

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica



RAFAEL MESSIAS GANDRA

**Potencial antifúngico de compostos de coordenação
à prata, manganês e cobre contra espécies fúngicas
multirresistentes pertencentes ao complexo *Candida
haemulonii*: ensaios *in vitro* e *in vivo***

Orientador: André Luis Souza dos Santos

**Rio de Janeiro
Setembro - 2018**

Rafael Messias Gandra

**Potencial antifúngico de compostos de coordenação
à prata, manganês e cobre contra espécies fúngicas
multirresistentes pertencentes ao complexo *Candida*
haemulonii: ensaios *in vitro* e *in vivo***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientador: André Luis Souza dos Santos

Rio de Janeiro

Setembo - 2018

Ficha Catalográfica

GANDRA, Rafael Messias.

Potencial antifúngico de compostos de coordenação à prata, manganês e cobre contra espécies fúngicas multirresistentes pertencentes ao complexo *Candida haemulonii*: ensaios *in vitro* e *in vivo* / Rafael Messias Gandra – Rio de Janeiro UFRJ / Julho, 2018.

134f

Tese (Doutorado) – UFRJ/Instituto de Química/Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2018.

Orientador: André Luis Souza dos Santos.

1. *Candida haemulonii*, 2. Compostos de coordenação, 3. Virulência. 4. *Galleria mellonella*. I. Santos, André. UFRJ, Instituto de Química – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. II. Potencial antifúngico de compostos de coordenação à prata, manganês e cobre contra espécies fúngicas multirresistentes pertencentes ao complexo *Candida haemulonii*: ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Rafael Messias Gandra

Potencial antifúngico de compostos de coordenação à cobre, manganês e prata contra espécies fúngicas multirresistentes pertencentes ao complexo *Candida haemulonii*: ensaios *in vitro* e *in vivo*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

Aprovada em: 20 de setembro de 2018, por:

André Luis Souza dos Santos, Doutor, IMPG – UFRJ

Marcos Dias Pereira, Doutor, DBQ/IQ - UFRJ

Igor de Almeida Rodrigues, Doutor, FF - UFRJ

Lucima Ferreira Kneipp, Doutora, FIOCRUZ-RJ

Cátia Lacerda Sodré, Doutora, UFF

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador André, uma pessoa que sempre preza pela qualidade, incentiva o aprimoramento e sempre tenta nos estimular a melhorar em todos os sentidos. Você foi parte fundamental de um período único na minha vida de crescimento, de aprendizado e de novas experiências que nunca imaginei que algum dia teria a oportunidade de vivenciar. Além do excelente profissional que é, é um sujeito de primeira com quem, além de falar de experimentos, artigos, teses e prazos atrasados, sempre me senti completamente à vontade para falar de dúvidas, anseios, desejos, bobagens, fazer piadas, dar gargalhadas...são mais de 6 anos de convivência, as vezes mais perto e as vezes mais longe, porém sempre sendo um prazer ter um cara como você na minha rotina profissional e nos momentos de convívio social e pessoal.

À Marta, que também tem papel fundamental na minha formação de forma direta ao sanar dúvidas, contribuir com sugestões e obviamente ao participar do processo para adquirir aquele pequeno detalhe chamado grana para o laboratório, e também indiretamente ao contribuir para o bom funcionamento e o bom convívio entre todos os membros do laboratório, e também ao me aturar fazendo piadas de gosto duvidoso.

A minha família, meus pais Lamar e Celma e a minha irmã Juliana, que sempre me apoiaram emocionalmente e financeiramente quando preciso. Apesar de sempre reclamarem das saudades sempre me apoiaram em minhas escolhas, mesmo quando elas nos deixaram a milhares de quilômetros de distância.

A minha segunda família Karín, Luís, Teresa, Livia e Natália pelo acolhimento, ajuda e convivência. Foi sempre um grande prazer compartilhar minha rotina com vocês. A minha vó adotada Dona Mariinha, que infelizmente nos deixou, mas a quem serei eternamente grato, e como era uma puxa-saco sem tamanho de mim, sei o quanto estaria orgulhosa.

A minha romana favorita, Laura Milanés, sempre me aguentando de perto e de longe. Ter te conhecido foi inesperado, nossa história estava longe de tudo que eu planejava, mas no fim foi uma das melhores coisas a me acontecer.

Ao Michael que me orientou na Irlanda e me ajudou de diversas formas, me dando todo o suporte possível para minha adaptação. A Orla, que também me orientou durante meu período na Irlanda e me ajudou muito com os experimentos e sugestões. Ao Malachy, Pauraic, Garret e Paul pela ajuda, contribuição e pints.

A Livia Viganor, que me ajudou com experimentos, me arrumou moradia, colchão e até dinheiro emprestado durante meu tempo na Irlanda!

Um agradecimento especial a minha aluna Mariana, que me ajudou muito e me aguentou falando bobagens lado a lado no fluxo durante um bom tempo.

A toda a galera do antigo LIP, agora LEAMER. Conviver com vocês diariamente sempre foi um prazer. Sempre dando risadas, sendo sempre uma convivência leve, sem problemas sérios, sem conflitos desnecessários. Além disso, a boa vontade de todos em se ajudar no que for preciso é algo a se admirar. Todos são pessoas excelentes, obrigado por me aturarem e fazerem meus dias mais toleráveis, já que mesmo nas manhãs que não me sentia bem era só chegar no laboratório que as risadas já me colocavam para cima.

As agências brasileiras que financiaram este estudo CNPq, FAPERJ e CAPES e as agências irlandesas Science Foundation Ireland e Higher Education Authority.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, ao Dublin Institute of Technology e ao Focas Research Institute.

RESUMO

GANDRA, Rafael Messias. Potencial antifúngico de compostos de coordenação à cobre, manganês e prata contra espécies fúngicas multirresistentes pertencentes ao complexo *Candida haemulonii*: ensaios *in vitro* e *in vivo*. Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica) - Laboratório de Investigação de Peptidases, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro e Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

As espécies que formam o complexo *Candida haemulonii* (*C. haemulonii*, *C. haemulonii* var. *vulnera* e *C. duobushaemulonii*) são patógenos emergentes que apresentam múltipla resistência às drogas antifúngicas comumente utilizadas no tratamento das fungemias. Compostos de coordenação contendo 1,10-fenantrolina como ligante, apresentam uma potente atividade anti-*Candida*, sendo portanto possíveis alternativas para o tratamento de fungemias causadas por tais espécies multirresistentes. Além disso, larvas de *Galleria mellonella* vêm sendo cada vez mais utilizadas em ensaios de virulência e em testes de eficácia de compostos, uma vez que seu sistema imune inato apresenta similaridades com o de mamíferos, apresentando uma boa correlação com dados obtidos em modelos murinos. Sendo assim, no presente estudo, 19 compostos de coordenação contendo cobre(II) ($n=7$), manganês(II) ($n=7$) e prata(I) ($n=5$) foram avaliados quanto a seu potencial antifúngico contra as espécies do complexo *C. haemulonii*. Além disso, os efeitos dos compostos em um sistema *in vivo* e sua aplicabilidade no tratamento de fungemia foram investigados utilizando-se larvas de *Galleria mellonella* como modelo. Três isolados de cada espécie do complexo foram utilizados e o efeito dos compostos de coordenação na viabilidade de células planctônicas foi avaliado utilizando-se o protocolo publicado pelo CLSI (documento M27-A3) e utilizando-se XTT em células crescendo em biofilme. A toxicidade dos compostos para células epiteliais pulmonares da linhagem A549 foi avaliada utilizando-se MTT. Os resultados iniciais evidenciaram que a maior parte dos compostos foi capaz de inibir a proliferação das células planctônicas, sendo os compostos de coordenação à prata(I) os mais eficazes (média geométrica geral da concentração inibitória mínima (MG-CIM) variou entre 0,26 e 2,16 μM), seguidos respectivamente pelos compostos de manganês(II) (MG-CIM entre 0,87 e 10,71 μM) e cobre(II) (MG-CIM geral entre 3,37 e >72 μM). Os compostos de manganês(II) apresentaram as menores taxas de toxicidade às células A549, seguidos pelos compostos de prata(I) e cobre(II), respectivamente. Os compostos foram menos ativos quando testados em biofilme maduro, apresentando valores de CIM entre 2 e $33\times$ maiores quando comparadas às CIMs obtidas com as células plactônicas. A

cepa LIPCh4 foi então selecionada para os ensaios subsequentes, bem como os compostos de manganês(II) e prata(I). Os ensaios utilizando-se *G. mellonella* revelaram que *C. haemulonii* possui uma virulência reduzida quando comparada à *C. albicans* e tal virulência foi maior a 30°C quando comparada a 37°C. A infecção fúngica foi capaz de induzir uma resposta imune nas larvas de forma inóculo-dependente, que foi corroborada pela flutuação no número de hemócitos presentes na hemolinfa dos animais e pelo processo de melanização. De forma similar, uma resposta imune dose-dependente frente à exposição aos compostos de coordenação também foi observada, resultando em aumento ou redução dos hemócitos circulantes de acordo com o composto testado, bem como impactando na expressão de peptídeos antimicrobianos relacionados ao sistema imune (transferrina, inibidor de metaloproteinase de inseto (IMPI), galiomicina e gallerimicina) detectados por reação em cadeia da polimerase em tempo real. Nenhum dos compostos de coordenação apresentou toxicidade capaz de induzir mortalidade em concentrações até 10 µg/larva, porém diferentes níveis de toxicidade foram observados em concentrações entre 15 e 100 µg/larva. Finalmente, alguns compostos foram capazes de afetar a carga fúngica de larvas infectadas. Nesse sentido, o tratamento das larvas com os compostos de manganês $\text{Mn}_2(\text{oda})(\text{phen})_4(\text{H}_2\text{O})_2$ [$\text{Mn}_2(\text{oda})(\text{phen})_4(\text{oda})_2$]4H₂O (13) e $\{[\text{Mn}(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_2].3\text{H}_2\text{O}.\text{EtOH}\}_n$ (14) reduziu a carga fúngica, ao passo que os compostos $[\text{Mn}(\text{ph})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (8) e $[\text{Mn}(\text{tereph})(\text{phen})_2].5\text{H}_2\text{O}$ (12) aumentaram a mesma. O pré-tratamento com concentrações subinibitórias dos compostos também foi capaz de reduzir de forma dose-dependente a virulência de *C. haemulonii* em *G. mellonella*. Os compostos de coordenação à cobre(II), manganês(II) e prata(I) são relativamente baratos e fáceis de serem sintetizados bem como apresentam atividade antifúngica significativa contra as espécies pertencentes ao complexo *C. haemulonii*. Além disso, alguns compostos como 13 e 14 apresentaram baixa toxicidade para célula A549, induziram uma resposta imune protetora na larva, refletindo em uma redução na carga fúngica, bem como reduziram a virulência fúngica após exposição das leveduras a concentrações sub-inibitórias, indicando que tais compostos de coordenação podem se tornar potenciais agentes terapêuticos para o tratamento de infecções fúngicas causadas por tais agentes etiológicos.

Palavras chave: Complexo *Candida haemulonii*, compostos de coordenação, virulência, *Galleria mellonella*

ABSTRACT

GANDRA, Rafael Messias. Antifungal potential of copper, manganese and silver coordination compounds against multiresistant fungal species belonging to the *Candida haemulonii* complex: *in vitro* and *in vivo* assays. Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica) - Laboratório de Investigação de Peptidases, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro e Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.

The species forming the *Candida haemulonii* complex (*C. haemuloniii*, *C. haemulonii* var. *vulnera* and *C. duobushaemulonii*) are emergent pathogens that are resistant to the most commonly used antifungal drugs in fungemia treatment. Coordination compounds containing copper(II), manganese(II) and silver(I) have a potent anti-*Candida* activity, being possible alternatives for the treatment of fungemia caused by such multidrug-resistant species. Besides that, *Galleria mellonella* larvae are becoming more commonly used in fungal virulence and infection treatment assays since its innate immune system possesses several similarities to mammals and the data obtained in such studies demonstrates a good correlation with data obtained in murine models. Therefore, 19 coordination compounds containing copper(II) ($n=7$), manganese(II) ($n=7$) and silver(I) ($n=5$) were assessed for their antifungal potential against the species belonging to the *C. haemulonii* complex. Besides that, the compounds effect over an *in vivo* system and their applicability in treatment of fungemia were investigated using *G. mellonella* larvae as model. Three isolates of each species of this fungal complex were used, and the effect of coordination compounds over planktonic cells viability was evaluated by the CLSI M27-A3 protocol and by using XTT over biofilm-growing cells. The cytotoxicity of the test compounds on lung epithelial cells (A549 lineage) was evaluated by MTT assay. Most of the coordination compounds were able to inhibit the planktonic cells' proliferation, with silver(I) complexes being the most efficient (overall geometric mean of the minimum inhibitory concentration (GM-MIC) ranging from 0.26 to 2.16 μM), followed by the manganese (overall GM-MIC ranging from 0.87 to 10.71 μM) and copper (overall GM-MIC ranging from 3.37 to >72 μM) respectively. The manganese(II) compounds had the least toxicity towards A549 cells, followed by silver(I) and copper(II) compounds. When tested against a mature biofilm, the coordination compounds were less active, with increased MIC values ranging between 2- and 33-fold when compared whit the planktonic results. The strain LIPCh4 was selected for the further assays together both manganese(II) and silver(I) compounds. The experiments using *G. mellonella* revealed that *C. haemulonii* possesses reduced virulence when compared with *C.*

albicans, and such virulence is higher at 30°C. The infection is capable of inducing an immune response in a typical inoculum-dependent manner in the larvae, reflected by fluctuations in the number of hemocytes present in the hemolymph and by the melanization process. Similarly, a dose-dependent immune response after exposition to the compounds was observed, which induced an increase or decrease in the number of hemocytes as well as impacting over the expression of antimicrobial peptides related to the immune system (transferrin, insect metalloproteinase inhibitor (IMPI), galiomycin and gallerimycin) detected by real-time polymerase chain reaction. None of the coordination compounds had toxicity capable of inducing mortality up to a concentration of 10 µg/larvae, while different toxicity levels were observed with concentrations ranging between 15 and 100 µg/larvae. Finally, the compounds were capable of affecting the fungal burden of infected *G. mellonella*. In this sense, larvae treated with the manganese compounds, $\text{Mn}_2(\text{oda})(\text{phen})_4(\text{H}_2\text{O})_2$ [$\text{Mn}_2(\text{oda})(\text{phen})_4(\text{oda})_2$]4H₂O (**13**) and $\{[\text{Mn}(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_2].3\text{H}_2\text{O}.\text{EtOH}\}_n$ (**14**), reduced the fungal burden, while compounds $[\text{Mn}(\text{ph})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**8**) and $[\text{Mn}(\text{tereph})(\text{phen})_2].5\text{H}_2\text{O}$ (**12**) increased it. Pre-treatment with sub-inhibitory concentrations of the compounds was also capable of reducing, in a dose-dependent manner, the *C. haemulonii* virulence on *G. mellonella*. Copper(II), manganese(II) and silver(I) coordination compounds are relatively cheap and easy to synthesize and possess significant antifungal activity. Besides that, some of the compounds, such as **13** and **14** possess low toxicity, induce an immune system response and are capable of reducing the fungal burden in *G. mellonella* infected by *C. haemulonii*, also reducing *C. haemulonii* virulence after yeast exposition to sub-inhibitory concentrations, indicating that such compounds are potential therapeutic agents in the treatment of fungal infections caused by such etiologic agent.

Keywords: *Candida haemulonii*, metal complexes, virulence, *Galleria mellonella*

LISTA DE ABREVIACÕES

ABS	– Absorbância
AgNO ₃	– Nitrato de prata
AIDS	– Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	– Coleção de cultura tipo americana
CIM	– Concentração inibitória mínima
CNT	– Controle
CuCl ₂	– Cloreto de cobre
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
EROs	– Espécies reativas de oxigênio
FISPQ	– Ficha de informações de segurança de produtos químicos
HIV	– Vírus da imunodeficiência humana
Hsp90	– Heat shock protein 90 kDa, ou proteína de choque térmico 90 kDa
IL-1	– Interleucina 1
IL-1 β	– Interleucina 1 beta
IL-1RA	– Receptor antagonista da interleucina 1
IL-6	– Interleucina 6
IL-8	– Interleucina 8
IMD	– Deficiência imunológica
IMPI	– Inibidor de metaloproteinase de inseto
ITS	– Espaço interno transcrito
LPS	– Lipopolissacarídeo
MCP	– Proteína quimioatratativa de monócito
MG-bCIM	– Média geométrica – Concentração inibitória mínima de biofilme
MG-CIM	– Média geométrica – Concentração inibitória mínima
MIP-1 β	– Proteína inflamatória de macrófago 1 beta
MnCl ₂	– Cloreto de manganês
NADPH	– Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NF-kB	– Fator nuclear Kappa b
PBS	– Tampão fosfato salina
pH	– Potencial de hidrogênio
PMAPs	– Padrões moleculares associados a patógenos

PMN	– Células polimorfonucleares
PRRs	– Receptores de reconhecimento de padrões
rRNA	– Ácido ribonucleico ribossomal
TLR2	– Receptor do tipo toll 2
TNF- α	– Fator de necrose tumoral alfa
UFC	– Unidades formadoras de colônia
XTT	– 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenil-amino) carbonil]-2H-tetrazólio

SUMÁRIO

Introdução	16-40
1. Infecções fúngicas	16-18
2. Candidíases	18-21
3. Complexo <i>Candida haemulonii</i>	21-23
4. Compostos de coordenação	23-28
5. O uso de invertebrados como modelo <i>in vivo</i>	28-32
6. <i>Galleria mellonella</i> como modelo <i>in vivo</i>	33-37
7. Peptídeos antimicrobianos produzidos por <i>G. mellonella</i>	37-40
Justificativa	42
Objetivos	44
Metodologia	46-57
I – Metodologia Geral	46-49
1. Microrganismos	46
2. Cultivo e obtenção de células	46
3. Compostos de coordenação	47
4. Modelo <i>in vivo</i> <i>Galleria mellonella</i>	47
II – Propriedades antifúngicas dos compostos de coordenação	49-52
5. Efeito dos compostos de coordenação sobre a proliferação celular do complexo <i>C. haemulonii</i>	49-50
6. Avaliação da citotoxicidade e determinação dos índices de seletividade dos compostos	50
7. Seleção dos compostos para ensaios subsequentes	50
8. Efeito dos compostos sobre células crescendo em um biofilme	51
9. Seleção da cepa para demais experimentos, determinação de IC ₅₀ e avaliação de efeito fungicida x fungistático	51-52
III – Ensaios <i>in vivo</i> utilizando larvas de <i>Galleria mellonella</i> como modelo	52-57
10. Avaliação da virulência de <i>Candida haemulonii</i>	52
11. Resposta imune de <i>G. mellonella</i> frente a infecção com <i>C. haemulonii</i>	53
12. Toxicidade dos compostos de coordenação	53
13. Efeito dos compostos de coordenação na resposta imune de <i>G. mellonella</i>	53
14. Efeito dos compostos de coordenação na expressão de genes relacionados a resposta imune de <i>Galleria mellonella</i>	54
14.1 Primers	54
14.2 Preparação das amostras	55
14.3 Extração do RNA de <i>Galleria mellonella</i>	55
14.4 Quantificação do RNA	55
14.5 PCR em tempo real	56
15. Efeito do tratamento com os compostos de coordenação na carga fúngica de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. haemulonii</i>	56

16. Efeito do pré-tratamento dos fungos sobre a virulência em <i>G. mellonella</i>	57
17. Análises estatísticas	57
Resultados	59-82
I – Propriedades antifúngicas dos compostos de coordenação	59-66
1. Efeito dos compostos de coordenação na proliferação celular e toxicidade em células de mamífero	59-62
2. Efeito dos compostos de coordenação em células crescendo em um biofilme	63-64
3. Determinação dos valores de IC ₅₀ dos compostos selecionados e efeito fungicida/fungistático	65-66
II – Ensaio utilizando como modelo <i>in vivo</i> larvas de <i>Galleria mellonella</i>	66-76
4. Avaliação da toxicidade dos compostos de coordenação em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	66-67
5. Avaliação da virulência de <i>Candida haemulonii</i>	67-71
6. Melanização de <i>Galleria mellonella</i>	71-72
7. Modulação da resposta imune de <i>G. mellonella</i> induzida pela infecção por <i>C. haemulonii</i>	72-73
8. Determinação da carga fúngica em <i>G. mellonella</i>	73-74
9. Imunomodulação de <i>G. mellonella</i> induzida pelos compostos de coordenação	74-76
10. Impacto dos compostos na expressão de peptídeos antimicrobianos	76-77
11. Efeito do tratamento com os compostos de coordenação na carga fúngica de larvas infectadas com <i>C. haemulonii</i>	78-79
12. Avaliação da correlação entre carga fúngica e expressão de PAMs	79-81
13. Efeito do pré-tratamento na virulência de <i>C. haemulonii</i>	81-82
Discussão	84-105
Conclusões	107-108
Referências bibliográficas	110-128
Anexos	130-134

Introdução

1. Infecções Fúngicas

A presença de fungos no ecossistema terrestre é abundante, sendo formas de vida essenciais para a manutenção do mesmo. Diversos fungos compõem o microbioma humano e afetam diversos aspectos da fisiologia humana como a aquisição de energia, disponibilidade de cofatores (vitaminas), metabolismo xenobiótico, desenvolvimento e funcionamento do sistema imune e até mesmo desenvolvimento neurológico e aspectos comportamentais (SEED, 2014; BENEDICT *et al.*, 2017). Porém, uma pequena fração destes é capaz de causar doenças, sendo capazes de colonizar a espécie humana e estabelecer quadro infeccioso, causando danos a diferentes tecidos (**Figura 1**) (SEED, 2014; BENEDICT *et al.*, 2017).

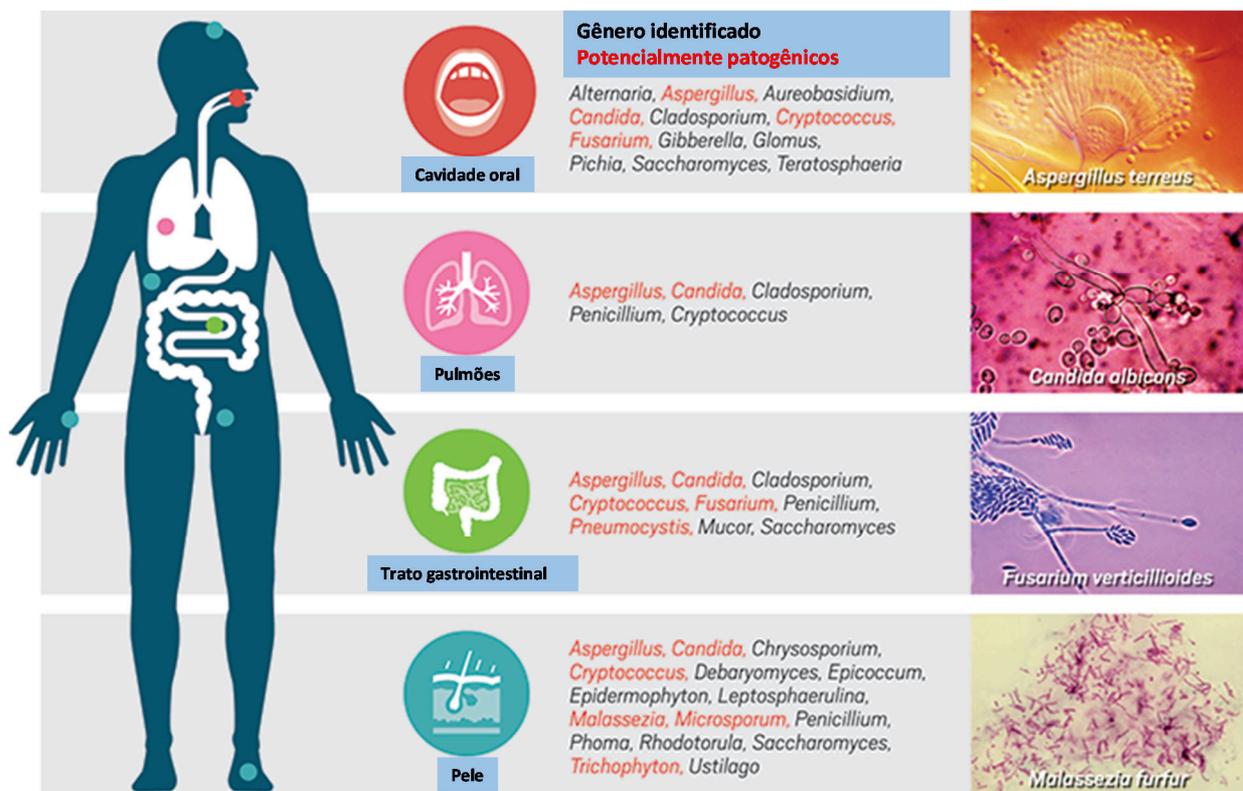


Figura 1. O microbioma humano é composto de diferentes gêneros de fungos com uma parcela destes apresentando o potencial de causar doença (Adaptado de EVERTS, 2014).

A partir da década de 1980, as infecções fúngicas invasivas emergiram como uma importante causa de mortalidade/morbidade e, conseqüentemente, como grande problema de saúde pública. As infecções fúngicas vêm recebendo maior atenção ao longo dos anos devido ao aumento significativo observado em sua incidência (CASTELLI *et al.*, 2014; HAMDY, ZAOUTIS & SEO, 2016; BENEDICT *et al.*, 2017). Diversos fatores estão relacionados a este aumento no número de fungemias, podendo ser atribuídos a mudanças relacionadas ao

patógeno, como o surgimento de novos fatores de virulências e/ou resistência, e também a fatores ambientais, como uso de antifúngicos na agricultura, introdução em novas regiões geográficas e alterações climáticas. Porém, as mudanças atribuídas ao hospedeiro, como a realocação geográfica de indivíduos que não foram anteriormente expostos as espécies ali presentes e, principalmente, o aumento do número de indivíduos imunossuprimidos e mais susceptíveis a tais infecções parecem desempenhar a maior contribuição para tal quadro (BENEDICT *et al.*, 2017). Os diversos avanços recentes na medicina resultaram em uma maior expectativa de vida e taxas de sobrevivência mais altas e, paralelamente, um maior número de indivíduos imunossuprimidos. Terapias agressivas com corticosteroides, antibióticos e quimioterápicos, infecções imunossupressoras como HIV/AIDS, cirurgias de grande porte, neoplasias hematológicas, transplantes de órgãos e a idade extrema são alguns dos fatores responsáveis pelo aumento no número destes indivíduos imunossuprimidos e mais susceptíveis a micoses sistêmicas (CASTELLI *et al.*, 2014; HAMDY, ZAOUTIS & SEO, 2016).

As infecções fúngicas apresentam morbidade e mortalidade importantes, além de considerável impacto econômico. O tratamento impacta no tempo de internação, com aumento que pode ser de 3 a 13 dias e pode aumentar os custos desta internação em cerca de 3 até 22 mil dólares (HAMDY, ZAOUTIS & SEO, 2016). Além deste impacto econômico, estima-se que a mortalidade global causada por infecções fúngicas invasivas seja de mais de 1 milhão de mortes anuais, sendo assim maior que o número de mortes causadas pela malária e o câncer de mama, e equivalente às incidências de morte causadas por tuberculose e HIV (GOW & NETEA, 2016). Além de infecções invasivas graves, os fungos podem causar infecções superficiais que, embora não sejam fatais, afetam a qualidade de vida dos indivíduos acometidos, sendo responsáveis por mais de 1 bilhão de infecções de pele, 100 milhões de infecções de mucosa e 10 milhões de alergias graves todos os anos (CASTELLI *et al.*, 2014; GOW & NETEA, 2016).

O diagnóstico e o tratamento das infecções fúngicas é difícil, uma vez que, devido à proximidade evolucionária com humanos, a presença de alvos diferenciados é pequena, o que resulta em baixa seletividade e gera a tendência a causar efeitos colaterais observados nas drogas antifúngicas (CASTELLI *et al.*, 2014; BENEDICT *et al.*, 2017). Cerca de 90% das infecções fúngicas invasivas são causadas pelas espécies pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e *Pneumocystis* e, mais especificamente, pelas espécies *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. No entanto, uma tendência na mudança deste perfil epidemiológico é cada vez mais evidente (CASTELLI *et al.*, 2014). Nesse sentido, espécies de *Candida* não-*albicans* são cada vez mais comuns, como *Candida*

parapsilosis, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Além disso, outros fungos oportunistas como *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp. e *Geotrichum capitatum*, *Fusarium* spp., *Acremonium*, *Scedosporium* spp., *Paecilomyces* e *Trichoderma* spp. também se tornaram mais incidentes. A maior presença de espécies anteriormente consideradas incomuns, que apresentam perfis de susceptibilidade reduzidos aos antifúngicos, associada a um aumento na incidência da resistência em espécies anteriormente susceptíveis as drogas antifúngicas compõem um quadro preocupante em relação ao perfil epidemiológico atual das fungemais (ANUNNATSIRI, CHETCHOTISAKD & MOOTSIKAPUN, 2009; ABU-ELTEEN & HAMAD, 2012).

2. Candidíases

O gênero *Candida* faz parte da microbiota humana, sendo encontrado colonizando a pele e superfícies mucosas do corpo de indivíduos saudáveis (WHIBLEY & GAFFEN, 2015; LAGUNES & RELLO, 2016). Múltiplas espécies constituem este gênero, e estas apresentam variações fenotípicas e filogenéticas consideráveis (WHIBLEY & GAFFEN, 2015; LAGUNES & RELLO, 2016). Sabe-se que pelo menos 15 espécies pertencentes a tal gênero sejam capazes de causar doença em seres humanos, sendo consideradas patógenos oportunistas, uma vez que costumam fazer parte da microbiota saudável, porém tornam-se patogênicos em situações específicas em que ocorre um desequilíbrio entre fungo-hospedeiro (**Figura 2**). Logo, qualquer variável que altere tal relação comensal pode ser considerado um fator de risco para o surgimento da candidíase. Diversos fatores interferem com esse equilíbrio como diabetes mellitus, insuficiência renal, pancreatite, nutrição parenteral, realização de hemodiálise, ventilação mecânica, uso de medicamentos imunossupressores, a presença de um cateter vascular central, administração de antibióticos de amplo espectro e cirurgias, especialmente abdominais. Pacientes em regime de tratamento intensivo são especialmente suscetíveis devido à severidade de seus quadros clínicos, tempo prolongado de internação e estado imunológico deprimido. Além da presença destes fatores ser comum em ambientes de terapia intensiva, a colonização por *Candida* em pacientes em tal regime de tratamento ocorre em cerca de 80% dos casos na primeira semana, o que eleva consideravelmente o risco de desenvolvimento de candidíases invasivas em ambientes hospitalares (KULLBERG & ARENDRUP, 2015; (MCCARTY & PAPPAS, 2015; CALANDRA *et al.*, 2016; LAGUNES & RELLO, 2016).

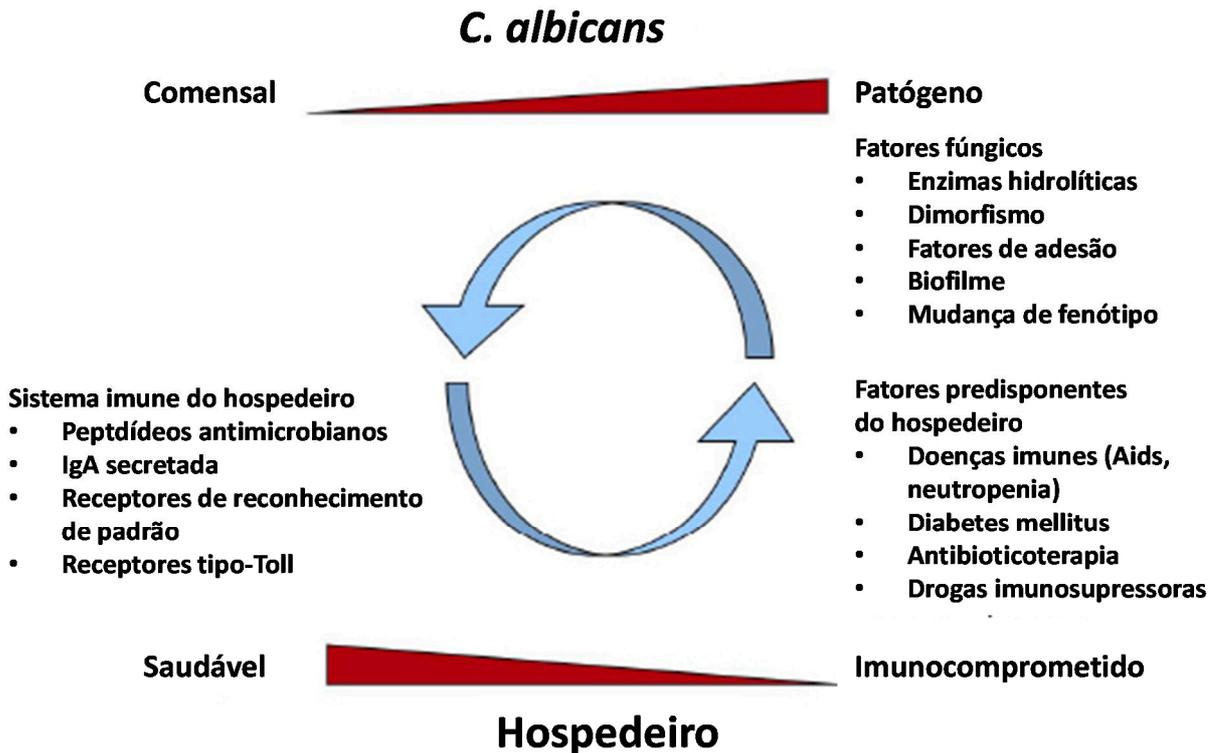


Figura 2. A candidíase causada por *C. albicans*, um comensal do corpo humano, ocorre frente a um desequilíbrio da relação *Candida*-hospedeiro (Adaptado de SCHALLER, 2012).

Candida pode causar infecções mucocutâneas superficiais e de pouca gravidade por serem limitadas e brandas, porém também podem causar infecções sistêmicas graves, com taxas de mortalidade descritas de 30 a 60%, e em alguns casos até 80% (WHIBLEY & GAFFEN, 2015; CALANDRA *et al.*, 2016). Além de candidemia, a forma mais comum de candidíase invasiva, também podem ocorrer infecções concomitantes ou não a uma candidemia em órgãos e sítios profundos como fígado, baço, coração, rins, meninges, ossos, músculos, articulações, olhos e sistema nervoso central, que costumam surgir após uma infecção sanguínea anterior ou que não tenha sido diagnosticada (**Figura 3**). Tais infecções profundas podem permanecer restritas ao local ou levar a uma candidemia disseminada secundária, e são chamadas de candidíase invasiva (KULLBERG & ARENDRUP, 2015; ANTINORI *et al.*, 2006). Acredita-se que tais infecções ocorram devido à translocação das espécies de *Candida* de locais colonizados para a corrente sanguínea ou demais órgãos e tecidos (OSTROSKY-ZEICHNER & AL-OBAIDI, 2017). Nos últimos anos, a prevalência de sepse causada por fungos aumentou em 200%, tornando assim *Candida* spp. responsáveis por 8-10% das infecções sanguíneas, sendo apontada entre a terceira e décima causa mais comum de infecções sanguíneas no mundo, apresentando uma importante variação regional. Em pacientes críticos, candidíase é a mais frequente causa de infecções sanguíneas nos Estados Unidos, sendo responsável por 70-90%

de todas as infecções fúngicas invasivas (ANTINORI *et al.*, 2016; BASSETTI, PEGHIN & TIMSIT, 2016; CALANDRA *et al.*, 2016; LAGUNES & RELLO, 2016). Vale ressaltar que, embora pacientes críticos internados em unidades de terapia intensiva sejam especialmente susceptíveis a infecções por *Candida* spp., nos últimos anos as candidíases emergiram também como um problema em pacientes hospitalizados em outros setores, como a clínica médica, ambiente este com dados indicando uma prevalência de 24% a 57% deste tipo de infecção (BASSETTI, PEGHIN & TIMSIT, 2016).

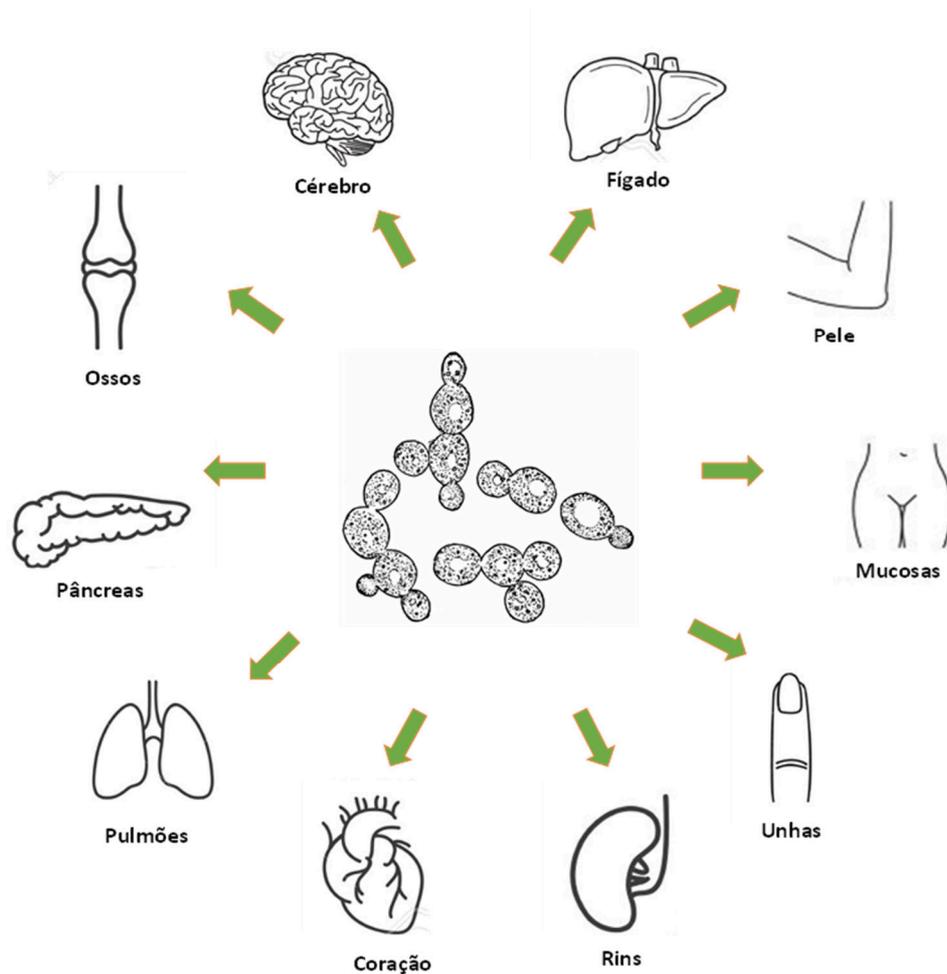


Figura 3. As candidíases podem ser superficiais ou profundas, afetando diversos órgãos.

Embora mais espécies do gênero possam tornar-se patogênicas, 95% destes quadros infecciosos são comumente causados por 5 espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (MCCARTY & PAPPAS, 2015). Em geral, *C. albicans* costumava ser isolada de 65 a 70% de todos os episódios de candidíase; embora ainda seja a espécie mais comumente isolada, estima-se que atualmente esta seja responsável por cerca de 38–70% dos casos, com alguns autores afirmando que *C. albicans* seja responsável por apenas metade dos

episódios de candidíases nos dias atuais. O consenso, porém, é que a sua incidência vem diminuindo e permanece em declínio (ANTINORI *et al.*, 2016; CALANDRA *et al.*, 2016). Espécies de *Candida* não-*albicans* emergiram nos últimos anos como importantes patógenos, como *C. glabrata* nos Estados Unidos, Canadá e norte da Europa, e *C. parapsilosis* na parte sul da Europa, Ásia e América do Sul. Embora com menos frequência, outras espécies também são agentes etiológicos de tais infecções no ambiente clínico, como exemplos *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr* e *C. guilhermondii* (KULLBERG & ARENDRUP, 2015). Tal mudança no perfil epidemiológico varia de acordo com a região geográfica, instalações hospitalares, condições predisponentes dos pacientes e principalmente o uso das drogas antifúngicas, uma vez que a exposição prévia a tais drogas está claramente associada com a mudança nas espécies incidentes e aumento dos valores da concentração inibitória mínima dos antifúngicos disponíveis (BASSETTI, PEGHIN & TIMSIT, 2016). Preocupantemente, o aumento da taxa de infecções fúngicas veio acompanhado de elevação nas taxas de resistência aos antifúngicos. Nesse sentido, algum nível de resistência as drogas antifúngicas já foi detectado em todas as espécies clinicamente relevantes do gênero *Candida*, sendo intrínseca em alguns casos. Tal fato pode estar associado ao uso inapropriado das drogas antifúngicas e ao aumento da incidência de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans*, uma vez que apresentam perfis de susceptibilidade diferentes. Sendo assim, a implementação de tratamento eficaz e escolha da droga apropriada tornaram-se problemáticas (WHIBLEY & GAFFEN, 2015; CALANDRA *et al.*, 2016). Essa nova realidade acaba por favorecer a emergência de espécies até então pouco conhecidas e de baixa incidência. Por exemplo, um estudo analisando dados de 10 centros de saúde da América Latina mostrou que 4,5% dos casos de infecções fúngicas foram causados por espécies diferentes das 5 mais incidentes anteriormente citadas (ALMEIDA JR. *et al.*, 2012). Neste cenário, espécies raras como *C. cifferri*, *C. inconspicua*, *C. guilhermondii*, *C. humicola*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. palmioleophila*, *C. rugosa*, *C. valida*, *C. fermentati* e *C. lusitaniae* são mais comumente isoladas, incluindo as espécies pertencentes ao complexo *C. haemulonii* (ALMEIDA JR. *et al.*, 2012).

