



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ADRYELLE IDALINA DA SILVA ALVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-VIRULÊNCIA DE DERIVADOS
TIOFÊNICOS FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida* spp. E SUA
INTERFERÊNCIA NA EXPRESSÃO DE GENES ESPECÍFICOS**

Recife

2024

ADRYELLE IDALINA DA SILVA ALVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-VIRULÊNCIA DE DERIVADOS
TIOFÊNICOS FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida* spp. E SUA
INTERFERÊNCIA NA EXPRESSÃO DE GENES ESPECÍFICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor(a) em Medicina Tropical. Área de concentração: Medicina Tropical.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves

Coorientador: Dr. Cícero Inácio Pinheiro

Recife

2024

Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central.

Alves, Adryelle Idalina da Silva.

Avaliação do potencial anti-virulência de derivados tiofênicos frente a isolados clínicos de *Candida* spp. e sua interferência na expressão de genes específicos / Adryelle Idalina da Silva Alves. - Recife, 2024.
90f.: il.

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências de Médicas, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2024.

Orientação: Rejane Pereira Neves.

Coorientação: Cícero Inácio Pinheiro.

Inclui referências e anexo.

1. Candidemia; 2. Resistência antifúngica; 3. Fatores de Virulência. I. Neves, Rejane Pereira. II. Pinheiro, Cícero Inácio. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

ADRYELLE IDALINA DA SILVA ALVES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-VIRULÊNCIA DE DERIVADOS
TIOFÊNICOS FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida* spp. E SUA
INTERFERÊNCIA NA EXPRESSÃO DE GENES ESPECÍFICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Ciências Médicas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical. Área de concentração: Medicina Tropical.

Aprovado em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves (Orientadora e Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Rossana de Aguiar Cordeiro (Examinadora Externo)
Universidade Federal do Ceará -UFC

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Examinador Externo)
Universidade Regional do Cariri -URCA

Prof^a. Dr^a. Dyana Leal Veras (Examinadora Externo)
Instituto Aggeu Magalhães

Prof^a. Dr^a. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo (Examinadora Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

À minha família, por todo o incentivo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por permitir mais essa conquista em minha vida.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, ao Centro de Pesquisas Ageu, ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) Magalhães e aos Laboratórios de Micologia Médica Sylvio Campos e Imunodiagnóstico pela infraestrutura disponibilizada para realização dos experimentos.

Agradeço aos meus pais, Roselena da Silva Pontes e Rogério da Silva Alves, responsáveis pela pessoa que me tornei, e que sempre fizeram de tudo para que eu conquistasse meus objetivos, me incentivando e acreditando em minha capacidade. Aos meus irmãos, Roger e Iasmim por todo o apoio e incentivo, e ao meu namorado, Diego, por toda a paciência, incentivo e apoio em minha carreira acadêmica. A vocês dedico todo o meu amor e carinho.

Agradeço a minha orientadora Prof.^a Rejane Neves, pela oportunidade, e por todo o apoio e confiança em mim depositada, e por sempre contribuir para o aperfeiçoamento do meu perfil profissional.

Ao meu coorientador, Cícero Pinheiro, por todos os ensinamentos e suporte que promoveram o meu crescimento profissional.

A professora Danielle Macêdo por sempre estar presente e disposta a ajudar, e por todos os ensinamentos transmitidos na docência e pesquisa científica.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos amigos e professores do Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos e Imunodiagnóstico por toda ajuda nos experimentos, momentos de descontração, e por estarem sempre ao meu lado.

A todos os que direta ou indiretamente fizeram parte desta conquista.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”. (Claude Lévi-Strauss).

