* (1), *Candida lusitanae* (1), *Candida zeylanoides* (1), *Candida rugosa* (1), *Candida dubliniensis* (1), and *Candida lipolytica* (1) were used. The clinical isolates came from bloodstream (35%), urine (26%), and other clinical material (39%), and were isolated from 2002 to 2006 at the Microbiology/Mycology Laboratory of Hemorio, Rio de Janeiro, Brazil. Species identification was performed by micromorphology analysis and Vitek Systems (Biomérieux Inc., France). The isolates were maintained in Sabouraud dextrose agar plates at 4 °C, and subcultures were used in each experiment.

Drugs

20-piperidin-2-yl-5α-pregnan-3β, 20-diol (22,26-azasterol or AZA) (Fig. 1) and 24(R,S),25-epiminolanosterol (EIL) (Fig. 1), Δ²⁴⁽²⁵⁾-sterol methyltransferase inhibitors, were synthesised, purified, and characterised as described by Urbina et al. [10]. Fluconazole (FLC) (Pfizer, São Paulo, Brazil), Itraconazole (ITC), and Amphotericin B (AMB) (both from Sigma Chemical Co., Missouri, USA) were used as reference antifungals. Drugs were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain 100-times stock solutions and maintained at -70 °C.

Antifungal susceptibility test

The minimal inhibitory concentration (MIC) of each drug was obtained using the broth microdilution technique as described in document M27-A3 of the Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI [42]. Briefly, serial two-fold dilutions of the drugs were performed in RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., Missouri, USA), buffered with MOPS 0.16 M, pH 7.0, into 96-well microtitre trays to obtain concentration ranges of 0.03–16 µg.ml⁻¹ (AZA, EIL, and ITC), 0.25–128 µg.ml⁻¹ (FLC) and 0.007–4 µg.ml⁻¹ (AMB). Next, the yeast inoculum was adjusted to 1–5 × 10⁶ CFU.ml⁻¹. Dilutions of 1:50 and 1:20 in RPMI 1640 medium were performed to obtain 1–5 × 10³ CFU.ml⁻¹, and an aliquot was dispensed into each well. The microtitre trays were incubated at 35 °C, for 48 h. MIC₅₀ and MIC₉₀ values (MICs that inhibit 50% and 90% of the yeast growth in relating to control, respectively) were determined using a spectrophotometer at 492 nm. MIC₅₀ and MIC₉₀ median values for test and standard drugs were also determined. Clinical isolates were classified according to their MIC in three different categories:

susceptible (S), susceptible dose-dependent (SDD), or resistant (R). Interpretative breakpoints proposed by the CLSI [42] for FLC and ITC were used, and concentrations above $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ were considered resistant for AMB [43]. Trailing effect for FLC and ITC was detected at visual reading after 24 h of incubation.

The minimum fungicidal concentration (MFC) was determined after 48 h of treatment with the inhibitory concentrations used in the susceptibility test. An aliquot of each *Candida* isolate was transferred onto Sabouraud dextrose agar plates without the presence of drugs. The plates were incubated at 35°C for 48 h, and the minimum fungicidal concentration (MFC) was determined. MFC means the lowest concentration that showed no fungal growth [44].

Fluorescence microscopy

C. albicans (isolate 77) was treated with MIC_{50} of AZA and EIL at 35°C for 48 h. Yeasts were washed in PBS, pH 7.2 and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min. Next, the yeasts were adhered to coverslips with poly-L-lysine and incubated with $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Nile Red (Fluka, USA) for 30 min to label the lipid bodies and $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ DAPI (Sigma Chemical Co., Missouri, USA) for 10 min to label the DNA. Coverslips were mounted in n-propylgallate solution and observed in a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope equipped with rhodamine (Nile Red fluorescence) and DAPI filters, and the images were recorded with a C5810 Hamamatsu camera. The number of altered *Candida* was determined after the counting of at least 300 yeast cells. Cell size was measured by means of the SemAfore 5.0 software (Jeol, Japan).