3. Complexo *Candida haemulonii*

Candida haemulonii foi isolada originalmente do intestino de um peixe (*Haemulon sciurus*), posteriormente foi isolada de golfinho e água marinha, tendo sido nomeada *Torulopsis haemulonii* há época (VAN UDEN & KOLIPINSKI, 1962). O primeiro relato de isolamento em seres humanos foi em 1984, a partir do sangue de um paciente que apresentava um quadro

de insuficiência renal e estava realizando diálise peritoneal e que foi a óbito mesmo após a instauração de terapia antifúngica com uso de anfotericina B e flucitosina (LAVARDE *et al.*, 1984). Desde então, *C. haemulonii* já foi isolada de casos de onicomicoses, úlceras nos pés e pernas, vaginite e sangue (KHAN *et al.*, 2007). Tal espécie também parece ser capaz de causar surtos, como foi relatado em uma unidade intensiva pediátrica no Kuwait, com a presença de uma cepa similar em 4 diferentes pacientes que apresentava resistência à anfotericina B e fluconazol (KHAN *et al.*, 2007). No Brasil, o primeiro relato de um isolado clínico de *C. haemulonii* foi feito por ALMEIDA JR. e colaboradores (2012). Dentre os fatores de risco citados na literatura, como ventilação mecânica, debilidades graves como câncer e imunocomprometimento, o principal destes parece ser a presença de um cateter venoso central, dado corroborado pela presença deste em todos os casos de fungemia relatados por *C. haemulonii*, entre os anos de 2002 e 2010, bem como no surto acima citado, uma vez que todos os neonatos recebiam nutrição parenteral total por acessos centrais (KHAN *et al.*, 2007; RUAN *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011; MURO *et al.*, 2012). Além disso, o complexo *C. haemulonii* apresenta uma capacidade considerável de formar biofilmes, um conhecido fator de virulência fúngico. Sabe-se que a presença de um biofilme protege o microrganismo do sistema imune do hospedeiro e da ação das drogas antifúngicas ao limitar a penetração destas através da matriz extracelular. Além disso, espécies do gênero *Candida* formadoras de biofilme estão associadas a uma maior taxa de mortalidade quando comparadas a cepas incapazes de formar biofilme (NGUYEN, TROFA & NOSANCHUK, 2009; OH *et al.*, 2011). Embora seja uma espécie incomum como agente etiológico de fungemias, *C. haemulonii* constitui um desafio no que se refere ao tratamento, uma vez que tal espécie apresenta resistência aos antifúngicos clássicos mais comumente utilizados na clínica médica, como anfotericina B, voriconazol, itraconazol e fluconazol. Além disso, um relato de uma cepa resistente à flucitosina isolada em um hospital brasileiro e relatos de casos de falha terapêutica com uso de fluconazol, itraconazol e anfotericina B estão disponíveis na literatura (GIUSIANO *et al.*, 2006; KHAN *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2009; RUAN *et al.*, 2010; ALMEIDA JR *et al.*, 2012). Vale ressaltar que, embora as equinocandinas sejam eficazes contra *C. haemulonii*, um relato de resistência à micafungina em 3 isolados de obtidos de 3 pacientes pediátricos está disponível, além de um relato de uma falha terapêutica mesmo com o uso de anfotericina B, fluconazol e caspofungina, resultando no óbito do neonato (KHAN *et al.*, 2007; MURO *et al.*, 2012). A pressão seletiva resultante do uso de anfotericina B e fluconazol, drogas contra as quais *C. haemulonii* apresenta elevados valores de MIC, pode estar relacionada com o surgimento desta como uma espécie emergente oportunista (OH *et al.*, 2011). Ainda não se sabe ao certo se tal resistência é intrínseca ou

secundária; no entanto, o isolamento de espécies resistentes à fluconazol e anfotericina B de pacientes sem histórico prévio de terapia antifúngica, utilizando tais agentes, indica que tal resistência pode ser intrínseca (KHAN *et al.*, 2007).

Lehman e colaboradores (1993) desenvolveram um estudo utilizando 25 cepas de *C. haemulonii* de variadas regiões geográficas e sítios de isolamento. Após analisarem os perfis de isoenzimas, reassociação de DNA e características fisiológicas, descreveram a existência de dois grupos geneticamente distintos de *C. haemulonii*, denominados de grupo I e II no período. Cendejas-Bueno e colaboradores (2012), a partir do sequenciamento da região do espaçador interno transcrito (*ITS*) e das regiões *D1/D2* do 26S rDNA, sugeriram que o complexo *C. haemulonii* I e II fosse reclassificado em um complexo composto de *C. haemulonii* e *C. duobushaemulonii*, que anteriormente formavam o grupo I e II, respectivamente, e ainda uma variedade denominada *C. haemulonii* var. *vulnera*, intimamente relacionada à *C. haemulonii*. Tal proposta teve como base as diferenças nas sequências de DNA observadas, além de variações fenotípicas como os padrões de fermentação de rafinose e sacarose e de assimilação de compostos de carbono como L-sorbose, inulina, D-galactose e succinato, que diferem entre as espécies (CENDEJAS-BUENO *et al.*, 2012). O primeiro relato de uma amostra clínica de *C. haemulonii* isolada em um hospital brasileiro foi em 2012 na cidade de São Paulo (ALMEIDA JR *et al.*, 2012). Desde então, as três espécies foram isoladas no Brasil com altas taxas de resistência à anfotericina B e azóis observadas nos isolados testados, além de um relato de cepas resistentes a micafungina (MURO *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2015, ALMEIDA JR. *et al.*, 2016). Tal resistência faz com que o tratamento destas fungemias torne-se difícil, sendo necessário o desenvolvimento de alternativas terapêuticas a fim de lidar com infecções causadas por espécies com tal perfil reduzido de susceptibilidade.

4. Compostos de coordenação: potencial ação antimicrobiana

O uso de metais como agentes terapêuticos para o tratamento das mais diversas condições data de tempos remotos. Na antiguidade, povos assírios, egípcios e chineses já utilizavam recursos como o sulfeto de mercúrio(II) no tratamento de indivíduos acometidos por enfermidades diversas, e os romanos o aplicavam no tratamento da tracoma e doenças venéreas. O uso de ouro e cobre por egípcios e chineses no tratamento de doenças como a sífilis era conhecido por todos. O trióxido de arsênio era empregado na medicina tradicional chinesa para o tratamento de psoríase, doenças reumáticas e sífilis (NDAGI, MHLONGO & SOLIMAN, 2017). Registros do uso do ouro como um medicamento ao longo da história de nossa

civilização datam de 2,500 antes de Cristo em relatos chineses, sendo componente de diversos elixires preparados por alquimistas na Europa medieval, e presente como parte de elixires em farmacopeias do século 17. Em tempos mais recentes, o ouro foi utilizado no tratamento da tuberculose e artrite reumatoide nos anos 1920, e embora seja ineficaz contra a tuberculose este apresenta eficácia contra a artrite, sendo ainda utilizado em diferentes tipos de doenças reumáticas (FRICKER, 1996; GLIŠIĆ & DJURAN, 2014). A arsfenamina, um composto a base de arsênico sintetizado nos anos 1900 por Paul Ehrlich e comercializado com o nome de Salvarsan, foi o composto metálico pioneiro no que tange a aplicação destes com sucesso na quimioterapia, tendo sido utilizado eficazmente no tratamento da sífilis antes da descoberta da penicilina (LI, COLLINS & KEENE, 2015). Meio século depois, na década de 1960, Barnett Rosenberg descobriu que o composto de platina nomeado como cisplatina possuía propriedades antitumorais, tornando-se uma das drogas mais amplamente utilizadas no tratamento do câncer até hoje e que lançou a base para o desenvolvimento de novas drogas com atividade anticâncer baseadas em platina, que hoje formam o cerne da quimioterapia contra o câncer (NDAGI, MHLONGO & SOLIMAN, 2017). Sendo assim, a aplicação de metais na medicina não é algo novo na história da ciência, e as propriedades medicinais destas moléculas vem sendo cada vez mais exploradas pela ciência atual.

Uma grande variedade de compostos foi sintetizada ao longo dos anos, utilizando diferentes centros metálicos e ligantes em suas estruturas. Os compostos de coordenação bem como os metais de transição utilizados em sua síntese apresentam características únicas que permitem a manipulação de suas propriedades para a síntese de diferentes moléculas. Em uma solução aquosa os íons metálicos são positivamente carregados e podem se ligar a moléculas biológicas carregadas negativamente, sendo, porém, possível modificar a solução e obter espécies catiônicas, aniônicas ou neutras de íons. Os compostos de coordenação positivamente carregados são capazes de interagir com diversas estruturas biológicas negativamente carregadas como DNA, RNA, diferentes fosfolídeos e determinadas regiões de proteínas (FREZZA et al., 2010; LI, COLLINS & KEENE, 2015; NDAGI, MHLONGO & SOLIMAN, 2017). Diferentes dos compostos baseados em carbono, a variedade estereoquímica dos compostos de coordenação é grande, uma vez que estes podem possuir inúmeras conformações geométricas de coordenação e formatos diferenciados, sendo possível modificá-los estruturalmente com a adição de diferentes moléculas, além de possuírem propriedades cinéticas únicas. A ampla faixa de geometrias possíveis também permite a introdução de novos elementos de quiralidade nos compostos de coordenação, o que afeta diretamente o reconhecimento e interação com moléculas biológicas. As propriedades cinéticas e

termodinâmicas das interações metal-ligante influenciam as reações de trocas de ligantes, e tal propriedade dos compostos de coordenação resulta em uma vasta gama de possíveis interações e coordenação com moléculas biológicas. Além disso, os íons metálicos possuem uma tendência a sofrerem reações de redução e oxidação e apresentam uma alta afinidade por elétrons, e podem facilmente polarizar grupos que são coordenados a eles, facilitando sua hidrólise (FREZZA et al., 2010; LI, COLLINS & KEENE, 2015; NDAGI, MHLONGO & SOLIMAN, 2017). Sendo assim, tais características que conferem aos compostos de coordenação as características como atividade redox, modos de coordenação variáveis e reatividade frente a diferentes compostos orgânicos faz de tais compostos promissores agentes com variadas aplicações no campo da saúde (FREZZA et al., 2010).

Os metais podem ser complexados com diversos tipos de moléculas, e o tipo de molécula bem como o átomo com o qual o centro metálico está coordenado impactam na atividade biológica do complexo (KALINOWSKA-LIS *et al.*, 2014). Os tipos de moléculas utilizadas como ligantes e co-ligantes são diversos, sendo comum o uso de bases de Schiff, uma vez que estas são versáteis e possuem boa estabilidade e denticidade, são facilmente sintetizadas e podem ser facilmente ligadas a íons metálicos. Além disso, bases de Schiff podem ser coordenadas a ligantes heterocíclicos aromáticos como a 1,10-fenantrolina, e a coordenação do heteroátomo destes ao íon metálico resulta em um aumento na planaridade da estrutura do composto devido à rigidez introduzida pela molécula heterocíclica coordenada, com a presença desta fração aromática impactando diretamente na atividade biológica do complexo, como por exemplo aumentando sua capacidade de interagir com DNA (KALINOWSKA-LIS *et al.*, 2014; RAMAN, MAHALAKSHMI & MITU, 2014; PAHONTU *et al.*, 2015; REDDY, RAJESHWAR & SATYNARAYANA, 2016). A 1,10-fenantrolina é um destes compostos heterocíclicos aromáticos, sendo uma derivada do fenantreno que possui nitrogênio substituindo os átomos de carbono nas posições 1 e 10, permitindo assim a formação de anéis quelatos de alta estabilidade com íons metálicos (BOTTEGA, 2012).

Nos últimos anos a 1,10-fenantrolina, tem atraído atenção considerável devido a suas propriedades eletrônicas e/ou magnéticas e estruturais, bem como devido a suas propriedades conferem a possibilidade de modulação da capacidade de ligação a DNA e de clivagem do mesmo (RAMAN, MAHALAKSHMI & MITU, 2014). Diversas aplicações vêm sendo desenvolvidas para a 1,10-fenantrolina e seus derivados orgânicos, bem como para a vasta gama de compostos de coordenação que são sintetizados utilizando tal agente quelante. Além do uso como dispositivos óticos, como catalisadores e como componentes em estruturas

supramoleculares, as aplicações no campo biológico são diversas, como intercaladores de DNA, agentes anticâncer e antimicrobianos (MCCANN *et al.*, 2013). Sabe-se que os derivados do fenantreno são capazes de inibir a proliferação celular de fungos e bacterias, e a 1,10-fenantrolina apresenta uma excelente atividade bacteristática e fungistática contra diversos patógenos, com relatos de inibição da proliferação celular de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e fungos como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*. De fato, a capacidade de sequestrar metais de tais derivados do fenantreno afeta seriamente a capacidade de sobrevivência de microrganismos patogênicos, uma vez que os metais são elementos importantes para a homeostase antimicrobiana, e a sua indisponibilidade leva a diversas disfunções metabólicas, culminando com morte celular (MCCANN *et al.*, 2012).

Estudos demonstram que os compostos de coordenação apresentam maior atividade antimicrobiana do que apenas as bases de Schiff ou os íons metálicos isoladamente, sendo tal característica atribuída a alterações estruturais devido à coordenação e ao processo de quelação, uma vez que este reduz consideravelmente a polaridade do íon metálico e seus ligantes devido a um compartilhamento parcial de sua carga positiva com grupos doadores e deslocalização de elétrons π em todo o anel do quelato. *A redução da polaridade, por sua vez, aumenta a lipofilicidade do átomo metálico central e os ligantes, conseqüentemente aumentando a capacidade do complexo em permear a bicamada lipídica da membrana celular* (RAMESH & MAHESWARAN, 2003; RAMAN, MAHALAKSHMI & MITU, 2014). Portanto, uma vez que a 1,10-fenantrolina e sua derivada 1,10-fenantrolina-5,6-diona afetam o funcionamento de diversos sistemas biológicos e apresentam atividade antimicrobiana tanto em sua forma livre quanto quando são complexadas a metais, e compostos de coordenação costumam ser mais eficientes em sua atividade antimicrobiana, estas são comumente utilizadas como os blocos de construção elementares a partir do qual compostos de coordenação são sintetizados a fim de obter compostos mais eficazes em inibir a proliferação de microrganismos (MCCANN *et al.*, 2013; CHANDRALEKA *et al.*, 2014; GRANATO *et al.*, 2017). De fato, estudos anteriores comparando a atividade da 1,10-fenantrolina livre e complexada a metais contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* demonstraram um potencial antifúngico muito superior dos compostos de coordenação, corroborando dados anteriores, além de ter sido hipotetizado que a bioatividade demonstrada pela 1,10-fenantrolina livre seja obtido após o sequestro de traços de metais, e que o complexo metálico resultante seja a molécula biologicamente ativa (MCCANN *et al.*, 2000; COYLE *et al.*, 2003; MCCANN *et al.*, 2012).

A utilização de metais na clínica médica, em diferentes esquemas terapêuticos nos dias atuais, é comum e bem difundida, a exemplo da prata. O uso de prata, seja como um simples sal inorgânico como uma espécie mais complexa, em infecções é bem conhecido, como a sulfadiazina de prata que é comumente empregada como um antibiótico tópico em lesões crônicas e queimaduras graves a fim de impedir uma infecção bacteriana no local e o nitrato de prata que é utilizado como colírio a fim de prevenir ou tratar a oftalmia neonatal (KALINOWSKA-LIS *et al.*, 2014; LI, COLLINS & KEENE, 2015) Além disso, nanopartículas de prata(I) tem sido utilizadas em coberturas de lesões e como revestimento de dispositivos médicos como implantes sintéticos e cateteres venosos a fim de impedir o surgimento de infecções (KALINOWSKA-LIS *et al.*, 2014) De fato, a utilização de compostos de coordenação contendo diferentes metais de transição como agentes antifúngicos e antibacterianos já foi descrita na literatura em diferentes momentos (COYLE *et al.*, 2003; CREAVEN *et al.*, 2009; THATI *et al.*, 2007; MCCANN *et al.*, 2012; VIGANOR *et al.*, 2015). Diversos compostos de coordenação à prata(I), por exemplo, apresentam atividade antibacteriana e antifúngica e capacidade de inibir o crescimento de bactérias como *P. aeruginosa*, *Staphylococcus epidemirdis* e *E. coli* e fungos como *C. albicans* (KALINOWSKA-LIS *et al.*, 2014). A atividade antimicrobiana de compostos de coordenação contendo prata parece resultar da liberação de íons Ag^+ , que são capazes de se ligar a superfície de microrganismos e interagir com proteínas envolvidas na síntese da parede celular, interferir com a cadeia transportadora de elétrons, inativação de enzimas, bem como se ligar as bases nitrogenadas do DNA e afetar a regulação da transcrição, afetando processos genéticos e celulares (KALINOWSKA-LIS *et al.*, 2014; THORTON *et al.*, 2016). Compostos de níquel e ferro complexados com *3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina* foram eficazes no controle de infecções por *S. aureus* e *C. albicans*, além de aliviarem os sintomas de onicomicoses e infecções vaginais causadas por *C. albicans* e *Trichophyton vaginalis*, respectivamente. Compostos de coordenação contendo manganês também foram utilizados topicamente para o tratamento de infecções dermatológicas causadas pelos dermatófitos *Malassezia furfur* e *Trichophyton rubrum* bem como por espécies de *Candida* (MCCANN *et al.*, 2000). Compostos de coordenação a base de cobre, prata e manganês, utilizando-se a *1,10-fenantrolina* como ligante, apresentaram potente atividade inibitória contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (MCCANN *et al.*, 2000; COYLE *et al.*, 2003; MCCANN *et al.*, 2012). Dentre os mecanismos de ação propostos para tais compostos de coordenação, sabe-se que estes afetam a função mitocondrial, reduzindo a síntese de citocromos *b* e *c* e induzindo o desacoplamento da respiração (MCCANN *et al.*, 2012). Também reduzem o conteúdo de ergosterol na membrana

plasmática, aumentando sua permeabilidade, bem como interagem, intercalam e clivam DNA (MCCANN *et al.*, 2004; CREAVEN *et al.*, 2007; MCCANN *et al.*, 2013). Tais mecanismos de ação diferem das drogas azólicas e poliênos comumente utilizados no tratamento, o que poderia contornar os mecanismos de resistência que *Candida* costuma apresentar, se constituindo uma possível alternativa terapêutica (CREAVEN *et al.*, 2007). Sendo assim, os compostos de coordenação contendo a 1,10-fenantrolina e sua derivada 1,10-fenantrolina-5,6-diona são promissores aliados no tratamento de fungemias causadas pelas novas espécies emergentes de *Candida* que apresentam resistência aos antifúngicos disponíveis.

5. O uso de invertebrados como modelo *in vivo*

Os modelos animais são comumente utilizados na ciência em diferentes frentes, como a descoberta de novas drogas, caracterização patofisiológica de doenças, avaliação dos mecanismos de ação de novas drogas, busca por novos alvos terapêuticos e por biomarcadores, investigação das dinâmicas de farmacocinética/farmacodinâmica de compostos e estabelecimento de estimativas de dosagens clínicas a serem utilizadas para determinação das margens de segurança e toxicidade destes (MCGONIGLE & RUGGERI, 2014). Idealmente, um modelo animal deve ser capaz de mimetizar ao máximo a patofisiologia da doença humana alvo de análise com um certo grau de fidelidade, e no caso de infecções fúngicas ser possível replicar até certo ponto os processos de colonização e invasão por rota de entrada específica, bem como reproduzir as defesas do sistema imune. Neste sentido, mamíferos de pequeno porte como coelhos, ratos, hamsters e camundongos costumam ser o padrão ouro para a pesquisa científica no mundo, uma vez que além de atenderem aos requisitos acima citados, tanto o modelo em si quanto o ambiente em que se encontram podem ser controlados de forma precisa, permitindo maior compreensão dos mecanismos sendo avaliados (CHAMILOS *et al.*, 2007). Porém, diversos problemas emergem do uso de modelos mamíferos na pesquisa, especialmente no que tange o uso de grandes números de animais, problemas estes de natureza logística, econômica e ética (CHAMILOS *et al.*, 2007). O uso de alternativas vem sendo constantemente debatido nos círculos acadêmicos e a chamada política dos 3 R's – redução, refinamento e substituição (do inglês Replacement, Reduction and Refinement) – se torna cada vez mais comum como parte da estrutura de trabalho na produção de ciência de qualidade, seja na academia seja no setor industrial que visem reduzir o uso de animais em seus processos de pesquisa e desenvolvimento (IGNASIAK & MAXWELL, 2017). Assim, na última década diversos estudos utilizando modelos invertebrados como alternativa ao uso de mamíferos foram

realizados, seja utilizando amebas como *Dictyostelium discoideum* e *Acanthamoeba castellanii*, nematódeos como *Caenorhabditis elegans* ou insetos como o mosquito *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*, a mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*, o bicho-da-seda *Bombyx mori*, a barata *Blattella germanica* e a mariposa *Galleria mellonella* (**Figura 4**) (CHAMILOS *et al.*, 2007; LIONAKIS, 2011).

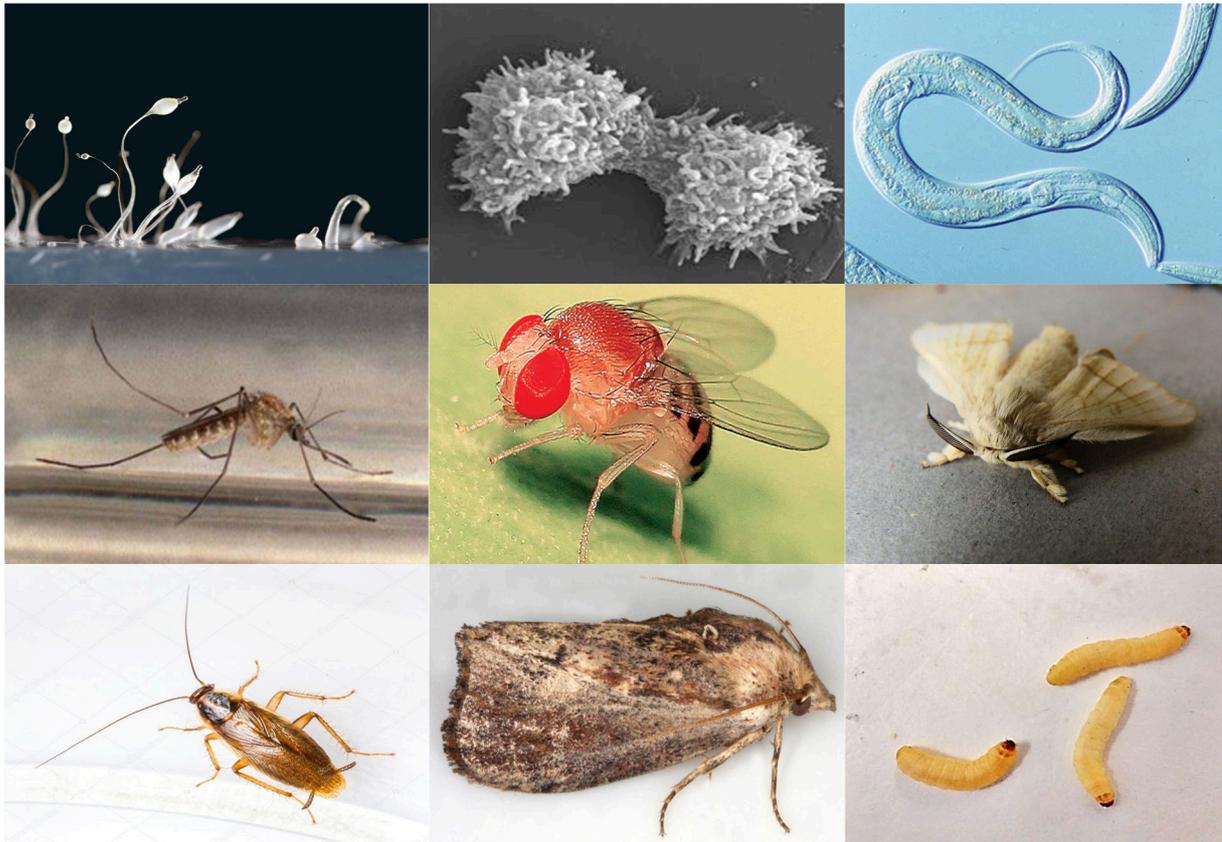


Figura 4. Diversos invertebrados vêm sendo utilizados como modelo *in vivo*, como amebas (*Dictyostelium discoideum* e *Acanthamoeba castellanii*), nematódeos (*Caenorhabditis elegans*) e insetos (*Culex quinquefasciatus*, *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Blattella germanica* e *Galleria mellonella*).

Os insetos constituem um grupo de animais amplo e diverso, que habitam todos os nichos ecológicos do planeta (exceto oceanos e regiões polares) inclusive ambientes extremos. Estima-se que existam entre 750,000 a 1,000,000 de espécies de insetos no planeta, além de serem a mais abundante forma de vida animal. Tal sucesso na diversidade e capacidade de colonizar tal ampla variedade de ambientes é em parte devido à presença de um sistema imune eficiente (KAVANAGH & REEVES, 2004; WU, XU & YI, 2016). A primeira linha de defesa dos insetos é a cutícula, uma barreira que atua forma análoga a pele em mamíferos e impõe uma barreira estruturada e quimicamente complexa a fim de prevenir a entrada de elementos

invasores na cavidade corporal da larva, a hemocele. Na cavidade corporal das larvas encontra-se a hemolinfa, onde circulam nutrientes, resíduos e moléculas de sinalização, além das células das larvas chamadas de hemócitos (KAVANAGH & REEVES, 2004). Embora os insetos não possuam sistema imune adquirido, estes possuem um sistema imune inato complexo e robusto, com a presença de mecanismos de defesa celular e humoral, sendo considerado estrutural e funcionalmente semelhante ao de mamíferos. A defesa celular é mediada por diferentes tipos de hemócitos que estão presentes circulando na hemolinfa (análogo ao sangue em mamíferos) e associados a estruturas como o corpo gorduroso, traqueia e trato digestivo. Estes hemócitos reconhecem seus alvos através de dois mecanismos: interação direta de suas proteínas de reconhecimento de patógenos (PRPs) com os padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) presentes nos invasores, ou pelo reconhecimento dos mecanismos efetores da imunidade humoral (BERGEN, BRENNAN & KAVANAGH, 2003; WU *et al.*, 2016; ALLEGRA *et al.*, 2018). A remoção de microrganismos patogênicos pelo sistema imune celular se dá através da fagocitose ou nodulação, e no caso de intrusos muito grandes (como ovos de nematódeos) por encapsulação. Já o sistema humoral participa da defesa através da produção de proteínas tipo-complemento, peptídeos antimicrobianos e produtos gerados pela via da fenoloxidase como a melanina (MOWLDS, BARRON & KAVANAGH, 2008; WU, XU & YI, 2016). A maior parte dos organismos produzem peptídeos antimicrobianos, e estes podem ser divididos em três grandes grupos, os peptídeos α -helicoidais, os peptídeos ricos em cisteína e os peptídeos lineares abundantes em certos aminoácidos como prolina, glicina ou triptofano (BROWN *et al.*, 2009). Tais peptídeos são liberados para a hemolinfa a partir de órgãos e células presentes nos insetos (corpo gorduroso, trato digestivo e hemócitos), sendo então difundidos para o sítio da infecção e atacando componentes da parede celular microbiana (BERGIN *et al.*, 2006; MOWLDS, BARRON & KAVANAGH, 2008).

Vale ressaltar que embora os insetos não possuam um sistema imune adaptativo, alguma similaridade com a resposta imune adaptativa de mamíferos está presente, uma vez que uma prévia exposição a patógenos ou componentes de sua parede celular aumenta a resistência dos insetos a uma nova exposição a tais patógenos, efeito denominado “*immune priming*” (WU, XU & YI, 2016). Interessantemente, alguns estudos indicam que tal resistência pode ser duradoura até mesmo por gerações e tal fenômeno é conhecido como “*immune priming transgeracional*”, como relatado por DUBOVISKY e colaboradores (2013) que, após expor larvas de *G. mellonella* ao fungo entomopatogênico, observou que a 25ª geração descendente destes animais ainda apresentava resistência a tal patógeno mesmo sem exposição prévia. Outro

estudo indica que tal transferência ocorre de forma materna por translocação das bactérias da hemolinfa para os ovos, induzindo assim a resistência nas gerações subsequentes (FREITAK *et al.*, 2014).

O estabelecimento de uma doença por um microrganismo possui um processo que geralmente se repete nos hospedeiros e estas semelhanças reforçam a possibilidade do uso de insetos como modelo animal. Os processos de adesão, entrada, invasão, estabelecimento, disseminação, produção de toxinas, escape do sistema imune e transmissão costumam ser passos comuns as infecções em mamíferos e insetos (SCULLY & BIDOCHKA, 2006). Por exemplo, a invasão por um microrganismo depende do rompimento da primeira linha de defesa, a epiderme em mamíferos e a cutícula dos insetos, e a fim de obter êxito neste processo, os microrganismos secretam proteases a fim de auxiliar no rompimento da barreira imposta por estas estruturas (**Figura 5a**). Outro paralelo pode ser traçado no que tange a susceptibilidade as toxinas produzidas por microrganismos, uma vez que receptores para toxinas oriundas de microrganismos estão presentes nas microvilosidades do intestino médio de insetos e no intestino de mamíferos (**Figura 5b**). Ainda outro paralelo está na resposta imune celular mediada por células fagocíticas e na indução da morte de invasores através da produção de radicais superóxidos muito semelhantes entre as células granulares de insetos e os neutrófilos de mamíferos (**Figura 5c**) (SCULLY & BIDOCHKA, 2006). De fato, as semelhanças entre o sistema imune de insetos e de mamíferos são diversas. Por exemplo, os hemócitos possuem um complexo NADPH oxidase com funcionalidade similar a neutrófilos de mamífero, sendo capaz de gerar superóxidos e incorporar proteínas homólogas a p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e gp91^{phox} dos neutrófilos, além de outras semelhanças como a fagocitose mediada por lectina, a presença de receptores de superfície para reconhecimento de patógenos e na comunicação e migração celular (SHEEHAN & KAVANAGH, 2018). Os receptores de reconhecimento de patógenos presentes nos hemócitos de insetos, tal como nos neutrófilos, são capazes de identificar diferentes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) tais como lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas, ácido teicoico e peptidoglicano de bactérias gram-positivas, além de manana e β -1,3-glucana presente nos fungos (SCULLY & BIDOCHKA, 2006). Outras similaridades observadas estão na forma como os hemócitos e neutrófilos respondem a toxinas. Em um estudo utilizando a toxina fumagilina, presente no fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*, a exposição de neutrófilos e hemócitos a tal molécula resultou em alterações semelhantes em ambas as células: redução na capacidade de eliminação das leveduras, de fagocitose de conídios de *A. fumigatus* e consumo de oxigênio reduzido. Além disso, a

capacidade de geração de superóxidos via complexo NADPH oxidase foi inibida, bem como redução da granulação, mecanismo este que resulta na liberação de enzimas proteolíticas que contribuem para a atividade antifúngica de neutrófilos (FALLON, REEVES & KAVANAGH, 2010; 2011). A resposta semelhante de hemócitos e neutrófilos as toxinas de *Aspergillus fumigatus* fumagilina, ao nocodazol que é um inibidor da formação de tubulina e a micotoxina citocalasina B que reduz a formação de actina também são indícios importantes da semelhança entre hemócitos e neutrófilos (SHEEHAN & KAVANAGH, 2018). Dentre os insetos que apresentam as características acima citadas, que vem sendo amplamente utilizados em diferentes ensaios experimentais, estão as larvas da mariposa *Galleria mellonella*.

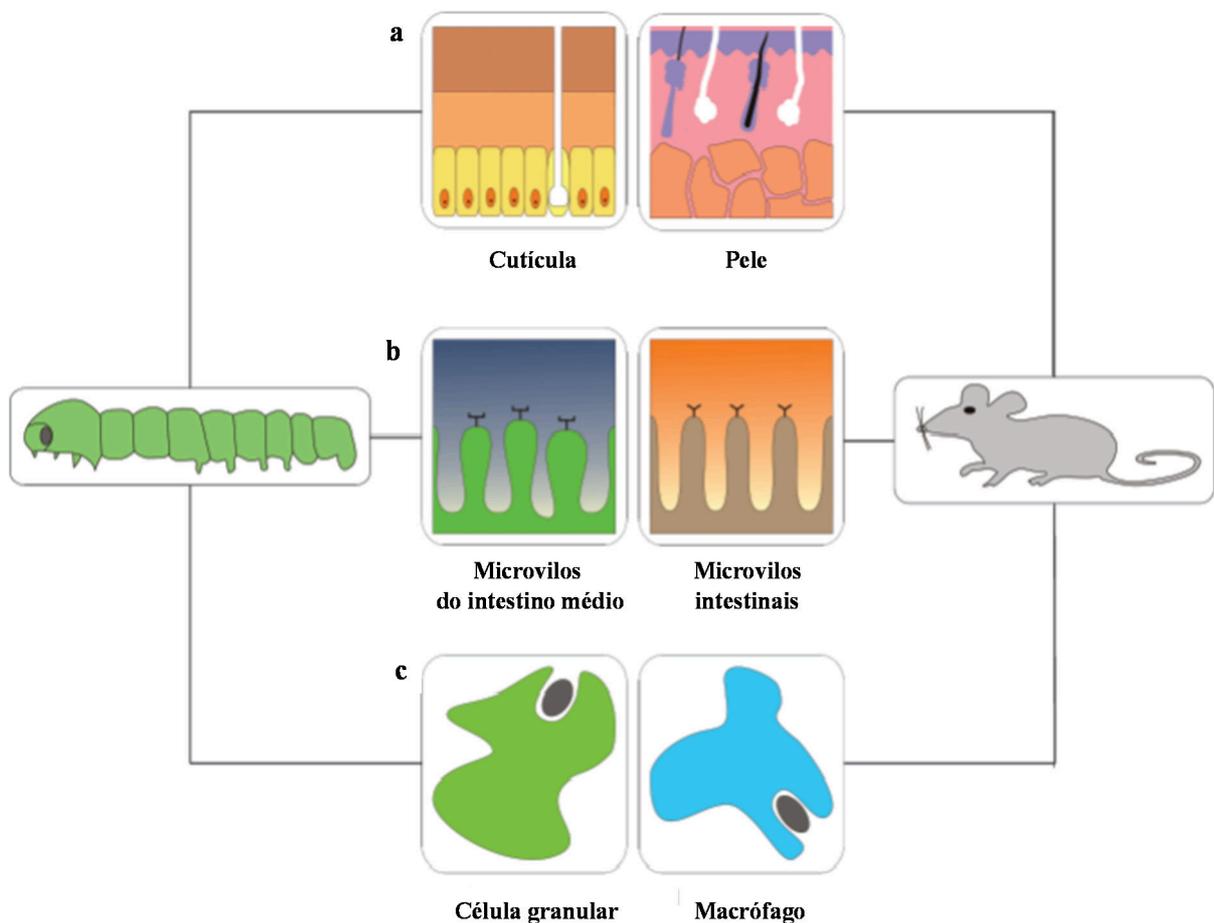


Figura 5. Paralelos entre insetos e mamíferos frente a infecções causadas por microrganismos são diversos. Por exemplo (a) secreção de proteases a fim de romper a barreira exercida pela cutícula do inseto ou da epiderme comprometida de mamíferos, (b) toxinas que se ligam as microvilosidades intestinais a fim de causarem seu efeito e (c) a forma como os agentes invasores são fagocitados por células granulares na hemolinfa dos insetos com o mesmo processo executado pelos macrófagos presentes no sangue de mamíferos (Adaptado de SCULLY & BIDOCHKA, 2006).

6. *Galleria mellonella* como modelo de infecção *in vivo*

O uso de invertebrados como as larvas de *G. mellonella* como substituto ao uso de mamíferos como modelo *in vivo* é considerado eticamente preferível, e insetos tem sido amplamente utilizados em ensaios de pré-clínicos de avaliação de toxicidade, patogenicidade bacteriana e fúngica bem como em estudos de eficácia e farmacocinética de agentes antimicrobianos (WU, XU & YI, 2016; ALLEGRA *et al.*, 2018). *G. mellonella* é um inseto lepidóptero da ordem Pyralidae. Suas larvas são branco-cremosas e possuem aproximadamente entre 1-3 mm após eclodirem dos ovos, chegando a possuir entre 25 e 30 mm antes de tornarem-se pupas. São encontradas em regiões da Ásia, norte da África, Grã-Bretanha, partes da Europa, América do Norte e Nova Zelândia, porém dados mais recentes parecem indicar que tal inseto seja ubíquo em todas as regiões onde a apicultura é praticada, uma vez que são consideradas uma das pragas mais nocivas a esta atividade econômica (KWADHA *et al.*, 2017). As larvas de *G. mellonella* despertam o interesse científico já por algum tempo. O primeiro artigo disponível encontrado na plataforma de periódicos científicos PUBMED data de 1938, e descreve diversas mutações induzidas pela exposição das larvas a raios-X (SMITH, 1938). Desde então, larvas de *G. mellonella* foram utilizadas em diferentes estudos, inicialmente de maior interesse entomológico, como estudos relacionados a mecanismos imunes de insetos e de patogenicidade de bactérias entomopatogênicas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Proteus mirabilis*, além de estudos de investigação de fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (WALTERS & RATCLIFFE, 1983; MORTON, DUNPHY & CHADWICK, 1987; VILCINSKAS, MATHA & GÖTZ, 1996). No ano de 1986, um estudo utilizando cepas de *P. aeruginosa* que apresentavam graus de virulência variados entre si devido a presença de mutações em seu lipopolissacarídeo demonstrou que *G. mellonella* pode ser utilizada para investigar diferenças de patogenicidade entre microrganismos (DUNPHY *et al.*, 1986). Alguns anos depois, um estudo demonstrou que as larvas de *G. mellonella* são susceptíveis à infecção e morte por *C. albicans*, porém muito pouco susceptíveis ao fungo *Saccharomyces cerevisiae*, confirmando que este modelo pode distinguir entre microrganismos patogênicos e pouco ou não-patogênicos, o que aumentou o interesse neste modelo e iniciou a popularização de sua utilização em estudos de patogênese fúngica (COTTER, DOYLE & KAVANAGH, 2000; ARVANITIS, GLAVIS-BLOOM & MYLONAKIS, 2013).

Diversas razões fazem das larvas de *G. mellonella* um bom modelo animal, como o fato de não necessitarem de equipamentos especializados já que podem ser mantidas em placas de

Petri e acondicionadas em incubadoras comuns, o tamanho grande da larva que facilita sua manipulação, a possibilidade de serem inoculadas por injeção direta na hemocele permitindo o uso de inóculos exatos, a possibilidade de serem incubadas em uma ampla faixa de temperatura (15°C a 37°C), a facilidade em sua manutenção e seu baixo custo, além da possibilidade da utilização de grandes grupos de animais nos ensaios, aumentando assim seu poder estatístico (**Figura 6**) (WANG *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2016; ALLEGRA *et al.*, 2018). Além disso, já foi demonstrado que seu sistema imune apresenta diversas similaridades com o de mamíferos, como por exemplo a maneira similar com que hemócitos e neutrófilos fagocitam e matam patógenos, bem como a semelhança na mediação da síntese de peptídeos antimicrobianos pelas vias sinalizadoras Toll e da Imunodeficiência presentes em insetos com as vias dos receptores do tipo Toll e TNF- α de mamíferos, respectivamente (WU, XU & YI, 2016). O sistema fagocítico de *G. mellonella* é composto por seis tipos de hemócitos diferentes (prohemócitos, coagulócitos, esferulócitos, enocitóides, plasmócitos e granulócitos) sendo os plasmócitos e granulócitos as principais células associadas aos processos de fagocitose, encapsulação e formação de nódulos, apresentando mecanismos de indução de morte de agentes invasores por espécies de reativa de oxigênio similares a morte oxidativa induzida por células de mamíferos (LIONAKIS, 2011). As similaridades no que tangem ao sistema imune humoral de mamíferos e larvas de *G. mellonella* encontram-se na produção de peptídeos antimicrobianos, sendo tais peptídeos produzidos nas larvas pelos hemócitos e pela estrutura chamada corpo gorduroso. Dentre estes estão as defensinas, peptídeos ricos em cisteína e essenciais na imunidade antifúngica de vertebrados e invertebrados; as moricinas, que aumentam a permeabilidade de membrana de fungos e bactérias; as gloverinas, que são peptídeos ricos em glicina e capazes de ligar-se ao LPS bacteriano e a parede celular fúngica. Além disso, peptídeos capazes de induzir a apoptose de *C. albicans*, como os peptídeos do tipo cecropina como a cecropina A e lisozimas também são produzidos por *G. mellonella* (SHEEHAN & KAVANAGH, 2018).



Figura 6. Dentre os aspectos que fazem das larvas de *Galleria mellonella* um bom modelo *in vivo* estão o seu tamanho e a possibilidade da inoculação direta em sua hemocele (Adaptado de FERNANDES *et al.*, 2017).

O uso das larvas de *G. mellonella* para ensaios de avaliação de virulência de microrganismos tem se expandido nos últimos anos. Tal modelo foi utilizado em diversos estudos de virulência utilizando-se bactérias gram-negativas (*Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia* spp., *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Yersinia* spp., *Campylobacter jejuni*, *Proteus mirabilis*, *E. coli* e *Legionella pneumophila*), bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*) e fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp., *Microsporium* spp., *Pneumocystis murina* e *Trichophyton* spp.), sendo especialmente eficazes em estudos com as bactérias gram-negativas e os fungos (CHAMILOS *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2013). Uma forte correlação da virulência em *G. mellonella* e modelos mamíferos já foi estabelecida em diferentes estudos. Por exemplo, BRENNAN e colaboradores (2002) utilizaram 10 cepas de *C. albicans* com mutações capazes de reduzir a formação de hifas, um importante fator de virulência deste fungo, em um ensaio a fim de comparar os dados com modelos murinos de outros 7 estudos previamente realizados com tais cepas. Uma forte correlação nos resultados foi observada, com as cepas avirulentas em camundongos sendo incapazes de matar *G. mellonella* ou induzindo apenas 10% de mortalidade, cepas pouco virulentas em camundongos apresentando taxas mais baixas mortalidade entre as larvas infectadas, e cepas virulentas para os modelos murinos similarmente induzindo 100% de taxas de mortalidade. De forma similar, análises fenotípicas utilizando 21 cepas de *C. albicans* demonstram diferentes níveis de virulência entre os isolados, com algumas cepas induzindo morte em 48 h e outras apenas após 7 dias, e tais dados apresentaram uma forte correlação com dados obtidos em modelos murinos (HIRAKAWA *et al.*, 2014). Em um outro estudo com 32 cepas de *P. aeruginosa* com diferentes mutações relacionadas a seus fatores de virulência, uma forte correlação da virulência das cepas em *G. mellonella* e camundongos foi encontrada, com cepas mutantes menos virulentas em camundongos também apresentando virulência reduzida em *G. mellonella*, indicando que fatores de virulência similares são utilizados pelo microrganismo durante o processo de infecção em insetos e mamíferos, bem como reforçando os dados que indicam que *G. mellonella* é um modelo viável na identificação de fatores de virulência utilizados por microrganismos na infecção de mamíferos (JANDER, RAHME & AUSUBEL, 2000).