RESUMO

A candidemia é a infecção fúngica invasiva mais comum associada a cuidados intensivos, com uma mortalidade que pode chegar a até 55% em alguns centros médicos. Essas infecções apresentam alta taxa de mortalidade, devido ao número limitado de antifúngicos disponíveis para o tratamento, alguns dos quais apresentam elevada toxicidade e alto custo. Aliado a isso, as espécies de *Candida* tem se tornado um desafio médico devido ao aumento do número de casos de resistência nos últimos anos. Atualmente, sabe-se que as infecções por estas leveduras são influenciadas por uma gama de fatores de virulência, principalmente por fatores como adesão, transição morfológica e formação de biofilmes. Os biofilmes são comunidades microbianas inerentemente resistentes à maioria dos antifúngicos, o que os torna particularmente difíceis de tratar e estima-se que aproximadamente 90% dos casos de candidemia ocorrem associadas a biofilmes. Portanto, há uma necessidade urgente de desenvolver medicamentos alternativos, que superem ou aumente a eficácia das terapias já utilizadas. Para tal, visar os fatores de virulência é considerada uma abordagem promissora para identificar novos alvos potenciais de drogas antifúngicas. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação antifúngica e antivirelência de dois compostos tiofênicos (2AT e 2B-amino) contra cepas de *Candida* spp. resistentes ao antifúngico fluconazol. Ao determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM), verificou-se que os compostos possuíam ação antifúngica nas concentrações de 100 a 200 µg/mL. Além disso, também foi observado forte efeito sinérgico com o fluconazol. A ação antibiofilme dos compostos em concentrações subinibitórias, isoladamente e em associação com fluconazol também foi detectada. Estruturalmente observou-se que apenas o composto 2AT conseguiu causar alterações em *Candida*. No entanto, foi demonstrado alterações celulares compatíveis com necrose e apoptose, indicando o possível mecanismo de ação dessas moléculas. Para determinar a causa dessas alterações, foi analisada e detectada a produção de reativas de oxigênio por *Candida*. Adicionalmente, esta pesquisa também teve como objetivo avaliar a ação dos compostos na expressão dos genes relacionados a virulência e resistência fúngica. No qual foi detectado supressão dos genes ALS3 e ERG3. No mais, os compostos não apresentaram toxicidade em células de macrófagos J774 até a concentração de 4000 µg/mL. Este trabalho, descreve a ação de dois compostos tiofenos como uma alternativa futura para terapia de candidíase

invasiva, especialmente em casos de isolados resistentes a terapia convencional; além de destacar a promessa de uma estratégia combinada com fluconazol no combate a infecções por *Candida*, eficaz também na prevenção de biofilmes por estas leveduras.

Palavras-chave: *Candida*, antibiofilme, resistência antifúngica, virulência, EROS, antifúngicos, tiofenos.

ABSTRACT

Candidemia is the most common invasive fungal infection associated with intensive care, with a gross mortality rate that can reach up to 55% in some medical centers. These infections have a high mortality due to the limited number of antifungals available for treatment, some of which are highly toxic and expensive. In addition, *Candida* species have become a medical challenge due to the increase in the number of cases of resistance in recent years. It is now known that infections by these yeasts are influenced by a range of virulence factors, mainly by factors such as adhesion, morphological transition and biofilm formation. Biofilms are microbial communities that are inherently resistant to most antifungals, which makes them particularly difficult to treat and it is estimated that approximately 90% of candidemia cases occur associated with biofilms. Therefore, there is an urgent need to develop alternative drugs that surpass or increase the efficacy of the therapies already used. To this end, targeting virulence factors is considered a promising approach to identify new potential targets for antifungal drugs. Therefore, the present study aimed to evaluate the antifungal and antiviral action of two thiophenic compounds (2AT and 2B-amino) against *Candida* spp. strains resistant to the antifungal agent fluconazole. By determining the minimum inhibitory concentrations (MIC), it was found that the compounds had antifungal action at concentrations of 100 to 200 µg/mL. In addition, a strong synergistic effect with fluconazole was also observed. The antibiofilm action of the compounds at subinhibitory concentrations, alone and in combination with fluconazole, was also detected. Structurally, it was observed that only the compound 2AT was able to cause changes in *Candida*. However, cellular changes compatible with necrosis and apoptosis were demonstrated, indicating the possible mechanism of action of these molecules. To determine the cause of these changes, the production of reactive oxygen species by *Candida* was analyzed and detected. Additionally, this research also aimed to evaluate the action of the compounds on the expression of genes related to virulence and fungal resistance. In which the suppression of the ALS3 and ERG3 genes was detected. Furthermore, the compounds did not show toxicity in J774 macrophage cells up to the concentration of 4000 µg/mL. This work describes the action of two thiophene compounds as a future alternative for the treatment of invasive candidiasis, especially in cases of isolates resistant to conventional therapy; in addition, it highlights the

promise of a combined strategy with fluconazole in the fight against *Candida* infections, also effective in the prevention of biofilms by these yeasts.