Transmission electron microscopy

C. albicans (isolate 77) was treated with MIC_{50} of AZA and EIL at 35°C , for 48 h. Yeasts were washed in PBS, pH 7.2 and fixed in a solution of 2.5% glutaraldehyde and 4% freshly prepared formaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, for 2 h at room temperature. After fixation, yeasts were post-fixed for 2 h in 1% osmium tetroxide containing 1.25% potassium ferrocyanide and 5 mM CaCl_2 in cacodylate buffer, pH 7.2, washed in the same buffer, dehydrated in ethanol, and embedded in Spurr. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and images were obtained in a Zeiss 900 electron microscope equipped with a CCD Camera (Mega view III model, Soft Image System, Germany). Images were processed with ITEM software (Soft Image System, Germany). Cell wall thicknesses and vesicles of untreated and treated yeasts were measured by means of the SemAfore 5.0 software (Jeol, Japan).

Scanning electron microscopy

C. albicans (isolate 77) treated with MIC_{50} of AZA and EIL at 35°C for 48 h, was fixed as described above for trans-

mission electron microscopy, and subsequently dehydrated in ethanol, critical-point dried in CO_2 , coated with gold, and observed in a JEOL JSM-5310 scanning electron microscope.

Cytotoxicity tests in mammalian cells

Green monkey kidney (Vero) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Invitrogen Corporation, New York, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), and $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ gentamicin at 37°C in a 5% CO_2 /air mixture. In 96-well microtitre trays, 2.5×10^4 cells/well were dispensed and incubated for 24 h. Monolayers of Vero cells were treated with different concentrations of 24-SMTI for 48 h at 37°C in 5% CO_2 and fixed in 10% trichloroacetic acid for 1 h at 4°C , stained with sulforhodamine B for 30 min at 4°C , and the optical densities were obtained in a spectrophotometer at 530 nm [45]. The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) and the selectivity index ($\text{SI} = \text{CC}_{50}/\text{MIC}_{50}$) were calculated.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the Prism 5.0 software, and $p < 0.05$ was considered as significant. Differences in the cell size and cell-wall thickness of untreated and treated *Candida* spp. were analysed by one-way ANOVA (Dunnett test), and MIC values were analysed by linear regression test.

Authors' contributions

KI, JCFR and SR designed the study and wrote the manuscript. The syntheses of 24-SMT inhibitors were performed by JAU. MDR provided the clinical isolates. KI and TVMV realized the susceptibility assay, fluorescence and transmission electron microscopy. CVN worked on cytotoxicity tests. JAU and WS critically revised the manuscript for its important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). J.C.F.R. has a postdoctoral fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

1. Kauffman CA: **Fungal infections.** *Proc Am Thoracic Soc* 2006, 3:35-40.
2. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Noue'R SA, Arthington-Skaggs B, Matta DA, Warnock D, Morgan J: **Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers.** *J Clin Microbiol* 2006, 44:2816-2823.
3. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE: **Guidelines of treatment of candidiasis.** *Clin Infect Dis* 2004, 38:161-189.
4. Odds FC, Brown AJ, Gow NA: **Antifungal agents: Mechanism of action.** *Trends Microbiol* 2003, 11:272-279.