Além de ensaios de avaliação de virulência, *G. mellonella* provou ser um modelo interessante para realização de ensaios de toxicidade e eficácia de antimicrobianos. O primeiro ensaio de avaliação de eficácia de drogas antimicrobianas foi realizado com cefotaxima, tetraciclina, gentamicina e meropenem contra infecção sistêmica por *A. baumannii* (PELEG *et*

al., 2009). Interessantemente, observou-se um significativo aumento na sobrevivência das larvas tratadas com gentamicina e meropenem, drogas eficazes contra *A. baumannii*, enquanto o uso de cefotaxima e tetraciclina, contra as quais tal bactéria é resistente, resultou em taxas de sobrevivência muito baixas entre as larvas infectadas. Os dados obtidos neste estudo despertaram então o interesse nesse modelo, e diversos grupos passaram a utilizar as larvas de *G. mellonella* como um modelo padrão para avaliação de toxicidade de substâncias como conservantes de alimentos e drogas antimicrobianas, além da investigação de patógenos e seu tratamento, apresentando resultados com uma forte correlação positiva aos obtidos com uso de mamíferos (IGNASIAK & MAXWELL, 2017; SHEEHAN & KAVANAGH, 2018). Uma vez que as infecções microbianas em *G. mellonella* são susceptíveis a tratamento com agentes antimicrobianos, estas tornam-se um modelo viável para avaliação de não apenas a toxicidade e eficácia de novos compostos, mas também para obtenção de dados farmacocinéticos como tempo de *clearance*, meia-vida e concentração máxima de drogas, podendo ser diretamente correlacionados com dados em humanos (WANG *et al.*, 2013; IGNASIAK & MAXWELL, 2017). A vantagem da possibilidade de inocular os compostos por meio de injeção direto na hemocele, o que nem sempre é possível com outros modelos invertebrados, fazem de *G. mellonella* especialmente valiosas neste tipo de ensaio, já que além de possibilitar a administração de doses exatas dos agentes, também permite a simulação da administração intravenosa sistêmica de agentes antimicrobianos em doses e regimes similares ao que seria utilizado em pacientes, permitindo a avaliação de diferentes regimes de tratamento com variações na dosagem, no número de doses administradas e variações no tempo da primeira administração e das administrações subsequentes do agente antimicrobiano (WANG *et al.*, 2013). Estudos de avaliação de toxicidade e eficácia de agentes antimicrobianos já foram realizados com, por exemplo, estreptomicina, ciprofloxacino e levofloxacino no tratamento de *Francisella tularensis*, gentamicina, meropenem, tetraciclina e cefotaxima para tratar infecção por *A. baumannii* e também uso de agentes antifúngicos como anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, flucitosina e caspofungina para o tratamento de larvas infectadas com *C. neoformans* e *C. albicans*, sendo importante ressaltar que os perfis de susceptibilidade destes microrganismos as drogas foram, em geral, os mesmos no modelo de *G. mellonella* e *in vitro* (WANG *et al.*, 2013). Por exemplo, em um estudo conduzido por IGNASIAK & MAXWELL (2017) utilizando larvas infectadas por *E. coli*, *M. smegmatis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* e tratadas com ampicilina, ciprofloxacina, rifampicina e tetraciclina, o desempenho das drogas manteve-se dentro do esperado, não sendo capazes de eliminar a infecção nos casos em que o microrganismo era resistente a droga utilizada, e resolvendo a infecção dos microrganismos

susceptíveis, e em geral dentro das doses terapêuticas recomendadas para seres humanos, indicando que as doses recomendadas para humanos podem ser traduzidas para as larvas. Similarmente, um estudo utilizando diferentes espécies de *Candida* (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitanae* e o complexo *C. haemulonii*) encontrou uma forte correlação nos perfis de susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* com o uso de anfotericina B, fluconazol e caspofungina (SILVA *et al.*, 2018). Além disso, estudos demonstram que *G. mellonella* pode ser utilizada para avaliação da eficácia da combinação de agentes antifúngicos e da interação de drogas. Combinações de anfotericina B e flucitosina e flucitosina e astemizol contra *C. neoformans* foram mais eficazes quando comparados à monoterapia, bem como combinações de inibidores de Hsp90 e fluconazol e caspofungina contra *C. albicans* e *A. fumigatus* (MYLONAKIS *et al.*, 2005; COWEN *et al.*, 2009; VU & GELLI, 2010; QIN *et al.*, 2011). Vale ressaltar que a maior eficácia da combinação de anfotericina B e flucitosina para o tratamento de *C. neoformans* em *G. mellonella* já foi descrito em estudos anteriores com camundongos e humanos, reforçando a validade deste modelo para tal tipo de ensaio (ARVANANTIS, GLAVIS-BLOOM & MYLONAKIS, 2013). Estudos confirmam que a patogenicidade microbiana e determinantes de virulência são os mesmos em humanos, camundongos e *G. mellonella* e diversos resultados de ensaios foram correlacionados positivamente com outros modelos, como o nematódeo *C. elegans* e com modelos murinos (BREANNAN *et al.*, 2002; IGNASIAK & MAXWELL, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Portanto, essas informações reforçam a ideia de que o uso de larvas de *G. mellonella* como modelo *in vivo* para ensaios de virulência com *C. haemulonii*, bem como na avaliação da toxicidade dos compostos de coordenação e de sua eficácia no tratamento de infecções causadas por tal agente é viável e pode fornecer informações essenciais na resposta as perguntas pertinentes ao presente estudo.

7. Peptídeos antimicrobianos produzidos por *G. mellonella*

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) estão presentes em plantas e animais vertebrados e invertebrados, sendo sua variedade altamente diversa. Centenas de peptídeos diferentes já foram identificados, possuindo papel fundamental na defesa direta do hospedeiro contra bactérias e fungos, além de serem capazes de neutralizar endotoxinas como LPS e modular o sistema imune inato e adaptativo (ANDREJKO, MIZERSKA-DUDKA & JAKUBOWICZ, 2009; BROWN *et al.*, 2009). Os PAMs são classificados de acordo com a sua estrutura em três grupos diferentes: peptídeos α -helicais como as moricinas e cecropinas, os peptídeos ricos em

cisteínas chamados de defensinas e peptídeos lineares, ricos em aminoácidos específicos como prolina, glicina e triptofano (BROWN *et al.*, 2009). Estudos demonstram que os PAMs atuam destruindo a membrana plasmática de microrganismos, porém também foi demonstrado que alguns peptídeos possuem alvos intracelulares e que os peptídeos também atuam suprimindo processos celulares como a síntese de proteínas e DNA (BROWN *et al.*, 2009; CORREA *et al.*, 2014; MOGHADDAM *et al.*, 2016). Os PAMs de invertebrados despertaram interesse a partir da década de 80, sendo descritos em praticamente todo o táxon dos invertebrados e em inúmeras espécies de insetos (ANDREJKO, MIZERSKA-DUDKA & JAKUBOWICZ, 2009). PAMs de insetos são, em sua maioria, pequenas moléculas catiônicas que possuem um amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, parasitos e vírus (ANDREJKO, MIZERSKA-DUDKA & JAKUBOWICZ, 2009; MOGHADDAM *et al.*, 2016). Insetos produzem um coquetel de PAMs de diferentes funcionalidades e estruturas frente a um insulto imunológico, o que permite atividades sinérgicas, potencialização e diversificação funcional, aumentando assim a robustez e eficácia da resposta imune (MOGHADDAM *et al.*, 2016).

Galleria mellonella produz pelo menos 18 PAMs conhecidos pertencetes a 10 famílias diferentes, que apresentam atividade antimicrobiana e anti-endotoxinas. Dentre os peptídeos que compõem o arsenal defensivo de *G. mellonella* estão as cecropinas, peptídeos tipo-moricina, peptídeos ricos em prolina 1 e 2, peptídeos aniônicos 1 e 2, gloverina, galiomicina, gallerimicina, lisozima, inibidor de serina protease induzível 2, 6tox e peptídeo tipo-heliocina (BROWN *et al.*, 2009; CORREA *et al.*, 2014). Interessantemente, a expressão de tais peptídeos é modulada pelo tipo de microrganismo com o qual *G. mellonella* é infectada, com diferentes perfis de expressão encontrados nos animais infectados com bactérias gram-positivas, gram-negativas, levedura ou fungo filamentosos (MAK, ZDYBICKA-BARABAS & CYTRYNSKA, 2010). Estudos demonstram que, dentre os peptídeos antimicrobianos produzidos por *G. mellonella*, a expressão de alguns destes é aumentada frente à exposição a *C. albicans* e *S. cerevisiae*, como a transferrina, o inibidor de metalopeptidase de inseto (IMPI), a galiomicina e a gallerimicina (BERGIN *et al.*, 2006). Sabe-se que galiocimcina, o IMPI e a transferrina também apresentam uma maior expressão frente a exposição das larvas à caspofungina e aumentam sua resistência às infecções posteriores com *C. albicans* (KELLY & KAVANAGH, 2011). O papel fundamental desses peptídeos no processo infeccioso fúngico faz com que tal característica de indução da expressão destes peptídeos pela caspofungina seja um aspecto interessante de um potencial composto antifúngico.

Em insetos, os estudos apontam que a transferrina parece desempenhar um papel muito mais relacionado a resposta imune do que ao transporte de ferro, criando um ambiente com baixa disponibilidade deste elemento e limitando assim a proliferação de microrganismos (KIM & KIM, 2010). Estudos prévios apontam que a expressão da ferritina é consideravelmente elevada em insetos expostos a diferentes patógenos como *E. coli*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Micrococcus luteus* (YOSHIGA *et al.*, 1997; 1999; GEISER & WINZERLING, 2012; LIU *et al.*, 2015; BRUMMETT *et al.*, 2017). Além disso, demonstrou-se que embora a halotransferrina não apresente atividade antimicrobiana, a apotransferrina (transferrina não-ligada a ferro) é capaz de reduzir significativamente a proliferação de *E. coli*, indicando que tal peptídeo de fato apresenta atividade antimicrobiana por sequestro do ferro presente, privando assim o microrganismo dos elementos necessários a seu crescimento (BRUMMETT *et al.*, 2017). Similarmente, a transferrina recombinante obtida a partir do bicho-da-seda *Bombyx mori* também tem sua expressão aumenta em até 27 vezes na presença de componentes de microrganismos que são indutores de uma resposta imune, como LPS, peptideoglicanos e laminarina e também na presença do vírus da poliedrose nuclear. Além disso, a transferrina recombinante utilizada no estudo com *B. mori* possui atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (*M. luteus*, *B. subtilis* e *E. hirae*) e gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) (YUN *et al.*, 2009).

O IMPI foi descoberto na hemolinfa de larvas *G. mellonella* inoculadas com estimulantes da resposta imune como LPS ou células bacterianas e fúngicas, sendo o primeiro e único inibidor de metalopeptidases antimicrobianas isolado de um animal, apresentando potente capacidade inibitória de toxinas microbianas (WEDDE *et al.*, 1998; WEDDE *et al.*, 2007). Após caracterização, descobriu-se que IMPI consiste de dois peptídeos separados por um sítio de clivagem, que após processamento dão origem a rIMPI-1 e rIMPI-2. O peptídeo rIMPI-1 é um potente inibidor de metaloproteases microbianas, como por exemplo a metaloprotease produzida pela bactéria *Vibrio vulnificus* e a pseudolisina de *Pseudomonas aeruginosa*, também chamada de elastase B que é o principal fator de virulência desta bactéria. Ambas toxinas apresentam potente capacidade de aumento de permeabilidade vascular e dano tecidual hemorrágico. Em contrapartida, o peptídeo rIMPI-2 não apresenta tal capacidade inibitória, desempenhando um papel na metamorfose da larva ao participar da modulação endógena de metaloproteases envolvidas na remodelagem da matriz extracelular (WEDDE *et al.*, 2007). Além disso, o IMPI é um potente inibidor das gluzincinas, uma família de metaloproteases de patógenos como *Legionella*, *Listeria*, *Clostridium*, *Helicobacter*,

Pseudomonas e *Vibrio* (CLERMONT *et al.*, 2004). Além disso, larvas de *G. mellonella* inoculadas com componentes da parede celular fúngica e com células de *C. albicans* apresentaram uma expressão aumentada de IMPI (BERGIN *et al.*, 2006; MOWLDS, BARRON & KAVANAGH, 2008).

A galiomicina é um peptídeo antimicrobiano purificado por LEE e colaboradores (2004), que apresenta expressão elevada em larvas inoculadas com *E. coli*, além de possuir atividade antifúngica demonstrada contra *C. albicans*, *G. candidum* e *C. neoformans* bem como atividade contra os fungos filamentosos *Trichoderma viride*, *Pyricularia grisea* e *Fusarium oxysporum*. Já a gallerimicina é um peptídeo induzível rico em cisteína com expressão aumentada em larvas inoculadas com LPS e que apresenta atividade contra o fungo filamentoso *Metarhizium anisopliae* previamente demonstrada, embora não tenha sido detectado atividade contra bactérias e leveduras (SCHUHMANN *et al.*, 2003; LANGEN *et al.*, 2006). Porém, em um estudo mais recente utilizando-se *E. coli* observou-se que, embora não tenha apresentado atividade antibacteriana como previamente descrito, a gallerimicina provavelmente age em combinação com outros PAMs, sendo capaz de despolarizar a membrana de *E. coli* e inibir completamente sua proliferação ao ser combinada com o peptídeo cecropina A em concentrações subletais de ambas as moléculas, e tal característica pode ser válida também para leveduras, sendo necessário ensaios nesse sentido (BOLOURI MOGHADDAM *et al.*, 2016).

Justificativa

A mudança no perfil epidemiológico das candidíases é uma realidade em todo mundo, e compreender melhor os aspectos envolvidos nas infecções causadas por essas espécies emergentes é fundamental. O complexo *C. haemulonii*, constituído de três diferentes espécies (*C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii* e *C. haemulonii* var. *vulnera.*), embora incomum como agente etiológico das fungemias, constitui-se como um importante agente oportunista. Tais espécies apresentam uma resistência intrínseca à anfotericina B, uma característica incomum entre as espécies de *Candida*, assim como aos agentes azólicos, os principais antifúngicos utilizados na clínica médica. Além disso, relatos de cepas resistentes às equinocandinas também podem ser encontrados na literatura. A falha terapêutica após utilização destes compostos, inclusive resultando no óbito dos pacientes, reforça à necessidade de encontrar alternativas para infecções causadas por tais espécies. Uma vez que compostos de coordenação contendo metais de transição, quando ligados a 1,10-fenantrolina, apresentam uma potente atividade anti-*Candida*, estes podem vir a se tornar um possível aliado na clínica. O seu mecanismo de ação diferenciado dos compostos azólicos e dos poliênicos indica que tais compostos são viáveis para o tratamento de cepas que sejam resistentes aos antifúngicos clássicos. Sendo assim, encontrar novos compostos de coordenação biologicamente ativos contra tais espécies, assim como compreender melhor como tais compostos de coordenação atuam nestas espécies, é de importância fundamental. Para atingir tal objetivo, o uso de modelos *in vivo* são poderosos aliados, e o uso de invertebrados em ensaios de toxicidade e virulência de diferentes espécies fúngicas vem se tornando cada vez mais disseminado. Larvas de *G. mellonella* apresentam uma série de vantagens econômicas, de logística e éticas frente a modelos murinos. Estas possuem um sistema imune inato que compartilha diversas semelhanças com o sistema imune inato de mamíferos, com a presença de células fagocíticas com atividade similar a macrófagos e neutrófilos e produção de diferentes peptídeos antimicrobianos que participam da defesa contra microrganismos invasores. Além disso, diversos estudos demonstram que os dados obtidos em tal modelo se correlacionam positivamente com dados obtidos em modelos mamíferos, reforçando a viabilidade de *G. mellonella* como modelo *in vivo* na busca por novos compostos antifúngicos eficazes no tratamento de espécies emergentes e multiresistentes, como *C. haemulonii*.

Objetivos

OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos dos compostos de coordenação a base de 1,10-fenantrolina contendo os metais de transição cobre(II), manganês(II) e prata(I) na proliferação celular, virulência e patogenicidade de *Candida haemulonii* utilizando-se como modelo *in vivo* larvas de *Galleria mellonella*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estabelecer a concentração inibitória mínima dos compostos de cobre(II), manganês(II) e prata(I), utilizando-se três cepas de cada espécie pertencente ao complexo *C. haemulonii* a fim de determinar os que possuem a maior atividade antifúngica em células planctônicas e células crescendo em biofilme.
2. Determinar a toxicidade dos compostos de coordenação utilizando células de mamífero (A549) e estabelecer os índices de seletividade dos compostos.
3. Investigar a toxicidade dos compostos de coordenação utilizando larvas de *Galleria mellonella* e avaliar o impacto destes na resposta imune dos animais.
4. Determinar o impacto do tratamento na carga fúngica de larvas infectadas e na virulência de *C. haemulonii*.

Metodologia

I - METODOLOGIA GERAL

1. Microrganismos

Três isolados clínicos de cada espécie pertencentes ao complexo *Candida haemulonii* foram utilizados no presente estudo: *C. haemulonii* (LIPCh4, LIPCh7 e LIPCh12), *C. duobushaemulonii* (LIPCh1, LIPCh6 e LIPCh8) e *C. haemulonii* var. *vulnera* (LIPCh5, LIPCh9 e LIPCh11). As cepas foram isoladas a partir de pacientes que foram atendidos nos serviços de saúde do Instituto de Biologia do Exército (IBEX, Rio de Janeiro, RJ), da Universidade Federal Fluminense (UFF, Niterói, RJ), da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, SP) e do Instituto Nacional do Câncer (INCA, Rio de Janeiro) (**Tabela 1**). Os isolados fúngicos utilizados foram previamente identificados utilizando-se CHROMagar *Candida* (CHROMagar Company), VITEK 2, e PCR-sequenciamento da região *ITS1-5.8S-ITS2* do RNA ribossomal (RAMOS *et al.*, 2015). Para uso diário, as amostras foram mantidas em placas contendo meio ágar Sabouraud dextrose, sendo transferidas para novas placas a cada 15 dias. As amostras originais foram mantidas em água estéril como estoque.

Tabela 1. Isolados clínicos utilizados

Espécies	Códigos das Amostras	Sítios de Isolamento
<i>Candida haemulonii</i>	LIPCh4	Quirodáctilos direito/esquerdo
	LIPCh7	Hálux direito/esquerdo
	LIPCh12	Sangue
<i>Candida duobushaemulonii</i>	LIPCh1	Quirodáctilos direito/esquerdo
	LIPCh6	Hálux direito/esquerdo
	LIPCh8	Sangue
<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>	LIPCh5	Hálux direito/esquerdo
	LIPCh9	Urina
	LIPCh11	Sangue

2. Cultivo e obtenção das células

Para a realização dos ensaios, as leveduras foram cultivadas em meio líquido Sabouraud dextrose por 48 h a 37°C sob agitação constante a 130 rpm. Após o cultivo, as amostras foram centrifugadas a 5000×g por 5 min, lavadas em tampão fosfato de sódio (PBS; NaCl a 150 mM, tampão fosfato a 20 mM, pH 7,2) e o número de células determinado utilizando-se uma câmara de Neubauer.

3. Compostos de coordenação

Um total de 19 diferentes compostos de coordenação foram fornecidos por nossos colaboradores Dr. Malachy McCann (National University Ireland – Maynooth – Ireland) e Dr. Michael Devereux (Dublin Institute of Technology – Dublin – Ireland) para a realização dos ensaios no presente estudo (**Tabela 2**). Os compostos a seguir foram preparados utilizando-se métodos previamente publicados: $[\text{Cu}(\text{ph})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**1**) (phH_2 =ácido ftálico) (phen =1,10-fenantrolina) (KELLETT *et al.*, 2012); $[\text{Cu}(\text{ph})(\text{phen})_2].3\text{H}_2\text{O}.2\text{EtOH}$ (**2**) (KELLETT *et al.*, 2011); $[\text{Cu}(\text{isoph})(\text{phen})_2].6\text{H}_2\text{O}.2\text{EtOH}$ (**3**) (isophH_2 =ácido isoftálico) (KELLETT *et al.*, 2011); (KELLETT *et al.*, 2011); $[\{\text{Cu}(\text{phen})_2\}_2(\text{terph})](\text{terph}).13.5\text{H}_2\text{O}.2\text{EtOH}$ (**4**) (terphH_2 =ácido tereftálico) (KELLETT *et al.*, 2011); $[\text{Cu}_2(\text{oda})(\text{phen})_4](\text{ClO}_4)_2.2.76\text{H}_2\text{O}.2\text{EtOH}$ (**5**) (odaH_2 =ácido octanodióico) (DEVEREUX *et al.*, 1999); $[\text{Cu}(\text{phendione})_3](\text{ClO}_4)_2.4\text{H}_2\text{O}$ (**6**) (phendione =1,10-fenantrolina-5,6-diona) (MCCANN *et al.*, 2004); $\{[\text{Cu}(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_2].3\text{H}_2\text{O}.2\text{EtOH}\}_n$ (**7**) (GANDRA *et al.*, 2017); $[\text{Mn}(\text{ph})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**8**) (DEVEREUX *et al.*, 2000); $[\text{Mn}(\text{ph})(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})].4\text{H}_2\text{O}$ (**9**) (DEVEREUX *et al.*, 1999); $[\text{Mn}_2(\text{isoph})_2(\text{phen})_3].4\text{H}_2\text{O}$ (**10**) (DEVEREUX *et al.*, 2000); $\{[\text{Mn}(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\}_2(\text{isoph})_2(\text{phen}).12\text{H}_2\text{O}$ (**11**) (DEVEREUX *et al.*, 2000); $[\text{Mn}(\text{tereph})(\text{phen})_2].5\text{H}_2\text{O}$ (**12**) (LEON, 2000); $[\text{Mn}_2(\text{oda})(\text{phen})_4(\text{H}_2\text{O})_2][\text{Mn}_2(\text{oda})(\text{phen})_4(\text{oda})_2].4\text{H}_2\text{O}$ (**13**) (CASEY *et al.*, 1994); $\{[\text{Mn}(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_2].3\text{H}_2\text{O}.2\text{EtOH}\}_n$ (**14**) ($3,6,9\text{-tddaH}_2$ =3,6,9-acido trioxiundecanodioico) (MCCANN *et al.*, 1997); $[\text{Ag}_2(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_4].\text{EtOH}$ (**15**) (GANDRA *et al.*, 2017); $[\text{Ag}(\text{phen})_2]\text{ClO}_4$ (**16**) (MCCANN *et al.*, 2004); $[\text{Ag}_2(\text{udda})]$ (**17**) (uddaH_2 =ácido undecanodioico) (THORTON *et al.*, 2016); $[\text{Ag}_2(\text{phen})_3(\text{udda})].3\text{H}_2\text{O}$ (**18**) (THORTON *et al.*, 2016) e $[\text{Ag}(\text{phendione})_2]\text{ClO}_4$ (**19**) (MCCANN *et al.*, 2004). As estruturas químicas dos compostos de coordenação utilizados no presente estudo estão ilustrados na **Figura 7**.

4. Modelo *in vivo* de *G. mellonella*

Larvas de *G. mellonella* em seu último instar do estágio larval foram adquiridas (Livefoods Direct, England, UK) e armazenadas em contêineres plásticos contendo maravalha a 15°C na ausência de luz. Larvas pesando entre 0,2 e 0,3 gramas foram utilizadas em todos os ensaios. (KEVIN, BRENNAN & KAVANAGH, 2003)

Tabela 2. Compostos de coordenação utilizados.

Compostos	Peso Molecular	Solubilidade
[Cu(ph)(phen)(H ₂ O) ₂] (1)	443,9 g/mol	DMSO
[Cu(ph)(phen) ₂].3H ₂ O.2EtOH (2)	734,26 g/mol	DMSO
[Cu(isoph)(phen) ₂].6H ₂ O.EtOH (3)	742,23 g/mol	DMSO
[{Cu(phen) ₂ } ₂ (terph)](terph).13.5H ₂ O.2EtOH (4)	1454,34 g/mol	DMSO
[Cu ₂ (oda)(phen) ₄](ClO ₄) ₂ .2.76H ₂ O.EtOH (5)	1314,8 g/mol	H ₂ O, EtOH
[Cu(phendione) ₃](ClO ₄) ₂ .4H ₂ O (6)	965,02 g/mol	H ₂ O, EtOH, DMSO
{[Cu(3,6,9-tdda)(phen) ₂].3H ₂ O.EtOH} _n (7)	744,26 g/mol	H ₂ O, EtOH, MeOH, n-butanol
[Mn(ph)(phen)(H ₂ O) ₂] (8)	435,30 g/mol	DMSO
[Mn(ph)(phen) ₂ (H ₂ O)].4H ₂ O (9)	669,56 g/mol	DMSO
[Mn ₂ (isoph) ₂ (phen) ₃].4H ₂ O (10)	1050,82 g/mol	DMSO
{[Mn(phen) ₂ (H ₂ O) ₂]} ₂ (isoph) ₂ (phen).12H ₂ O (11)	1627,42 g/mol	DMSO
[Mn(tereph)(phen) ₂].5H ₂ O (12)	669,56 g/mol	H ₂ O, MeOH, DMSO
[Mn ₂ (oda)(phen) ₄ (H ₂ O) ₂][Mn ₂ (oda)(phen) ₄ (oda) ₂].4H ₂ O (13)	2458,23 g/mol	H ₂ O, EtOH
{[Mn(3,6,9-tdda)(phen) ₂].3H ₂ O.EtOH} _n (14)	735,65 g/mol	H ₂ O, EtOH, MeOH, n-Butanol
[Ag ₂ (3,6,9-tdda)(phen) ₄].EtOH (15)	1202,82 g/mol	H ₂ O, EtOH, MeOH, n-Butanol
[Ag(phen) ₂]ClO ₄ (16)	567,73 g/mol	H ₂ O, EtOH, MeOH, n-Butanol
[Ag ₂ (udda)] (17)	430,00 g/mol	H ₂ O
[Ag ₂ (phen) ₃ (udda)].3H ₂ O (18)	1024,66 g/mol	H ₂ O
[Ag(phendione) ₂]ClO ₄ (19)	627,70 g/mol	MeCN, DMSO

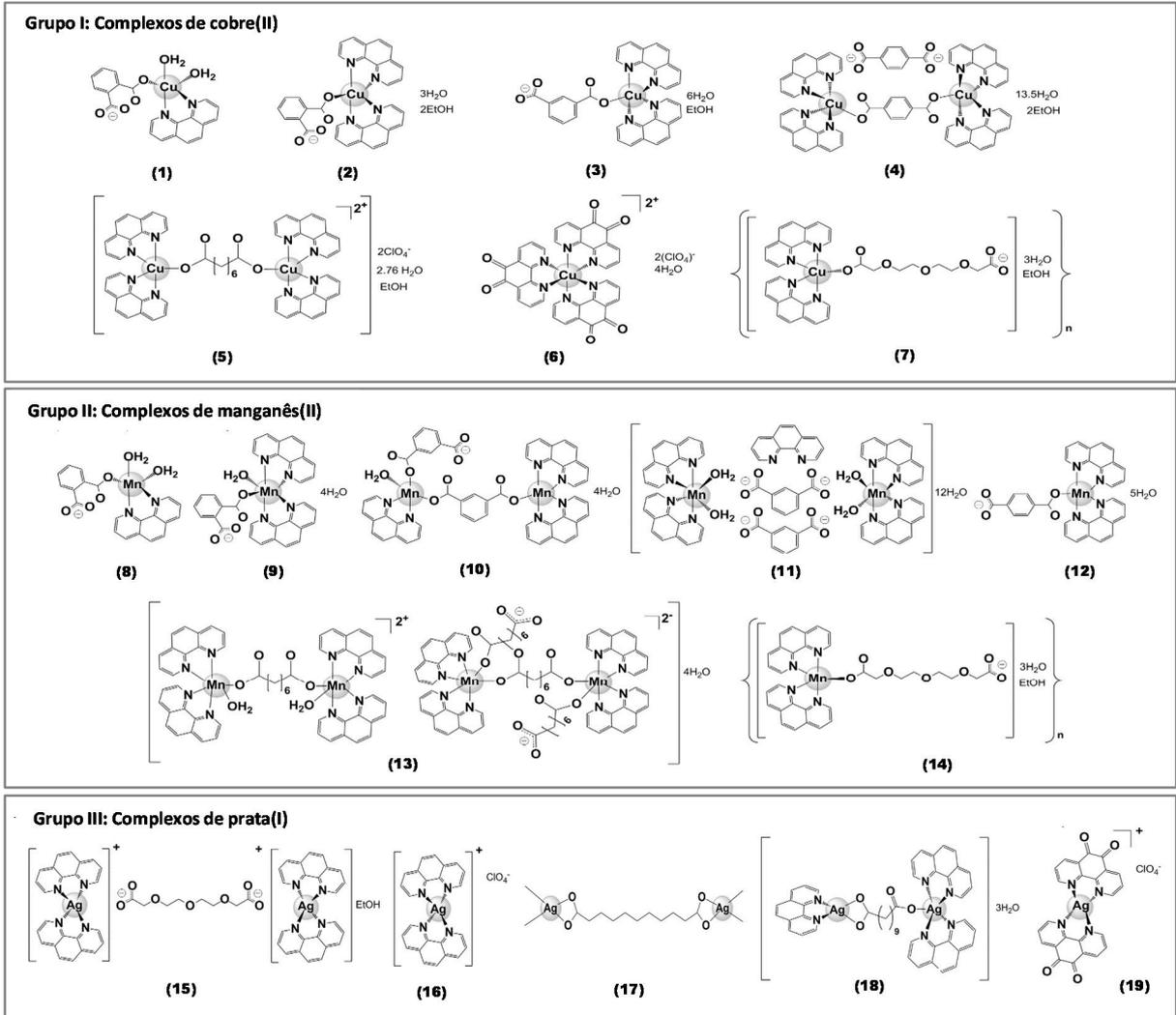


Figura 7. Estrutura dos compostos de coordenação estudados.

II – Propriedades antifúngicas dos compostos de coordenação

5. Efeito dos compostos de coordenação sobre a proliferação celular

Os perfis de susceptibilidade foram determinados utilizando-se o protocolo de microdiluição descrito pelo documento M27-A3 publicado pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2008). Os compostos foram dissolvidos em 500 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos de forma seriada em uma placa de 96 poços contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) a fim de obter a faixa de concentrações utilizadas de 0,0625 a 32 mg/L. Soluções aquosas contendo os sais metálicos $MnCl_2$, $CuCl_2$ e $AgNO_3$ também foram utilizados nas mesmas concentrações citadas acima. DMSO diluído em água nas concentrações correspondentes as utilizadas para a preparação das soluções com os compostos de coordenação

também foram utilizadas como controle. Células fúngicas tratadas e não-tratadas com os compostos foram incubadas a 37°C por 48 h, e a concentração inibitória mínima (CIM) foi estabelecida como sendo a menor concentração do compostos onde não foi possível detectar o crescimento celular mediante inspeção visual, de acordo com as recomendações do CLSI. Os valores das médias geométricas (MG) dos valores de CIM de cada composto contra todos os isolados fúngicos (MG-CIM) foram calculados utilizando-se o software Microsoft Excel 2013.

6. Avaliação da citotoxicidade e determinação dos índices de seletividade dos compostos

Para os ensaios de citotoxicidade, células epiteliais de adenocarcinoma pulmonar A549 foram mantidas em garrafas contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Os níveis de citotoxicidade dos compostos de coordenação foram determinados utilizando-se o ensaio com MTT (*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium]*) (Sigma-Aldrich) (MOSMANN, 1983). Células A549 (10⁴) foram inoculadas em placas de cultura de tecido (TPP, Suíça) e incubadas por 24 h a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ a fim de permitir confluência celular. Os poços foram então lavados duas vezes com DMEM a fim de remover células não-aderentes. Os compostos foram então adicionados aos poços contendo DMEM em uma faixa de concentrações variando de 0,0313 a 500 µg/mL, e as placas foram incubadas por 48 h nas mesmas condições anteriormente citadas. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados. A viabilidade celular foi avaliada através da adição de MTT a cada poço, e placa foi então incubada durante 3 h na ausência de luz, permitindo assim que as enzimas desidrogenases mitocondriais metabolizassem o sal de tetrazólio em cristais de formazana. Os cristais foram então dissolvidos em DMSO (100 µL) e a absorbância foi medida em uma faixa de 405 nm utilizando-se um leitor de microplacas Thermomax Molecular Device. A concentração dos compostos capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular (CC₅₀) foi calculada através do método da regressão linear, e os índices de seletividade foram determinados através da seguinte equação: CC₅₀ da A549/MG-CIM do complexo *Candida haemulonii*.

7. Seleção dos compostos para ensaios subsequentes

Os compostos de coordenação que apresentaram um valor de concentração inibitória mínima (CIM) igual ou inferior a 10 µM nos ensaios utilizando-se células planctônicas foram selecionados para a realização dos ensaios subsequentes (compostos 3 e 5-18, além do sal de prata, AgNO₃, a 1,10-fenantrolina (phen) e 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendione) livres.

8. Efeito dos compostos sobre fungos crescendo em biofilme

O efeito dos compostos de coordenação sobre fungos crescendo em biofilme foi avaliado utilizando-se a técnica de microdiluição descrita previamente (RAMAGE *et al.*, 2001). Células fúngicas (10^6) foram incubadas durante 48 h a 37°C em uma placa de poliestireno de 96 poços contendo (Corning®, Corning Incorporated, EUA) contendo caldo Sabouraud dextrose a fim de permitir a formação de um biofilme maduro (RAMOS *et al.*, 2017). Após a formação deste, o sobrenadante foi aspirado e as células não-aderidas foram removidas através da cuidadosa lavagem dos poços por três vezes com tampão fosfato salino estéril (PBS – 0,15 M de NaCl, 0,01 M de tampão fosfato, pH 7,2). Os compostos foram então adicionados aos poços nas concentrações entre 0,0625 a 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e as placas foram incubadas por mais 48 h a 37°C . A atividade metabólica foi avaliada utilizando-se o ensaio colorimétrico que mensura a redução metabólica do sal 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenil-amino) carbonil]-2H-tetrazólio (XTT – Sigma Aldrich) a um produto de formazana solúvel em água (PEETERS *et al.*, 2008). A concentração inibitória mínima do biofilme (bCIM) foi estabelecida como sendo a menor concentração capaz de inibir em 50% a atividade metabólica quando comparada ao poços controle sem a presença de compostos (ZICCARDI *et al.*, 2015).

9. Seleção da cepa para demais experimentos, determinação de IC_{50} e avaliação de efeito fungicida \times fungistático dos compostos

A partir dos dados obtidos nos ensaios de avaliação da atividade antifúngica dos compostos, o isolado clínico LIPCh4 foi escolhido como modelo para a realização dos experimentos posteriores. Embora seu perfil de susceptibilidade aos compostos, quando crescendo de forma planctônica, seja semelhante ao dos demais isolados, a capacidade de formação de biofilme e a resistência conferida pela presença deste ao isolado LIPCh4 difere completamente do restante das amostras testadas, o que foi a principal motivação para a escolha desta amostra como modelo (vide os resultados). A fim de determinar os valores de IC_{50} dos compostos de coordenação, *C. haemulonii* foi inoculada em uma placa de 96 poços (10^6 células/poço) contendo 200 μl de RPMI e os diferentes compostos em concentrações variando de 2 a 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas foram então incubadas a 37°C por um período de 24 h. O conteúdo dos poços foi recolhido para tubos eppendorf e centrifugados a $12,000\times g$ por 2 min, o sobrenadante descartado e as amostras resuspendidas em PBS. A densidade celular foi determinada por contagem direta em câmara de Neubauer, e a concentração inibitória capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular foi obtida através da análise de regressão linear após plotagem do número de células viáveis versus o log da concentração das drogas utilizando-se o

software Origin Pro 7.5. Finalmente, a fim de determinar os efeitos dos compostos sobre a proliferação de *C. haemulonii* (fungicida × fungistático) a cepa LIPCh4 foi inoculada em uma placa de 96 poços conforme o protocolo CLSI e como previamente descrito no item 5. Após 48 h de incubação, uma amostra de 50 µl de cada poço onde não foi possível detectar a presença de crescimento fúngico mediante inspeção visual foi inoculada em placas contendo ágar Sabouraud, e as placas foram então incubadas por 48 h a 37°C. Após a incubação, as placas foram avaliadas e as concentrações em que a presença de colônias era visível foram consideradas fungistáticas, enquanto a ausência total de células ou colônias visíveis induzidas pelo tratamento foram consideradas concentrações fungicidas.

III - Ensaios *in vivo* utilizando-se larvas de *Galleria mellonella* como modelo

10. Avaliação da virulência de *C. haemulonii*

O perfil de virulência de *C. haemulonii* LIPCh4 foi avaliado pela metodologia previamente descrita para utilização de larvas de *G. mellonella* (KAVANAGH & REEVES, 2004; DESBOIS & COOTE, 2012). Para a realização dos ensaios, a cepa LIPCh4 foi inoculada em meio Sabouraud dextrose líquido e incubada durante 48 h a 37°C sob constante agitação (130 rpm). Após a incubação, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS e sua concentração determinada após contagem direta utilizando-se câmara de Neubauer. As células foram então diluídas em PBS em concentrações finais de 5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 , 5×10^7 e 5×10^8 fungos/ml de PBS. Larvas de *G. mellonella* com peso entre 0,2 e 0,3 gramas e sem alterações em sua coloração foram selecionadas e separadas em grupos de 10 animais. Utilizando-se uma seringa Myjector (23G, BD PrecisionGlide), as larvas foram inoculadas através da última falsa pata esquerda com 20 µl das soluções acima, resultando assim em uma concentração final de 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 fungos por larva. As larvas foram então colocadas em placas de Petri estéreis contendo papel filtro 9 mm e incubadas em duas diferentes temperaturas, 30 e 37°C. Dois grupos controles foram utilizados, sendo o primeiro com larvas não inoculadas, e outro grupo contendo larvas inoculadas com 20 µl de PBS. A mortalidade foi avaliada durante um período de 9 dias, sendo a morte determinada pela melanização e ausência de movimento das larvas frente estímulo com uma agulha (BARNOY *et al.*, 2017). Para fins de comparação do perfil de virulência, uma cepa de *Candida albicans* (ATCC 10231) também foi utilizada como descrito.

11. Resposta imune de *G. mellonella* frente a infecção com *C. haemulonii*

Larvas de *G. mellonella* foram inoculadas com células de *C. haemulonii* como descrito acima a fim de avaliar o número de hemócitos em sua hemolinfa. Três larvas foram selecionadas randomicamente de cada sistema e a hemolinfa extraída (2-3 gotas) através da perfuração da região dorsal na região imediatamente anterior a cabeça com uma agulha estéril. A hemolinfa foi coletada para um tubo eppendorf previamente resfriado e mantida em gelo a fim de prevenir a melanização. A hemolinfa (30 µl) foi então transferida para novos tubos eppendorf contendo 270 µl de PBS gelado contendo 0,37% (v/v) de β-mercaptoetanol a fim de evitar sua melanização e coagulação (KELLY & KAVANAGH, 2011). Após ser gentilmente homogeneizada, 10 µl da solução foram transferidos para uma câmara de Neubauer e o número de hemócitos presentes contados utilizando-se um microscópio de luz. Três contagens diferentes foram realizadas e o número de células multiplicado pelo fator de diluição da hemolinfa e da câmara de Neubauer a fim de determinar a densidade celular.

12. Toxicidade dos compostos de coordenação

Os compostos selecionados foram diluídos em DMSO ou água estéril e diluições seriadas preparadas nas concentrações de 1500 mg/L, 750 mg/L, 500 mg/L, 200 mg/L e 100 mg/L. Utilizando-se uma seringa Myjector (23G, PrecisionGlide), um total de 30 larvas foram inoculadas com 20 µl de cada solução, resultando em concentrações finais de 30, 15, 10, 4 e 2 µg/larva, injetadas diretamente na hemolinfa. Larvas não inoculadas, inoculadas com uma solução contendo DMSO equivalente a maior concentração presente nas diluições (2%) e inoculadas com PBS estéril foram utilizadas como controle. As larvas foram então acondicionadas em placas de Petri estéreis contendo papel filtro 9 mm e maravalha, sendo então incubadas a 30°C por 72 h na ausência de luz. A mortalidade avaliada a cada 24 h como descrito acima.

13. Efeito dos compostos de coordenação na resposta imune de *G. mellonella*

Grupos de 10 larvas de *G. mellonella* foram inoculados com 15 e 30 µg dos compostos e incubadas por 24 h como previamente descrito. Após este período, 3 larvas foram selecionadas aleatoriamente, sua hemolinfa extraída mediante perfuração com uma agulha estéril e a densidade celular de hemócitos determinada como anteriormente descrito. (KELLY & KAVANAGH, 2011)

14. Efeito dos compostos de coordenação na expressão de genes relacionados à resposta imune de *G. mellonella*

14.1 Primers

As sequências dos primers foram projetadas e sintetizadas no Laboratório de Micologia Médica da National University of Ireland – Maynooth. Os detalhes dos primers utilizados encontram-se na **Tabela 3**. Os genes analisados foram associados à resposta imune de *G. mellonella*, sendo estes *IMPI* (inibidor de metalopeptidase de inseto), *transferrina* (peptídeo quelante de ferro), *galiomicina* (peptídeo com atividade antifúngica e antibacteriana) e *gallerimicina* (peptídeo rico em cisteína com provável atividade sinérgica com outros peptídeos antimicrobianos) (LEE *et al.*, 2004; WEDDE *et al.*, 2007; KIM & KIM, 2010; BOLOURI MOGHADDAM *et al.*, 2016). A expressão destes genes foi normalizada contra o gene *S7e* (gene “housekeeping” que codifica a proteína ribossomal S7e) (LEUCO & RAIVIO, 2012).

Tabela 3. Sequências forward (F) e reverse (R) dos genes relacionados ao sistema imune de *G. mellonella* analisados.