Keywords: *Candida*, antibiofilm, antifungal resistance, virulence, ROS, antifungals, thiophenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Estágios da patogênese de *C. albicans*. (A) Levedura ligam-se a células epiteliais e formam pseudohifas. (B) Hifas invadem as células epiteliais via endocitose induzida (esquerda) ou penetração ativa (meio). Durante a endocitose induzida, a *Als3* e a *Ssa* interagem com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), uma proteína relacionada (*HER2*) e E-caderina na junção aderente. As hifas também podem se alongar e causar danos mecânicos às células hospedeiras (direita). (C) As células hifais interepiteliais extensamente alongadas liberam vários fatores de virulência, como: candidalísina, aspartil proteinases secretadas (*Sap*), fosfolipase B (*Plb*) e lipase (*Lip*). 29
- Figura 2 – Estágios de formação e desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*. (A) Fixação inicial das leveduras a uma superfície por meio de adesinas (*Als*). (B) Proliferação e filamentação: as leveduras fazem a transição para hifas e esse processo é regulado por muitos fatores de transcrição (*Tec1p* e *Efg1p*) e adesinas específicas (*Hwp1p* e *Hyr1p*). (C) Maturação do biofilme e formação da matriz extracelular, regulada pelo TF *Rlm1p*. (D) Dispersão do biofilme: células se dispersam do biofilme para colonizar outras partes do corpo. 31
- Figura 3 – Mecanismo de ação das equinocandinas. 37
- Figura 4 – Mecanismo de ação dos azóis. Os azóis exercem atividade fungistática ao inibir a lanosterol 14- α -desmetilase (codificada por *ERG11*), o que leva a um bloqueio na síntese de ergosterol e ao acúmulo de intermediários de esteróis tóxicos, incluindo 14- α -metil-3,6-diol produzido por *Erg3*. 38
- Figura 5 – Mecanismo de ação da anfotericina B e estrutura antifúngicas. (A) Polienos, como a anfotericina B, atuam 40

	formando agregados extramembranosos que extraem ergosterol de bicamadas lipídicas.	
Figura 6 –	Estrutura típica do anel tiofeno.	43
Figura 7 –	Estrutura química do isopropil 2-amino-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carboxilato (2AT).	46
Figura 8 –	Estrutura química do 2-(Benzylideneamino)-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]-tefteno-3-carbonitrile (2B-amino).	47
Gráfico 1 –	Formação de biofilme por isolados clínicos de <i>Candida</i> spp.	61
Gráfico 2 –	Efeito antibiofilme <i>in vitro</i> de cepas de <i>Candida</i> tratadas com 2AT. Os dados demonstram a atividade do composto e fluconazol isoladamente, e em combinação por 24 e 48 horas.	64
Gráfico 3 –	Efeito antibiofilme <i>in vitro</i> de cepas de <i>Candida</i> tratadas com 2B-amino. Os dados demonstram a atividade do composto e fluconazol isoladamente, e em combinação por 24 e 48 horas.	65
Figura 9 –	Micrografias eletrônicas <i>C. albicans</i> ATCC 14053 (AB) na ausência do composto 2AT e (CD) sob efeito do composto. A) Presença de numerosas células fúngicas, filamentos de hifa e produção de biomassa (ponta de seta). B) Células fúngicas apresentam paredes intactas e lisas, com presença de cicatrizes polares (setas brancas). C) Sob efeito do composto tiofeno, há redução significativa de células e biomassa. D) Células tratadas com 2AT, apresentando paredes celulares rugosas (setas brancas).	66
Figura 10 –	Micrografias eletrônicas de <i>C. albicans</i> ATCC 14053 na ausência de 2B-amino (AB) e tratada em uma concentração subinibitória de 12,5 µg/mL (CD). A) Presença de numerosas células de levedura isoladas e filamento de hifas (seta vermelha). B) Células de <i>Candida</i> mostrando superfícies lisas e cicatrizes polares (asteriscos). C) Células fúngicas expostas a 2B-amino mostrando número reduzido de células	67