5. Pasqualotto AC, Denning DW: **New and emerging treatments for fungal infections.** *J Antimicrob Chemother* 2008, **61**(Suppl 1):i19-i30.
6. Barret-Bee K, Ryder NS: **Biochemical aspects of ergosterol biosynthesis inhibition.** In *Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy* Edited by: Sutcliffe J, Georgopadakou NH. New York: Chapman & Hall; 1992:410-436.
7. Burbiel J, Bracher F: **Azasteroids as antifungals.** *Steroids* 2003, **68**:587-594.
8. Oehlschlager AC, Czyżewska E: **Rationally designed inhibitors of sterol biosynthesis.** In *Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy* Edited by: Sutcliffe J, Georgopadakou NH. New York: Chapman & Hall; 1992:437-475.
9. Song Z, Nes WD: **Sterol biosynthesis inhibitors: Potential for transition state analogs and mechanism-based inactivators targeted at sterol methyltransferase.** *Lipids* 2007, **42**:15-33.
10. Urbina JA, Vivas J, Visbal G, Contreras LM: **Modification of the composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by $\Delta^{24(25)}$ sterol methyltransferase inhibitors and their combinations with ketoconazole.** *Mol Biochem Parasitol* 1995, **73**:199-210.
11. Rodrigues JCF, Bernardes CF, Visbal G, Urbina JA, Vercesi AE, de Souza W: **Sterol methenyl transferase inhibitors alter the ultrastructure and function of the *Leishmania amazonensis* mitochondrion leading to potent growth inhibition.** *Protist* 2007, **158**:447-456.
12. Rodrigues JCF, Attias M, Rodriguez C, Urbina JA, de Souza W: **Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**:487-499.
13. Urbina JA, Visbal G, Contreras LM, McLaughlin G, Docampo R: **Inhibitors of D24(25) sterol methyltransferase block sterol synthesis and cell proliferation in *Pneumocystis carinii*.** *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **41**:1428-1432.
14. Visbal G, Alvarez A, Moreno B, San-Blas G: **S-adenosyl-L-methionine inhibitors Δ^{24} -sterol methyltransferase and $\Delta^{24(28)}$ -sterol methylreductase as possible agents against *Paracoccidioides brasiliensis*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**:2966-2970.
15. Borg-von Zepelin M, Kunz L, Rühl R, Reichard U, Weig M, Groß U: **Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July to August 2005.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **60**:424-428.
16. Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, da Matta DA, Colombo AL: **Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003, **98**:401-405.
17. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R: **Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance.** *Int J Antimicrob Agents* 2006, **27**:359-366.
18. Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahisa A: **Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2000 to 2003.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:1829-1835.
19. Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, Powderly WG, Hyslop N, Kauffman CA, Cleary J, Mangino JE, Lee J: **Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**:3149-3154.
20. Georgopadakou NH, Dix BA, Smith SA, Freudenberger J, Funke PT: **Effect of antifungal agents on lipid biosynthesis and membrane integrity in *Candida albicans*.** *Antimicrob Agents Chemother* 1987, **31**:46-51.
21. Hays PR, Parks LW, Pierce HD, Oehlschlager AC: **Accumulation of ergosta-8,14-dien-3 β -ol by *Saccharomyces cerevisiae* cultured with an azasterol antimycotic agent.** *Lipids* 1977, **12**:666-668.
22. Oehlschlager AC, Angus RH, Pierce AM, Srinivasan R: **Azasterol inhibition of Δ^{24} -sterol methyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochemistry* 1984, **23**:3582-3589.
23. Dantas-Leite LRV, Urbina JA, de Souza W, Vommaro RC: **Selective anti-*Toxoplasma gondii* activities of azasterols.** *Int J Antimicrob Agents* 2004, **23**:620-626.
24. Maia C, Attias M, Urbina JA, Gilbert I, Magaraci F, de Souza W: **Azasterols impair *Giardia lamblia* proliferation and induces encystation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **363**:310-316.