Nomes do primer	Oligonucleotídeos (5'-3')	Tamanho dos fragmentos em pares de base
S7e F S7e R	ATGTGCCAATGCCAGTTG GTGGCTAGGCTTGGGAAGAAT	131
Transferrin F Transferrin R	CCCGAAGATGAACGATCAC CGAAAGGCCTAGAACGTTTG	535
IMPI F IMPI R	ATTTGTAACGGTGGACACGA CGCAAATTGGTATGCATGG	409
Galiomicin F Galiomicin R	CCTCTGATTGCAATGCTGAGTG GCTGCCAAGTTAGTCAACAGG	359
Gallerimycin F Gallerimycin R	GAAGATCGCTTTCATAGTCGC TACTCCTGCAGTTAGCAATGC	175

14.2 Preparação das amostras para PCR em tempo real

Grupos de 10 larvas foram expostos a uma concentração de 10 µg/larva dos compostos após inoculação dos mesmos diretamente em sua hemolinfa como previamente descrito. Todos os materiais e espaço de trabalho foram previamente tratados com RNase Away (Molecular Bioproducts Inc.). Após 24 h de exposição, 3 larvas foram randomicamente selecionadas de cada sistema e imersas em nitrogênio líquido em um macerador estéril e então maceradas com um pistilo estéril até a obtenção de um pó fino. Após alguns minutos (a fim de permitir o aumento da temperatura do macerador e evitar o congelamento do reagente), 1 ml de reagente trizol (Sigma-Aldrich) foi adicionado ao almofariz e a mistura obtida cuidadosamente transferida para um eppendorf livre de RNase. A amostra foi deixada descansando (2 min) antes de ser centrifugada a 2000×g por 2 min, permitindo a separação do material insolúvel da amostra. O sobrenadante foi então coletado, transferido para novos eppendorfs livres de RNase e acondicionados a -80°C. (ROCHFORD, 2015)

14.3 Extração do RNA de *G. mellonella*

Previamente a extração do RNA, os materiais e espaço de trabalho foram tratados com RNase Away para prevenir a degradação do RNA das amostras. Os tubos eppendorf contendo as amostras foram descongelados à temperatura ambiente e gentilmente invertidos. Clorofórmio (Sigma Aldrich) foi adicionado aos tubos e após 5 min, as amostras foram centrifugadas a 12,000×g a 4°C por 5 min, resultando na separação da amostra em 3 fases distinta. A fase superior (aquosa) contendo o RNA foi cuidadosamente transferida para outro tubo eppendorf e um volume de 0,5 mL de isopropanol (2-propanol, Sigma Aldrich) foi adicionado aos mesmos, sendo gentilmente invertidos e incubados á temperatura ambiente por 10 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12,000×g por 10 min a 4°C e o sobrenadante removido. O sedimento contendo o RNA foi lavado com 1 ml de etanol 75% (Sigma Aldrich) e novamente suspenso em 30 µl de água tratada com 0,1% de pirocarbonato de dietila (DEPC) e as amostras armazenadas a -80°C (ROCHFORD, 2015).

14.4 Quantificação do RNA

O grau de pureza e concentração de RNA das amostras foram mensuradas mediante utilização de um espectrofotômetro MaestroNano™ (MaestroGen, USA). Uma amostra em branco de água tratada com DEPC 0,1% foi utilizada inicialmente e as absorbâncias (A260/A280 e A260/A230) registradas (ROCHFORD, 2015).

14.4 PCR em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real 1-step foi realizado com o kit QuantiFast SYBR Green RT-PCR (Qiagen, UK) de acordo com as orientações do fabricante. As reações foram realizadas em um volume final total de 25 µl contendo 100 nanogramas de RNA total e 1 µM dos primers reverse e forward, que foram colocados em uma placa de PCR de 96 poços. Em cada placa controles negativos foram adicionados (poços sem RNA e poços sem a mistura de RT). As placas foram seladas e centrifugadas a 1,200×g durante 2 min e, então, processadas em um sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O protocolo de RT-PCR conteve 10 minutos de reação RT a 50°C e um passo de ativação inicial de PCR por 5 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de desnaturação durante 10 seg a 95°C e 30 seg de anelamento/extensão a 60°C. Após estas etapas, análises da curva de dissociação foram realizadas a fim de confirmar a especificidade do RT-PCR. A expressão relativa dos genes foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e os valores de Ct dos genes analisados (*Transferrin*, *IMPI*, *Galiomycin*, and *Gallerimycin*) foram normalizados contra a expressão do gene de referência *S7e* (ROCHFORD, 2015).

15. Efeito do tratamento com os compostos de coordenação na carga fúngica de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. haemulonii*

Grupos de 10 larvas de *G. mellonella* foram inoculadas com uma concentração de 5×10^5 fungos por larva como descrito anteriormente e incubadas a 30°C por 1 h. Após a incubação, as larvas foram tratadas com os compostos nas concentrações de 5, 2,5, 1,25 e 0,625 µg por larva e então incubadas a 30°C por 48 h, sendo a carga fúngica verificada após 24 h e 48 h de tratamento. Para tal determinação da carga fúngica, 3 larvas foram selecionadas randomicamente e imersas em álcool a 70% por alguns segundos. Após estarem secas, as larvas foram cortadas em pequenos pedaços com um bisturi estéril dentro de um falcon de 15 ml contendo 1g de pérolas de vidro 1 mm e 1 ml de PBS contendo ampicilina (1 µg/mL). Os falcons foram então vortexados por 10 seg e as amostras foram diluídas seriadamente até 100,000×. As amostras diluídas foram plaqueadas (50 µl) em placas de Petri contendo ágar Sabouraud e cloranfenicol (100 mg/L). As placas foram incubadas a 30°C por 48 h, e as unidades formadoras de colônia (UFC) estimadas. Larvas não inoculadas, inoculadas apenas com PBS e inoculadas com *C. haemulonii*, porém não tratadas, foram utilizadas como controle (MESA-ARANGO *et al.*, 2013).

16. Efeito do pré-tratamento dos fungos sobre a virulência em *G. mellonella*

Uma concentração de 5×10^6 células de *C. haemulonii* foi transferida para eppendorfs contendo 1 ml de caldo Sabouraud e os compostos nas concentrações equivalentes a $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ e $\frac{1}{4} \times IC_{50}$. Os eppendorfs foram incubados por 24 h a 30°C e, então, os mesmos foram centrifugados a 14,000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi descartado e as células fúngicas foram lavadas com PBS por 2×, sendo resuspendidas em 20 µl de PBS após este processo. Os fungos foram inoculados nas larvas como previamente descrito, e a mortalidade foi avaliada após 24 e 48 h da infecção.

17. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes, utilizando-se triplicatas. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student. Valores de *P* menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos. Os dados referentes ao efeito dos compostos de coordenação na proliferação do complexo *C. haemulonii* em células planctônicas e crescendo em um biofilme foram analisados pelo testes One-way ANOVA no Prisma Graphpad 5.

Resultados

I - Propriedades antifúngicas dos compostos de coordenação

1. Efeitos dos compostos de coordenação na proliferação celular e toxicidade em células de mamífero

A capacidade dos compostos de coordenação (1-19) em inibir a viabilidade de nove isolados clínicos pertencentes ao complexo *C. haemulonii* foi resumida na **Tabela 4**. Os compostos de manganês(II) e prata(I) inibiram de forma significativa todos os isolados fúngicos. Com exceção dos compostos de coordenação **1**, **2** e **4**, os compostos de cobre(II) também demonstraram atividade antifúngica variando de moderada a boa. Quando as amostras foram incubadas na presença dos sais simples CuCl_2 e MnCl_2 , não observou-se nenhum efeito antifúngico. Em contraste, o sal de prata, AgNO_3 , e os ligantes 1,10-fenantrolina (phen) e 1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendione) livres do metal reduziram o crescimento fúngico de forma significativa, embora não de forma tão intensa quanto os quelatos de manganês(II) e prata(I). Soluções aquosas contendo DMSO nas mesmas concentrações finais utilizadas para a preparação das soluções com os compostos, foram testadas e não foram capazes de inibir a proliferação celular dos isolados fúngicos (dados não apresentados).

As análises dos valores de MG-CIM geral dos compostos de cobre(II) (**Tabela 4**), demonstraram que o composto $\{[\text{Cu}(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_2]3\text{H}_2\text{O}.\text{EtOH}\}_n$ (**7**) apresenta a melhor atividade anti-complexo *C. haemulonii* (MG-CIM = 3,37 μM). $[\text{Mn}_2(\text{oda})(\text{phen})_4(\text{H}_2\text{O})_2][\text{Mn}_2(\text{oda})(\text{phen})_4(\text{oda})_2].4\text{H}_2\text{O}$ (**13**) foi o composto de manganês com maior atividade (MG-CIM = 0,87 μM), sendo superado apenas pelos compostos de prata(I) $[\text{Ag}_2(\text{phen})_3(\text{udda}).3\text{H}_2\text{O}$ (**18**) e $[\text{Ag}_2(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_4].\text{EtOH}$ (**15**) (MG-CIM = 0,26 e 0,83 μM , respectivamente). Vale ressaltar que os compostos de prata(I) foram mais ativos do que o sal simples de prata(I), AgNO_3 (3,87 μM). De forma geral, a fenantrolina livre foi aproximadamente 2 vezes mais ativa quando comparada com a fendiona.

Os valores de MG-CIM contra cada uma das espécies utilizadas demonstraram certo grau de variação. Por exemplo, o valor de MG-CIM de todos os complexos de cobre(II) (excluindo-se os com valor de MG-CIM de 32 mg/L ou maior) foram mais baixos contra a espécie *C. duobushaemulonii* quando comparado a *C. haemulonii*. O mesmo perfil se aplica quando comparamos *C. duobushaemulonii* e *C. haemulonii* var. *vulnera*, exceto para o composto **6**. De forma contrária, os compostos de prata(I) demonstraram uma tendência oposta, com *C. duobushaemulonii* apresentando o maior valor de MG-CIM para todos os complexos quando comparada as outras duas espécies de *Candida*.

Tabela 4. Efeito dos compostos estudados na proliferação celular do complexo *Candida haemulonii*

Compostos de coordenação	<i>Candida haemulonii</i>				<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>				<i>Candida duobushaemulonii</i>				Geral	
	CIM (mg/L)			MG-CIM (mg/L)	CIM (mg/L)			MG-CIM (mg/L)	CIM (mg/L)			MG-CIM (mg/L)		
	LIP <i>Ch4</i>	LIP <i>Ch7</i>	LIP <i>Ch12</i>		LIP <i>Ch5</i>	LIP <i>Ch9</i>	LIP <i>Ch11</i>		LIP <i>Ch1</i>	LIP <i>Ch6</i>	LIP <i>Ch8</i>			
1,10-fenantrolina (phen)	1	1	1	1	1	1	0,5	0,79	1	1	1	1	0,93 (5,16 µM)	
1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendione)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	2	2,52	2,16 (10,27 µM)	
CuCl₂	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32 (>23 µM)	
MnCl₂	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32 (>28 µM)	
AgNO₃	1	0,5	1	0,79	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	0,63	0,63 (3,93 µM)	
Compostos de cobre(II)														
[Cu(ph)(phen)(H ₂ O) ₂] (1)	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32 (>72 µM)	
[Cu(ph)(phen) ₂].3H ₂ O.2EtOH (2)	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32 (>43,52 µM)	
[Cu(isoph)(phen) ₂].6H ₂ O.EtOH (3)	8	8	16	10,08	4	8	8	6,35	4	8	4	5,04	6,86 (9,21 µM)	
[{Cu(phen) ₂] ₂ (terph)](terph).13.5H ₂ O.2EtOH (4)	>32	>32	>32	>32	32	32	32	32	>32	>32	>32	>32	>32 (>21.92 µM)	
[Cu ₂ (oda)(phen) ₄](ClO ₄) ₂ .2.76H ₂ O.EtOH (5)	8	8	16	10,08	8	16	8	10,08	8	8	8	8	9,33 (7,09 µM)	
[Cu(phendione) ₃](ClO ₄) ₂ .4H ₂ O (6)*	16	16	16	16	4	8	8	6,35	8	16	4	8	9,33 (9,65 µM)	
{[Cu(3,6,9-tdda)(phen) ₂].3H ₂ O.EtOH} _n (7)	4	4	2	3,17	2	2	4	2,52	2	2	2	2	2,52 (3,37 µM)	
Compostos de manganês(II)														
[Mn(ph)(phen)(H ₂ O) ₂] (8)	8	4	4	5,04	4	4	4	4	8	4	4	5,04	4,67 (10,71 µM)	
[Mn(ph)(phen) ₂ (H ₂ O)] ₂ .4H ₂ O (9)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2 (2,98 µM)	
[Mn ₂ (isoph) ₂ (phen) ₃].4H ₂ O (10)	8	8	4	6,35	4	4	4	4	8	8	4	6v35	5,44 (5,15 µM)	
{[Mn(phen) ₂ (H ₂ O) ₂] ₂ (isoph) ₂ (phen)}.12H ₂ O (11)	4	2	2	2,52	4	2	2	2,52	2	4	2	2,52	2,52 (1,54 µM)	
[Mn(tereph)(phen) ₂].5H ₂ O (12)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4 (5,96 µM)	
[Mn ₂ (oda)(phen) ₄ (H ₂ O) ₂][Mn ₂ (oda)(phen) ₄ (oda) ₂].4H ₂ O (13)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	2	2,52	2,16 (0,87 µM)	
{[Mn(3,6,9-tdda)(phen) ₂].3H ₂ O.EtOH} _n (14)	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	2	3,17	2,33 (3,15 µM)	
Compostos de prata(I)														
[Ag ₂ (3,6,9-tdda)(phen) ₄].EtOH (15)	1	1	1	1	1	0,5	1	0,79	2	1	1	1,26	1 (0,83 µM)	
[Ag(phen) ₂].ClO ₄ (16)*	1	1	1	1	1	0,5	0,5	0,63	2	1	2	1,59	1 (1,76 µM)	
[Ag ₂ (udda)] (17)	0,25	0,25	0,125	0,19	0,5	0,125	0,125	0,19	2	0,5	1	1	0,34 (0,79 µM)	
[Ag ₂ (phen) ₃ (udda)].3H ₂ O (18)	0,125	0,25	0,125	0,16	0,5	0,125	0,25	0,25	0,5	0,25	1	0,5	0,27 (0,26 µM)	
[Ag(phendione) ₂].ClO ₄ (19)*	1	1	1	1	2	1	1	1,26	2	2	2	2	1,36 (2,16 µM)	

Todos os valores de CIM são apresentados como mg/L. MG-CIM – Média geométrica dos valores de CIM do composto (mg/L) para cada espécie do complexo *Candida haemulonii*. A última coluna representa a média geométrica geral para cada composto contra todas as nove amostras do complexo *C. haemulonii*. Os valores de CIM (µM) entre cobre(II), manganês(II) e prata(II) foram estatisticamente significativos (P=0.038, one-way ANOVA). *Análises estatísticas utilizando one-way ANOVA evidenciaram que os valores de CIM deste composto entre as três espécies foi significativa (composto **6** – P=0.05; composto **15** – P=0.04; composto **19** – P=0.02). Nota: os ligantes derivados do ácido dicarboxílico (phthalic, isophthalic, terephthalicoctanedioic and 3,6,9-trioxaundecanedioic) não exibem atividade anti-*Candida* (Devereux et al., 2000).

A citotoxicidade dos compostos de coordenação 1-18, os sais e os ligantes phen e phendione foi avaliada através de um ensaio utilizando MTT e tendo como modelo células da linhagem A549 (adenocarcinoma pulmonar) (**Tabela 5**). Os compostos a base de manganês(II) foram extremamente bem tolerados pelas células A549 e, conseqüentemente, exibiram os maiores valores de índice de seletividade (IS), sendo $[\text{Mn}_2(\text{oda})(\text{phen})_4(\text{H}_2\text{O})_2][\text{Mn}_2(\text{oda})(\text{phen})_4(\text{oda})_2].4\text{H}_2\text{O}$ (**13**) o composto com o maior valor de IS. Quanto aos demais compostos, apenas $[\text{Ag}_2(\text{phen})_3(\text{udda})].3\text{H}_2\text{O}$ (**18**) e o sal de prata, AgNO_3 , demonstraram valores relativamente altos de IS (média de IS = 56,11 e 27,43; respectivamente).

Tabela 5. Citotoxicidade e índices de seletividade dos compostos estudados.

Compostos de coordenação	A549 (CC ₅₀)	<i>C. haemulonii</i> (IS)	<i>C. haemulonii</i> var. <i>vulnera</i> (IS)	<i>C. duobushaemulonii</i> (IS)	Média geral IS
1,10-fenantrolina (phen)	4,30	4,30	5,42	4,30	4,67
1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendione)	2,02	1,01	1,01	0,80	0,94
CuCl₂	123,68	>3,87	>3,87	>3,87	>3,87
MnCl₂	133,76	>4,18	>4,18	>4,18	>4,18
AgNO₃	16,98	21,39	33,96	26,95	27,43
Compostos de cobre(II)					
[Cu(ph)(phen)(H ₂ O) ₂] (1)	0,53	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
[Cu(ph)(phen) ₂].3H ₂ O.2EtOH (2)	1,93	<0,06	<0,06	<0,06	<0,06
[Cu(isoph)(phen) ₂].6H ₂ O.EtOH (3)	0,89	0,09	0,14	0,18	0,14
[{Cu(phen) ₂] ₂ (terph)](terph).13.5H ₂ O.2EtOH (4)	3,86	<0,12	0,12	<0,12	ND
[Cu ₂ (oda)(phen) ₄](ClO ₄) ₂ .2.76H ₂ O.EtOH (5)	0,98	0,10	0,10	0,12	0,11
[Cu(phendione) ₃](ClO ₄) ₂ .4H ₂ O (6)	0,68	0,04	0,11	0,09	0,08
{[Cu(3,6,9-tdda)(phen) ₂].3H ₂ O.EtOH} _n (7)	1,06	0,33	0,42	0,53	0,43
Compostos de manganês(II)					
[Mn(ph)(phen)(H ₂ O) ₂] (8)	234,51	46,53	58,63	46,53	50,56
[Mn(ph)(phen) ₂ (H ₂ O)].4H ₂ O (9)	259,34	129,67	129,67	129,67	129,67
[Mn ₂ (isoph) ₂ (phen) ₃].4H ₂ O (10)	255,87	40,30	63,97	40,30	48,19
{[Mn(phen) ₂ (H ₂ O) ₂] ₂ (isoph) ₂ (phen).12H ₂ O (11)	251,76	99,91	99,91	99,91	99,91
[Mn(tereph)(phen) ₂].5H ₂ O (12)	251,94	62,99	62,99	62,99	62,99
[Mn ₂ (oda)(phen) ₄ (H ₂ O) ₂][Mn ₂ (oda)(phen) ₄ (oda) ₂].4H ₂ O (13)	>512	>256	>256	>203,19	>236,40
{[Mn(3,6,9-tdda)(phen) ₂].3H ₂ O.EtOH} _n (14)	261,67	130,84	130,84	82,42	114,70
Compostos de prata(I)					
[Ag ₂ (3,6,9-tdda)(phen) ₄].EtOH (15)	2,21	2,21	2,78	1,75	2,25
[Ag(phen) ₂](ClO ₄) (16)	2,07	2,07	3,29	1,30	2,22
[Ag ₂ (udda)] (17)	ND	ND	ND	ND	ND
[Ag ₂ (phen) ₃ (udda)].3H ₂ O (18)	13,63	86,55	54,52	27,26	56,11
[Ag(phendione) ₂](ClO ₄) (19)	3,76	3,76	2,98	1,88	2,87

Índices de seletividade (IS) são calculados utilizando-se a fórmula CC₅₀/MG-CIM. Células epiteliais basais alveolares de adenocarcinoma humano A549 foram utilizadas para os ensaios de citotoxicidade e os valores de CC₅₀ são expressos como mg/L. Cada coluna representa a média geométrica dos valores do IS de cada composto contra cada espécie do complexo *Candida haemulonii*.

2. Efeito dos compostos de coordenação sobre biofilme

Neste grupo de experimentos, phen, phendione, AgNO₃ e os compostos de coordenação que apresentaram um valor de MG-CIM ≤ 10 μ M foram selecionados a fim de serem examinados quanto a sua capacidade de afetar a viabilidade de células fúngica presentes em um biofilme maduro. Os resultados (**Tabela 6**) indicaram que os compostos de coordenação foram capazes de interferir com a viabilidade do biofilme, e o perfil observado indicou que a atividade anti-biofilme foi dependente do isolado fúngico. Em geral, o quelato de cobre(II) **7**, os compostos de manganês(II) **11**, **13** e **14** e composto de prata(I) **15** foram os mais ativos, apresentando valores de bCIM abaixo de 10 μ M. Os demais compostos de coordenação testados apresentaram valores de bCIM entre 12,04 e 28,42 μ M. O phendione e o AgNO₃ foram os agentes menos eficazes. Curiosamente, o isolado de *C. haemulonii* LIPCh4 apresentou valores de bCIM que excederam a concentração máxima testada (512 mg/L) frente a um número considerável dos compostos de coordenação. Devido a esta característica de apresentar uma elevada resistência aos compostos na presença de um biofilme, tal cepa foi selecionada para a realização dos ensaios subsequentes.

Tabela 6. Efeito dos compostos estudados em células crescendo em um biofilme.

Compostos de coordenação	<i>Candida haemulonii</i>			<i>Candida haemulonii</i> var. <i>vulnera</i>				<i>Candida duobushaemulonii</i>				geral	
	bCIM (mg/L)			MG-bCIM (mg/L)	bCIM (mg/L)			MG-bCIM (mg/L)	bCIM (mg/L)				MG-bCIM (mg/L)
	LIP Ch4	LIP Ch7	LIP Ch14		LIP Ch5	LIP Ch9	LIP Ch13		LIP Ch1	LIP Ch6	LIP Ch8		
1,10-fenantrolina (phen)	512	2	2	12,70	4	32	8	10,08	1	1	1	1	5,04 (27,96 µM)
1,10-fenantrolina-5,6-diona (phendione)	>512	8	16	11,31*	16	16	32	20,16	4	32	16	12,70	14,67 (76 µM)*
AgNO₃	>512	8	32	16*	128	64	8	40,32	16	16	128	32	29,34 (172 µM)*
Compostos de cobre(II)													
[Cu(isoph)(phen) ₂].6H ₂ O.EtOH (3)	32	16	16	20,16	16	8	16	12,70	32	8	8	12,70	14,81 (19,95 µM)
[Cu ₂ (oda)(phen) ₄](ClO ₄) ₂ .2.76H ₂ O.EtOH (5)	32	16	16	20,16	32	8	16	16	32	8	16	16	17,28 (13,19 µM)
[Cu(phendione) ₂](ClO ₄) ₂ .4H ₂ O (6)*	256	32	16	50,80	32	32	32	32	16	16	8	12,70	27,43 (28,42 µM)
{[Cu(3.6.9-tdda)(phen) ₂].3H ₂ O.EtOH} _n (7)	32	4	4	8	4	4	2	3,17	16	4	8	8	5,88 (7,9 µM)
Compostos de manganês(II)													
[Mn(ph)(phen)(H ₂ O) ₂] (8)	>512	4	16	8*	32	16	8	16	16	8	8	10,08	11,31 (25,98 µM)*
[Mn(ph)(phen) ₂ (H ₂ O)].4H ₂ O (9)	512	2	16	25,40	16	4	4	6,35	16	4	2	5,04	9,33 (13,93 µM)
[Mn ₂ (isoph) ₂ (phen) ₃].4H ₂ O (10)	>512	8	32	16*	32	8	8	12,70	16	16	16	16	14,67 (13,96 µM)*
{[Mn(phen) ₂ (H ₂ O) ₂] ₂ (isoph) ₂ (phen).12H ₂ O (11)	>512	8	32	16*	16	4	8	8	8	8	4	6,35	8,72 (5,3 µM)*
[Mn(tereph)(phen) ₂].5H ₂ O (12)	>512	16	16	16*	2	4	16	5,04	32	8	16	16	10,37 (15,48 µM)*
[Mn ₂ (oda)(phen) ₄ (H ₂ O) ₂][Mn ₂ (oda)(phen) ₄ (oda) ₂].4H ₂ O (13)	>512	32	16	22,63*	16	4	8	8	4	4	8	5,04	8,72 (3,5 µM)*
{[Mn(3.6.9-tdda)(phen) ₂].3H ₂ O.EtOH} _n (14)	512	4	4	20,16	16	4	8	8	16	4	16	10,08	11,76 (4,7 µM)
Compostos de prata(I)													
[Ag ₂ (3.6.9-tdda)(phen) ₄].EtOH (15)	32	16	8	16	4	1	4	2,52	4	8	8	6,35	6,35 (5,2 µM)
[Ag(phen) ₂].ClO ₄ (16)*	32	32	8	20,16	8	0,5	8	8	16	8	8	10,08	12,34 (21,73 µM)
[Ag ₂ (udda)] (17)	>32	>32	>32	>32	>32	>32	32	ND	>32	>32	32	ND	ND
[Ag ₂ (phen) ₃ (udda)].3H ₂ O (18)	32	8	16	16	8	0,5	16	11,31	16	8	8	10,08	12,34 (12,04 µM)
[Ag(phendione) ₂].ClO ₄ (19)*	>512	8	16	11,31*	32	32	32	32	8	32	4	10,08	16 (25,48 µM)*

Todos os valores de CIM de biofilme (bCIM) são expressos como mg/L. Os valores de bMIC foram estatisticamente diferentes entre as cepas de *Candida haemulonii* e as outras duas espécies (P=0.04). Não foram detectadas diferenças quando foram comparadas *C. haemulonii* var. *vulnera* and *C. duobushaemulonii*. Os valores de bCIM foram significativamente diferentes entre as cepas (P≤0.0001. one-way ANOVA). Nota: *Estes valores não incluem os resultados obtidos com a cepa LIP Ch4 que não puderam ser estabelecidos (>512).

3. Determinação dos valores de IC₅₀ e efeito fungicida/fungistático

Os valores de IC₅₀ dos compostos de coordenação selecionados foram determinados através de contagem direta em câmara de Neubauer e por ensaios utilizando-se o XTT. Os valores de IC₅₀ obtidos variaram entre 0,28 e 1,07 µg/L (**Tabela 7**). A avaliação do efeito fungicida/fungistático revelou que os compostos apresentaram atividade fungicida em concentrações mais elevadas, ≥16 µg/L para o complexo **10**, ≥8 µg/L para os complexos **7**, **8**, **11**, **13**, **15**, **16**, e entre ≥4 µg/L para os complexos **9** e **14**. Os complexos com maior capacidade em matar células de *C. haemulonii* foram os compostos **17** (≥1 µg/L), **18** e **19** (≥2 µg/L). De forma contrária, o complexo **6** apresentou atividade fungicida apenas na concentração de 32 µg/L.

Tabela 7. Valores de IC₅₀ e concentrações fungicidas dos dos compostos de coordenação.

Compostos de coordenação	IC ₅₀ (mg/L)	Fungicida (mg/L) ^a
{[Cu(3.6.9-tdda)(phen) ₂].3H ₂ O.EtOH} _n (7)	0,52±0,08	8
[Mn(ph)(phen)(H ₂ O) ₂] (8)	0,96±0,23	8
[Mn(ph)(phen) ₂ (H ₂ O)].4H ₂ O (9)	0,78±0,18	4
[Mn ₂ (isoph) ₂ (phen) ₃].4H ₂ O (10)	0,69±0,01	16
{[Mn(phen) ₂ (H ₂ O) ₂]} ₂ (isoph) ₂ (phen).12H ₂ O (11)	1,07±0,24	8
[Mn(tereph)(phen) ₂].5H ₂ O (12)	0,59±0,10	32
[Mn ₂ (oda)(phen) ₄ (H ₂ O) ₂][Mn ₂ (oda)(phen) ₄ (oda) ₂].4H ₂ O (13)	0,55±0,03	8
{[Mn(3.6.9-tdda)(phen) ₂].3H ₂ O.EtOH} _n (14)	0,65±0,10	4
[Ag ₂ (3.6.9-tdda)(phen) ₄].EtOH (15)	0,39±0,07	8
[Ag(phen) ₂]ClO ₄ (16)	0,36±0,08	8
[Ag ₂ (udda)] (17)	0,33±0,03	1
[Ag ₂ (phen) ₃ (udda)].3H ₂ O (18)	0,28±0,08	2
[Ag(phendione) ₂]ClO ₄ (19)	0,77±0,02	2

^a Os valores refletem as concentrações dos compostos presentes nos poços em que não foi possível detectar crescimento fúngico visualmente e após amostras serem plaqueadas em ágar sabouraud e incubadas por 48 h.

II - Ensaio utilizando-se como modelo *in vivo* larvas de *G. mellonella*

4. Avaliação da toxicidade dos compostos de coordenação em larvas de *G. mellonella*

A fim de determinar o grau de toxicidade dos compostos de coordenação sobre as larvas de *G. mellonella*, em um primeiro ensaio, os animais foram inoculados com diferentes concentrações dos compostos (20 µL de soluções de 1,500 mg/L (30 µg/larva), 750 mg/L 15 µg/larva), 500 mg/L (10 µg/larva), 200 mg/L (4 µg/larva) e 100 mg/L (2 µg/larva). Após 72 h de incubação, a mortalidade foi avaliada pela presença de melanização e ausência de movimento dos animais mediante estímulo com uma agulha. Os compostos apresentaram uma toxicidade dose-dependente, com as doses de 2, 4 e 10 µg/larva sendo toleradas por todos os animais (**Tabela 8**). Exceção aos compostos **10**, **12**, **13** e **16** e **17**, doses de 15 µg/larva foram capazes de induzir mortalidade, com taxas de 10% (**15** e **18**), 13,33% (**11**) 35% (**9**) e 40% (**8**) e

60% (7). O aumento na concentração testada de 15 para 30 µg/larva induziu taxas de mortalidade entre 80% e 100%, exceto para os complexos **13** (30%), **14** (13,33%) e **16** (33,33%) e **17** (20%).

Tabela 8. Toxicidade dos compostos de coordenação em larvas de *G. mellonella*.

Compostos	2 µg (µM)	4 µg (µM)	10 µg (µM)	15 µg (µM)	30 µg (µM)
7	0±0 (2,68)	0±0 (5,36)	0±0 (13,41)	60±14,14 (20,15)	100±0 (40,30)
8	0±0 (4,6)	0±0 (9,18)	0±0 (22,97)	40±0 (34,46)	90±0 (68,92)
9	0±0 (2,97)	0±0 (5,94)	0±0 (14,86)	35±7,07 (22,30)	96,67±5,77 (44,6)
10	0±0 (1,90)	0±0 (3,80)	0±0 (9,51)	0±0 (14,27)	80±0 (28,54)
11	0±0 (1,22)	0±0 (2,44)	0±0 (6,14)	13,33±5,77 (9,21)	90±0 (18,42)
12	0±0 (2,98)	0±0 (5,96)	0±0 (14,93)	0±0 (22,40)	85±7,07 (44,8)
13	0±0 (0,81)	0±0 (1,62)	0±0 (4,06)	0±0 (6,10)	30±0 (12,2)
14	0±0 (2,71)	0±0 (5,42)	0±0 (13,59)	0±0 (20,39)	13,33±5,77 (40,78)
15	0±0 (1,66)	0±0 (3,32)	0±0 (8,31)	10±10 (12,47)	95±7,07 (24,94)
16	0±0 (3,52)	0±0 (7,04)	0±0 (17,61)	0±0 (26,42)	33,33±5,77 (52,84)
17	0±0 (4,65)	0±0 (9,30)	0±0 (23,25)	0±0 (34,88)	20±14,14 (68,75)
18	0±0 (1,95)	0±0 (3,90)	0±0 (9,75)	10±10 (14,63)	90±14,14 (29,26)

Os valores percentuais expressos na tabela são referentes ao % total de mortalidade em um sistema contendo 10 larvas após 72 h de exposição aos compostos. Os valores entre parênteses representam as concentrações em micromolar/larva de cada um dos compostos.

5. Avaliação da virulência de *C. haemulonii* em *G. mellonella*

A fim de avaliar a virulência de *C. haemulonii*, as larvas foram inoculadas com diferentes concentrações de células fúngicas e incubadas a 30°C e 37°C por nove dias. Para fins de comparação, uma cepa de *C. albicans* foi utilizada nos ensaios nas mesmas condições (**Figura 8**). Uma pequena taxa de mortalidade foi notada nas concentrações mais baixas, entre 10³ e 10⁵ células/larva, a partir do 5 dia de incubação, porém não apresentando relevância, uma vez que mesmo os controles não inoculados apresentaram uma tendência semelhante de mortalidade. Nos ensaios utilizando-se um inóculo de 10⁶ células/larva, *C. albicans* induziu

mortalidade nos primeiros dias de infecção, sendo esta gradual em larvas incubadas a 30°C, de 28% após 24 h de infecção e aumentando para 53%, 65%, 82% e 90% em cada tempo avaliado subsequentemente. De forma contrária, as larvas incubadas a 37°C apresentaram 83% de mortalidade já no primeiro dia, com aumento para 85% e 95% após 48 h e 72 h de infecção, respectivamente. A infecção das larvas com 10⁷ células de *C. albicans* resultou em 100% de mortalidade logo nas primeiras 24 h em ambas as temperaturas avaliadas.

Larvas infectadas com 10⁶ células de *C. haemulonii* apenas apresentaram alguma mortalidade a partir do terceiro dia de infecção no sistema incubado a 30°C, sendo esta de 60% ao final de 9 dias, uma mortalidade 48% maior quando comparada ao controle. As larvas incubadas a 37°C apresentaram mortalidade apenas no sexto dia, porém as taxas foram extremamente similares as observadas no controle não-inoculado mantido a 37°C, sendo tal resultado pouco relevante. Porém, após o aumento do inóculo para 10⁷ células/larva, os animais incubados a 30°C apresentaram mortalidade de 82% após 24 h de infecção, elevando-se para 97% e 100% após 48 h e 72 h, respectivamente. Nos sistemas incubados a 37°C, uma taxa de mortalidade de 15% foi observada em 48 h pós-infecção, posteriormente elevando-se a para 55%, 63%, 83% e finalmente 88% em cada ponto de avaliação, mantendo-se estável nesta taxa até o final do período de incubação. De fato, a temperatura impactou diretamente nas taxas de mortalidade, sendo a virulência de *C. albicans* maior nos sistemas incubados a 37°C enquanto a tendência oposta foi observada nos sistemas infectados com *C. haemulonii*, com maior mortalidade observada a 30°C. Vale ressaltar que nos sistemas controle (não inoculados) taxas de mortalidade também foram observada a partir do sexto dia, sendo esta, ao final de 9 dias, de 30% nos animais incubados a 37°C e de 12% nos sistemas incubados a 30°C.

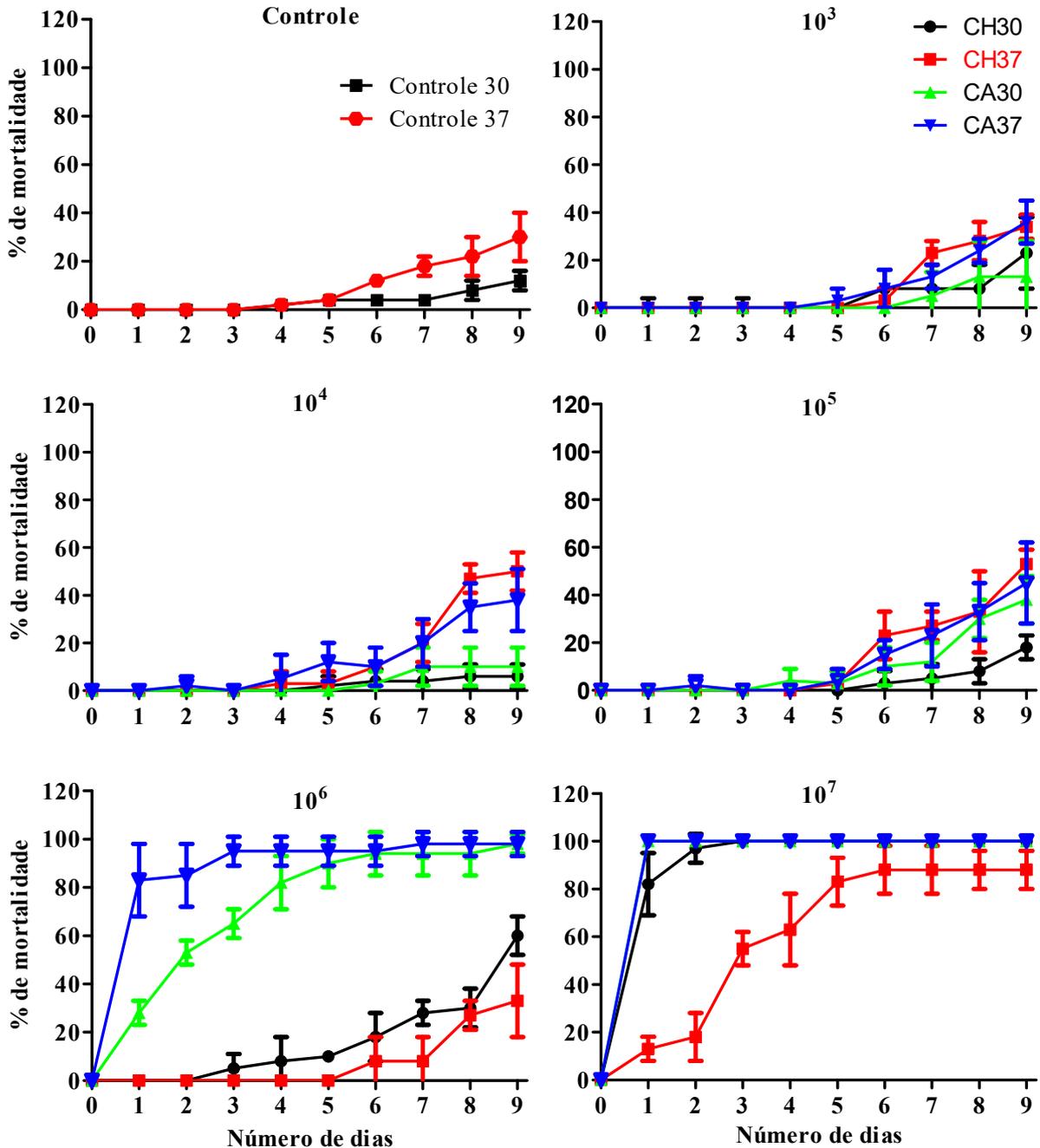


Figura 8. Avaliação da virulência de diferentes inóculos de *C. haemulonii* e efeito da temperatura em sua patogênese utilizando larvas de *G. mellonella*. *C. haemulonii* e *C. albicans* foram incubadas a 37°C por 48 h em caldo Sabouraud sob constante agitação (130 rpm). As células foram então obtidas após centrifugação (4.000 rpm por 5 min) e o número de células determinado utilizando uma câmara de Neubauer. Grupos de 10 larvas de *G. mellonella* foram inoculadas com diferentes concentrações ($10^3 - 10^7$ células/larva) de *C. haemulonii* e *C. albicans*. As larvas infectadas foram incubadas a 30 e 37°C por um período total de 9 dias, e a mortalidade foi avaliada a cada 24h (CH 30 – *C. haemulonii* 30°C; CA 30 – *C. albicans* 30°C; CH 37 – *C. haemulonii* 37°C; CA 37 – *C. albicans* 37°C). Larvas inoculadas apenas com PBS foram utilizadas como controle. A mortalidade foi determinada a partir da ausência de movimento após estímulo físico com uma agulha. Nos ensaios utilizando o inóculo de 10^6 células, CA 30 e CA 37 apresentaram aumento de mortalidade significativo em relação ao controle em todos os pontos de avaliação, e CH 30 partir do oitavo dia ($p > 0,05$; teste *t* student). Nos ensaios utilizando o inóculo de 10^7 células todos os sistemas apresentaram significância estatística em relação ao controle ($p > 0,05$; teste *t* student).

Após 9 dias de incubação, os inóculos de fungos correspondentes à 10^3 , 10^4 e 10^5 não foram capazes de afetar de forma significativa a mortalidade das larvas em nenhum dos sistemas avaliados (**Figura 9**). O inóculo contendo 10^6 fungos induziu mortalidade significativa nos animais infectados com *C. albicans* incubados a 30°C e 37°C. Já os animais infectados com 10^7 fungos apresentaram mortalidade significativa com *C. haemulonii* e *C. albicans* em todos os sistemas avaliados.

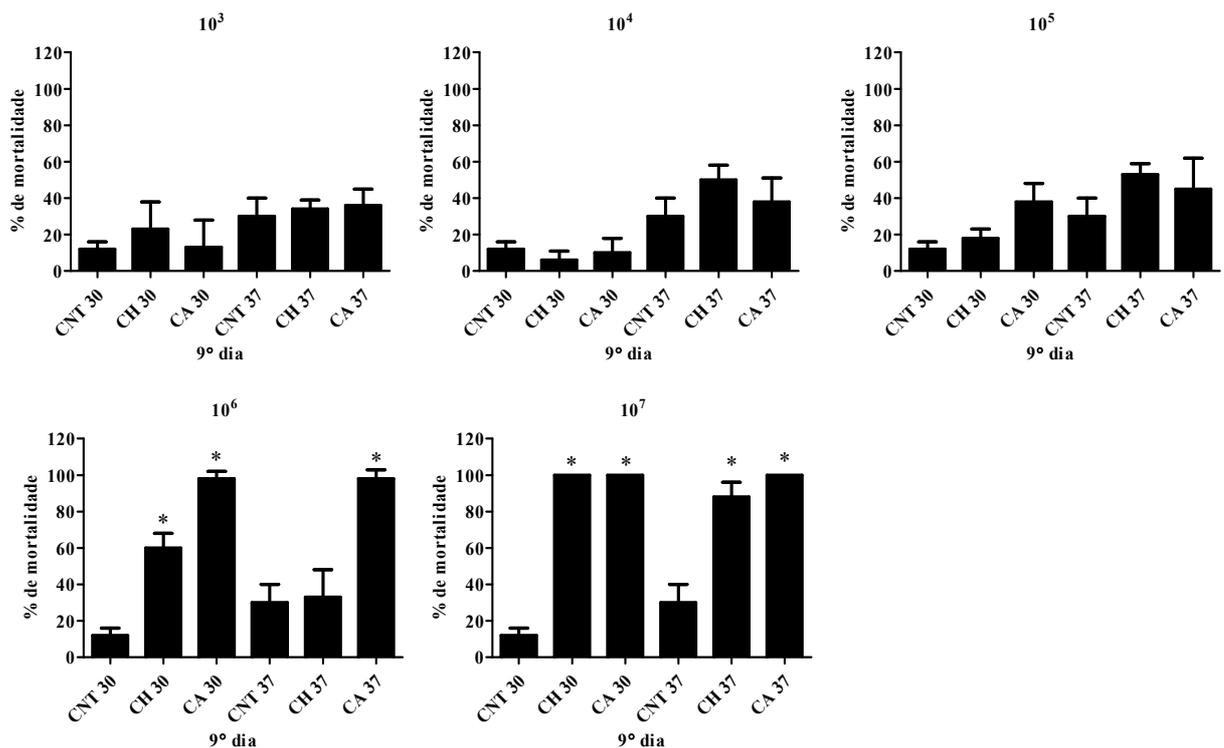


Figura 9. Comparação da mortalidade induzida por *C. haemulonii* e *C. albicans* em *G. mellonella*. Porcentuais de mortalidade de larvas de *G. mellonella* infectadas com diferentes concentrações de *C. haemulonii* e *C. albicans* e incubadas a 30°C e 37°C correspondente ao nono dia de infecção. Os asteriscos indicam valores que foram estatisticamente diferentes em relação ao controle (teste *t* student/ $p < 0,05$).