- e ausência de hifas. D) Células tratadas com tiofeno mostrando um pequeno aglomerado de células interconectadas, presença de cicatrizes polares (setas) e presença de alguns brotos nas extremidades (ponta de seta).
- Figura 11 – Micrografias de transmissão de células *C. albicans* ATCC 14053 na ausência de 2AT (AB) e tratadas em concentração subinibitória (CD). AB) Células de *C. albicans* não tratadas, mostrando núcleos (n) e mitocôndrias (pontas de setas brancas). CD) Células de *C. albicans* tratadas com o derivado de tiofeno, mostrando inchaço mitocondrial (m), espessamento da parede celular (seta vermelha) e desintegração da membrana (setas pretas) e migração da cromatina (asterisco branco), e presença de agregações de pequenos vacúolos (pontas de setas brancas) presentes em processos de apoptose e necróticos. 68
- Figura 12 – Micrografias eletrônicas de transmissão de *C. albicans* ATCC 14053 na ausência do composto 2B-amino (AB) e tratadas com o composto em uma concentração subinibitória de 12,5 µg/mL (CDEF). A) Células de *C. albicans* não tratadas, mostrando núcleos (n) em aumento de 500 nm. B) Visualização do núcleo e da parede de *Candida* mostrando a espessura fina da parede celular, bem como a ausência de alterações na parede e na membrana em aumento de 200 nm. CD) Células de *Candida* tratadas com o composto, mostrando retração nuclear (n*), mitocôndrias (ponta de seta), espessamento da parede celular (seta vermelha) e a presença de agregações de pequenos vacúolos (asteriscos vermelhos). EF) *Candida* em aumento de 200 nm evidenciando espessamento da parede celular (seta vermelha), irregularidades e lesões na membrana (seta azul). 70
- Gráfico 4 – Viabilidade celular do composto 2AT e 2B-amino em células de macrófagos J774. Dados obtidos através da redução do MTT, demonstrando a viabilidade celular (em porcentagem) 71

de macrófagos quando expostos a concentrações dos compostos, variando entre 250 e 4000 µg/ml.

- Figura 13 – Intensidades de fluorescência em células da cepa ATCC 14503 de *C. albicans* tratadas (6,25 e 12,45 µg/mL), não tratadas (controle) com 2AT e marcadas com DCFH-DA. 72
- Figura 14 – Intensidades de fluorescência em células da cepa HG 04 *C. albicans* tratadas (6,25 e 12,45 µg/mL), não tratadas (controle) com 2AT e marcadas com DCFH-DA. 73
- Figura 15 – Intensidades de fluorescência em células da cepa ATCC 14503 de *C. albicans* tratadas (6,25 e 12,45 µg/mL), não tratadas (controle) com 2B-amino e marcadas com DCFH-DA. 73
- Figura 16 – Intensidades de fluorescência em células da cepa HG 04 *C. albicans* tratadas (6,25 e 12,45 µg/mL), não tratadas (controle) com 2B-amino e marcadas com DCFH-DA. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados no estudo para RT-qPCR.	55
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração inibitória fracionada (CIF) do fluconazol (FLZ) e 2-amino-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carboxilato (2AT) contra leveduras clínicas do gênero <i>Candida</i> spp.	58
Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração inibitória fracionada (CIF) do fluconazol (FLZ) e 2-(Benzilidenoamino)-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclohepta[b]-tefteno-3-carbonitrila (2B-A) contra leveduras clínicas do gênero <i>Candida</i> spp.	59
Tabela 4 – Níveis de expressão dos genes alvos nas cepas de <i>C. albicans</i> frente composto 2AT.	75
Tabela 5 – Níveis de expressão dos genes alvos nas cepas de <i>C. albicans</i> frente composto 2B-amino	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	CANDIDIASE INVASIVA E CANDIDEMIA	19
2.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICO DA CANDIDEMIA	20
2.3	DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES	22
2.4	FATORES DE RISCO	24
2.5	PATOGÊNESE DA CANDIDÍASE INVASIVA	25
2.6	FATORES DE VIRULÊNCIA	26
2.6.1	Adesão e invasão das células hospedeiras	27
2.6.2	Biofilmes	30
2.7	DIAGNÓSTICO	34
2.8	TRATAMENTO	35
2.8.1	Equinocandinas	36
2.8.2	Azóis	37
2.8.3	Polienos	39
2.9	RESISTENCIA ANTIFÚNGICA	42
2.10	COMPOSTOS TIOFÊNICOS	42
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVOS GERAIS	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	CEPAS	46
4.2	OS COMPOSTOS	46
4.3	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i>	47
4.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DOS DERIVADOS	48
4.4.1	Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FIC)	48
4.5	PRODUÇÃO DE BIOFILMES E EFEITO ANTIBIOFILME	48
4.5.1	Formação dos biofilmes <i>in vitro</i>	48
4.5.2	Avaliação do efeito antibiofilme dos compostos	49
4.5.3	Análise estatística	50
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	50