25. Bellanger P, Nast CC, Fratti R, Sanati H, Ghannoum M: **Voriconazole (UK-109,496) inhibits the growth and alters the morphology of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida* species.** *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **41**:1840-1842.
26. Koul A, Vitullo J, Reyes G, Ghannoum M: **Effects of voriconazole on *Candida glabrata* in vitro.** *J Antimicrob Chemother* 1999, **44**:109-112.
27. Borges M, Ven MA Van de: **Degenerative changes after itraconazole treatment.** *Rev Infect Dis* 1987, **9**(Suppl 1):S33-42.
28. Hazen KC, Mandell G, Coleman E, Giangin W: **Influence of fluconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*.** *FEMS Microbiology Letters* 2000, **183**:89-94.
29. Phillips A, Sudbery I, Ramsdale M: **Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:14327-14332.
30. Bahmed K, Bonaly R, Benallaoua S, Coulon J: **Effect of sub-inhibitory concentrations of amphotericin B on the yeast surface and phagocytic killing activity.** *Process Biochem* 2005, **40**:759-765.
31. Vivas J, Urbina JA, de Souza W: **Ultrastructural alterations in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* induced by $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitors and their combinations with ketoconazole.** *Int J Antimicrob Agents* 1996, **7**:235-240.
32. Mariante RM, Guimarães CA, Linden R, Benchimol M: **Hydrogen peroxide induces caspase activation and programmed cell death in the amitochondrial *Trichomonas foetus*.** *Histochem Cell Biol* 2003, **120**:129-141.
33. Dahl C, Biemann HP, Dahl J: **A protein kinase antigenically related to pp60^{src} possibly involved in yeast cell cycle control: Positive *in vivo* regulation by sterol.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, **84**:4012-4016.
34. Sardari S, Mori Y, Kurosawa T, Daneshmandi M: **Modulatory effect of cAMP on fungal ergosterol level and inhibitory activity of azole drugs.** *Can J Microbiol* 2003, **49**:344-349.
35. Pacchierotti F, Bassani B, Marchetti F, Tiverson C: **Griseofulvin induces mitotic delay and aneuploidy in bone marrow cells of orally treated mice.** *Mutagenesis* 2002, **17**:219-222.
36. Panda D, Rathinasamy K, Santra MK, Wilson L: **Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: Implications for its possible use in the treatment of cancer.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:9878-9883.
37. Shaw SL, Yeh E, Maddox P, Salmon ED, Bloom K: **Astral microtubule dynamics in yeast: A microtubule-based searching mechanism for spindle orientation and nuclear migration into the bud.** *J Cell Biol* 1997, **139**:985-994.
38. Palmié-Perixoto IV, Rocha M, Urbina JA, de Souza W, Einicker-Lamas M, Motta MC: **Effects of sterol biosynthesis inhibitors on endosymbiont-bearing trypanosomatids.** *FEMS Microbiol Letters* 2006, **255**:33-42.
39. Urbina JA, Vivas J, Lazardi K, Molina J, Payares G, Piras MM, Piras R: **Antiproliferative effects of delta 24(25) sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies.** *Chemotherapy* 1996, **42**(4):294-307.
40. Lorente SO, Rodrigues JC, Jimenez C, Joyce-Menckse M, Rodrigues C, Croft SL, Yardley V, de Luca-Fradley K, Ruiz-Perez LM, Urbina J, de Souza W, Gonzalez Pacanowska D, Gilbert IH: **Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:2937-2950.
41. Gros L, Castillo-Costa VM, Jiménez CJ, Sealey-Cardona M, Vargas S, Estevez AM, Yardley V, Rattray L, Croft SL, Ruiz-Perez LM, Urbina JA, Gilbert IH, González-Pacanowska D: **New azasterols against *Trypanosoma brucei*: role of 24-sterol methyltransferase in inhibitor action.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:2595-2601.
42. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts.** In *Approved Standard Third edition*. CLSI, Wayne, PA, USA; Clinical and Laboratory Standards Institute . M27-A3
43. Nguyen MH, Clancy CL, Yu VL, Yu YC, Morris AJ, Snyderman DR, Sutton DA, Rinaldi MG: **Do *in vitro* susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a pro-**