Embora o inóculo de 10^6 células de *C. haemulonii* por larva não tenha impactado na sobrevivência de *G. mellonella*, a utilização de densidades celulares variando entre 2×10^6 e 5×10^6 foi capaz de induzir taxas de mortalidade de 20% (3×10^6), 37% (4×10^6) e 80% (5×10^6) após 24 h e de 45% (2×10^6), 83% (3×10^6), 90% (4×10^6) e 100% (5×10^6) após 48 h (**Figura 10**). Após 72 h de incubação, todas as concentrações induziram 100% de mortalidade nos animais infectados.

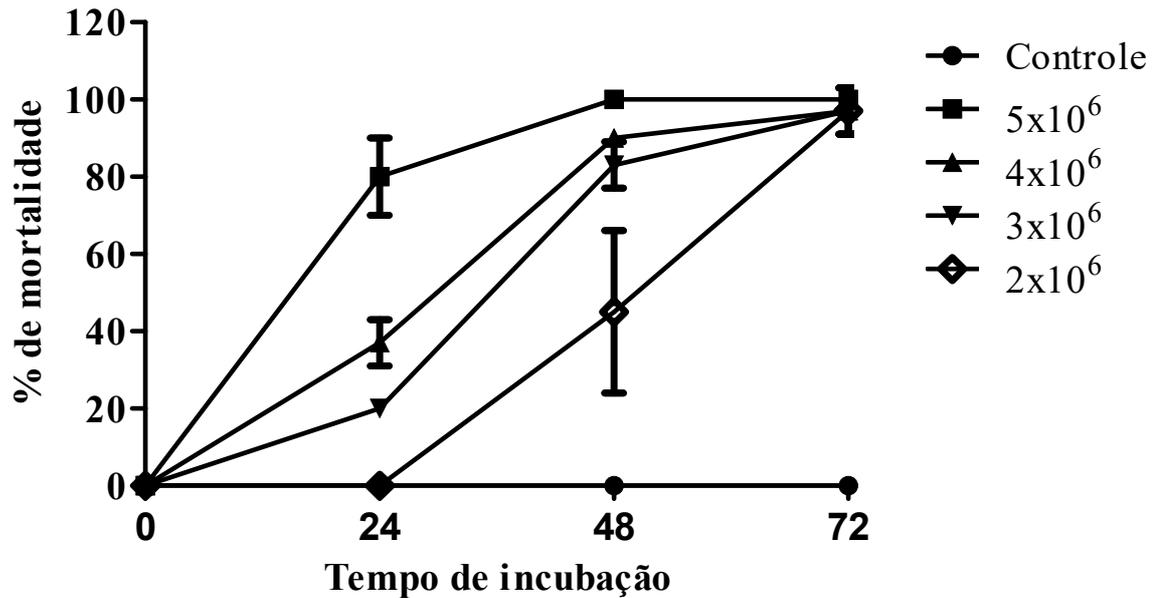


Figura 10. Virulência de diferentes concentrações de células de *C. haemulonii* em *G. mellonella*. Grupos de 10 larvas foram inoculadas com *C. haemulonii* em concentrações variando entre 2×10^6 e 5×10^6 e incubadas a 30°C por até 72 h. Larvas inoculadas com PBS foram utilizadas como controle, e a mortalidade foi avaliada como previamente descrito. Os valores representam as médias \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Excetuando-se o resultado obtido com o inóculo de 2×10^6 no ponto de 24 h, todos os sistemas foram estatisticamente significativos em relação ao controle (teste *t* student).

6. Melanização de *G. mellonella* em resposta à infecção fúngica

O processo de melanização em *G. mellonella* ocorre como parte da resposta imune frente a um agente invasor. Larvas fotografadas 1 h após a infecção com diferentes concentrações de *C. haemulonii* demonstraram um processo de melanização inóculo-dependente (**Figura 11**). Embora nenhuma alteração na coloração da cutícula tenha sido observada em larvas infectadas com 10^3 e 10^4 células/larva, o inóculo de 10^5 induziu a presença de pequenas áreas escurecidas na região ao redor do local de inoculação. Alterações mais intensas foram observada nos animais infectados com 10^6 células, com grandes áreas escurecidas presentes na cutícula de *G. mellonella*. Finalmente, um processo intenso e disseminado de melanização foi observado em larvas infectadas com 10^7 células de *C. haemulonii*.

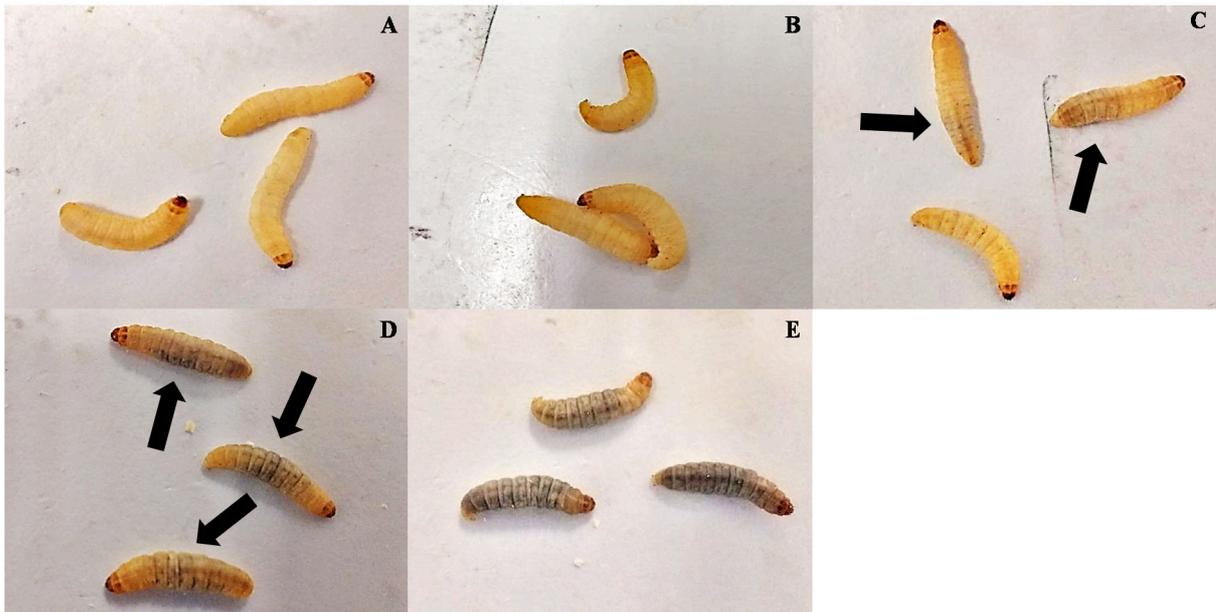


Figura 11. Processo de melanização induzido pela infecção por *C. haemulonii* em *G. mellonella*. As larvas foram inoculadas com as concentrações de (A) 10^3 , (B) 10^4 , (C), 10^5 , (D) 10^6 e (E) 10^7 fungos/larva e incubadas a 30°C por 1 h antes de serem fotografadas. As setas pretas indicam áreas escurecidas devido a presença do processo de melanização da resposta imune de *G. mellonella*.

7. Modulação da resposta imune de *G. mellonella* induzida pela infecção por *C. haemulonii*

O impacto da infecção por *C. haemulonii* na resposta imune das larvas de *G. mellonella* foi avaliado através da extração e contagem do número de haemócitos presentes na hemolinfa dos animais. Uma resposta imune inóculo-dependente foi observada como demonstrado na **figura 12**. Embora o menor inóculo testado (10^3) não tenha sido capaz de afetar o número de hemócitos presentes na hemolinfa dos animais, as demais concentrações foram capazes de impactar na resposta imune das larvas. A presença de um aumento significativo na densidade de hemócitos nos animais infectados com 10^4 células/larva foi observada, mantendo-se elevada em níveis similares pelas 48 h de análise. Ao aumentar o inóculo inicial para 10^5 observou-se que, embora os hemócitos permanecessem elevados após 6 h e 24 h de infecção quando comparado ao controle, estes apresentavam densidades significativamente reduzidas se comparadas ao perfil observado em animais infectados com 10^4 células. Larvas infectadas com 10^6 apresentaram aumento do número de hemócitos após 6 h, com subsequente queda após 24 h e 48 h de infecção, perfil semelhante ao observado nos animais infectados com 10^7 células/larva.

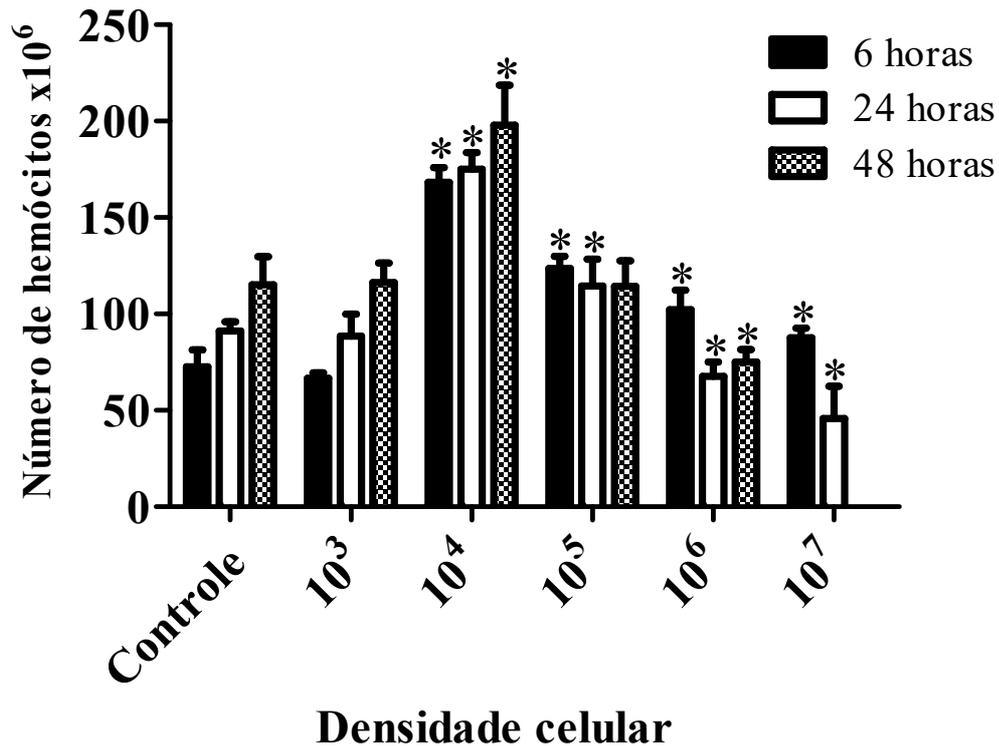


Figura 12. Imunomodulação de *G. mellonella* induzida pela infecção com *C. haemulonii*. As larvas foram infectadas com diferentes concentrações de células fúngicas, e após 6, 24 e 48 h de infecção, amostras dos animais foram sacrificadas a fim de estimar o número de hemócitos circulantes nos modelos infectados. Os asteriscos indicam valores que foram estatisticamente diferentes em relação ao controle (teste *t* student) em seu respectivo tempo de incubação. Devido a mortalidade de 100% das larvas, não foi possível a realização da contagem dos hemócitos das larvas infectadas com 10⁷ células por 48 h.

8. Determinação da carga fúngica em *G. mellonella*

As larvas inoculadas com *C. haemulonii* foram maceradas e o extrato plaqueado a fim de avaliar a carga fúngica presente nos animais infectados com diferentes densidades celulares, e uma relação direta entre o inóculo inicial e a carga fúngica foi observada. Uma estabilidade no número de células fúngicas presentes nos animais entre os pontos de análise (6, 24 e 48 h) foi observada nos inóculos menores, possivelmente devido a contenção do quadro infeccioso pelo sistema imune dos animais (**Figura 13**). Contrariamente, ao utilizarmos inóculos contendo inicialmente 10⁶ e 10⁷ células, um aumento gradativo no número de UFC foi observado, indicando uma progressão da infecção e incapacidade do sistema imune em efetivamente impedir a replicação celular das leveduras.

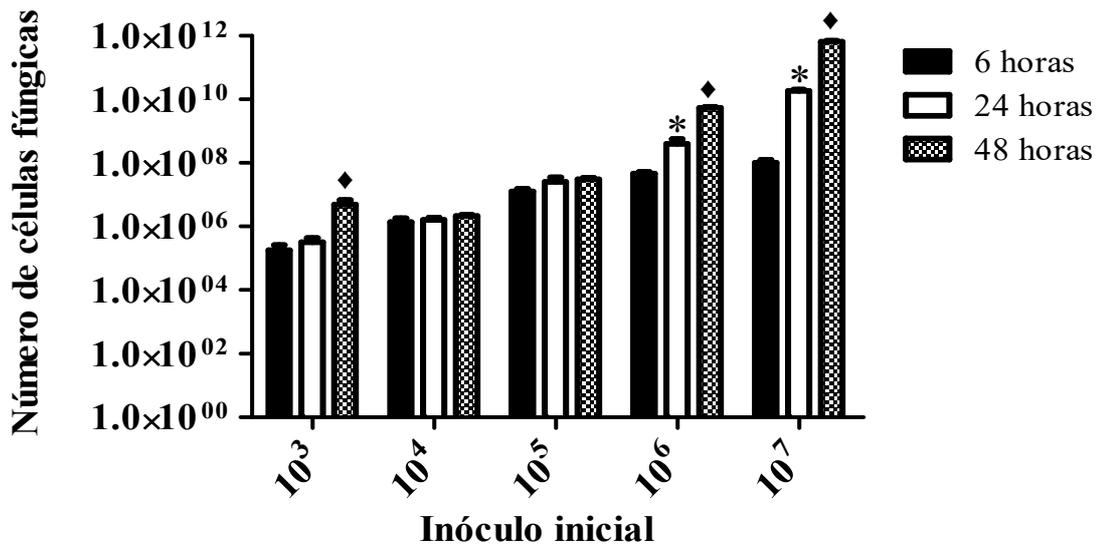


Figura 13. Carga fúngica de *C. haemulonii* nas larvas infectadas. Os animais foram infectados com diferentes concentrações celulares, e a carga fúngica foi determinada após 6, 24 e 48 h de infecção após o plaqueamento do extrato de larvas maceradas. Os asteriscos indicam valores que foram estatisticamente diferentes em relação ao ponto anterior de avaliação (6 h versus 24h (*)) e 24 h versus 48 h (♦)) (teste *t* Student).

9. Imunomodulação de *G. mellonella* induzida pelos compostos de coordenação

Uma vez que uma possível imunomodulação induzida pelos compostos pode ser capaz de afetar a resposta dos animais à infecção por *C. haemulonii*, a avaliação do impacto dos compostos de coordenação no número de hemócitos circulantes foi realizada (**Figura 14**). Após 24 h de incubação, os animais no sistema controle apresentaram uma densidade de hemócitos média de $75,8 \times 10^6$ células/mL. Os animais expostos aos compostos de coordenação em uma concentração de 15 μ g/larva apresentaram aumento significativo em tal densidade após o tratamento com os compostos **9** ($101,2 \times 10^6$ /mL), **11** (90×10^6 /mL), **13** (138×10^6 /mL) e **14** (149×10^6 /mL). De forma contrária, uma redução foi observada com os compostos **10** (40×10^6 /mL), **12** ($32,5 \times 10^6$ /mL), **15** (35×10^6 /mL), **16** ($48,3 \times 10^6$ /mL) e **18** ($54,1 \times 10^6$ /mL). Nenhuma alteração significativa foi observada com os compostos **8** e **17**. Ao utilizarmos uma concentração de 30 μ g/larva, uma queda expressiva no número de hemócitos foi observada com os compostos de coordenação **9** (15×10^6 /mL) e **17** ($19,6 \times 10^6$ /mL), e um aumento na densidade com o composto **14** (103×10^6 /mL). Os compostos **8**, **13** e **16** não induziram alterações estatisticamente significativas, enquanto os complexos **10**, **11**, **12**, **15** e **18** na concentração de 30 μ g/larva induziram uma total ausência de hemócitos nas amostras obtidas. O tratamento utilizando o composto **7**, nas duas concentrações utilizadas, resultou na ausência total de hemócitos nas amostras.

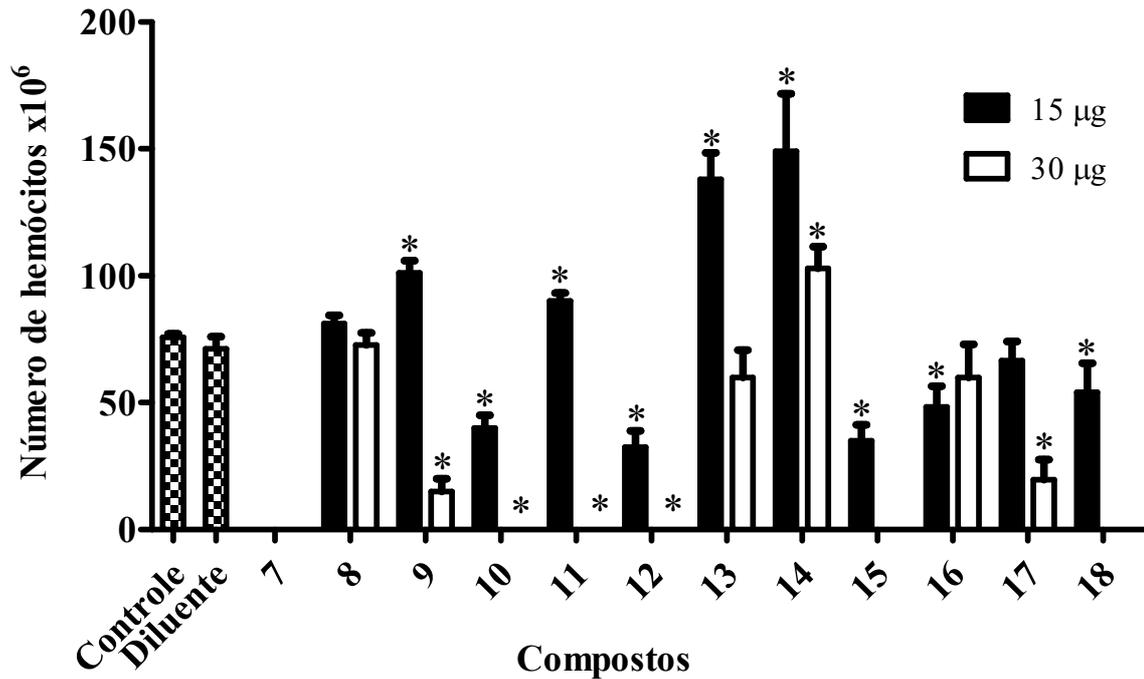


Figura 14. Efeito dos compostos de coordenação no número de hemócitos livres de *G. melonella*. As larvas foram inoculadas com duas diferentes concentrações dos compostos (15 e 30 µg). Após 24 h de tratamento, 3 larvas foram selecionadas randomicamente e após a extração dos hemócitos, a densidade destes nas amostras foi estabelecida através de contagem direta em câmaras de Neubauer. Como alguns dos compostos apresentaram taxas de mortalidade muito elevadas, larvas mortas foram selecionadas a fim de completar um total de 3 animais utilizados, resultando em amostras com ausência total de hemócitos e não sendo possível determinar a concentração destes com os compostos **7** (15 e 30 µg) **15** e **18** (30 µg). Os asteriscos indicam valores que foram estatisticamente diferentes em relação ao controle (teste *t* student).

A fim de investigar uma possível correlação entre a flutuação no número de hemócitos observada após 24 h e a toxicidade dos compostos de coordenação, um novo ensaio de toxicidade com as concentrações de 15 e 30 µg/larva foi realizado (**Tabela 9**). Uma vez que os tratamentos com 15 µg/larva apresentaram taxas de mortalidade muito semelhantes entre si após 24 h, as análises foram realizadas levando-se em consideração apenas a mortalidade observada com 30 µg/larva. De uma forma em geral, uma relação entre toxicidade (30 µg/larva) e densidade de hemócitos (15 µg/larva) foi observada, uma vez que compostos com taxas de mortalidade de 0% induziram um aumento do número de hemócitos (**13** e **14**) ou não afetaram tal número (**17**), e compostos mais tóxicos induziram queda na densidade de hemócitos (**15**, **18**, **12**, **16** e **10**).

Tabela 9. Mortalidade versus número de hemócitos após tratamento de larvas de *G. Mellonella* com os compostos de coordenação.

Compostos	15µg		30µg	
	% de mortalidade	Hemócitos x10 ⁶	% de mortalidade	Hemócitos x10 ⁶
Controle	0%	75,8	0%	75,8
Diluente	0%	71,2	0%	71,2
7	70%	-	100%	-
8	10%	81,2	60%	72,7
9	0%	101,2	90%	15
10	0%	40	20%	0
11	0%	90	60%	0
12	0%	32,5	60%	0
13	0%	138	0%	60
14	0%	149	0%	103
15	10%	35	90%	-
16	0%	48,3	60%	60
17	0%	66,6	70%	19,6
18	20%	54,1	90%	-

10. Impacto dos compostos de coordenação na expressão de peptídeos antimicrobianos em *G. mellonella*

Frente ao impacto dos compostos de coordenação sobre o número de hemócitos circulantes, decidimos aprofundar a investigação dos efeitos imunomodulatórios dos compostos sobre as larvas de *G. mellonella*. Para tal, a expressão de quatro genes relacionados à resposta imune das larvas foram analisadas: *Transferrina*, *IMPI*, *galiomicina* e *gallerimicina*, que foram normalizados contra o gene de referência *S7e*. Os resultados (**Figura 15**) indicaram que diversos compostos afetaram à expressão gênica de tais peptídeos, sendo possível detectar aumentos significativos na expressão da transferrina e IMPI após o tratamento com os compostos **10**, **11**, **12**, **14**, **15**, **16** e **17**. No caso dos compostos **10**, **12** e **14**, o aumento induzido por estes na expressão gênica da *transferrina* chegou a

níveis até 100× maiores quando comparados ao controle, bem como aumentos de mais de 20× nos níveis da expressão de *IMPI*. A expressão do peptídeo *galiomicina* foi significativamente aumentada pelo composto **17** (2,66×) e a *gallerimicina* pelos compostos **10** (2,03×) e **12** (20,55×).

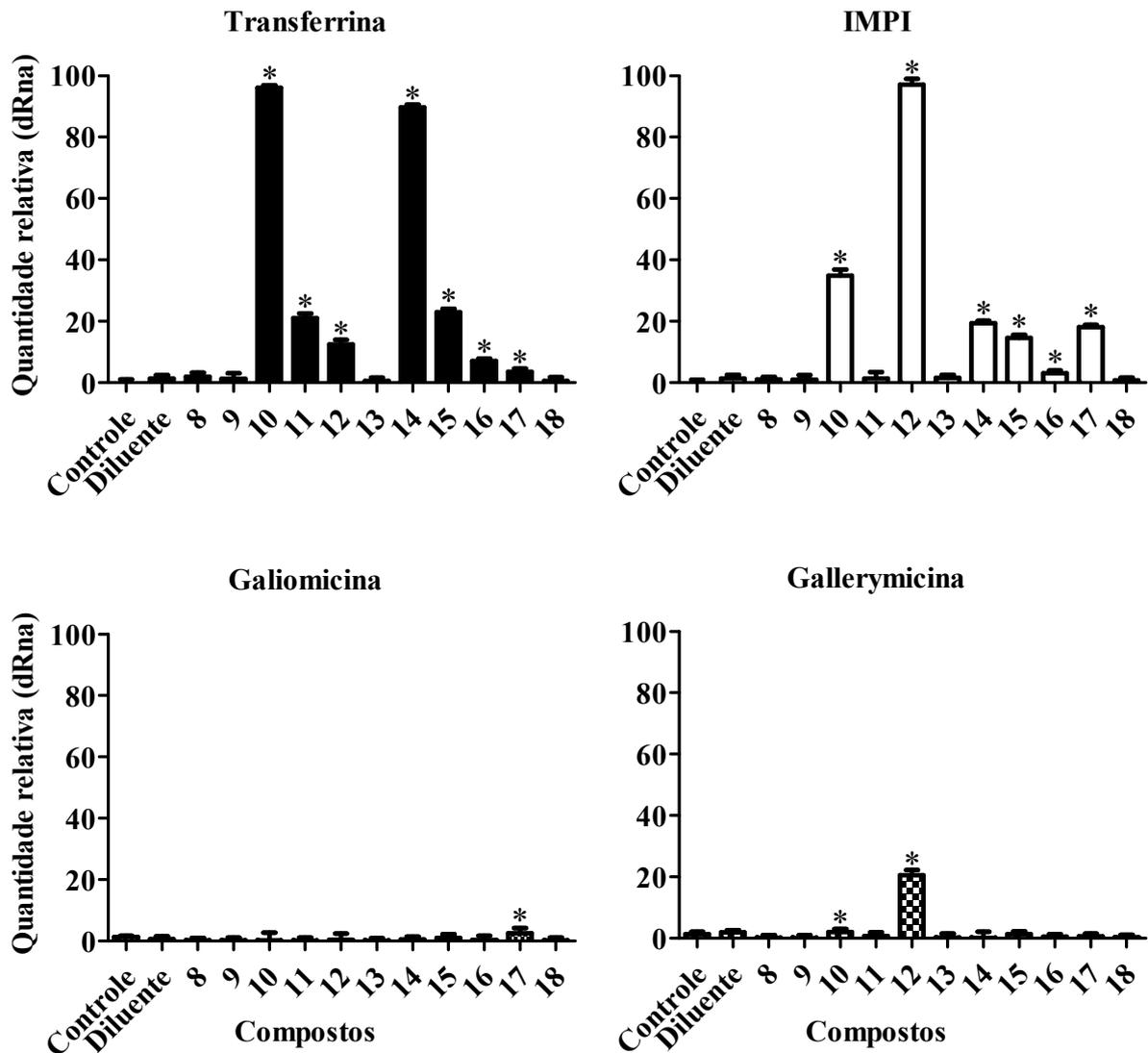


Figura 15. Análise do efeito imunomodulatório dos compostos de coordenação em *G. mellonella* através de RT-PCR. As larvas foram inoculadas com 15 µg/larva dos compostos e após 24 h de exposição, o RNA total foi obtido. Os 4 genes avaliados participam da resposta imune de *G. mellonella* e foram normalizados contra o gene de referência *S7e*. Os asteriscos indicam valores que foram estatisticamente diferentes em relação ao controle (teste *t* student).

11. Efeito do tratamento com os compostos de coordenação na carga fúngica de larvas infectadas com *C. haemulonii*

A fim de avaliar o efeito do uso dos compostos de coordenação na infecção por *C. haemulonii*, larvas infectadas com o fungo foram tratadas com concentrações não-tóxicas dos compostos e a carga fúngica analisada após 24 h e 48 h de tratamento. As análises após 24 h de ensaio (Figura 16) indicaram que os compostos 9 e 14 foram capazes de reduzir significativamente o número de leveduras presentes nos animais infectados em todas as concentrações utilizadas. Os complexos 10 e 13 reduziram a carga fúngica em larvas tratadas com 1,25 e 0,625 $\mu\text{g/larva}$, dado similar ao observado com o complexo 11 nas 3 concentrações mais elevadas. Curiosamente, os compostos 10, 17 e 18, em concentração de 5 $\mu\text{g/larva}$, induziram um aumento expressivo no número de UFC obtidos, resultado similar ao perfil observado com o composto 11 nas duas concentrações mais altas bem como o complexo 8 em todas as concentrações avaliadas. Nenhuma relevância estatística foi observada com a utilização dos demais compostos de coordenação.

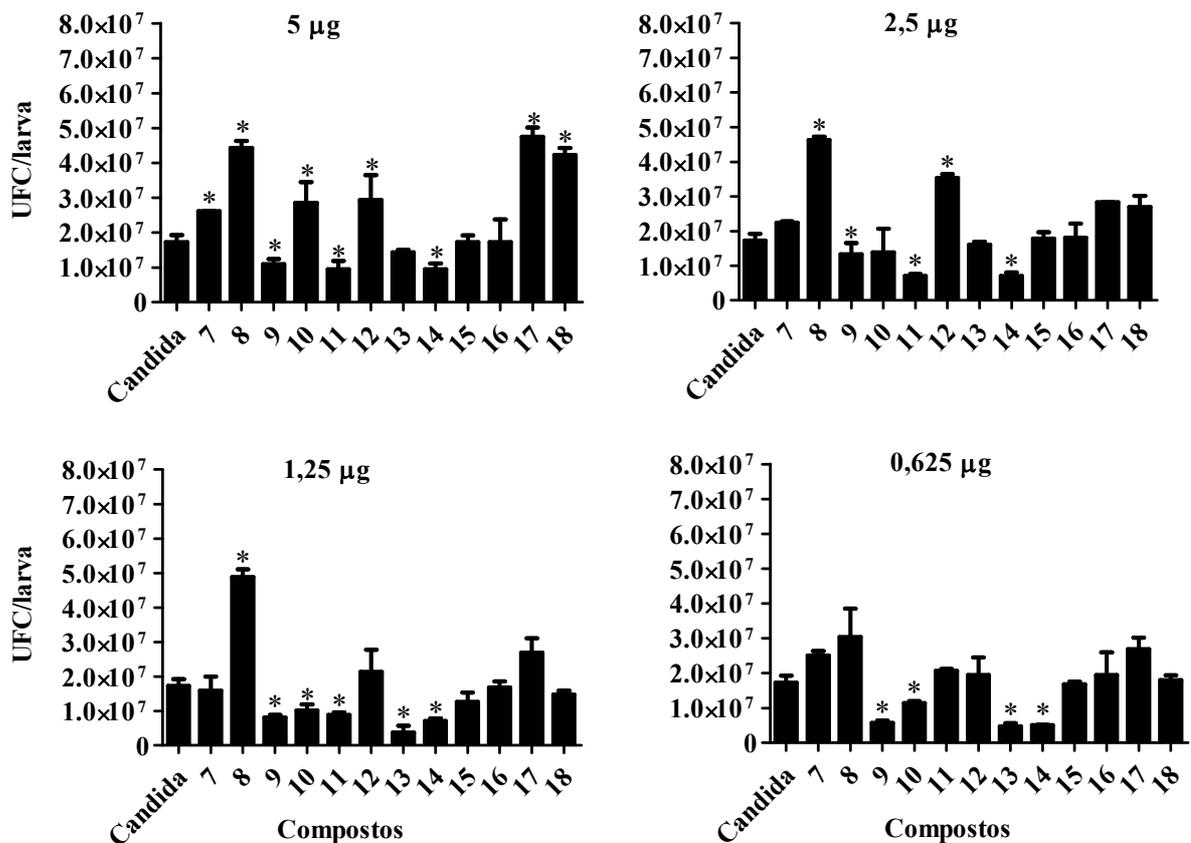


Figura 16. Efeito dos compostos de coordenação na infecção por *C. haemulonii*. Larvas foram infectadas com *C. haemulonii* (5×10^5) tratadas com os compostos em diferentes concentrações 1 h após a infecção. Após 24 h de incubação, três larvas foram selecionadas randomicamente, maceradas e o extrato obtido plaqueado a fim de determinar a carga fúngica dos animais infectados. Os asteriscos indicam valores que foram estatisticamente diferentes em relação ao controle (teste *t* student).

Após 48 h de incubação, o composto **14** nas concentrações de 2,5, 1,25 e 0,625 $\mu\text{g/larva}$ manteve a capacidade de inibição da proliferação fúngica, bem como os complexos **13** (0,625 $\mu\text{g/larva}$) e **15** (5 $\mu\text{g/larva}$) (**Figura 17**). No entanto, os compostos **7**, **8**, **17** e **18**, em todas as concentrações testadas, bem como o complexo **12** (5 e 2,5 $\mu\text{g/larva}$) e **13** (5 $\mu\text{g/larva}$) resultaram em um aumento considerável na carga fúngica das larvas infectadas. Os demais tratamentos resultaram na obtenção de números similares de UFCs obtidas dos animais infectados.

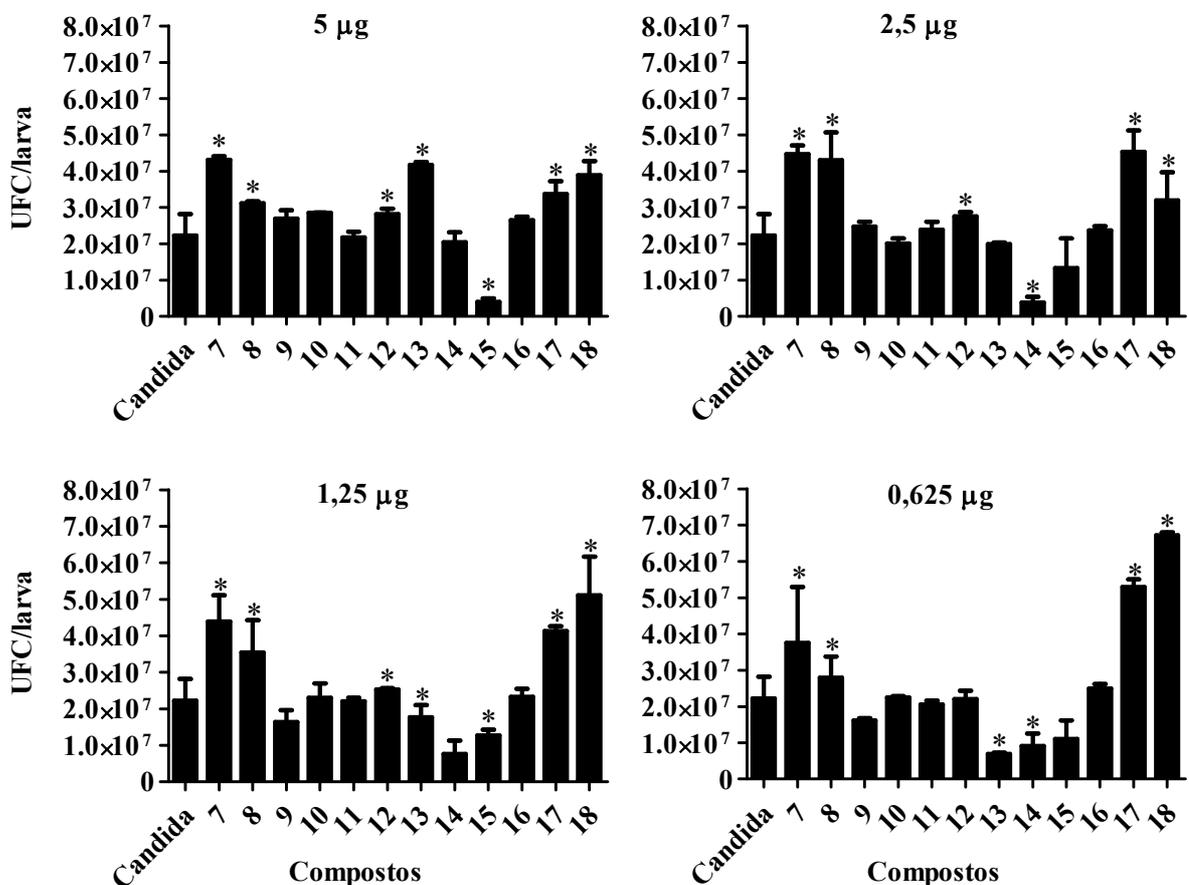


Figura 17. Efeito dos compostos de coordenação na infecção por *C. haemulonii*. Avaliação da carga fúngica em larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. haemulonii* após 48h de tratamento. Os asteriscos indicam valores que foram estatisticamente diferentes em relação ao controle (teste *t* student).

12. Avaliação da correlação entre carga fúngica e expressão de PAMs

O cruzamento dos dados relacionados ao impacto dos compostos sobre a expressão da transferrina com os dados acerca da carga fúngica de larvas tratadas com os compostos demonstram a presença de uma correlação dos resultados obtidos. O composto **14** induziu um aumento considerável na expressão de transferrina, o que coincidiu com um baixo

número de UFCs obtidos dos animais tratados com tal composto (**Figura 18**). Os compostos **10** e **11** apresentaram uma correlação semelhante, exceto na concentração de 5 μg (composto **10**) e 0,625 μg (composto **11**). Além disso, uma curva de tendência de aumento no número de UFCs frente a níveis mais baixos de expressão da transferrina pode ser observada com os compostos **15**, **16** e **17**. De forma oposta, o complexo **12**, embora tenha induzido a expressão de transferrina, resultou em um grande número de UFCs presentes nos animais tratados.

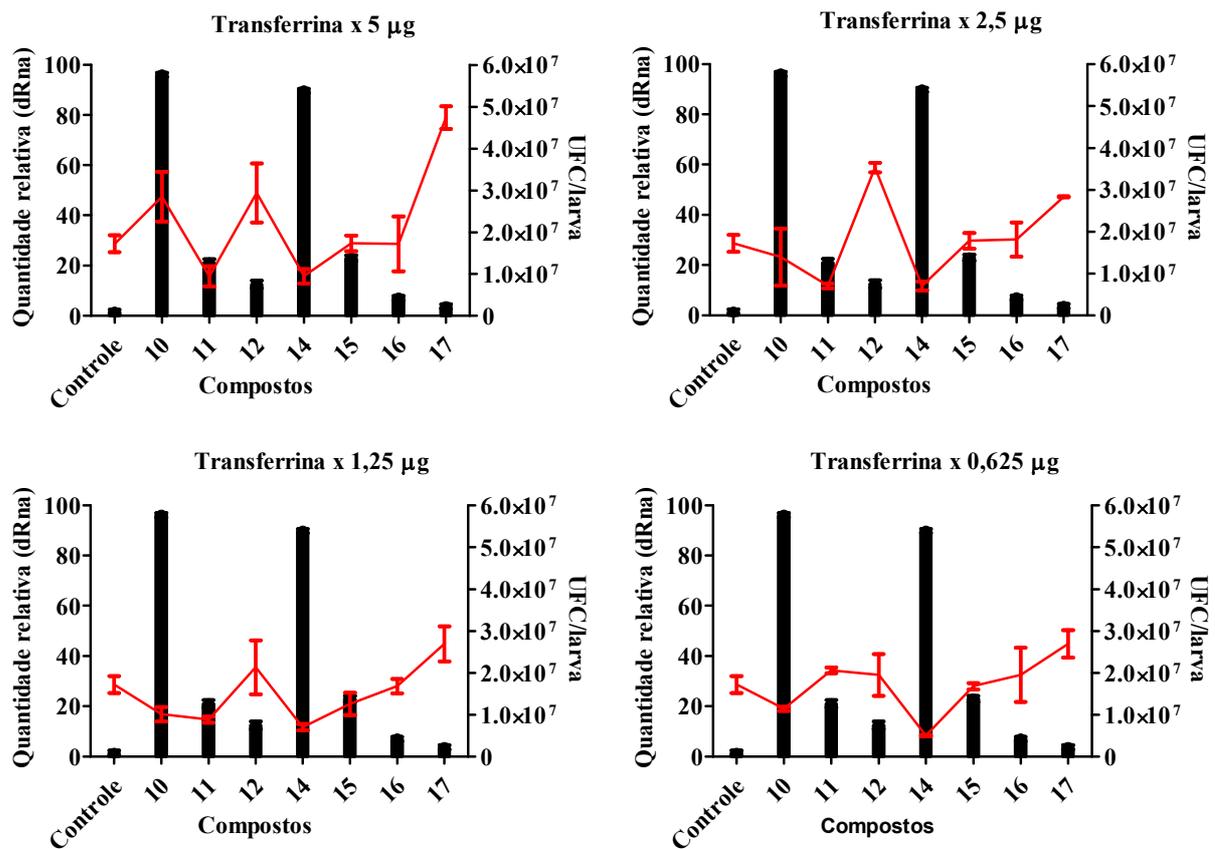


Figura 18. Correlação entre a expressão de transferrina e a virulência de *C. haemulonii* em *G. mellonella*. Os dados relacionam a modulação da expressão de transferrina (barras pretas) com os dados da carga fúngica (linha em vermelho) dos animais tratados durante 24 h com os compostos. Apenas os compostos que foram capazes de modular de forma significativa a expressão gênica foram plotados nos gráficos ($p < 0,05$).

O cruzamento dos dados de carga fúngica com a modulação da expressão de IMPI pelos compostos demonstram que, de forma similar ao observado com a transferrina, a indução de uma maior expressão de IMPI pelos compostos **10** e **14** coincide com um menor número de UFCs obtidas dos animais tratados com os compostos (**Figura 19**).

Curiosamente, o composto que resultou na maior indução da expressão de IMPI não foi capaz de reduzir o número de UFCs nos animais tratados.