4.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	50
4.8	CITOTOXICIDADE	51
4.8.1	Cultura de Macrófagos	51
4.8.2	Análise de citotoxicidade de compostos	51
4.9	PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	52
4.10	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES ALS3, UM6 E ERG3	52
4.10.1	Detecção dos genes alvos	52
4.10.2	Extração e quantificação do RNA	53
4.10.3	RT-PCR e PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	55
5	RESULTADOS	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
	REFERÊNCIAS	78
	APENDICE A – ARTIGO 1	87

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas são consideradas um sério problema de saúde pública e sua incidência tem aumentado significativamente nos últimos anos. Dentre estas, as infecções por espécies de *Candida* são as mais predominantes em seres humanos, representando cerca de 90% dos casos. As infecções sanguíneas causadas por estes microrganismos representam a maioria das infecções nosocomiais, com uma mortalidade atribuível de até 55% (LASS-FLÖRL et al., 2024; MCCARTY; WHITE; PAPPAS, 2021).

Os casos de candidíase invasiva são geralmente adquiridos no ambiente hospitalar, principalmente em unidades de terapia intensiva, um terço dos casos ocorrendo em pacientes imunocomprometidos. E, apesar do significativo progresso com relação ao manejo de pacientes com candidíase invasiva, o aparecimento de cepas resistentes a antifúngicos tem se tornado um problema devido à profilaxia e estratégias de tratamento empírico (LASS-FLÖRL et al., 2024).

Além disso, a suscetibilidade antifúngica pode variar conforme a espécie de *Candida* e mesmo em linhagens da mesma espécie; enquanto, o desenvolvimento de resistência pode ocorrer em qualquer classe de antifúngicos, dificultando assim seu tratamento (LOGAN; MARTIN-LOECHES; BICANIC, 2020).

O surgimento da resistência antifúngica é uma ameaça presente devido ao limitado arsenal antifúngico disponível para o tratamento destas infecções. A escassez de classes de medicamentos antifúngicos, juntamente com a plasticidade intrínseca do genoma fúngico, promove a adaptação e a sobrevivência fúngica sob estresse de medicamentos antifúngicos (MURPHY; BICANIC, 2021).

Além disso, outros fatores podem influenciar no perfil de suscetibilidade destas espécies. A virulência de *Candida* está relacionada ao aumento da resistência por estas leveduras, uma vez que caracterizam a patogenicidade atribuída a um conjunto de fatores de virulência que facilitam a colonização e a infecção do hospedeiro. Supõe-se que uma das principais contribuições para a virulência das espécies de *Candida* seja sua versatilidade em adaptar-se a uma variedade de habitats diferentes (ARAÚJO; HENRIQUES; SILVA, 2017).