- spective study of patients with *Candida* fungaemia. *J Infect Dis* 1998, **177**:425-30.
44. Ishida K, Mello JCP, Cortez DAG, Dias Filho BP, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV: Influence of tannins from *Stryphnodendro adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J Antimicrobial Chemother* 2006, **58**:942-949.
 45. Lin Z, Hoult J, Raman A: Sulforhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo. *J Ethnopharmacol* 1999, **66**:141-150.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Anexo II: Manuscritos em fase de redação

Synthetic arylquinuclidine derivatives exhibit antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilopsis*.

Kelly Ishida¹, Juliany Cola Fernandes Rodrigues², Simon Cammerer³, Julio A. Urbina⁴, Ian Gilbert³, Wanderley de Souza^{2,5}, Sonia Rozental^{1*}

Abstract

Background: Sterol biosynthesis is an essential pathway for fungal survival and many currently used antifungal agents work by targeting this pathway. There are a number of currently used and potential drug targets in this the pathway; the most widely used antifungal drugs are compounds that inhibit cytochrome P-450-dependent C14 α -demethylase (CYP51). Another important enzyme in this pathway is squalene synthase (SQS), which catalyzes the first committed step in the sterol biosynthesis.

Methods: Ten known arylquinuclidine SQS inhibitors were tested as antiproliferative agents against 5 ATCC strains and 54 clinical isolates of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilopsis*. The morphological alterations on the treated yeasts were evaluated by fluorescence and transmission electron microscopy.

Results: The most potent arylquinuclidine derivative (3-[1'-{4'-(benzyloxy)-phenyl}]-quinuclidine-2-ene) had an MIC₅₀ of 2 μ g/ml to all species, with MIC_{90s} varying from 4 μ g/ml to 8 μ g/ml. Ultrathin sections of *C. albicans* treated with 1 μ g/ml of this potent compound showed several ultrastructural alterations: (a) lost of cell wall integrity, (b) detachment of plasma membrane from the fungal cell wall, (c) an accumulation of small vesicles in the periplasmatic region, (d) presence of large electron-dense vacuoles, and (e) a significant increase of cell size and cell wall thickness. In addition, fluorescence microscopy of cell labeled with Nile Red showed an accumulation of lipid droplets in the cytoplasm of treated yeasts suggesting a correlation with the electron-dense vacuoles

observed by electron microscopy. Staining with DAPI, a fluorescent stain that binds to DNA, revealed important alterations in the cell cycle after treatment with compound.

Conclusion: Taken together, our data demonstrate that arylquinuclidine derivatives could become useful leads for the development of new anti-Candida agents, including azole-resistant strains.

Squalene synthase inhibitors, E5700 and ER-119884, inhibit growth and alter ultrastructure and lipid profile of *Candida tropicalis*.

Kelly Ishida^a, Gonzalo Visbal^b, Juliany Cola Fernandes Rodrigues^c, Julio A. Urbina^d,
Wanderley de Souza^c, Sonia Rozental^{a,*}

Abstract

Three quinuclidine-based squalene synthase inhibitors (SQSI), {3-(biphenyl-4-yl)-3-hydroxyquinuclidine (3-biphenyl-4-yl-1-aza-bicyclo[2,2,2]-octan-3-ol} (BPQ-OH), E5700 and ER-119884, were evaluated against 5 *Candida tropicalis* strains with different susceptibility profiles to fluconazole (FLC), itraconazole (ITC), terbinafine (TRB) and amphotericin B (AMB).

Although BPQ-OH, E5700 and ER-119884 were inactive for most *C. tropicalis* strains tested in concentrations up to 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; E5700 and ER-119884 were active against *C. tropicalis* ATCC 28707, a triple resistant strain to FLC, ITC and AMB but not to the TRB, with MIC₅₀ and MIC₉₀ values of 1 and 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Treatment of *C. tropicalis* ATCC 28707 with E5700 or ER-119884 MIC₅₀ values induced several ultrastructural alterations, mainly associated with the cell wall, which exhibited prominent shading and an increase in its thickness. An increase in the number of electron-dense vacuoles was also observed. Lipid analyses revealed drastic alterations on the sterol biosynthesis pathway showing a decrease in the squalene and absence of intermediate sterol in *C. tropicalis* ATCC 28707 treated with E5700, ER-119884, and squalene accumulation in yeasts treated with TRB. Although *C. tropicalis* ATCC 28707 fatty acids profiles of cells grown in the presence of E5700 and ER-119884 revealed several alteration as an increase of C:18 percentage in relation to C:16 with drastic increase of propionic acid (Ar-C:18), no alteration was detection in the phospholipids profile.

In conclusion, our results indicated that E5700 and ER-119884 inhibited the growth and altered the ultrastructure and the lipid profile of *C. tropicalis* ATCC 28707, a resistant strain to AMB, FLC and ITC. Therefore, these inhibitors could be an option for the treatment of resistant strains and could represent interesting lead compounds in the development of new inhibitors of the SQS enzyme with broad-spectrum antifungal activity.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)