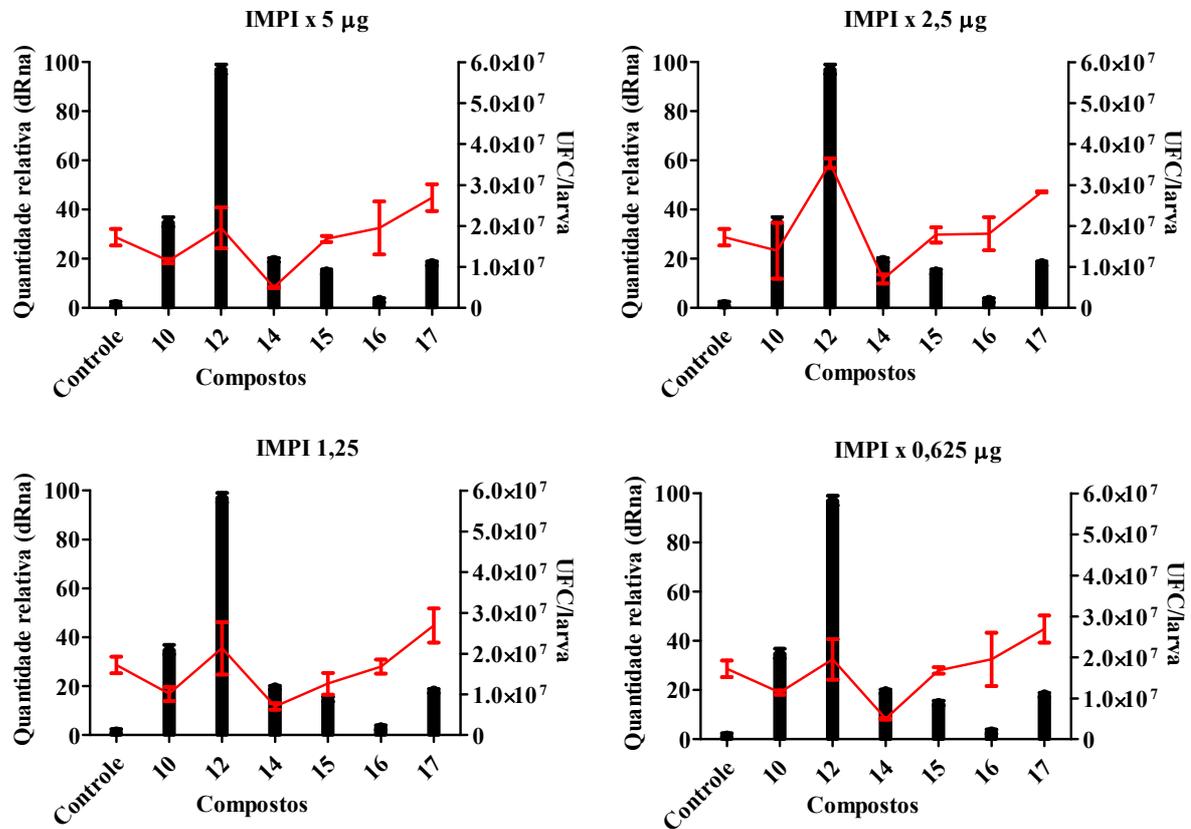


Figura 19. Correlação entre a expressão de IMPI e a virulência de *C. haemulonii* em *G. mellonella*. Os dados relacionam a modulação da expressão de IMPI (barras pretas) com os dados da carga fúngica (linha em vermelho) dos animais tratados durante 24 h com os compostos. Apenas os compostos que foram capazes de modular de forma significativa a expressão gênica foram plotados nos gráficos ($p < 0,05$).

13. Efeito do pré-tratamento na virulência de *C. haemulonii*

Frente aos dados indicando que o tratamento com os compostos foi capaz de afetar o processo de infecção por *C. haemulonii* em larvas de *G. mellonella*, um ensaio a fim de avaliar o impacto da pré-exposição de *C. haemulonii* a concentrações sub-inibitórias dos compostos foi realizado. Para tal, leveduras de *C. haemulonii* (5×10^6) foram tratadas com duas concentrações subinibitórias dos compostos ($\frac{1}{2} \times IC_{50}$ e $\frac{1}{4} \times IC_{50}$) durante 24 h e, então, inoculadas nos modelos animais. As células incubadas na ausência de qualquer composto induziram uma mortalidade de 100% após 24 h, porém diversos dos compostos foram capazes de reduzir drasticamente a mortalidade dos animais (**Tabela 10**). Nos ensaios utilizando a concentração de $\frac{1}{2} \times IC_{50}$, o composto **11** apresentou a capacidade de reduzir em

100% a taxa de mortalidade, seguido pelos compostos **9** (95% de redução) **12** e **17** (85% de redução),) e **8** (55% de redução). Os demais compostos reduziram a mortalidade com taxas de 50% (**14**), 30% (**16**), 35% (**13** e **15**), 15% (**10**) e 10% (**7**). O composto **18** não foi capaz de afetar à virulência de *C. haemulonii*. Após redução da concentração dos complexos para $\frac{1}{4} \times IC_{50}$, as reduções nas taxas de mortalidade foram de 55% (**11**), 45% (**8**), 40% (**12** e **14**), 30% (**10**), 25% (**9**), 15% (**16**) e 10% (**15** e **17**). Nesta concentração os compostos **7**, **13** e **18** não foram capazes de reduzir a mortalidade das larvas infectadas. Após 48 h de infecção, as taxas de mortalidade apresentaram-se bem elevadas para todos os compostos e concentrações testadas (variando entre 75 e 100%), com exceção dos compostos **9** e **11**, com uma redução em 90% da taxa de mortalidade na concentração de $\frac{1}{2} \times IC_{50}$.

Tabela 10. Efeito do pré-tratamento de *C. haemulonii* com os compostos de coordenação sobre a mortalidade de larvas de *G. mellonella*.

Compostos	Tempo de infecção (horas)			
	24		48	
Controle	0±0		0±0	
<i>Candida haemulonii</i>	85±7,07		100±0	
Concentração	$\frac{1}{2} IC_{50}$	$\frac{1}{4} IC_{50}$	$\frac{1}{2} IC_{50}$	$\frac{1}{4} IC_{50}$
7	85±7,07	100±0	100±0	100±0
8	45±7,07	55±7,07	80±14,14	100±0
9	5±7,07	75±21,21	10±0	100±0
10	85±7,07	70±0	100±0	100±0
11	0±0	45±7,07	10±14,14	100±0
12	15±7,07	60±0	90±0	100±0
13	65±7,07	100±0	100±0	100±0
14	50±0	60±14,14	90±14,14	90±0
15	65±7,07	90±0	100±0	100±0
16	70±0	85±7,07	90±0	100±0
17	15±7,07	90±	75±7,07	100±0
18	100±0	100±	100±0	100±0

Os valores indicam o percentual (%) de mortalidade das larvas infectadas com as células de *C. haemulonii* previamente expostas aos compostos. *Candida haemulonii* representa o controle positivo (larvas infectadas com 5×10^6 leveduras não expostas aos complexos).

Discussão

Micoses invasivas oportunistas estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade, representando um sério problema de saúde pública mundial, criando um fardo significativo tanto para pacientes quanto para os sistemas de saúde devido aos elevados custos de tratamento (CAGGIANO *et al.*, 2015). O número reduzido de drogas antifúngicas eficazes e o constante aumento na emergência de perfis de resistência têm cada vez mais limitado as opções de tratamento de tais infecções (ABU-ELTEEN & HAMAD, 2012; ALMEIDA JR *et al.*, 2012; MURO *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2015; SANGUINETTI, POSTERARO & LASS-FLÖRL, 2015). As severas dificuldades encontradas para o tratamento de infecções causadas pelas espécies pertencentes ao complexo *C. haemulonii* põem em foco à necessidade da exploração de novas alternativas terapêuticas. As propriedades antimicrobianas dos metais têm sido exploradas por séculos, com aplicações históricas na preservação de água e alimentos, na agricultura e na medicina (LEMIRE, HARRISON & TURNER, 2013). A química inorgânica medicinal, uma área de pesquisa interdisciplinar, tem contribuído para o avanço do nosso conhecimento da toxicidade dos metais e facilitando o *design* de novos compostos contendo metais, que sejam agentes antimicrobianos eficientes e com boa especificidade, oferecendo assim uma alternativa realista aos antibióticos orgânicos (LEMIRE, HARRISON & TURNER, 2013). Já foi previamente demonstrado que compostos contendo Cu(II), Mn(II) e Ag(I) com ligantes do “tipo-fenantrolina” apresentam atividade antifúngica contra isolados clínicos de *C. albicans* (DEVEREUX *et al.*, 2000; GERAGHTY *et al.*, 2000; COYLE *et al.*, 2003; MCCANN *et al.*, 2004; CREAVER *et al.*, 2009). Diante destes fatos, decidimos avaliar o potencial quimioterapêutico desta classe de quelados metálicos contra as espécies altamente resistentes do complexo *C. haemulonii*. Com este objetivo, testamos 17 compostos de coordenação já conhecidos (1-6, 8-14 e 16-19) e dois novos compostos (7 e 15) contendo ligantes de 1,10-fenantrolina neutros ou de fendiona, bem como ânions dicarboxilato ou ânions perclorato coordenados ou não-coordenados a um metal.

Os compostos de coordenação, bem como a 1,10-fenantrolina e a fendiona sem metal e os sais simples dos metais, foram avaliados quanto a habilidade em inibir o crescimento de nove cepas clínicas pertencentes às três espécies que formam o complexo *C. haemulonii*, tanto contra a sua forma planctônica quanto contra seu crescimento em biofilme. Uma potente atividade antifúngica foi observada com um grande número dos compostos testados, sendo a ordem de inibição de crescimento planctônico 18>17>15>13>11>16>19>9>14>7>10>12>5>3>6>8. Ao classificar os compostos de acordo com a natureza do íon metálico central, os compostos de prata(I) (15-19) possuíram os maiores efeitos inibitórios sobre o crescimento de uma forma em

geral, seguidos pelos compostos de coordenação à manganês(II) (8-14). Enquanto os sais metálicos simples CuCl_2 e MnCl_2 não foram capazes de reduzir a proliferação celular fúngica, o sal de prata apresentou uma boa capacidade inibitória. O efeito produzido pelos compostos de coordenação em concentrações mais elevadas foi fungicida, característica oposta ao efeito fungistático observado com a utilização dos mesmos em concentrações mais reduzidas. As drogas fungistáticas são assim chamadas por acreditar-se que estas inibem a proliferação fúngica, porém sem induzir a morte das células como as drogas fungicidas (VENISSE *et al.*, 2008). As drogas antifúngicas utilizadas na clínica apresentam características diferentes em tal sentido. Os azóis por exemplo, são drogas com potente ação fungistática, que agem inibindo a proliferação fúngica. De forma oposta, drogas como a caspofungina e a anfotericina B são capazes de matar diretamente as células fúngicas, sendo, portanto, fungicidas (GRAYBILL, BURGESS & HARDIN, 1997; VENISSE *et al.*, 2008; DOMÁN *et al.*, 2015). Porém, estudos recentes apontam que, de forma similar ao observado aos resultados obtidos no presente estudo, a concentração das drogas sendo utilizada impacta diretamente na atividade fungicida/fungistática desta, como observado previamente com drogas fungistáticas como fluconazol e voriconazol, que apresentaram efeitos fungicidas contra *C. albicans* e *Aspergillus* spp. dependendo da concentração utilizada, ou a caspofungina apresentando-se como uma droga fungistática ou fungicida contra *C. glabrata* de acordo com a dosagem utilizada (MELETIADIS *et al.*, 2007; VENISSE *et al.*, 2008; DOMÁN *et al.*, 2015; LEE & LEE, 2018).

Vale ressaltar que o AgNO_3 é uma fonte de íons Ag^+ bem estabelecida, sendo de conhecimento geral que tais íons possuem uma potente atividade antifúngica (LEMIRE, HARRISON & TURNER, 2013). Sendo assim, é justo assumir que o tipo de íon metálico presente no composto pode ser capaz de impactar diretamente em suas propriedades antifúngicas (DEVEREUX *et al.*, 2000; MCCANN *et al.*, 2004). Em contraste, sabe-se que os ligantes derivados do ácido dicarboxílico (ácido ftálico, isoftálico, tereftálicoctanodióico e 3,6,9-trioxaundecanedióico) não apresentam atividade anti-*Candida*, e nossos resultados indicam que tais ligantes também não apresentam efeito na proliferação dos isolados fúngicos empregados no presente estudo (dados não apresentados) (DEVEREUX *et al.*, 2000). A 1,10-fenantrolina livre de metal (não coordenada) e a fendiona também demonstraram um potente efeito inibitório nas espécies do complexo *C. haemulonii*, dados que estão de acordo com resultados obtidos em outros estudos reportando a atividade da 1,10-fenantrolina contra espécies de *Candida* tais como *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* (GERAGHTY *et al.*, 2000; MCCANN *et al.*, 2000, 2004, 2012; COYLE *et al.*, 2003). Vale ressaltar que, apesar da 1,10-

fenantrolina livre de metal e os íons Ag^+ (provenientes do AgNO_3) exibirem atividade antifúngica, a análise dos valores de MG-CIM (valores em μM) dos compostos de coordenação à prata(I) (15-19) mostraram que estes foram capazes de induzir uma inibição antifúngica mais proeminente. A mesma observação aplicou-se ao composto 7 de cobre(II) e aos compostos de manganês(II) 9, 10, 11, 13 e 14, que inibiram a proliferação celular mais ativamente quando comparados aos seus sais metálicos correspondentes e aos ligantes 1,10-fenantrolina e fendiona, indicando que tais compostos são agentes antimicrobianos muito superiores. Estudos anteriores dos mecanismos de ação destes agentes revelam que os mesmos possuem o potencial de perturbar a atividade mitocondrial e o processo de respiração, restringir o crescimento celular ao interferir com a síntese proteica, clivagem de proteínas, interação/clivagem do DNA e influências epigenéticas (DEVEREUX *et al*, 2000; METCALFE & THOMAS, 2003; MCCANN *et al*, 2012; KHARISSOVA *et al*, 2014). Tais mecanismos de ação dos compostos de coordenação diferem dos mecanismos das classes dos azóis e polienos, drogas comumente utilizadas para tratar infecções fúngicas, e por isso oferecem o prospecto para desenvolvimento de novas drogas capazes de superar os mecanismos de resistência que fazem do tratamento de infecções por espécies do complexo *C. haemulonii* tão complicado.

A capacidade de formar biofilmes é um conhecido fator de virulência de microrganismos, que os protege do sistema imune do hospedeiro e também da ação de drogas antifúngicas (MELLO *et al*, 2017). As drogas administradas nos pacientes acabam por terem o acesso ao patógeno reduzido devido à presença da matriz extracelular do biofilme que é composto de polissacarídeos, carboidratos, proteínas e DNA. Além disso, a presença de um biofilme em um dispositivo médico implantado pode tornar-se um reservatório de células patogênicas que são liberadas na corrente sanguínea, resultando em sua disseminação para órgãos e outros sítios internos (BUJDÁKOVÁ, 2016; RAMOS *et al*, 2017). Cepas de *Candida* que possuem a habilidade inerente de formar biofilmes estão associadas com uma maior taxa de mortalidade quando comparadas com cepas incapazes de formar um biofilme (PEETERS, NELIS & COENYE, 2008; GARCIA-VIDAL, VIASUS & CARRATALÁ, 2013; KAWAI, YAMAGISHI & MIKAMO, 2015; RAJENDRAN *et al*, 2016). O complexo *C. haemulonii* possui uma capacidade considerável de formar biofilmes (BUJDÁKOVÁ, 2016; RAMOS *et al*, 2017) e, curiosamente, a presença de um cateter venoso central foi mencionado em todos os casos descritos de fungemia por tal espécie entre os anos de 2002 e 2010 (KHAN *et al*, 2007; ALMEIDA JR. *et al*, 2012; CENDEJAS-BUENO *et al*, 2012; MURO *et al*, 2012). Um caso documentado também descreve um surto ocorrido em neonatos que estavam recebendo nutrição

parenteral total (KIM *et al*, 2009). A 1,10-fenantrolina livre, fendiona, AgNO₃ e os complexos **5-19**, todos apresentaram boa atividade *in vitro* contra o crescimento planctônico das três espécies fúngicas que formam o complexo *C. haemulonii*, foram também avaliados quanto a sua capacidade de inibir o crescimento de células em um biofilme maduro. Os complexos mais ativos foram os de manganês(II) **13** (3,5 µM), **14** (4,7 µM) e o composto de prata(I) **15** (5,2 µM). Outros dois compostos também foram muito eficazes contra o biofilme, o de manganês(II) **11** e o de cobre(II) **7**. Uma clara redução na capacidade antifúngica dos compostos testados ficou evidente frente a mudança do estilo de vida planctônico para biofilme. A redução mais evidente na atividade foi detectada com o composto **18** (46,3×), seguido pelo AgNO₃ (43,8×), **16** (12,3×), **19** (11,8×) e o complexo **15** (6,3×). É interessante notar que o composto **18**, que demonstrou a maior atividade contra o crescimento celular planctônico, apresentou a maior taxa de redução na atividade. Um certo grau de variação na tolerância aos compostos dentre as amostras fúngicas é perceptível, sendo a amostra LIPCh4 a mais resistente aos compostos de coordenação. Os dados obtidos no presente estudo demonstram que, embora os compostos testados sejam menos ativos contra um biofilme, alguns destes apresentaram valores de MG-bCIM impressionantemente baixos, tais como os compostos **13** (3,5 µM), **14** (4,7 µM), **15** (5,2 µM) e **11** (5,3 µM). Em uma escala global, existe uma demanda urgente do descobrimento de novas terapias que sejam eficientes, seguras e baratas e que possam ser utilizadas como alternativas para o tratamento de patógenos multirresistentes. Seguindo tal linha de pensamento, compostos de coordenação à cobre(II), manganês(II) e prata(II) contendo ligantes de 1,10-fenantrolina e fendiona são relativamente baratos e de fácil preparo e claramente apresentam um significativo potencial terapêutico antifúngico contra o altamente resistente complexo *C. haemulonii*.

O uso de organismos invertebrados como modelo *in vivo* tem se tornado cada vez mais disseminado e estudos envolvendo larvas de *G. mellonella* na avaliação da toxicidade de compostos, patogenicidade de microrganismos e a eficácia e farmacocinética de novas moléculas como potenciais antimicrobianos são diversos (WU, XU & YI, 2016; ALLEGRA *et al.*, 2018). As inúmeras similaridades entre o sistema imune inato de *G. mellonella* e de mamíferos permitem que uma forte correlação entre os resultados obtidos com este modelo e em modelos murinos seja estabelecida, o que possibilita que *G. mellonella* seja inicialmente utilizada como um modelo alternativo, evitando os aspectos éticos, o custo econômico e problemas logísticos envolvidos no uso de mamíferos (SHEEHAN & KAVANAGH, 2018). Sendo assim, tal modelo foi adotado para a realização dos ensaios *in vivo* iniciais a fim de

investigar a patogenicidade de *C. haemulonii*, a toxicidade dos compostos de coordenação à cobre(II), manganês(II) e prata(I), bem como a sua atividade antifúngica em um modelo de infecção *in vivo*.

Ensaio de virulência utilizando larvas de *G. mellonella* foram realizados com os mais diferentes tipos de microrganismos, e mostraram-se especialmente eficientes com fungos como *A. fumigatus*, *C. neoformans* e *Candida* spp., com uma forte correlação positiva com modelos murinos (WANG *et al.*, 2013). A fim de determinar a virulência de *C. haemulonii*, *G. mellonella* foi inoculada com diferentes densidades celulares de *C. haemulonii* e *C. albicans*. Nenhuma mortalidade de larvas infectadas com as concentrações celulares mais baixas foi observada até o quinto dia de infecção, e uma vez que o controle não-infectado apresentou taxas de mortalidade semelhantes após o quinto dia, não é possível afirmar que esta tenha sido devido à infecção por *Candida*. Sendo assim, apenas os inóculos de 10^6 e 10^7 células foram capazes de impactar significativamente na sobrevivência de *G. mellonella* nos primeiros dias. Como observado nos ensaios aqui descritos, o tamanho do inóculo inicial afeta diretamente à mortalidade final de *G. mellonella*, e tal virulência inóculo-dependente já foi descrita em diversos estudos anteriores com *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. neoformans* e *Paracoccidioides* spp. (AMES *et al.*, 2017; MESA-ARANGO *et al.*, 2013; GU *et al.*, 2017; SINGULANI *et al.*, 2016). Por exemplo, é bem estabelecido que *G. mellonella* é susceptível à infecção letal com um inóculo de 10^6 células de *C. albicans*, e nossos dados corroboram tais relatos anteriores (BERGIN *et al.*, 2006). Porém, *C. albicans* também é capaz de induzir mortalidade com inóculos inferiores a 10^6 , como descrito no estudo conduzido por SHEEHAN & KAVANAGH (2018), em que a infecção utilizando um inóculo de 5×10^5 células/larva resultou em uma taxa de mortalidade de 60% e 70% após 24 e 48 h de inoculação respectivamente, reforçando a virulência inóculo-dependente de *C. albicans*. Tal perfil parece ser também uma característica de *C. haemulonii* como observado no presente estudo, sendo possível observar diferentes taxas de mortalidade frente aos inóculos testados. Vale ressaltar que *C. haemulonii* possui virulência reduzida quando comparada à *C. albicans*, e a fim de obter taxas de mortalidade similares um inóculo contendo $10 \times$ mais células de *C. haemulonii* foi necessário. Os dados obtidos, portanto, indicam que *C. haemulonii* possui virulência limitada quando comparada à *C. albicans*. Resultados similares foram descritos em um estudo utilizando um isolado de *C. albicans* e *C. krusei*, e embora a cepa de *C. krusei* tenha sido capaz de induzir 100% de mortalidade em larvas inoculadas com 10^7 células/larva após 4 dias de infecção, o isolado de *C. albicans* induziu 100% de mortalidade em larvas infectadas com 10^6 células/larva em apenas 24 h, indicando uma

virulência significativamente maior de tal espécie (SCORZONI *et al.*, 2013). Em um estudo conduzido por COTTER, DOYLE & KAVANAGH (2000), larvas de *G. mellonella* foram inoculadas com 2×10^6 células de diferentes cepas de *Candida*, e taxas de mortalidades distintas foram observadas após 72 h de incubação, sendo estas 90% para *C. albicans*, 70% para *C. tropicalis*, 45% para *C. parapsilosis* e *C. pseudotropicalis*, 20% para *C. krusei* e nenhuma mortalidade observada com *C. glabrata*. Ainda em outro relato de avaliação de diferenças de patogenicidade de espécies de *Candida* em *G. mellonella*, os animais foram inoculados com 10^6 células e as espécies foram divididas em 3 grupos de acordo com as taxas de mortalidade: o grupo mais patogênico contendo diferentes cepas de *C. albicans* e apresentando taxas de sobrevivência dos animais abaixo de 40%, um grupo inoculado com *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* e uma cepa de *C. albicans* a taxas de sobrevivência entre 40% e 80%, e finalmente um grupo contendo os isolados menos patogênicos, *C. krusei*, *C. glabrata*, alguns isolados de *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, com taxas de sobrevivência acima de 100% (BERGIN, BRENNAN & KAVANAGH, 2003). Portanto, nossos dados corroboram observações descritas previamente acerca dos diferentes graus de patogenicidade de *Candida* em *G. mellonella* e indicam que *C. haemulonii* é capaz de infectar e levar as larvas a morte de forma inóculo-dependente, porém tal espécie apresenta virulência reduzida quando comparada à *C. albicans*.

Outro fator capaz de interferir diretamente no processo infeccioso é a temperatura de incubação das larvas de *G. mellonella* infectadas. Sabe-se que temperatura é capaz de afetar a patogenicidade de um microrganismo de forma expressiva, uma vez que esta regula diversos mecanismos de virulência de patógenos (WANG *et al.*, 2013). De fato, diversos relatos com *G. mellonella* confirmam este tipo de regulação. Em um estudo utilizando a bactéria *Acinetobacter baumannii*, a temperatura impactou diretamente na mortalidade das larvas inoculadas com $3,7 \times 10^5$ células, sendo esta de 50% quando os animais foram incubados a 30°C, e de mais de 80% quando os animais eram incubados a 37°C (PELEG *et al.*, 2009). Um perfil similar foi observado bactéria *Francisella tularienses*, como uma maior mortalidade de animais incubados a 37°C quando comparados com aos sistemas incubados a 30°C (APERIS *et al.*, 2000). Estudos com fungos também indicam um perfil semelhante de impacto direto da temperatura de incubação na virulência em *G. mellonella*. Por exemplo, ensaios de infecção utilizando *A. terreus* em uma concentração de 10^7 conídios/larva incubados a 37°C resultaram em uma mortalidade de 100% após 72 h, sendo esta de apenas 30% quando a temperatura de incubação utilizada foi de 30°C. Tal perfil se manteve com inoculos de 10^6 (100% de mortalidade a 37°C

e 50% de mortalidade a 30°C após 6 dias) e 10⁵ (50% de mortalidade a 37°C e menos de 10% de mortalidade a 30°C após 5 dias) (MAURER *et al.*, 2015). Um padrão similar foi observado com isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, com uma maior virulência e maior indução de morte dos animais infectados quando incubados a 37°C quando comparados a 30°C (ROSSI *et al.*, 2016). No estudo de SCORZONI e colaboradores (2013) a virulência de *C. albicans* também se apresentou maior a 37°C, porém a virulência de *C. krusei* não foi afetada pela temperatura com taxas de mortalidade similares das larvas infectadas foram observadas a 25, 30 e 37°C (SCORZONI *et al.*, 2013). Nos dados obtidos no presente estudo observou-se que *C. albicans* apresenta um perfil semelhante aos relatos de estudos anteriores indicando uma maior virulência desta espécie a 37°C (SCORZONI *et al.*, 2013). Curiosamente, porém, *C. haemulonii* apresentou virulência significativamente maior quando os animais infectados foram incubados a 30°C. Tais dados obtidos com *C. haemulonii* estão de acordo com um estudo anterior em que uma relação inversa entre temperatura e virulência em *G. mellonella* foi descrita em 12 isolados de *Fusarium* spp. por COLEMAN e colaboradores (2011), que descreveram taxas de mortalidade significativamente maiores entre as larvas incubadas a 30°C quando comparadas aos animais incubados a 37°C. Este perfil observado para *C. haemulonii* no presente estudo pode ser explicado através do histórico de isolamento desta espécie, pela primeira vez do intestino do peixe *Haemulon sciurus*, e subsequentemente isolada da pele de um golfinho no suriname e de água do mar nos EUA e Portugal (VAN UDEN & KOLIPINSKI, 1962; GARGEYA *et al.*, 1991; KHAN *et al.*, 2007). A temperatura preferida pelo peixe *Haemulon sciurus*, por exemplo, encontra-se entre 25,5°C e 28°C e uma média de 27,3°C (KASCHNER *et al.*, 2016). Sendo assim, embora *C. haemulonii* seja capaz de causar infecções a 37°C, sua maior virulência quando incubada a 30°C não é inesperada, e tal característica pode ser um fator limitante da capacidade infectante desta espécie, o que explicaria sua baixa incidência como agente etiológico de infecções fúngicas em humanos. Finalmente, vale ressaltar que, embora as larvas de *G. mellonella* possam ser incubadas em uma ampla faixa de temperatura (entre 15 e 37°C) permitindo este seja um modelo útil para estudos de patógenos na temperatura fisiológica do corpo humano (WANG *et al.*, 2013), os dados obtidos no presente estudo demonstram que a exposição constante a 37°C por períodos acima de 5 dias pode induzir uma maior mortalidade quando comparada a uma temperatura mais baixa de 30°C, característica que deve ser levada em consideração frente a realização de estudos com períodos de incubação mais longos.

O processo infeccioso por *C. haemulonii* foi acompanhado de alterações de cor da cutícula das larvas infectadas, alterações estas que ocorrem devido ao processo de melanização induzida pelo sistema imune da larva. A melanização é parte essencial da resposta imune de *G. mellonella* contra os mais diversos patógenos, sendo a melanina depositada em torno dos microrganismos presentes na hemolinfa, facilitando a sua eliminação. Embora a resposta imune das larvas se dê primariamente através da fagocitose, a partir de um limite, ou seja, um número exacerbado de células microbianas, o processo de nodulação é amplamente utilizado pelas larvas, o que permite a eliminação de grandes grupos de microrganismos invasores, e a melanina desempenha um papel fundamental em tal processo (RATCLIFFE & WALTERS, 1983; DUNPHY *et al.*, 2003). A nodulação é mediada pela lectina e ocorre quando múltiplos hemócitos aderem a agregados celulares de microrganismos formando um nódulo constituído de células granulares viáveis ou degradadas, partículas e debris. Este coágulo pode estar aderido ao tecido da larva ou cercado por plasmócitos, com o processo de nodulação culminando com a ativação da profenoloxidase e consequente intensa melanização dos nódulos maduros (DUNPHY *et al.*, 2003; KAVANAGH & REEVES, 2004; BROWNE, HEELAN & KAVANAGH, 2013). A melanização já foi descrita em outros ensaios de infecção, como com a bactéria *A. baumannii* (PELEG *et al.*, 2009) e em um estudo utilizando os fungos *C. albicans* e *C. krusei*, que descreveu a presença de níveis de melanização dependentes do tamanho do inóculo inicial nas larvas infectadas, dados similares aos observados no presente estudo (SCORZONI *et al.*, 2013). Tal informação pode explicar a ausência de melanização nas larvas inoculadas com 10^3 e 10^4 células, com a provável presença de uma resposta primariamente fagocítica, porém intensa melanização com uso de inoculos contendo 10^6 e 10^7 células de *C. haemulonii*, que seriam densidades celulares acima do limite do número de células e disparariam um intenso processo de nodulação e atividade da profenoloxidase, resultando em altos níveis de melanização dos animais.

Outra característica da resposta imune de *G. mellonella* são as flutuações no número de hemócitos circulantes devido à presença de estímulo patogênico ou componentes da parede celular de patógenos (WU, XU & YI, 2016). Diversos estudos relatam o aumento na densidade de hemócitos na hemolinfa de larvas expostas a agentes estimulantes. Por exemplo, a inoculação de células de *Photorhabdus luminescens inativadas por calor é capaz de induzir o aumento de hemócitos de forma dose-dependente* (WU, XU & YI, 2016). A inoculação de β -glucanas provenientes de *C. albicans* também resulta em um aumento da densidade de hemócitos e de peptídeos antimicrobianos de forma dose-dependente (MOWLDS *et al.*, 2010).

Nos resultados obtidos durante nossos ensaios, nenhuma alteração no número de hemócitos circulantes foi detectada mediante a utilização de um inóculo contendo 10^3 células, porém o aumento na densidade celular para 10^4 células induziu um aumento intenso nos hemócitos presentes na hemolinfa, indicando a presença de uma resposta imune inóculo-dependente nas larvas de *G. mellonella*. Relatos do aumento na densidade de hemócitos mediante infecção com espécies como *A. fumigatus*, *C. albicans* e *S. cerevisiae* estão disponíveis na literatura (BERGIN *et al.*, 2006; FALLON, TROY & KAVANAGH, 2011). Além disso, a proporcionalidade da resposta imune com o inóculo utilizado, similar ao observado no presente estudo, também foi descrita em ensaios utilizando conídios de *A. fumigatus* e β -glucanas provenientes de *C. albicans* (MOWLDS *et al.*, 2010; FALLON, TROY & KAVANAGH, 2011). Sabe-se que o aumento na densidade de hemócitos circulantes resulta em benefícios para a fagocitose e eliminação de patógenos invasores (WU, XU & YI, 2016). Entretanto, a ativação da resposta imune impõe um custo ao hospedeiro, que embora nem sempre esteja visível possui efeito importante na estratégia de sobrevivência deste, sendo até mesmo fatal para o mesmo em condições específicas como a ausência de fontes de alimento ou incapacidade de alimentar-se. Portanto, tal resposta inóculo-dependente previamente relatada e aqui observada reforça dados que indicam que *G. mellonella* monta uma resposta imune de tamanho proporcional ao desafio a fim de reduzir o custo imunológico desta ativação (MORET & SCHMID-HEMPEL, 2000; MOWLDS *et al.*, 2010; WU, XU & YI, 2016).

Outro perfil observado nas larvas infectadas com 10^4 células foi o rápido aumento no número de hemócitos circulantes em apenas 6 h, bem como a permanência de um número significativamente elevado destes na hemolinfa pelas 72 h de análise. O aumento observado apenas 6 h após a infecção pode ser atribuído a liberação de hemócitos ligados a órgãos e estruturas internas, como o corpo gorduroso, a traqueia ou o sistema digestivo, para a hemolinfa, como sugerido em estudos anteriores (MATHA & MRAECK, 1984; BERGAN, BRENNIN & KAVANAGH, 2003). Além disso, a manutenção elevada do número de hemócitos na hemolinfa mesmo após 72 h de inoculação pode estar relacionado ao efeito chamado de “*priming* imune”, característica previamente descrita em *G. mellonella*, em que o contato prévio com um inóculo não letal confere a larva certo grau de proteção a infecções subsequentes (WU, XU & YI, 2016). Por exemplo, uma correlação positiva da inoculação de 10^6 células de *Photobacterium luminescens* inativadas por calor e subsequente aumento no número de hemócitos circulantes, maior capacidade de fagocitose e encapsulação pelos hemócitos “primed” e aumento na resistência a infecções posteriores foi descrito (WU, XU & YI, 2016).

Além da exposição a agentes imunogênicos de origem microbiana, larvas também apresentaram uma densidade de hemócitos elevada 24 h e 48 h após serem submetidas a estresse físico, mostrando-se mais resistentes à infecção por *C. albicans* pós-estresse (MOWLDS, BARRON & KAVANAGH, 2008). De forma similar, larvas inoculadas com β -1,3-glucana de *C. albicans* permaneceram com uma densidade de hemócitos elevada mesmo após 48 h de exposição (MOWLDS *et al.*, 2010). Embora nenhum dos estudos citados tenha analisado o número de hemócitos após 48 h, nosso estudo indica que tal perfil de densidade elevada permanece após 72 h de exposição ao agente estimulante do sistema imune, provavelmente relacionado ao processo de “*priming* imune”.

As análises com os animais infectados com 10^6 e 10^7 fungos indicam que estes também alterações consideráveis na densidade de hemócitos presentes na hemolifa, porém, embora um aumento tenha sido notado após 6 h, as análises seguintes indicaram uma queda significativa de hemócitos livres ao longo do tempo. Similarmente, em um estudo conduzido por SHEENHAN & KAVANAGH (2018), duas fases distintas da resposta imune de *G. mellonella* infectadas com inóculos mais elevados de células fúngicas foram descritas, a primeira entre 0 e 6 h de infecção, onde um aumento no número de hemócitos circulantes foi observado, e uma segunda fase entre 6 e 24 h pós-infecção com queda na população de hemócitos e morte das larvas infectadas. Uma redução significativa no número de hemócitos circulantes também foi observada após 48 h de infecção com os fungos *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (SINGULANI *et al.*, 2016). Além disso, larvas inoculadas com 4×10^6 células de *C. tropicalis* também apresentam queda no número de hemócitos livres na hemolinfa (MESA-ARANGO, 2013). A queda no número de hemócitos livres em larvas infectadas foi previamente atribuída a diferentes possíveis razões, como aumento na aderência aos tecidos e a outros hemócitos a fim de formar nódulos, remoção das células da hemolinfa para reparo de tecido danificado, possível aumento no volume da hemolinfa aparentando queda no número de hemócitos e possíveis alterações de pH e esgotamento de nutrientes na hemolinfa, sendo porém a mais provável hipótese a formação de nódulos pelos hemócitos associada à lise celular destes devido à presença de toxinas e metabólitos tóxicos (RATCLIFFE & WALTERS. 1983). De fato, como previamente descrito, embora a resposta imune de *G. mellonella* seja através da fagocitose, quando um número exacerbado de células microbianas invade seu organismo o processo de nodulação é amplamente utilizado a fim de eliminar grandes grupos de microrganismos com envolvimento do processo de melanização (RATCLIFFE & WALTERS. 1983; DUNPHY *et al.*, 2003). Como observado nos resultados aqui demonstrados, um processo de melanização intenso foi

observado em larvas inoculadas com 10^6 e 10^7 células de *C. haemulonii*, sendo então razoável assumir que um processo de nodulação disseminado associado à morte de hemócitos devido à infecção seja o principal responsável pela queda detectada. Curiosamente, as larvas infectadas com 10^5 leveduras de *C. haemulonii* apresentaram uma resposta mediana de melanização bem como um aumento no número de hemócitos que permaneceu estável ao longo das 48 h, o que pode indicar a presença de uma resposta fagocitária bem como presença de nodulação, porém sem a predominância de uma destas como observado nos demais sistemas. Em resumo, os dados indicam uma ausência de estímulo a uma resposta imune quando as larvas são infectadas com 10^3 fungos, porém um significativo aumento na densidade de hemócitos ocorre frente a um inóculo contendo 10^4 leveduras sem a presença de melanização, indicando uma resposta primariamente fagocitária. As larvas infectadas com 10^5 células parecem exibir uma resposta combinando fagocitose com algum nível de nodulação com presença de melanização na área inoculada e aumento no número de hemócitos circulantes. Finalmente, os inóculos mais altos induziram um forte processo de nodulação acompanhado de pequeno aumento seguido de queda na densidade dos hemócitos na hemolinfa.

Uma possível correlação direta entre a resposta imune induzida pelas diferentes concentrações celulares de *C. haemulonii* e a carga fúngica resultante também foi observada nos ensaios. As análises mostraram um aumento no número de UFCs obtidas das larvas infectadas com uma concentração de 10^3 células após 48 h, perfil oposto ao observado nas concentrações intermediárias de 10^4 e 10^5 células/larva, em que a carga fúngica, permaneceu estável ao longo do período de incubação dos animais. Tal fenômeno pode estar relacionado à resposta imune e a densidade de hemócitos previamente descritas, uma vez que a concentração celular mais baixa inoculada nos animais (10^3) não foi capaz de induzir um aumento no número de hemócitos circulantes, permitindo assim a proliferação celular de *C. haemulonii*. De forma contrária, o aumento do inóculo para 10^4 células resultou em uma resposta imune caracterizada por um maior número de hemócitos circulantes, o que pode ter mantido a proliferação celular fúngica sob controle uma vez que tal aumento induz a proteção de *G. mellonella* contra patógenos fúngicos (MOWLDS, BARRON & KAVANAGH, 2008). De forma similar, as larvas infectadas com 10^5 leveduras apresentaram maior densidade de hemócitos bem como provável processo de nodulação acompanhado pela melanização da região inoculada, resultando em um número semelhante de células fúngicas ao longo das primeiras 48 h, indicando a não-proliferação de *C. haemulonii*. Finalmente, um aumento progressivo da proliferação fúngica foi observado em larvas de *G. mellonella* inoculadas com 10^6 e 10^7 fungos,

justamente os sistemas que apresentaram uma considerável queda em de densidade de hemócitos como previamente descrito. Em um estudo anterior, SHEENAN & KAVANAGH (2018) demonstraram que a queda no número de hemócitos em larvas infectadas com *C. albicans* está diretamente associada a uma maior carga fúngica presente em sua hemolinfa. Em outro estudo utilizando diferentes cepas de *C. albicans*, uma alta taxa de sobrevivência foi previamente associada a uma baixa ou nenhuma proliferação fúngica, enquanto uma baixa sobrevivência foi associada a alta proliferação e conseqüente alta carga fúngica, com cepas de alta patogenicidade sendo associadas a uma baixa densidade de hemócitos e alta carga fúngica e as de baixa patogenicidade associadas à alta densidade de hemócitos e baixa carga fúngica (BERGAN, BRENNIN & KAVANAGH, 2003). Embora em nosso estudo não exista a comparação de patogenicidade entre cepas, o tamanho do inóculo utilizado produziu um resultado semelhante, com queda no número de hemócitos ao utilizarmos um inóculo acima de 10^6 fungos após 24 h de infecção, sendo esta queda acompanhada de uma maior carga fúngica. O inóculo mais alto, e conseqüentemente mais danoso e patogênico, resultou em proliferação fúngica intensa acompanhada da queda vertiginosa na densidade de hemócitos e conseqüente morte da larva infectada. Portanto, a resposta imune de *G. mellonella*, seja esta através do aumento na densidade de hemócitos, seja pelo disparo do processo de nodulação, parece estar diretamente associada ao controle da proliferação celular de *C. haemulonii* e a mortalidade dos animais infectados.

O uso de insetos para a realização de screenings iniciais de avaliação de toxicidade de novos compostos permite que problemas com o uso de modelos mamíferos como questões éticas, o custo e a logística envolvida sejam contornados. Estudos demonstram que doses eficazes de antibióticos são as mesmas no bicho-da-seda *Bombyx mori* e em modelos mamíferos, inclusive com semelhanças nos resultados obtidos por administração oral, sugerindo semelhanças entre os mecanismos de absorção, distribuição, metabolização e excreção das drogas (HAMAMOTO *et al.*, 2009). O corpo gorduroso dos insetos, por exemplo, atua no metabolismo de drogas de forma similar ao fígado dos mamíferos, com a presença nesta estrutura de diversas enzimas citocromo P450 e enzimas de conjugação de glutathione, glicose e sulfoconjugação, todas envolvidas na detoxificação de drogas, o que reforça a viabilidade do uso de insetos em ensaios de toxicidade (HAMAMOTO *et al.*, 2009). De fato, no estudo citado o envolvimento de enzimas do citocromo P450 no metabolismo de substâncias químicas exógenas injetadas na hemolinfa de foi demonstrado *Bombyx mori* (HAMAMOTO *et al.*, 2009). O uso de larvas de *G. mellonella* em ensaios de avaliação de toxicidade apresenta diferentes

vantagens sobre outros modelos *in vivo*, como a facilidade de obtenção e baixo custo a ausência de necessidade de treinamento e equipamentos específicos. Além disso, seu tamanho permite que dosagens específicas sejam inoculadas sistemicamente através de uma seringa, uma vantagem sobre outros modelos invertebrados como *C. elegans* e *D. melanogaster* (MEGAW *et al.*, 2015). As larvas de *G. mellonella* já foram utilizadas na avaliação da toxicidade de líquidos iônicos, com resultados descritos como confiáveis e robustos (MEGAW *et al.*, 2015), em ensaios de toxicidade de conservantes alimentícios com forte correlação com a toxicidade em células HEp2 e mamíferos (MAGUIRE, DUGGAN & KAVANAGH, 2016) Além disso, estudo conduzido por ISGNASIAK & MAXWELL (2017), avaliando a toxicidade de diversos compostos quimioterápicos e antimicrobianos como novobiocina, ciprofloxacino, tetraciclina, streptomomicina, cloranfenicol, doxorubicina, ansacrina, etoposido e cloroquina, encontrou uma boa correlação com a toxicidade descrita nas fichas de segurança de produtos químicos (FISPQ) para ratos e camundongos, indicando que as larvas podem ser utilizadas para obtenção de dados relacionados à toxicidade de forma mais barata e rápida quando comparada aos testes padrões. Os ensaios de avaliação da toxicidade no presente estudo indicam que todos os compostos são tolerados por *G. mellonella* em concentrações de até 500 mg/L (10 µg/larva), porém, uma concentração de 750 mg/L (15 µg/larva) da maior parte dos compostos já é capaz de impactar na sobrevivência dos animais. Uma toxicidade dose-dependente foi observada, e taxas e mortalidade em geral em torno de 80 a 100% das larvas em concentrações a partir de 1,500 mg/L (30 µg/larva) foram observadas. Não foi possível estabelecer uma correlação entre o tipo de metal presente na molécula e a toxicidade observada, porém o complexo **7**, único contendo cobre(II), apresentou uma alta toxicidade no ensaio utilizando 750 mg/L (15 µg/larva) corroborando os dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade que revelaram que os complexos contendo cobre(II) apresentam índices de seletividade muito baixos (1,06 para o composto **7**). O composto **17** induziu 20% de mortalidade mesmo nos sistemas expostos a dosagem mais elevada utilizada nos ensaios. Sendo o único composto de coordenação que não possui a 1,10-fenantrolina em sua estrutura, uma possível hipótese seria de que tal molécula é em parte responsável pela toxicidade dos compostos. Porém, composto de coordenação com grandes números de moléculas de 1,10-fenantrolina como **10**, **11**, **13** e **15** não foram tóxicas nas concentrações de 15 µg/larva (0% a 13,33% de mortalidade). Entretanto, devido ao tamanho das moléculas, a molaridade final utilizada foi relativamente baixa (entre 6,10 e 14,27 µM/larva) se comparadas aos demais compostos. Portanto, não é possível afirmar se a ausência de 1,10-fenantrolina em sua estrutura resulta na relativa baixa toxicidade do composto **17**. Vale ressaltar que embora a concentração mais elevada apresente uma toxicidade acentuada, os

valores de CIM para *C. haemulonii* dos compostos de coordenação encontram-se bem abaixo das concentrações que induziram alguma mortalidade nas larvas.