A transição da forma de levedura para hifas, a formação de biofilme e a produção de enzimas hidrolíticas são as principais responsáveis no desenvolvimento de falha terapêutica. Estudos relatam que estes contribuem com cerca de 80% das falhas terapêuticas observadas em diversos estudos nas últimas décadas (ARUMUGAM et al., 2019).

A capacidade de adesão e produção de biofilme por *Candida* spp. também estão entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento da forma disseminada da infecção e, a formação de biofilmes foi altamente associada à candidemia persistente (KIOSHIMA et al., 2019).

Apesar de dificultar o tratamento, estes fatores e seus inibidores têm sido consideravelmente investigados e caracterizados; uma vez que, o direcionamento da virulência no desenvolvimento de antifúngicos tem relevância sobre outras estratégias terapêuticas, ao indicar possíveis alvos necessários para a descoberta de novos candidatos a medicamentos (KHAN et al., 2020).

A família dos genes ALS codifica as glicoproteínas de parede celular relacionadas à adesão às superfícies do hospedeiro. As proteínas ALS são reconhecidas por desempenhar um papel na adesão e na formação inicial de biofilmes. Como a formação de biofilme contribui para a resistência aos medicamentos, os genes ALS parecem ser responsáveis pela resistência ao fluconazol em algumas espécies. Dentre estas, a adesina ALS3, codificada pelo gene ALS3 medeia a adesão ao epitélio, células endoteliais e proteínas da matriz extracelular. Também desempenha um papel essencial na formação de biofilme e invasão tecidual porque se liga a receptores de células hospedeiras (OLIVER et al., 2019).

Ainda com relação a mudanças morfológicas, o gene UME6 é um regulador específico da transição dos filamentos, e seu papel é determinante na morfologia. Estudos mostram que a ausência de expressão de UME6 faz com que as células cresçam como leveduras. Conseqüentemente, baixos níveis na expressão destes genes fazem as células exibirem principalmente a morfologia de pseudo-hifas e em altos níveis de expressão de UME6 as células formam uma rede quase completa de hifas (OLIVER et al., 2019).

Outro gene importante, não apenas na resistência, mas também na patogênese de *Candida* é o ERG3. Este gene é responsável pelo bloqueio de uma etapa tardia da biossíntese de ergosterol, alterações na sua expressão pode

resultar em anormalidades na membrana e hipersensibilidade a alguns estresses fisiológicos. Além disso, perda de atividade de ERG3 também é associada a defeitos no crescimento hifal, uma das principais determinantes da virulência (HIRAYAMA et al., 2021).

Muitos dos fatores de virulência de *Candida* já foram investigados e caracterizados, no entanto, o uso direcionado da inibição desses fatores de virulência permanece superficialmente explorado. Estudos recentes já demonstraram que conversões morfogenéticas podem ser controladas *in vitro* e *in vivo*, além disso há evidências convincentes do papel da filamentação na progressão para a infecção ativa, bem como a validação genética de que a filamentação pode ser direcionada no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (KHAN et al., 2020).

Como alternativa para a resistência cada vez mais presente, visar os fatores de virulência, os quais são processos essenciais para agentes infecciosos, representa um alvo promissor para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (LOHSE et al., 2020).

Na química medicinal, os tiofenos são uma classe versátil de compostos heterocíclicos contendo enxofre, na qual uma estrutura molecular simples consegue fornecer ligantes para diversos alvos. Vários estudos confirmam que pequenas substituições na estrutura do tiofeno causam grandes diferenças nos perfis biológicos e farmacológicos. As propriedades descritas na literatura incluem: anti-inflamatória, antitumoral, anticonvulsivante e antiarrítmica. Essas estruturas também exibem atividade promissora contra microrganismos devido às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antiprotozoárias (ARCHNA; PATHANIA; CHAWLA, 2020).