Outro impacto da exposição das larvas aos composto de coordenação investigado no presente estudo foi o efeito dos compostos em aspectos relacionados à resposta imune de *G. mellonella*. Larvas expostas aos complexos apresentaram alterações consideráveis nas densidades de hemócitos circulantes na hemolinfa dos animais inoculados com 15 µg/larva dos compostos. As maiores taxas de aumento foram detectadas com os complexos **14** (aumento de 96,56%), **13** (82,05%), **9** (33,50%) e **11** (18,73%) respectivamente. De forma contrária, alguns compostos de coordenação induziram uma redução no número de hemócitos, como o **12** (57,12%), **15** (53,82%) **10** (47,22%), **16** (36,27%) e **18** (28,62%). Ao aumentar a concentração para 30 µg/larva, novamente observou-se que o composto **14** aumentou a densidade de hemócitos circulantes, embora significativamente menor quando comparada ao resultado obtido com 15 µg/larva. O complexo **8** novamente não impactou no número de hemócitos, e embora um número semelhante de hemócitos foi observado com o complexo **16**, e a ausência de significância estatística provavelmente se deve ao maior desvio padrão obtido. O restante dos compostos de coordenação induziu uma queda drástica ou total ausência de hemócitos detectáveis na hemolinfa. Estudos anteriores demonstram que as drogas antifúngicas apresentam, além da capacidade de inibir o crescimento ou matar células fúngicas, propriedades imunomodulatórias que conferem um mecanismo adicional de combate as infecções ao estimular a resposta imune do hospedeiro (MESA-ARANGO, SCORZONI & ZARAGOZA, 2012). Além disso, uma relação entre toxicidade (30 µg/larva) e densidade de hemócitos (15 µg/larva) foi observada, e os compostos de coordenação com taxas de mortalidade de 0% resultaram nos maiores aumentos do número de hemócitos (**13** e **14**) ou não afetaram tal número (**17**), enquanto os compostos mais tóxicos resultaram em queda na densidade (**15**, **18**, **12**, **16** e **10**). Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que drogas antifúngicas como a anfotericina B induz efeitos diversos em linhagens celulares e animais tratados com esta droga, ainda que não-infectados. Ao se ligar a receptores do tipo Toll 2 ou CD14 de diferentes células, a anfotericina B estimula a transcrição e produção de diversos mediadores do sistema imune como citocinas, quimiocinas e prostaglandinas. Células mononucleares e neutrófilos expostos à anfotericina B desoxicolato liberam citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1RA e IL-1b e quimiocinas como IL-8, MCP-1, and MIP-1b, além de óxido nítrico, prostaglandinas, intermediários reativos de oxigênio e molécula de adesão intercelular-1 (BEN-AMI, LEWIS & KONTOYIANNIS, 2008; MESA-ARANGO, SCORZONI & ZARAGOZA, 2012). Um estudo

utilizando macrófagos alveolares e leucócitos PMN demonstrou que a anfotericina B aumenta a atividade antifúngica destas células contra *A. fumigatus*, similar a dados observados com macrófagos peritoniais murinos tratados com anfotericina B e que apresentaram uma maior produção de NO, TNF- α e IL-1 e conseqüente maior atividade contra *C. neoformans* (TOHYAMA, KAWAKAMY & SAITO, 1996; ROILIDES *et al.*, 2002; MESA-ARANGO, SCORZONI & ZARAGOZA, 2012). Sabe-se que o combate as infecções fúngicas sistêmicas e de mucosa dependem de uma resposta Th1 mediada por citocinas como o IFN- γ , enquanto uma resposta Th2 mediada por citocinas como a IL-4 por exemplo, está associada à susceptibilidade e progressão da infecção. Interessantemente, análises da resposta Th celular de camundongos com candidíase disseminada ou gastrointestinal demonstraram que a anfotericina B foi capaz de induzir uma resposta protetiva Th1 e depletar os níveis de IL-4 concomitantemente, resultados similares aos observados em outro estudo utilizando camundongos infectados com *A. fumigatus* e tratados com esta droga. Ainda em outro estudo, o aumento da produção de IL-1 β e TNF- α em tecido renal de camundogons induzida por anfotericina B foi descrito (CENCI *et al.*, 1997; SAXENA *et al.*, 1999; FALK *et al.*, 2005; MESA-ARANGO, SCORZONI & ZARAGOZA, 2012). Além disso, altos níveis de anticorpos contra a chaperona molecular fúngica Hsp90 encontrada em sobreviventes de candidíase invasiva e dados que indicam uma atividade sinérgica entre anfotericina B e tais anticorpos tanto em modelos animais quanto em humanos indicam que a anfotericina também pode interferir com a imunidade humoral adaptativa (BEN-AMI, LEWIS & KONTOYIANNIS, 2008). Os azóis também apresentam a capacidade de imunomodular a resposta do hospedeiro, sendo previamente descrito que fluconazol e voriconazol agem em sinergia com células fagocíticas e aumentam a sua capacidade fagocítica contra *C. albicans* e *C. neoformans*. Além disso, observou-se que o voriconazol é capaz de induzir a expressão de TLR2, induzir a atividade de NF-kB e de TNF- α em monócitos, e que o fluconazol induz uma resposta Th1 protetiva em camundongos com candidíase mucosa ou invasiva (CENCI *et al.*, 1997; BEN-AMI, LEWIS & KONTOYIANNIS, 2008). Finalmente, as equinocandinas também parecem exercer alguma atividade imunomodulatória, e estudos relatam que a pré-exposição de monócitos e macrófagos à micafungina ou caspofungina resultam em maior inibição *in vitro* da proliferação do fungo *A. fumigatus* (CHILLER *et al.*, 2001; CHOI, BRUMMER & STEVENS, 2003). Em um estudo utilizando-se a caspofungina, uma equinocandina que inibe a síntese de β -1,3-glucana da parede celular fúngica, percebeu-se que inocular a droga em *G. mellonella* conferia as larvas proteção contra uma subsequente infecção por *C. albicans* e também contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. Análises posteriores demonstraram que caspofungina era

capaz de induzir uma resposta imune nas larvas, com um aumento na densidade dos hemócitos circulantes (KELLY & KAVANAGH, 2011). Similarmente, a micafungina apresenta uma capacidade imunomodulatória, uma vez que larvas tratadas profilaticamente com tal droga tornaram-se mais resistentes a uma posterior infecção com *S. aureus*, microrganismo contra o qual a micafungina não apresenta atividade antimicrobiana direta, além de induzir um aumento na densidade de hemócitos. Além disso, macrófagos obtidos de modelos murinos tratados com micafungina profilática por 3 dias antes da coleta apresentaram uma capacidade de fagocitar *C. albicans* e *A. fumigatus* significativamente maior quando comparada ao controle não exposto à micafungina (FUCHS *et al.*, 2016). Em resumo, os dados indicam que os compostos de coordenação apresentam a capacidade de modular a resposta imune em *G. mellonella*, e uma vez que diversas drogas antifúngicas possuem tal característica, tal perfil pode indicar que os compostos de coordenação podem se tornar drogas antifúngicas eficientes.

Uma vez que um patógeno invada a hemocele de um inseto, os hemócitos se encarregam de eliminá-lo ao engolfá-lo ou encapsulá-lo caso seja muito grande. Porém, os patógenos possuem meios de escapar da resposta imune celular, e o inseto depende então da resposta humoral e sua produção de peptídeos antimicrobianos para eliminar o agente invasor, sendo tais peptídeos, portanto, um componente chave na imunidade de *G. mellonella* (BERGIN *et al.*, 2006). De fato, estudos demonstram que a pré-exposição das larvas a inóculos não-letais de *C. albicans* e *S. cerevisiae* confere resistência a infecções posteriores, e tal resistência é mediada tanto pela maior densidade de hemócitos quanto pelo aumento na produção de peptídeos microbianos, como a galiocimicina, gallericimina, IMPI e transferrina, com picos de expressão após 24 h de infecção (BERGIN *et al.*, 2006). Interessantemente, a caspofungina, além de aumentar a densidade de hemócitos também é capaz de induzir o aumento na expressão de PAMs como a galiocimicina, o IMPI e transferrina, bem como aumentar a sobrevivência de larvas posteriormente infectadas com *C. albicans* (KELLY & KAVANAGH, 2011). De forma similar, a administração de mercúrio em larvas de *G. mellonella* resulta em um aumento da expressão da ferritina, outra molécula que desempenha um papel na resposta imune de insetos (CHOI *et al.*, 2006). Estes dados indicam que a indução de uma resposta imune mediada por PAMs pode ocorrer com compostos de origem não-microbiana, e que esta induz uma maior resistência a infecções por microrganismos (KELLY & KAVANAGH, 2011). Frente a tais informações, análises da expressão de 4 genes envolvidos na resposta imune de *G. mellonella* foram realizadas com resultados indicando que alguns compostos de coordenação foram capazes de impactar na expressão destas moléculas. A transferrina é uma molécula com alta

afinidade por ferro que desempenha um importante papel na resposta imune de insetos ao criar ambiente com baixa disponibilidade deste elemento, limitando assim a proliferação de microrganismos (KIM & KIM, 2010). De fato, diferentes relatos apontam para a participação da transferrina na resposta imune de insetos como os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* bem como *Drosophila melanogaster* expostos a *E. coli*, que apresentaram expressão aumentada de forma significativa da transferrina 16 h após serem infectadas (YOSHIGA *et al.*, 1997; 1999). Além disso, a exposição de insetos a infecções fúngicas por *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* também resultaram em um aumento expressivo na expressão de transferrina (GEISER & WINZERLING, 2012; LIU *et al.*, 2015). Análises de RT-PCR de larvas da mariposa *Manduca sexta* inoculadas com a bactéria *Micrococcus luteus* também demonstraram um aumento de 3× na expressão de transferrina (BRUMMETT *et al.*, 2017). Nossas análises demonstram que a expressão do gene da transferrina, foi significativamente aumentada em larvas expostas aos compostos de coordenação **10** (96,02×), **14** (89,71×), **15** (22,94×), **11** (21,08×), **12** (12,44×), **16** (7,02×) e **17** (3,63×). Dados similares com larvas inoculadas com caspofungina foram previamente descritos, com aumentos significativos na expressão de transferrina, associada a uma maior taxa de sobrevivência entre os animais posteriormente infectados com *C. albicans* (KELLY & KAVANAGH, 2011). Os níveis significativamente elevados na expressão de transferrina observados em nosso estudo poderiam estar associados à presença dos metais nos compostos. Estudos *in vivo* acerca do papel da transferrina no transporte de Ag(I) não estão disponíveis, e os relatos acerca do transporte de manganês indicam que de fato a transferrina sérica se liga e transporta tal molécula em mamíferos, porém não se sabe a que extensão isso ocorre e até que ponto é uma função essencial (VINCENT & LOVE, 2012). Porém, vale ressaltar que a afinidade da transferrina pelo ferro é de várias ordens de magnitude maior, e a presença de ferro impede a ligação do manganês com a transferrina (VICENT & LOVE, 2012; HERRERA, PETTIGLIO & BARTNIKAS, 2014). Portanto, o aumento da expressão de transferrina induzido pelos compostos pode criar um ambiente com baixa presença de ferro e gerar um efeito fungistático, e compostos que induzam sua expressão apresentam um maior potencial para ser utilizado como agente antifúngico caso também apresentem um perfil de indução na produção de transferrina ou de PAMPs como a lactoferrina em hospedeiros mamíferos. Outro peptídeo antimicrobiano com expressão elevada por diversos compostos foi o inibidor de metalopeptidases antimicrobianas (IMPI). O IMPI é um potente inibidor de metalopeptidases microbianas de diferentes microrganismos como *Vibrio vulnificus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella*, *Listeria*, *Clostridium* e *Helicobacter*, (CLERMONT *et al.*, 2004). No presente estudo, níveis elevados na expressão de IMPI foram

observados com os complexos **12** (97,07×), **10** (34,90×), **14** (19,39×), **17** (18×), **15** (14,64×) e **16** (3,06×). Em estudos anteriores envolvendo a resposta imune de *G. mellonella* níveis aumentados na expressão de IMPI foram observados em larvas submetidas a estresse físico, componentes da parede celular de bactérias e fungos bem como em animais inoculados com *C. albicans*, além de níveis maiores em sua expressão ter sido associado a maior resistência a infecções fúngicas (BERGIN *et al.*, 2006; MOWLDS, BARRON & KAVANAGH, 2008). Além disso, a caspofungina também é capaz de induzir um aumento na expressão de IMPI de forma expressiva (KELLY & KAVANAGH, 2011). Finalmente, os dois últimos genes analisados codificam duas defensas de *G. mellonella*, a galiomicina, e a gallerimicina. Nos ensaios realizados no presente estudo, a expressão de galiomicina foi pouco afetada pelos compostos, sendo possível detectar aumento significativo, de 2,66×, na quantidade relativa de dRNA apenas com o composto **17**. Similarmente, a expressão de gallerimicina foi afetada por apenas um composto (**12**), porém de o aumento foi significativamente maior quando comparado a modulação da galiomicina (20,55×). Vale ressaltar que dados similares foram obtidos no estudo utilizando larvas inoculadas com caspofungina, que induziu um aumento de mais de 200% na expressão de IMPI e transferrina, porém com pouco impacto na expressão de galiomincina e nenhuma interferência na expressão de gallerimicina (KELLY & KAVANAGH, 2011). Portanto, os dados obtidos indicam que os compostos apresentam capacidade imunomodulatória, induzindo aumento significativo da expressão dos peptídeos antimicrobianos IMPI e transferrina. Uma vez que a expressão elevada destas moléculas foi associada a uma maior resistência a infecções por *C. albicans* (BERGIN *et al.*, 2006), tal característica torna-se valiosa para um composto candidato a agente antifúngico.

As larvas de *G. mellonella* vêm sendo utilizadas com sucesso como um modelo para avaliação da eficácia de antimicrobianos e tratamentos antifúngicos bem como para determinar parâmetros farmacocinéticos (BINDER, MAURER & LASS-FLÖRL, 2015). Por exemplo, um estudo conduzido por IGNASIAK & MAXWELL (2017) buscando estabelecer tal modelo como alternativa viável para testes de infectividade e toxicidade utilizando-se 4 espécies de bactérias (*Mycobacterium smegmatis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosas*) e 4 diferentes antibióticos (ampicilina, ciprofloxacino, tetraciclina e rifampicina) demonstrou que, em geral, os antibióticos atuaram como previsto, sendo capazes de tratar a infecção de cepas suscetíveis, inclusive em geral dentro das mesmas faixas de dose prescritas para seres humanos, ou sendo ineficazes contra as cepas resistentes. Outros estudos utilizando *C. tropicalis* e *C. krusei* demonstraram que os dados obtidos em *G. mellonella* apresentaram uma boa correlação com

dados obtidos *in vitro* e em modelos murinos (Mesa-Arango et al. 2013; Scorzoni et al. 2013). Uma vez que a taxa de clearance de células fúngicas em um modelo de infecção reflete diretamente a eficácia do tratamento utilizado, a análise da carga fúngica em larvas infectadas foi realizada e os compostos **9**, **10**, **11**, **13** e **14** foram eficientes em reduzir a carga fúngica após 24 h de tratamento em pelo menos uma das concentrações testadas. Similarmente, um ensaio utilizando *P. brasiliensis* e *P. lutzii* para infectar larvas posteriormente tratadas com intraconazol e anfotericina B observaram uma queda na carga fúngica logo após o início do tratamento (SINGULANI *et al.*, 2016). Em um estudo anterior analisando a redução da carga fúngica em larvas infectadas com *C. albicans* e tratadas com fluconazol ou uma combinação de fluconazol e as drogas minociclina ou doxiciclina, ambas derivadas das tetraciclinas e que apresentam atividade antifúngica *in vitro*, GU e colaboradores (2017) relataram, após 24 h de tratamento, uma redução da carga fúngica de cerca de $1,6 \times 10^6$ células/mL para 1×10^6 com o uso apenas do fluconazol e de cerca de $1,6 \times 10^6$ células/mL para cerca de $0,5 \times 10^6$ com a combinação flucoazol/minociclina ou fluconazol/doxiciclina. Vale ressaltar que para obter tal redução, as concentrações utilizadas no primeiro grupo foram de 1,6 µg/larva de fluconazol e 5,12 µg/larva de minociclina e 3,12 µg/larva de fluconazol e 5,12 µg/larva de doxicilina no segundo grupo. Comparando tal metodologia com os dados obtidos no presente estudo, observa-se que alguns compostos, como os complexos **9**, **10**, **11**, **13** e **14**, foram capazes de reduzir a carga fúngica de forma semelhante, porém com o uso de concentrações abaixo das utilizadas no estudo citado (0,625 ou 1,25 µg/larva). Ensaio com larvas infectadas também com *C. albicans* (5×10^8 células) usando fluconazol e voriconazol associado com gentamicina avaliou a carga fúngica por 4 dias, e embora o tratamento tenha sido eficaz em reduzir a carga fúngica frente ao controle, o número de colônias recuperadas dos extratos aumentaram progressivamente ao longo do tempo de incubação (LU *et al.*, 2018). Similarmente, no estudo conduzido por GU e colaboradores (2017), a carga fúngica permaneceu estável após 48 h de tratamento, porém o número de UFCs subiu gradativamente no terceiro e quarto dias de infecção, sugerindo um tempo limitado de atividade da droga, efeito similar ao observado com os compostos **9**, **10**, **11** e **13** após 48 h de incubação. Porém, embora tais compostos tenham sido incapazes de manter sua atividade, os compostos **13** na menor concentração e **14**, exceto em sua concentração mais alta, continuaram a exibir a capacidade de inibir a proliferação fúngica, com UFC obtidas apresentando números similares ao ensaio de 24 h. Curiosamente, embora não tenha sido eficiente em inibir a proliferação após 24 h de infecção, o composto **15** apresentou atividade tardia na concentração de 5 µg, sendo detectada após 48 h, resultado similar ao observado com a concentração mais elevada. Os complexos **7**, **8**, **17** e **18** foram

responsáveis pelos maiores índices de carga fúngica após 48 h, provavelmente por impactarem na capacidade de fagocitose dos hemócitos. Curiosamente, o composto **8**, embora não tenha interferido com a densidade de hemócitos anteriormente, resultou em maiores taxas de carga fúngica. Uma possível explicação pode estar associada à interferência dos compostos no processo de produção de espécies reativas de oxigênio através do complexo NADPH oxidase, aspecto essencial na resposta imune das larvas e na atuação dos hemócitos no combate a agentes invasores (BROWNE, HEELAN & BROWNE, 2013). Em um estudo utilizando a fumagilina, uma toxina produzida pelo fungo *A. fumigatus*, observou-se que embora nenhuma redução na viabilidade das larvas ou dos hemócitos tenha ocorrido, uma redução no uptake de oxigênio foi notada, o que indica uma redução na geração de EROs já que a formação destes depende de um aporte de oxigênio suficiente além da presença do complexo NADPH oxidase funcional. Sabe-se que a fumagilina faz com que os neutrófilos também apresentem uma capacidade reduzida de fagocitar e matar microrganismos, e que tal efeito se dá devido à redução na formação do complexo NADPH oxidase funcional (FALLON, REEVES & KAVANAGH, 2011). A fumagilina reduziu a capacidade dos hemócitos em fagocitar conídios de *A. fumigatus* opsonizados bem como a capacidade de matar células de *C. albicans* opsonizadas (fagocitose reduzida em 14,71% e redução da capacidade de induzir a morte de células fúngicas em 44,36%) (FALLON, REEVES & KAVANAGH, 2010). Em face das semelhanças entre neutrófilos e hemócitos no que tange ao burst oxidativo e presença de proteínas homólogas a p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e gp91^{phox} dos neutrófilos e eliminação de microrganismos através da ação do complexo NADPH oxidase, a redução da capacidade imunológica dos hemócitos induzida pela fumagilina provavelmente ocorre por razões semelhantes, a não funcionalidade deste complexo (FALLON, REEVES & KAVANAGH, 2011). Tendo em vista que os compostos de coordenação são capazes de causar o desacoplamento da respiração mitocondrial (MCCANN *et al.*, 2004), uma possível hipótese para o efeito observado é que os compostos de coordenação, embora não tenham afetado a viabilidade dos hemócitos, estejam afetando o complexo NADPH oxidase como a fumagilina acima citada e afetando a capacidade de geração de EROs dos mesmos, reduzindo assim sua capacidade de fagocitar e matar as células de *C. haemulonii*.

O chamado efeito PAFE (postantifungal effect ou efeito pós-antifúngico) resulta da inibição do crescimento fúngico que ocorre após uma exposição limitada a um agente antifúngico (MINGUEZ *et al.*, 1994). Nos dados obtidos no presente estudo, a virulência de *C. haemulonii* foi afetada de forma dose-dependente após as células serem expostas por 24 h a

$\frac{1}{2} \times IC_{50}$ de diversos compostos, sendo os mais eficazes os complexos **11, 9, 17, 12, 8 e 14**, com a mortalidade das larvas sendo reduzida em taxas variando entre 100% e 55%, sendo os complexos **9 e 11** eficazes em reduzir a mortalidade mesmo 48 h após a infecção. Uma dose-dependência de tal perfil foi observada, uma vez que uma menor virulência foi observada nas células tratadas com $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ quando comparadas às células tratadas com $\frac{1}{4} \times IC_{50}$ dos compostos. Relatos de virulência atenuada em ensaios *in vivo* estão disponíveis na literatura. Por exemplo, células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. kefyr* expostas a concentrações subinibitórias de anfotericina B, nitrato de miconazol e 5-fluorocitosina apresentaram uma redução em sua capacidade de aderir a células epiteliais bucais de até 78% (ABU-EL TEEN, GHANNUM & STRETTON, 1989). Em outros estudos anteriores utilizando agentes antifúngicos, células de *C. albicans* expostas à fluconazol demonstraram uma taxa de crescimento reduzida bem como maior susceptibilidade a leucócitos polimorfonucleares, efeito também observado em células de *C. albicans* expostas à anfotericina B, cetoconazol e 5-flucitosina (MINGUEZ *et al.*, 1994, 1997). Um relato utilizando um composto antifúngico chamado benanomicina A também resultou em células de *C. albicans* mais susceptíveis à fagocitose por macrófagos murinos, sendo hipotetizado que isto ocorra devido a alterações na superfície celular induzidas pelo contato com tal composto (WATABE *et al.*, 1996). Portanto, a pré-exposição de *Candida* a compostos com ação antifúngica, mesmo em concentrações subinibitórias, impacta na proliferação e em aspectos envolvidos com o estabelecimento da infecção como a adesão e resistência a fagocitose por células do sistema imune. Nossos dados corroboram tal impacto na virulência uma vez que reduções drásticas na mortalidade de larvas infectadas com *C. haemulonii* pré-tratadas com os compostos foram observadas.

Ao longo dos últimos anos, novas espécies emergentes de fungos vêm se tornando cada vez mais comuns como causadores de fungemias, e seus perfis diferenciados de susceptibilidade as drogas disponíveis tornam o tratamento difícil e custoso. Espécies multirresistentes como *C. haemulonii* e outras semelhantes são um desafio ainda maior, uma vez que o espectro de drogas antifúngicas é limitado e muitas vezes ineficaz frente a tais novos patógenos. Com as drogas a base de metais, e os compostos de coordenação a base de 1,10-fenantrolina sendo cada vez mais investigadas pela comunidade científica, desvendar suas propriedades antimicrobianas bem como compreender a dinâmica destes em um modelo *in vivo* é necessário. Os dados obtidos neste presente estudo indicam que compostos contendo a 1,10-fenantrolina ligadas a metais como o manganês(II) e a prata(I) possuem uma potente ação anti-*C. haemulonii* e níveis de toxicidade toleráveis. Porém, grandes taxas de variação nos níveis de toxicidade e na resposta

sistema imune dos animais afetados indicam que as diferenças estruturais nos complexos, por menores que sejam, impactam diretamente na forma como este afeta o fungo e o hospedeiro *G. mellonella*. O composto **14** possui características interessantes, possuindo excelente atividade antifúngica, baixa toxicidade, é capaz de estimular a resposta imune de *G. mellonella*, reduz a carga fúngica de animais além de afetar diretamente a virulência de *C. haemulonii*, sendo portanto um composto promissor para investigações mais aprofundadas. Porém, os resultados obtidos nesta tese reforçam a necessidade de continuar a investigar mais profundamente os compostos de coordenação aqui descritos bem como continuar a busca por novas moléculas que possam resultar em compostos mais ativos e menos tóxicos que possam tornar-se alternativas a serem utilizadas no tratamento envolvendo espécies fúngicas multirresistentes.

Conclusões

1. Atividade anti-*Candida haemulonii* dos compostos de coordenação à cobre(II), manganês(II) e prata(I)

- 1.1. Os compostos de cobre(II), manganês(II) e prata(I) apresentaram potente atividade antifúngica.
- 1.2. Os compostos de coordenação à prata(I) apresentaram as maiores capacidades de inibir a proliferação celular, seguidos pelos compostos de manganês(II).
- 1.3. Os compostos de coordenação em geral apresentaram atividade fungicida em concentrações mais elevadas e fungistáticas em concentrações mais baixas.
- 1.4. Os ensaios utilizando células A549 indicaram que os compostos de manganês(II) apresentaram baixa toxicidade e altos índices de seletividade. Os compostos de cobre(II) apresentaram alta toxicidade, resultado em baixos índices de seletividade.
- 1.5. A inibição induzida pelos compostos de coordenação é maior se comparada à inibição induzida pela 1,10-fenantrolina, 1,10-fenantrolina-5,6-diona ou os metais isoladamente.
- 1.6. A presença de um biofilme reduz a capacidade antifúngica dos complexos, porém atividade biológica significativa ainda é observável.

2. Ensaios *in vivo* utilizando *Galleria mellonella* como modelo

- 2.1. *C. haemulonii* apresentou virulência reduzida quando comparada a *C. albicans*.
- 2.2. *C. haemulonii* foi mais virulenta a 30°C.
- 2.3. *C. haemulonii* apresentou virulência inóculo-dependente e induziu uma resposta imune de *G. mellonella* refletida pela alteração no número de hemócitos livres.
- 2.4. Inóculos mais elevados de *C. haemulonii* induziram uma queda nos hemócitos livres bem como uma resposta imune de nodulação e melanização intensa.
- 2.5. A resposta imune da *G. mellonella* foi montada de acordo com o tamanho do inóculo inicial, e tal resposta parece estar diretamente associada a carga fúngica observada nos animais infectados.
- 2.6. Os compostos não apresentam toxicidade para os modelos testados em concentrações de até 10 µg/larva, e uma toxicidade dose-dependente a partir desta.
- 2.7. Os compostos de coordenação foram capazes de afetar a imunidade das larvas de *G. mellonella*, com aumento de hemócitos em animais tratados com 15 µg/larva com os complexos 14, 13, 9 e 11. De forma contrária, os compostos 12, 15, 10, 16 e 18 reduziram a densidade de hemócitos.

- 2.8. Compostos apresentando menor toxicidade (**13** e **14**) também induziram uma resposta imune com maior densidade de hemócitos circulantes.
- 2.9. Compostos com maior toxicidade (**15, 18, 12, 16** e **10**) induziram queda significativa no número de hemócitos.
- 2.10. Os compostos **10, 14, 15, 11, 12, 16** e **17** foram capazes de induzir um aumento na expressão de peptídeos antimicrobianos.
- 2.11. Os compostos **9, 10, 11, 13** e **14** foram capazes de reduzir a carga fúngica em animais infectados de forma dose-dependente.
- 2.12. Os compostos **9, 11, 17, 12, 8** e **14** foram capazes de afetar significativamente a virulência de *C. haemulonii* mesmo em concentrações sub-inibitórias.
- 2.13. O composto **14** parece ser promissor, apresentando potente atividade antifúngica, pouca toxicidade, sendo capaz de estimular a resposta imune de *G. mellonella*, reduzir a carga fúngica de animais infectados e de afetar a virulência de células de *C. haemulonii* tratadas com concentrações sub-inibitórias deste.

Referências Bibliográficas

- ABU-EL TEEN, K., STRETTON, R.J. **Effects of Sub-Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents on Adherence of *Candida* spp. to Buccal Epithelial Cells *in Vitro***. Mycoses. v. 32, p. 551-562, 1989.
- ABU-ELTEEN, K.H., HAMAD, M.A. **Changing epidemiology of classical and emerging human fungal infections: a review**. Jordan Journal of Biological Sciences. v. 5, p. 215-230, 2012.
- ALLEGRA, E., TITBALL, R.W., CARTER, J., CHAMPION, O.L. ***Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals**. Chemosphere. v. 198, p. 469-472, 2018.
- ALMEIDA JR., J.N., MOTTA, A.L., ROSSI, F., ABDALA, E., PIERROTTI, L.C., KONO, A.S.G., DIZ, M.D.P., BENARD, G., DEL NEGRO, G.M.B. **First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil**. Clinics, v. 67, p. 1229-1231, 2012.
- ALMEIDA JR., J.N., ASSY, J.G.P.L., LEVIN, A.S., DEL NEGRO, G.M.B., GIUDICE, M.C., TRINGONI, M.P., THOMAZ, D.Y., MOTTA, A.L., ABDALA, E., PIERROTTI, L.C., STRABELLI, T., MUNHOZ, A.L., ROSSI, F., BENARD, G. ***Candida haemulonii* Complex Species, Brazil, January 2010-March 2015**. Emerging Infectious Disease. v. 22, p. 561-563, 2016.
- AMMES, L., DUXBURY, S., PAWLOWSKA, B., HO, H., HAYNES, K., BATES. S. ***Galleria mellonella* as a host model to study *Candida glabrata* virulence and antifungal efficacy**. Virulence. v. 8, p. 1909-1917, 2017.
- ANDREJKO, M., MIZERSKA-DUDKA, M., JAKUBOWICZ, T. **Antibacterial activity *in vivo* in the hemolymph of *Galleria mellonella* infected with *Pseudomonas aeruginosa***. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. v. 125, p. 118-123, 2009.
- ANTINORI, S., MILAZZO., L., SOLLIMA, S., GALLI, M., CORBELLINO, M. **Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review**. European Journal of Internal Medicine. v. 34, p. 21-28, 2016.
- ANUNNATSIRI, S., CHETCHOTISAKD, P., MOOTSIKAPUN, P. **Fungemia in non-HIV-infected patients: a five-year review**. International Journal of Infectious Diseases. v. 13, p. 90-96, 2009.
- APPERIS, G., FUCHS, B.B., ANDERSON, C.A., WARNER, J.E., CALDERWOOD, S.B., MYLONAKIS, E. ***Galleria mellonella* as a model host do study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain**. Microbes and Infection. v. 9, p. 729-734, 2007.
- ARVANITIS, M., GLAVIS-BLOOM, J., MYLONAKIS, E. **Invertebrate models of fungal infections**. Biochimica et Biophysica Acta. v. 1832, p. 1378-1383, 2013.

- BARNOY, S., GANCZ, H., ZHU, Y., HONNOLD, C.L., ZURAWSKI, D.V., VENKATESAN, M.M. **The *Galleria mellonella* larvae as an *in vivo* model for evaluation of *Shigella* virulence.** Gut Microbes. v. 8, p. 335-350, 2017.
- BASSETI, M., PEGHIN, M., TIMSIT, J.F. **The current treatment landscape: candidiasis.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v. 71, p. 13-22. 2016.
- BEN-AMI, R., LEWIS, R.E., KONTOYIANNIS, D.P. **Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals.** Clinical Infectious Diseases. v. 47, p. 226-235, 2008.
- BENEDICT, K., RICHARDSON, M., VALLABHANENI, S., JACKSON, B.R., CHILLER, T. **Emerging issues, challenges, and changing epidemiology of fungal disease outbreaks.** Lancet infectious diseases, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30443-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30443-7), 2017.
- BERGIN, D., BRENNAN, M., KAVANAGH, K. **Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*.** Microbes and Infection. v. 5, p. 1389-1395, 2003.
- BERGIN, D., MURPHY, L., KEENAN, J., CLYNES, M., KAVANAGH, K. **Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides.** Microbes and Infection. v. 8, p. 2105-2112, 2006.
- BINDER, U., MAURER, E., LASS-FLÖRL, C. ***Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species.** Fungal Biology. v. 120, p. 288-295, 2016.
- BOLOURI MOGHADDAM, M.R., TONK, M., SCHREIBER, C., SALZIG, D., CZERMAK, P., VILCINSKAS, A., RAHNAMAIEAN, M. **The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides.** Biological Chemistry. v. 397, p. 939-945, 2016.
- BRENNAN, M., THOMAS, D.Y., WHITEWAY, M., KAVANAH, K. **Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae.** FEMS Immunology and Medical Microbiology. v. 34, p. 153 – 157, 2002.
- BROWN, S.E., HOWARD, A., KASPRZAK, A.B., GORDON, K.H., EAST, P.D. **A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*.** Insect Biochemistry and Molecular Biology. v. 39, p. 792-800, 2009.

- BROWNE, N., HEELAN, M., KAVANAGH, K. **An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes.** *Virulence*. v. 4, p. 597 – 603, 2013.
- BRUMMETT, L.M., KANOST, M.R., GORMAN, M.J. **The immune properties of *Manduca sexta* transferrin.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v. 81, p. 1-9, 2017.
- BUJDÁKOVÁ, H. **Management of *Candida* biofilms: state of knowledge and new options for prevention and eradication.** *Future Microbiology*. v. 11, p. 235–251, 2016.
- CAGGIANO, G., CORETTI, C., BARTOLOMEO, N., LOVERO, G., DE GIGLIO, O., MONTAGNA, M.T. ***Candida* bloodstream infection in Italy: changing epidemiology during 16 years of surveillance.** *Biomed Research International*, doi: 10.1155/2015/256580, 2015.
- CALANDRA, T., ROBERTS, J.A., ANTONELLI, M., BASSETTI, M., VINCENT, J.L. **Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: an updated approach to an old enemy.** *Critical Care*. v. 20, DOI 10.1186/s13054-016-1313-6, 2016.
- CASTELLI, M.V., BUTASSI, E., MONTEIRO, M.C., SVETAZ, L.A., VICENTE, F., ZACCHINO, S.A. **Novel antifungal agentes: a patente review (2011 – present).** *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. v. 24, p. 323-328, 2014.
- CENCI, E., MENCACCI, A., DEL SERO, G., BISTONI, F., ROMANI, L. **Induction of protective Th1 response to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist.** *Journal of Infectious Disease*. v. 176, p. 217-226, 1997.
- CENDEJAS-BUENO, E., KOLECKA, A. ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., THEELEN, B., GROENEWALD, M., KOSTRZEWA, M., CUENCA-ESTRELLA, M., GÓMEZ-LÓPEZ, A., BOEKHOUT, T. **Reclassification of the *Candida haemulonii* Complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* Group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* Group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: Three Multiresistant Human Pathogenic Yeasts.** *Journal of Clinical Microbiology*. v. 50, p. 3641-3651, 2012.
- CHAMILOS, G., LIONAKIS, M.S., LEWIS, R.E., KONTOYIANNIS, D.P. **Role of mini-host models in the study of medically important fungi.** *Lancet Infectious Disease*. v. 7, p. 42-55, 2007.
- CHANDRALEKA, S., RAMYA, K., CHANDRAMOHAN, G., DHANASEKARAN, D., PRIYADHARSHINI, A., PANNEERSELVAM, A. **Antimicrobial mechanism of copper(II) 1,10-phenantroline and 2,2'-bipyridyl complex on bacterial and fungal pathogens.** *Journal of Saudi Chemical Society*. v. 18, p. 953-962, 2014.

- CHILLER, T., FARROKHSHAD, K., BRUMMER, E., STEVENS, D.A **The interaction of human monocytes, monocyte-derived macrophages and polymorphonuclear neutrophils with caspofungin (MK-0991), an echinocandin, for antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. v. 39, p. 99-103, 2001.
- CHOI, J.H., BRUMMER, E., STEVENS, D.A. **Combined action of micafungin, a new echinocandin, and human phagocytes for antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*.** Microbes and Infection. v. 6, p. 383-389, 2004.
- CLERMONT, A., WEDDE, M., SEITZ, V., PODSIADLOWSKI, L., LENZE, D., HUMMEL, M., VILCINSKAS, A. **Cloning and expression of an inhibitor of microbial metalloproteinases from insects contributing to innate immunity.** Biochemical Journal. v. 382, p. 315-322, 2004.
- CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard – 3rd Ed. M27-A3.** Wayne, PA, CLSI, 2008.
- COLEMAN, J.J., MUHAMMED, M., KASPERKOVITZ, P.V., VYAS, J.M., MYLONAKIS, E. ***Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as heterologous host.** Fungal Biology. v. 115, p. 1279-1289, 2011.
- CORREA, W., MARINQUE-MORENO, M., BEHREND, J., PATIÑO, E., MARELLA, C., PELÁEZ-JARAMILLO, C., GARIDEL, P., GUTSMANN, T., BRANDENBURG, K., HEINBOCKEL, L. ***Galleria mellonella* native and analogue peptides Gm1 and ΔGm1.II Anti-bacterial and anti-endotoxic effects.** Biochimica et Biophysica Acta. v. 1838, p. 2739-2744, 2014.
- COTTER, G., DOYLE, S., KAVANAGH, K. **Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts.** FEMS Immunology and Medical Microbiology. v. 27, p. 163–169, 2000.
- COWEN, L.E., SINGH, S.D., KOHLER, J.R., COLLINS, C., ZAAS, A.K., SCHELL, W.A., AZIZ, H., MYLONAKIS, E., PERFECT, J.R., WHITESELL, L., LINDGQUIST, S. **Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious diseases.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v. 24, p. 2818-2823, 2009.
- COYLE, B., KAVANAGH, K., MCCANN, M., DEVEREUX, M., AND GERAGHTY, M. **Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes.** Biometals. v. 16, p. 321–329, 2003.

- CREAVEN, B. S., EGAN, D. A., KARCZ, D., KAVANAGH, K., MCCANN, M., MAHON, M., NOBLE, A., THATI, B., WALSH, M. **Synthesis, characterisation and antimicrobial activity of copper(II) and manganese(II) complexes of coumarin-6,7-dioxyacetic acid (cdoaH₂) and 4-methylcoumarin-6,7-dioxyacetic acid (4-MecdoaH₂): X-ray crystal structures of [Cu(cdoa)(phen)₂].8.8H₂O and [Cu(4-Mecdoa)(phen)₂].13H₂O (phen=1,10-phenanthroline).** *Journal of Inorganic Biochemistry.* v. 101, p. 1108–1119, 2007.
- CREAVEN, B.S., DEVEREUX M., KARCZ, D., KELLET, A., MCCANN, M., NOBLE, A., WALSH, M. **Copper(II) complexes of coumarin-derived Schiff bases and their anti-*Candida* activity.** *Journal of Inorganic Biochemistry.* v. 103, p. 1196-1203, 2009.
- DESBOIS, A.P., COOTE, P.J. **Utility of Greater Wax Moth (*Galleria Mellonella*) for Evaluating the Toxicity and Efficacy of New Antimicrobial Agents.** *Advances in Applied Microbiology.* v. 78, p. 25-53, 2012.
- DEVEREUX, M., MACCANN, M., LEON, V., GERAGHTY, M., MCKEE, V., WIKAIRA, J. **Synthesis and biological activity of manganese (II) complexes of phthalic and isophthalic acid: X-ray crystal structures of [Mn(ph)(Phen)₂(H₂O)].4H₂O, [Mn(Phen)₂(H₂O)₂](Isoph)₂ (Phen)·14H₂O and {[Mn(Isoph)(bipy)₂]₄.2.75bipy}_n (pH₂ = phthalic acid; Isoph = isophthalic acid; Phen = 1,10-phenanthroline; bipy = 2,2-bipyridine).** *Metal-Based Drugs.* v. 7, p. 275-288, 2000.
- DOMÁN, M., KOVÁCS, R., PERLIN, D.S., KARDOS, G., GESZTELYI, R., JUHÁSZ, B., BOZÓ, A., MAJOROS, L. **Dose escalation studies with caspofungin against *Candida glabrata*.** *Journal of Medical Microbiology.* v. 64, p. 998-1007, 2015.
- DUBOVSKIY, I.M., WHITTEN, M.M.A., YAROSLAVTSEVA, O.N., GREIG, C., KRYUKOV, V.Y., GRIZANOVA, E.V., MUKHERJEE, K., VILCINSKAS, A., GLUPOV, V.K., BUTT, T.M. **Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi?** *Plos one.* v. 8, e60248, 2013.
- DUNPHY, G.B., MORTON, D.B., ANDREW, K., CHADWICK, J.M. **Pathogenicity of Lipopolyscharide Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for Larvae of *Galleria mellonella*: Bacterial Properties Associated with Virulence.** *Journal of Invertebrate Pathology.* v. 47, p. 48-55, 1986.
- EVERTS, S. **The fungus among us.** *Chemical & Engineering Society.* v. 94, p. 24-27, 2016.
- FALK, R., HACHAM, M., NYSKA, A., FOLEY, J.F., DOMB, A.J., POLACHECK, I. **Induction of Interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alfa and apoptosis in mouse organs by amphotericin B is neutralized by conjugation with arabinogalactan.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* v. 55, p. 713-720, 2005.

- FALLON, J.P., REEVES, E.P., KAVANAGH, K. **Inhibition of neutrophil function following exposure to the *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin.** Journal of Medical Microbiology. v. 59, p. 625-633, 2010.
- FALLON, J.P., REEVES, E.P., KAVANAGH, K. **The *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin suppresses the immune response of *Galleria mellonella* larvae by inhibiting the action of haemocytes.** Microbiology. v. 157, p. 1481-1488, 2011.
- FALLON, J.P., TROY, N., KAVANAGH, K. **Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses.** Virulence. v. 2, p. 413-421, 2011.
- FERNANDES, C.M., FONSECA, F.L., GOLDMAN, G.H., PEREIRA, M.D., KURTENBACH, E. **A Reliable Assay to Evaluate the Virulence of *Aspergillus nidulans* Using the Alternative Animal Model *Galleria mellonella* (Lepidoptera).** Bio-Protocols. v. 7, DOI: 10.21769/BioProtoc.2329, 2017.
- FREITAK, D., SCHMIDTBERG, H., DICKEL, F., LOCHNIT, G., VOGEL, H., VILCINSKAS, A. **The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects.** Virulence. v. 5, p. 547-554, 2014.
- FRICKER, S.P. **Medical Uses of Gold Compounds.** Gold bulletin. v. 29, p. 53-60, 1996.
- FUCHS, B.B., LI, Y., LI, D., JOHNSTON, T., HENDRICKS, G., LI, G., RAJAMUTHIAH, R., MYLONAKIS, E. **Micafungin Elicits an Immunomodulatory Effect in *Galleria mellonella* and Mice.** Mycopathologia. v. 181, p. 17-25, 2016.
- GANDRA, R.M., MCCARRON, P., FENANDES, M.F., RAMOS, L.S., MELLO, T.P., AOR, A.C., BRANQUINHA, H.M., MCCANN, M., DEVEREUX, M., SANTOS, A.L.S. **Antifungal Potential of Copper(II), Manganese(II), and Silver(I) 1,10-Phenantroline Chelates Against Multidrug-Resistant Fungal Species Forming the *Candida haemulonii* Complex: Impact on the Planktonic and Biofilm Lifestyles.** Frontiers in Microbiology. v. 11, p. 1257, 2017.
- GARCIA-VIDAL, C., VIASUS, D., CARRATALÁ, J. **Pathogenesis of invasive fungal infections.** Current Opinion in Infectious Diseases. v. 26, p. 270-276, 2013.
- GARGEYA, I.B., PRUITT, W.R., MEYER, S.A., AHEARN, D.G. ***Candida haemulonii* from clinical specimens in USA.** Journal of Medical and Veterinary Mycology. v. 29, p. 335-338, 1991.

- GEISER, D.L., WINZERLING, J.J. **Insect transferrins: Multifunctional proteins.** *Biochimica et Biophysica Acta.* v. 1820, p. 437-451, 2012.
- GERAGHTY, M., CRONIN, J. F., DEVEREUX, M., MCCANN, M. **Synthesis and antimicrobial activity of copper(II) and manganese(II) α,ω -dicarboxylate complexes.** *Biometals.* v. 13, p. 1–8, 2000.
- GIUSIANO, G., MANGIATERRA, M., SAITO, V.G., ROJAS, F., GÓMEZ, V., DÍAZ, M.C. **Etiology of fungaemia and catheter colonization in Argentinian paediatric patients.** *Mycoses.* v. 49, p. 49-54, 2005.
- GLIŠIĆ, B. Đ., DJURAN, M.I. **Gold complexes as antimicrobial agents: an overview of different biological activities in relation to the oxidation state of the gold ion and the ligand structure.** *Dalton Transactions.* v. 43, p. 5950-5969, 2014.
- GOW, N.A.R., NETEA, M.G. **Medical mycology and fungal immunology: new research perspectives addressing a major world health challenge.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* v. 371, p. 20150462, 2016.
- GRANATO, M.Q., GONÇALVES, D.S., SEABRA, S.H., MCCANN, M., DEVEREUX, M., SANTOS, A.L.S., KNEIPP, L.F. **1,10-Phenantroline-5,6-Dione-Based Compounds are Effective in Disturbing Crucial Physiological Events of *Phialophora verrucosa*.** *Frontiers in Microbiology.* v. 8, p. 76, 2017.
- GU, W., YU, Q., YU, C., SUN, S. ***In vivo* activity of fluconazole/tetracycline combinations in *Galleria mellonella* with resistant *Candida albicans* infection.** *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* v. 13, p. 74-80, 2017.
- HAMAMOTO, H., TONOIKE, A., NARUSHIMA, K., HORIE, R., SEKIMIZU, K. **Silkworm as a model animal to evaluate drug candidate toxicity and metabolism.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* v. 149, p. 334-339. 2009.
- HAMDY, R.F., ZAOUTIS, T.E., SEO, S.K. **Antifungal stewardship considerations for adults and pediatrics.** *Virulence*, DOI:10.1080/21505594.2016.1226721, 2016.
- HERRERA, C., PETTGLIO, M.A., BARTNIKAS, T.B. **Investigating the role of transferrin in the distribution of iron, manganese, copper and zinc.** *Journal of Biological Inorganic Chemistry.* v. 19, p. 869-877, 2014.
- HIRAKAWA, M.P., MARTINEZ, D.A., SAKTHIKUMAR, S., ANDERSON, M.Z., BERLIN, A., GUJJA, S., ZENG, Q., ZISSON, E., WANG, J.M., GREENBERG, J.M., BERMAN, J.,

- BENNETT, R.J., CUOMO, C.A. **Genetic and phenotypic intra-species variation in *Candida albicans***. *Genome Research*. v. 25, p. 413-425, 2014.
- IGNASIAK, K., MAXWELL, A. ***Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials**. *BMC Research Notes*. v. 10, p. 428, 2017.
- JANDER, G., RAHME, L.G., AUSUBEL, F.M. **Positive Correlation between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects**. *Journal of Bacteriology*. v. 182, p. 3843-3845, 2000.
- KALINOWSKA-LIS, U., SZEWCZYK, E.M., CHECINSKA, L., WOJCIECHOWSKI, J.M., WOLF, W.M., OCHOCKI, J. **Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Silver(I) and Copper(II) Complexes of Phosphate Derivatives of Pyridine And Benzimidazole**. *ChemMedChem*. v. 9, p. 169-176, 2014.
- KARYOTAKIS, N.C., ANAISSIE, E.J., HACHEM, R., DIGNANI, M.C., SAMONIS, G. **Comparison of the efficacy of polyenes and triazoles against hematogenous *Candida krusei* infection in neutropenic mice**. *Journal of Infectious Diseases*. v. 168, p. 1311–1313, 1993.
- KASCHNER, K., KESNER-REYES, C. GARILAO, J. RIUS-BARILE, T. REES AND R. FROESE. **AquaMaps: predicted range maps for aquatic species**. AquaMaps, 2016. Disponível em: www.aquamaps.org. Acesso em: 08 jun. 2018.
- KAVANAGH, K., REEVES, E.P. **Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens**. *FEMS Microbiology Reviews*. v. 28, p. 101-112, 2004.
- KAVANAGH, K., REEVES, E.P. **Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens**. *FEMS Microbiology Reviews*. v. 28, p. 101-112, 2004.
- KAWAI, A., YAMAGISHI, Y., AND MIKAMO, H. **In vitro efficacy of liposomal amphotericin B, micafungin and fluconazole against non-*albicans* species biofilms**. *Journal of Infection and Chemotherapy*. v. 21, p. 647–653, 2015.
- KELLY, J., KAVANAGH, K. **Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response**. *Journal of Medical Microbiology*. v. 60, p. 189-196, 2011.
- KHAN, Z.U., AL-SWEIH, N.A., AHMAD, S., AL-KAZEMI, N., KHAN, S., JOSEPH, L., CHANDY, R. **Outbreak of Fungemia among Neonates Caused by *Candida haemulonii***

- Resistant to Amphotericin B, Itraconazole and Fluconazole.** Journal of Clinical Microbiology. v. 45, p. 2025-2027, 2007.
- KHARISSOVA, O. V., MENDEZ-ROJAS, M. A., KHARISOV, B. I., MÉNDEZ, U. O., MARTÍNEZ, P. E. **Metal complexes containing natural and artificial radioactive elements and their applications.** Molecule. v. 19, p. 10755–10802, 2014.
- KIM, J., KIM, Y. **A viral histone H4 suppresses expression of a transferrin that plays a role in the immune response of the diamondback moth, *Plutella xylostella*.** Insect Molecular Biology. v. 19, p. 567-574, 2010.
- KIM, M. N., SHIN, J. H., SUNG, H., LEE, K., KIM, E. C., RYOO, N., LEE, J.S., JUNG, S.L., PARK, K.H., KEE, S.J., KIM, S.H., SHIN, M.G., SUH, S.P., RYANG, D.W. ***Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features.** Clinical Infectious Diseases. v. 48, p. 57–61, 2009.
- KIM, S., KO, K.S., MOON, S.Y., LEE, M.S., LEE, M.Y., SON, J.S. **Catheter-related Candidemia Caused by *Candida Haemulonii* in a Patient in Long-term Hospital Care.** Journal of Korean Medical Science. v. 26, p. 297-300, 2011.
- KULLBERG, B.J., ARENDRUP, M.C. **Invasive Candidiasis.** The New England Journal of Medicine. v. 373, p. 1445-1456, 2015.
- KWADHA, C.A., ONG'AMO, G.O., NDEGWA, P.N., RAINA, S.K., FOMBONG, A.T. **The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*.** Insects. v. 8, p. 61, 2017.
- LAGUNES, L., RELLO, J. **Invasive candidiasis: from mycobiome to infection, therapy and prevention.** European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. v. 35, p. 1221-1226, 2016.
- LANGEN, G., IMANI, J., ALTINCICEK, B., KIESERITZKY, G., KOGEL, K.H., VILCINSKAS, A. **Transgenic expression of gallerimycin, a novel insect antifungal defensin from the greater wax moth *Galleria mellonella*, confers resistance to pathogenic fungi in tobacco.** Biological Chemistry. v. 387, p. 549-557, 2006.
- LAVARDE, V., DANIEL, F., SAEZ, H., ARNOLD, M., FAGNER, B. **Peritonite mycosique a *Torulopsis haemulonii*.** Bulletin de la Societé mycologique de France. v. 13, p. 173-176, 1984.
- LEE, Y.S., YUN, E.K., JANG, W.S., KIM, I., LEE, J.H., PARK, S.Y., RYU, K.S., SEO, S.J., KIM, C.H., LEE, I.H. **Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin**

- from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Insect Molecular Biology*. v. 13, p. 65-72, 2004.
- LEE, W., LEE, D.G. **A novel mechanism of fluconazole: fungicidal activity through dose-dependent apoptotic responses in *Candida albicans***. *Microbiology*. v. 164, p. 194-204, 2018.
- LEHMAN, P.F., WU, L.C., PRUITT, W.R., MEYER, S.A., AHEARN, D.G. **Unrelatedness of groups of yeasts within the *Candida haemulonii* complex**. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 31, p.1683-1687, 1993.
- LEMIRE, J. A., HARRISON, J. J., AND TURNER, R. J. **Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications**. *Nature Reviews Microbiology*. v. 11, p. 371–384, 2013.
- LEUCO, S., RAIVIO, T.L. **Mutations that impact the enteropathogenic *Escherichia coli* Cpx envelope stress response attenuate virulence in *Galleria mellonella***. *Infection and immunity*. v. 80, p. 3077-3085, 2012.
- LI, F., COLLINS, G., KEENE, F.R. **Ruthenium complexes as antimicrobial agents**. *Chemistry Society Reviews*. v. 44, p. 2529-2642, 2015.
- LIONAKIS, M.S. ***Drosophila* and *Galleria* insect model hosts**. *Virulence*. v. 2, p. 521-527, 2011.
- LIU, L., GANGHUA, L., SUN, P., LEI, C., HUANG, Q. **Experimental verification and molecular basis of active immunization against fungal pathogens in termites**. *Scientific Reports*. v. 5, p. 15106, 2015.
- LU, M., YU, C., CUI, X., SHI, J., YUAN, L., SUN, S. **Gentamicin synergizes with azoles against drug-resistant *Candida albicans***. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 51, p. 107-114, 2018.
- MAGUIRE, R., DUGGAN, O., KAVANAGH, K. **Evaluation of *Galleria mellonella* larvae as an *in vivo* model for assessing the relative toxicity of food preservatives agents**. *Cell Biology and Toxicology*. v. 32, p. 209-216, 2016.
- MAJITHIYA, J., SHARP, A., PARMAR, A., DENNING, D.W., WARN, P.A. **Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei***. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 63, p. 161–166, 2009.

- MAK, P., ZDYBICKA-BARABAS, A., CYTRYNSKA, M. **A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi.** Developmental and Comparative Immunology. v. 34, p. 1129-1136, 2010.
- MATHA, V., MRAECK, Z. **Changes in haemocyte counts in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Galleriidae) larvae infected with *Steinernema* Sp. (Nematoda: Steinernematidae).** Nematologica. v. 30, p. 86-89, 1984.
- MAURER, E., BROWNE, N., SURLIS, C., JUKIC, E., MOSER, P., KAVANAGH, K., LASS-FLORL, C., BINDER, U. ***Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B resistance.** Virulence. v. 6, p. 591-598, 2015.
- MCCANN, M., COYLE, B., MCKAY, S., MCCORMACK, P., KAVANAGH, K., DEVEREUX, M., MCKEE, V., KINSELLA, P., O'CONNOR, R., CLYNES, M. **Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phendio)2]ClO4 (phendio =1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells.** Biometals. v. 17, p. 635–645, 2004.
- MCCANN, M., GERARTHY, M., DEVEREUX, M., O'SHEA, D., MASON, J., O'SULLIVAN, L. **Insights into the mode of action of the anti-*Candida* activity of 1,10-phenanthroline and its metal chelates.** Metal Based Drugs. v. 7, p. 185-193, 2000.
- MCCANN, M., KELLETT, A., KAVANAGH, K., DEVEREUX, M., AND SANTOS, A. L. S. **Deciphering the antimicrobial activity of phenanthroline chelators.** Current Medicinal Chemistry. v. 19, p. 2703–2714, 2012.
- MCCANN, M., MCGINLEY, J., NI, K., O'CONNOR, M., KAVANAH, K., MCKEE, V., COLLERAN, J., DEVEREUX, M., GATHERGOOD, N., BARRON, N., PRISECARU, A., KELLET, A. **A new phenanthroline-oxazine ligand: synthesis, coordination chemistry and atypical DNA biding interaction.** Chemical Communications. v. 49, p. 2341, 2013.
- MCCARTY, T.P., PAPPAS, P.G. **Invasive Candidiasis.** Infectious Disease Clinics of North America. v. 30, p. 103-124, 2016.
- MCGONIGLE, P., RUGGERI, B. **Animal models of human disease: Challenges in enabling translation.** Biochemical Pharmacology. v. 87, p. 162-171, 2014.
- MEGAW, J., THOMPSON, T.P., LAFFERTY, R.A., GILMORE, B.F. ***Galleria mellonella* as a novel *in vivo* model foe assessment of the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids.** Chemosphere. v. 139, p. 197-291, 2015.
- MELETIADIS, J., ANTACHOPOULOS, C., STERGIOPOULO, T., POURNARAS, S., ROILIDES, E., WALSH, T.J. **Differential Fungicidal Activities of Amphotericin B and**

- Voriconazole Against *Aspergillus* Species Determined by Microbroth Methodology.** v. Antimicrobial Agents Chemotherapy. v. 51, p. 3329-3337, 2007.
- MELLO, T. P., RAMOS, L. S., BRAGA-SILVA, L. A., BRANQUINHA, M. H., SANTOS, A. L. S. **Fungal biofilm – a real obstacle against an efficient therapy: lessons from *Candida*.** Current Topics in Medicinal Chemistry v. 17, p. 1987–2004, 2017.
- MESA-ARANGO, A.C., FORASTIERO, A., BERNAL-MARTÍNEZ, L., CUENCA-ESTRELLA, M., MELLADO, E., ZARAGOZA, O. **The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast.** Medical Mycology. v. 51, p. 461-472, 2013.
- MESA-ARANGO, A.C., SCORZONI, L., ZARAGOZA, O. **It takes only one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug.** Frontiers in Microbiology. v. 3, p. 286, 2012.
- METCALFE, C., THOMAS, A. **Kinetically inert transition metal complexes that reversibly bind to DNA.** Chemical Society Reviews. v. 32, p. 215–224, 2003.
- MINGUEZ, F., CHIU, M.L., LIMA, J.E., ÑIQUE, R., PRIETO, J. **Activity of fluconazole: postantifungal effect, effects of low concentrations and of pretreatment on the susceptibility of *Candida albicans* to leucocytes.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v. 34, p. 93-100, 1994.
- MINGUEZ, F., LIMA, J.E., GARCÍA, M.T., PRIETO, J. **Effects of Antifungal Pretreatment on the Susceptibility of *Candida albicans* to Human Leucocytes.** Chemotherapy. v. 43, p. 346-351, 1997.
- MOGHADDAM, M.R.B., TONK, M., SCHREIBER, C., SALZIG, D., CZERMAK, P., VILCINSKAS, A., RAHNAMAEIAN, M. **The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides.** Biological Chemistry. v. 397, p. 939-945, 2016.
- MORET, Y., SCHMID-HEMPEL, P. **Survival for Immunity: The Price of Immune System Activation for Bumblebee Workers.** Science. v. 10, p. 1166-1168, 2000.
- MORTON, D., DUNPHY, G. AND CHADWICK, J. **Reactions of haemocytes of immune and non-immune *Galleria mellonella* larvae to *Proteus mirabilis*.** Development & Comparative Immunology. v. 11, p. 47–55, 1987.

- MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunology.* v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOWLDS, P., BARRON, A., KAVANAGH, K. **Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*.** *Microbes and Infection.* v. 10, p. 628-634, 2008.
- MOWLDS, P., COATES, C., RENWICK, J., KAVANAGH, K. **Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following b-glucan inoculation.** *Microbes and Infection.* v. 12, p. 146-153, 2010.
- MURO, M.D., MOTTA, F.A., BURGER, M., MELO, A.S.A., DALLA-COSTA, L.M. **Echinocandin Resistance in Two *Candida haemulonii* Isolates from Pediatric Patients.** *Journal of Clinical Microbiology.* v. 50, p. 3783-3785, 2012.
- MYLONAKIS, E., MORENO, R., EL KHOURY, J.B., IDNURM, A., HEITMAN, J., CALDERWOOD, S.B., AUSUBEL, F.M., DIENER, A. ***Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis.** *Infection and Immunity.* v. 73, p. 3842-3850, 2005.
- NDAGI, U., MHLONGO, N., SOLIMAN, M.E. **Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective.** *Drug Design, Development and Therapy.* v. 11, p. 599-616, 2017.
- NGUYEN, L.N., TROFA, D., NOSANCHUCK, J.D. **Fatty Acid Synthase Impacts the Pathobiology of *Candida parapsilosis* *In Vitro* and during Mammalian Infection.** *Plos One.* v. 4, e8421, 2009.
- OH, B.J., SHIN, J.H., KIM, M.N., SUNG, H., LEE, K., JOO, M.Y., SHIN, M.G., SUH, S.P., RYANG, D.W. **Biofilm formation and genotyping of *Candida haemulonii*, *Candida pseudohaemulonii*, and a proposed new species (*Candida auris*) isolates from Korea.** *Medical Mycology.* v. 49, p. 98-102, 2011.
- OLIVEIRA, F.E., ROSSONI, R.D., BARROS, P.P., BEGNINI, B.E., JUNQUEIRA, J.C., JORGE, A.O.C., LEÃO, M.V.P., OLIVEIRA, L.D. **Immunomodulatory effects and anti-*Candida* activity of lactobacilli in macrophages and in invertebrate model of *Galleria mellonella*.** *Microbial Pathogenesis.* v. 110, p. 603-611, 2017.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L., AL-OBAIDI, M. **Invasive Fungal Infections in the Intensive Care Unit.** *Infectious Diseases Clinics of North America.* v. 31, p. 475-487, 2017.
- PAHONTU, E., JULEA, F., ROSU, T., PURCAREA, V., CHUMAKOV, Y., PETRENCO, P., GULEA, A. **Antibacterial, antifungal and *in vivo* antileukaemia activity of metal**

- complexes with thiosemicarbazones.** Journal of Cellular and Molecular Medicine. v. 19, p. 865-878, 2015.
- PEETERS, E., NELIS, H.J., COENEYE, T. **Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilm grown in microtiter plates.** Journal of Microbiology Methods. v. 72, p. 157-165, 2008.
- PELEG, A.Y., MONGA D, J.S., ELIOPOULUS, G.M., MOELLERING, R.C., MYLONAKIS, E. **Galleria mellonella as a model to study Acinetobacter baumannii pathogenesis and therapeutics.** Antimicrobial Agents Chemotherapy. v. 53, p. 2605-2609, 2009.
- QIN, Q.M., LUO, J., LIN, X., PEI, J., LI, L., FICHT, T.A., FIGUEIRO, P. **Functional analysis of Host Factors that Mediate the Intracellular Lifestyle of Cryptococcus neoformans.** Plos Pathogens. v. 7, e1002078, 2011.
- RAJENDRAN, R., SHERRY, L., NILE, C. J., SHERRIFF, A., JOHNSON, E. M., HANSON, M. F., WILLIAMS, C., MUNRO, C.A., JONES, B.J., RAMAGE, G. **Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with Candida albicans bloodstream infections-Scotland, 2012-2013.** Clinical Microbiology and Infection. v. 22, p. 87–93, 2016.
- RAMAGE, G., WALLE, K.V., WICKES, B.L., LÓPEZ-RIBOT, J.L. **Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of Candida albicans biofilms.** Antimicrobial Agents Chemotherapy. v. 45, p. 2475-2479, 2001.
- RAMAN, N., MAHALAKSHMI, R., MITU, L. **Bio-sensitive activities of coordination compounds containing 1,10-phenantroline as co-ligand: Synthesis, structural elucidation and DNA binding properties of metal(II) complexes.** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. v. 131, p. 355-364, 2014.
- RAMESH, R., MAHESWARAN, S. **Synthesis, spectra, dioxygen affinity and antifungal activity of Ru(II) Schiff base complexes.** Journal of Inorganic Biochemistry. v. 96, p. 457-462, 2003.
- RAMOS, L.S., FIGUEIREIDO-CARVALHO, M.H., BARBEDO, L.S., ZICCARDI, M., CHAVES, A.L., ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M., PINTO, M.R., SGARBI, D.B., DORNELAS-RIBEIRO, M., BRANQUINHA, M.H., SANTOS, A.L.S. **Candida haemulonii complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v. 70, p. 111–115, 2015.
- RAMOS, L. S., OLIVEIRA, S. C. S., BRANQUINHA, M. H., SANTOS, A. L. S. (2017). **Planktonic growth and biofilm formation profiles in Candida haemulonii species complex.** Medical Mycology. v. 55, p. 785-789, 2017.

- RATTCLIFE, N.A., WALTERS, J.B. **Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: clearance of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* larvae.** Journal of Insect Physiology. v. 29, p. 407-415, 1983.
- REDDY, P.R., RAJESHWAR, S., SATYANARAYANA, B. **Synthesis, characterization of new copper(II) Schiff base and 1,10-phenantroline complexes and study of their bioproperties.** Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. v. 160, p. 217-224, 2016.
- ROCHFORD, G. **Investigating the mechanistic mode of action of novel Cu(II) complexes in *Galleria mellonella* and mammalian cell models.** 2015. 202f. Tese (Doutorado em Ciências) – School of Biological Sciences, Dublin Institute of Technology, Dublin.
- ROILIDES, E., LYMAN, C.A., FILIOTI, J., AKPOGHENETA, O., SEIN, T., LAMAIGNERE, G.G., PETRAINTIENE, R., WALSH, T.J. **Amphotericin B formulations exert additive antifungal activity in combination with pulmonary alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes against *Aspergillus fumigatus*.** Antimicrobial Chemotherapy Agents. v. 46, p. 1974-1976, 2002.
- ROSSI, S.A., TREVIJANO-CONTADOR, N., SCORZONI, L., MESA-ARANGO, A.C., OLIVEIRA, H.C., WERTHER, K., RASO, T.F., MENDES-GIANNINI, M.J.S., ZARAGOZA, O., FUSCO-ALMEIDA, A.M. **Impacto of Resistance to Fluconazole on Virulence and Morphological Aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Isolates.** Frontiers in Microbiology. v. 7, p. 153, 2016.
- RUAN, S.Y., KUO, Y.W., HUANG, C.T., HSIUE, H.C., HSUEH, P.R. **Infections due to *Candida haemulonii*: species identification, antifungal susceptibility and outcomes.** International Journal of Antimicrobial Agents. v. 35, p. 85-88, 2010.
- SANGUINETTI, M., POSTERARO, B., LASS-FLÖRL, C. **Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact.** Mycose. v. 58, p. 2–13, 2015.
- SAXENA, S., BHATNAHAR, P.K., GHOSH, P.C., SARMA, P.U. **Effect of amphotericin B lipid formulation on immune response in aspergillosis.** International Journal of Pharmaceutics. v. 188, p. 19-30, 1999.
- SCHALLER, M. **Lactobacilli in mucosal *Candida albicans* infections.** In: DE VOS, W.M., ENGSTRAND, L., DRAGO, L., REID, G., SCHAUBER, J., HAY, R., MENDLING, W., SCHALLER, M., SPILLER, R., GAHAN, C.G., ROWLAND, I. SelfCare. v. 3, p. S41-S45, 2012.

- SCHUHMANN, B., SEITZ, V., VILCINSKAS, A., PODSIADLOWSKI, L. **Cloning and Expression of Gallerimycin, an Antifungal Peptide Expressed in Immune Response of Greater Wax Moth Larvae, *Galleria mellonella***. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. v. 53, p. 125-133, 2003.
- SCORZONI, L., LUCAS, M.P., MESA-ARANGO, A.C., FUSCO-ALMEIDA, A.M., LOZANO, E., CUENCA-ESTRELLA, M., MENDES-GIANNINI, M.J., ZARAGOZA, O. **Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast *In Vitro* Susceptibility Profile**. Plos One. v. 8, e60047, 2013.
- SCULLY, L.R., BIDOCHKA, M.J. **Developing insect models for the study of current and emerging human pathogens**. FEMS Microbiology Letters. v. 263, p. 1-9, 2006.
- SEED, P.C. **The human mycobiome**. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. v. 5, a019810, 2014.
- SHEEHAN, G., KAVANAGH, K. **Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans***. Virulence. v. 9, p. 163-172, 2018.
- SILVA, L.N., CAMPOS-SILVA, R., RAMOS, L.S., TRENTIN, D.S., MACEDO, A.J., BRANQUINHA, M.H., SANTOS, A.L.S. **Virulence of *Candida haemulonii* complex in *Galleria mellonella* and efficacy of classical antifungal drugs: a comparative study with other clinically relevant non-*albicans* species**. FEMS Yeasts. No prelo. 2018.
- SINGULANI, J.L., SCORZONI, L., PAULA E SILVA, A.C.A., FUSCO-ALMEIDA, A.M., MENDES-GIANNINI, M.J.S. **Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella* model**. International Journal of Antimicrobial Agents. v. 48, p. 292-297, 2016.
- SMITH, T.L. **Genetical studies on the wax moth *Galleria mellonella* Linn**. Genetics, v. 23, p. 115-137, 1938.
- THATI, B., NOBLE, A., ROWAN, R., CREVEN B.S., WALSH, M., MCCANN, M., EGAN, D., KAVANAH, K. **Mechanism of action of coumarin and Silver(I)-coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans***. Toxicology in Vitro. v. 21, p. 801-808, 2007.
- THORTON, L., DIXIT, V., ASSAD, L.O.N., RIBEIRO, T.P., QUEIROZ, D.D., KELLET, A., CASEY, A., COLLERAN, J., PEREIRA, M.D., ROCHOFORD, G., MCCANN, M., O'SHEA, D., DEMPSEY, R., MCCLEAN, S., KIA, A.F.A., WALSH, M., CREAVEN, B., HOWE, O., DEVEREUX, M. **Water-soluble and photo-stable silver(I) dicarboxylate complexes**

- containing 1,10-phenantroline ligands: Antimicrobial and anticancer chemotherapeutic potential, DNA interactions and antioxidant activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. v. 159, p. 120-132, 2016.
- TOHYAMA, M., KAWAKAMI, K., SAITO, A. **Anticryptococcal effect of amphotericin B is mediated through macrophage production of nitric oxide.** *Antimicrobial Chemotherapy Agents*. v. 40, p. 1919-1923, 1996.
- VAN UDEN, N., KOLIPINSKI, M.C. ***Torulopsis haemulonii* nov. spec. a yeast from the Atlantic ocean.** *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology*. v. 28, p. 78-80, 1962.
- VENISSE, N., GRÉGOIRE, N., MARLIAT, M., COUET, W. **Mechanism-Based Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Models of *in Vitro* Fungistatic and Fungicidal Effects against *Candida albicans*.** v. 52, p. 937-943, 2008.
- VIGANOR, L., GALDINO, A.C., NUNES, A.P., SANTOS, K.R., BRANQUINHA, M.H., DEVEREUX, M., KELLET, A., MCCANN, M., SANTOS, A.L.S. **Anti-*Pseudomonas Aeruginosa* activity of 1,10-phenantroline-based drugs against both planktonic- and biofilm growing cells.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 71, p. 128-134, 2015.
- VILCINSKAS, A., MATHAT, V., GÖTZ, P. **Effects of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* and its Secondary Metabolites on Morphology and Cytoskeleton of Plasmocytes Isolated from the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*.** *Journal of Insect Physiology*. v. 43, p. 1149-1159, 1997.
- VINCENT, J.B., LOVE, S. **The binding and transport of alternative metals by transferrin.** *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1820, p. 362-378, 2012.
- VU, K., GELLI, A. **Astemizole and an analogue promote fungicidal activity of fluconazole against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*.** *Medical Mycology*. v. 48, p. 255-262, 2010.
- WALTERS, J.B., RATCLIFFE, N.A. **Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: Fate of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* nodules.** *Journal of Insect Physiology*. v. 29, p. 417-424, 1983.
- WANG, Y., LI, D.D., JIANG, Y.Y., MYLONAKIS, E. **Utility of Insects for Studying Human Pathogens and Evaluating New Antimicrobial Agents.** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. v. 135, p. 1-25, 2013.

- WATABE, H., MIKUNIYA, T., INOUE, S., ABE, S., YAMAGUCHI, H., KONDO, S., TAKEUCHI, T., KLEIN, T.W., FRIEDMAN, H., YAMAMOTO, Y. **Antifungal Antibiotic Benanomicin A Increases Susceptibility of *Candida albicans* to Phagocytosis by Murine Macrophages.** The Journal of Antibiotics. v. 49, p. 1221-1225, 1996.
- WEDDE, M., KOPACEK, C., FRANKE, P., VILCINSKAS, A. **Purification and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*.** European Journal of Biochemistry. v. 255, p. 535-543, 1998.
- WEDDE, M., WEISE, C., NUCK, R., ALTINCICEK, B., VILCINSKAS, A. **The insect metalloproteinase inhibitor gene of lepidopteran *Galleria mellonella* encodes two distinct inhibitors.** Biological Chemistry. v. 388, p. 119-127, 2007.
- WHIBLEY, N., GAFFEN, S.L. **Beyond *Candida albicans* : Mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species.** Cytokine. v. 76, p. 42-52, 2015.
- WU, G., LIU, Y., DING, Y., YI, Y. **Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity.** Tissue and Cell. v. 48, p. 297-304, 2016.
- WU, G., XU, L., YI, Y. ***Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportionate cellular and humoral immuneresponses.** Immunology Letters. v. 174, p. 45-52, 2016.
- YOSHIGA, T., GEORGIEVA, T., DUNKOV, B.C., HARIZANOVA, N., RALCHEV, K., LAW, J.H. ***Drosophila melanogaster* transferrin – Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection.** European Journal of Biochemistry. v. 260, p. 414-420, 1999.
- YOSHIGA, T., HERNANDEZ, V.P., FALLON, A.M., LAW, J.H. **Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection.** Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. v. 94, p. 12337-12342, 1997.
- YUN, E.Y., LEE, J.K., KWON, O.Y., HWANG, J.S., KIM, I., KANG, S.W., LEE, W.J., DING, J.L., YOU, K.H., GOO, T.W. ***Bombyx mori* transferrin: Genomic structure, expression and antimicrobial activity of recombinant protein.** Developmental and Comparative Immunology. v. 33, p. 1064-1069, 2009.
- ZICCARDI, M., SOUZA, L.O.P., GANDRA, R.M., GALDINO, A.C., BAPTISTA, A.R., NUNES, A.P.F., RIBEIRO, M.A., BRANQUINHA, M.H., SANTOS, A.L.S. ***Candida***

parapsilosis (sensu lato) isolated from hospitals located in the southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. International Journal of Medical Microbiology. v. 305, p. 848-859, 2015.

Anexos



Antifungal Potential of Copper(II), Manganese(II) and Silver(I) 1,10-Phenanthroline Chelates Against Multidrug-Resistant Fungal Species Forming the *Candida haemulonii* Complex: Impact on the Planktonic and Biofilm Lifestyles

OPEN ACCESS

Edited by:
 Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa,
 Pontifícia Universidade Católica do
 Paraná, Brazil
Reviewed by:
 Rafael Guerra Lund,
 Universidade Federal de Pelotas,
 Brazil
 Osmar Nascimento Silva,
 Universidade Católica Dom Bosco,
 Brazil
***Correspondence:**
 André L. S. Santos
 andre@micro.ufpr.br
Specialty section:
 This article was submitted to
 Antimicrobials, Resistance and
 Chemotherapy,
 a section of the journal
 Frontiers in Microbiology
Received: 12 May 2017**Accepted:** 23 June 2017**Published:** 11 July 2017**Citation:**
 Gandra RM, Mc Carron P,
 Fernandes MF, Ramos LS, Mello TP,
 Aor AC, Branquinho MH, McCann M,
 Devereux M and Santos ALS (2017)
 Antifungal Potential of Copper(II),
 Manganese(II) and Silver(I)
 1,10-Phenanthroline Chelates Against
 Multidrug-Resistant Fungal Species
 Forming the *Candida haemulonii*
 Complex: Impact on the Planktonic
 and Biofilm Lifestyles.
 Front. Microbiol. 8:1257.
 doi: 10.3389/fmicb.2017.01257

 Rafael M. Gandra^{1,2,3}, Pauraic Mc Carron^{3,4}, Mariana F. Fernandes¹, Livia S. Ramos¹,
 Thais P. Mello¹, Ana Carolina Aor¹, Marta H. Branquinho¹, Malachy McCann⁴,
 Michael Devereux³ and André L. S. Santos^{1,2*}
¹Laboratório de Investigação de Peptidases, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ³The Inorganic Pharmaceutical and Biomimetic Research Centre, Focas Research Institute, Dublin Institute of Technology, Dublin, Ireland, ⁴Chemistry Department, Maynooth University, National University of Ireland, Maynooth, Ireland

Candida haemulonii, *Candida haemulonii* var. *vulnera* and *Candida duobushaemulonii*, which form the *C. haemulonii* complex, are emerging etiologic agents of fungal infections known to be resistant to the most commonly used antifungals. The well-established anti-*Candida* potential of metal complexes containing 1,10-phenanthroline (phen) ligands encouraged us to evaluate different copper(II), manganese(II), and silver(I) phen chelates for their ability to inhibit planktonic growth and biofilm of *C. haemulonii* species complex. Two novel coordination complexes, $[[\text{Cu}(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_2]\cdot 3\text{H}_2\text{O}\cdot \text{EtOH}]_n$ and $[\text{Ag}_2(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_4]\cdot \text{EtOH}$ ($3,6,9\text{-tddaH}_2 = 3,6,9\text{-trioxaundecanedioic acid}$), were synthesized in a similar fashion to the other, previously documented, sixteen copper(II), manganese(II), and silver(I) chelates employed herein. Three isolates of each *C. haemulonii* species complex were used and the effect of the metal chelates on viability was determined utilizing the CLSI standard protocol and on biofilm-growing cells using the XTT assay. Cytotoxicity of the chelates was evaluated by the MTT assay, employing lung epithelial cells. The majority of the metal chelates were capable of interfering with the viability of planktonic-growing cells of all the fungal isolates. The silver complexes were the most effective drugs (overall geometric mean of the minimum inhibitory concentration (GM-MIC) ranged from 0.26 to 2.16 μM), followed by the manganese (overall GM-MIC ranged from 0.87 to 10.71 μM) and copper (overall GM-MIC ranged from 3.37 to >72 μM) chelates. The manganese chelates (CC_{50} values ranged from 234.51 to >512 μM) were the least toxic to the mammalian cells, followed by the silver (CC_{50} values ranged from 2.07 to 13.63 μM) and copper (CC_{50} values ranged from 0.53



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Medical Microbiology

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

Candida parapsilosis (*sensu lato*) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes

Mariangela Ziccardi^{a,b,1}, Lucieri O.P. Souza^{a,1}, Rafael M. Gandra^{a,c},
Anna Clara M. Galdino^{a,c}, Andréa R.S. Baptista^d, Ana Paula F. Nunes^e,
Mariceli A. Ribeiro^e, Marta H. Branquinho^a, André L.S. Santos^{a,c,*}

^a Laboratório de Investigação de Peptidases, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^d Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

^e Departamento de Patologia, Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2015

Received in revised form 28 July 2015

Accepted 10 August 2015

Keywords:

Candida parapsilosis complex

Antifungal susceptibility

Virulence factors

Pseudohyphae

Hydrolytic enzymes

Biofilm

ABSTRACT

Candida parapsilosis (*sensu lato*), which represents a fungal complex composed of three genetically related species – *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*, has emerged as an important yeast causing fungemia worldwide. The goal of the present work was to assess the prevalence, antifungal susceptibility and production of virulence traits in 53 clinical isolates previously identified as *C. parapsilosis* (*sensu lato*) obtained from hospitals located in the Southeast of Brazil. Species forming this fungal complex are physiologically/morphologically indistinguishable; however, polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism of *FKS1* gene has solved the identification inaccuracy, revealing that 43 (81.1%) isolates were identified as *C. parapsilosis sensu stricto* and 10 (18.9%) as *C. orthopsilosis*. No *C. metapsilosis* was found. The geographic distribution of these *Candida* species was uniform among the studied Brazilian States (São Paulo, Rio de Janeiro and Espírito Santo). All *C. orthopsilosis* and almost all *C. parapsilosis sensu stricto* (95.3%) isolates were susceptible to amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole and caspofungin. Nevertheless, one *C. parapsilosis sensu stricto* isolate was resistant to fluconazole and another one was resistant to caspofungin. *C. parapsilosis sensu stricto* isolates exhibited higher MIC mean values to amphotericin B, fluconazole and caspofungin than those of *C. orthopsilosis*, while *C. orthopsilosis* isolates displayed higher MIC mean to itraconazole compared to *C. parapsilosis sensu stricto*. Identical MIC mean values to voriconazole were measured for these *Candida* species. All the isolates of both species were able to form biofilm on polystyrene surface. Impressively, biofilm-growing cells of *C. parapsilosis sensu stricto* and *C. orthopsilosis* exhibited a considerable resistance to all antifungal agents tested. Pseudohyphae were observed in 67.4% and 80% of *C. parapsilosis sensu stricto* and *C. orthopsilosis* isolates, respectively. The secretion of phytase (93% versus 100%), aspartic protease (88.4% versus 90%), esterase (20.9% versus 50%) and hemolytic factors (25.6% versus 40%) was detected in *C. parapsilosis sensu stricto* and *C. orthopsilosis* isolates, respectively; however, no phospholipase activity was identified. An interesting fact was observed concerning the caseinolytic activity, for which all the producers (53.5%) belonged to *C. parapsilosis sensu stricto*. Collectively, our results add new data on the epidemiology, antifungal susceptibility and production of potential virulence attributes in clinical isolates of *C. parapsilosis* complex.

© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

* Corresponding author at: Laboratório de Investigação de Peptidases (LIP), Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Bloco E-subsolo, sala 05, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil.

E-mail address: andre@micro.ufrj.br (A.L.S. Santos).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.08.003>

1438–4221/© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Ziccardi, M., et al., *Candida parapsilosis* (*sensu lato*) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. *Int. J. Med. Microbiol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.08.003>

4

BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGRO&INDÚSTRIA

FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES



colaboradores

CARLOS RICARDO SOCCOL
LUIZ RENATO DE FRANÇA

organizador

RODRIGO RIBEIRO RESENDE

Blucher



11 CAPÍTULO

PEPTIDASES EM BIOTECNOLOGIA: PRODUÇÃO, APLICAÇÕES E MERCADO

Anderson Fragoso dos Santos
Rafael Messias Gandra
Simone Santiago Carvalho de Oliveira
Lucimar Ferreira Kneipp
Claudia Masini d'Avila-Levy
Cátia Lacerda Sodré
Marta Helena Branquinha
André Luis Souza dos Santos

Submetido - Medical Mycology

Running title: TPCK presents potent anti-*Candida parapsilosis* action

The serine peptidase inhibitor TPCK induces several morphophysiological changes in the opportunistic fungal pathogen *Candida parapsilosis sensu stricto*

Rafael M. Gandra^{1,2}, Xênia M. Souto¹, Laura N. Silva¹, Leandro S. Sangenito¹, Lucas P.S. Cruz¹, Lys A. Braga-Silva¹, Diego S. Gonçalves^{1,2}, Sergio H. Seabra³, Marta H. Branquinha¹ and André L. S. Santos^{1,2,*}

¹Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil and ³Laboratório de Tecnologia em Cultura de Células, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, Brazil

* To whom correspondence should be addressed. André L.S. Santos, Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes (LEAMER), Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Bloco E subsolo, Sala 05, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Rio de Janeiro, 21941-902, Brazil. Tel: + 55 21 39380366; E-mail: andre@micro.ufrj.br

Em fase final de redação:

Rafael Messias Gandra; Clarissa Almeida; Pauraic Mc Carron; Leandro Sangenito; Laura Nunes Silva; Malachy Maccan, Michael Devereux; André L. S. Santos - Analysis of different metal-based drugs anti-*Candida* activity, cytotoxicity *in vivo* toxicity evaluation using *Galleria mellonella* model.

Rafael Messias Gandra; Diego Gonçalves, André L. S. Santos - Detection and characterization of secreted serine metallopeptidase in *Candida parapsilosis sensu stricto*

Lucas P. S. Cruz, **Rafael M. Gandra,** Érika A. Abi-chacra, Lucieri O. P. Souza, Lys A. Braga-Silva, Mariangela Ziccardi, Marcos D. Ribeiro & André L. S. Santos - *Candida parapsilosis sensu stricto*: expression of aspartic-type proteases are heterogeneous and strain specific.