Neste contexto, o presente trabalho descreve a atividade antifúngica e antibiofilme de dois compostos tiofenos isoladamente e em associação com o antifúngico fluconazol frente a cepas de *Candida* resistentes. Além disso, também buscou compreender as bases do mecanismo de ação dos compostos nas células fúngicas através da detecção de alterações estruturais e celulares, bem como a influência destes compostos nos principais genes associados a virulência e resistência nas células de *Candida*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CANDIDÍASE INVASIVA E CANDIDEMIA

A Candidíase é uma infecção oportunista causada por leveduras do gênero *Candida*. Geralmente, essas infecções podem variar de doenças superficiais leves, como infecções de pele, cabelo e unhas, a manifestações sistêmicas, como infecções da corrente sanguínea. Além disso, podem se desenvolver de forma aguda, subaguda ou crônica e frequentemente resulta em micoses fatais (OLIVER et al., 2019).

Há muito tempo está estabelecido que estas leveduras estão entre as causas mais relevantes de infecções fúngicas. A candidíase foi atribuída a mais de 400.000 casos por ano em todo o mundo com uma taxa de mortalidade de 46–75% (BOHNER; PAPPAS; GÁCSEK, 2022).

De forma geral, a candidíase se refere a infecções cutâneas, mucosas e de órgãos profundos que podem ocorrer em qualquer idade e que geralmente estão associadas a fatores de risco facilmente identificáveis. Enquanto a candidíase invasiva, pode se referir a infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp., ou seja, a candidemia. Assim como, pode se referir a infecções profundas, localizadas, com, ou sem a presença da candidemia. É importante destacar que a candidíase e candidemia de forma concomitantes, ocorrem em 6,2% de todos os casos de candidemia (GONZALEZ-LARA; OSTROSKY-ZEICHNER, 2020; PAPPAS et al., 2018)

A candidíase invasiva é um termo utilizado para designar três condições clínicas: candidemia, candidíase profunda e candidíase profunda com candidemia associada. Estas infecções, apesar de semelhantes, possuem particularidades que as tornam diferentes entre si (LOGAN; MARTIN-LOECHES; BICANIC, 2020; TORTORANO et al., 2021).

As infecções invasivas causadas por *Candida* spp. ocorrem mais frequentemente em seres humanos por meio de reservatórios endógenos. Visto que essas espécies são organismos comensais e, estão presentes na pele e nas mucosas da cavidade oral e dos tratos gastrointestinal e geniturinário (LASS-FLÖRL et al., 2024; LOGAN; MARTIN-LOECHES; BICANIC, 2020).

A candidíase invasiva possui sinais e sintomas inespecíficos. O quadro infeccioso apresenta síndrome de resposta inflamatória sistêmica, variando de febre mínima a choque séptico com falência de múltiplos órgãos, sendo indistinguível de infecção bacteriana grave (GONZALEZ-LARA; OSTROSKY-ZEICHNER, 2020; LASS-FLÖRL et al., 2024).

Pode se espalhar por disseminação hematogênica para múltiplas vísceras, causando micro abscessos hepatoesplênicos ou renais, endocardite, endoftalmite ou envolvimento do sistema nervoso central. Os sintomas de envolvimento ocular em pacientes com candidemia incluem visão turva, fotossensibilidade e moscas-volantes. Manifestações cutâneas na candidíase disseminada são comumente relatadas como pápulas assintomáticas e eritematosas. A endocardite por *Candida* é pouco frequente e a apresentação clínica é semelhante à endocardite bacteriana (GONZALEZ-LARA; OSTROSKY-ZEICHNER, 2020; LASS-FLÖRL et al., 2024).

A candidemia é a manifestação mais diagnosticada dentre as infecções por *Candida*, com candidíase disseminada afetando órgãos únicos ou múltiplos. Os casos são frequentemente adquiridos em hospitais, e pacientes gravemente enfermos são particularmente vulneráveis, com aproximadamente um terço de toda a candidemia ocorrendo neste cenário (LOGAN; MARTIN-LOECHES; BICANIC, 2020).

2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA CANDIDEMIA

A incidência da candidemia conforme a região geográfica, epidemiologia local, idade dos pacientes e outros fatores de risco associados. Nas últimas décadas houve um aumento de 50% na incidência de candidemia em todo o mundo, associada a uma taxa de mortalidade bruta geral entre 40 e 60%. A mortalidade atribuível variando de 5% a 49% dependendo do grupo de pacientes avaliados, e das comorbidades associadas (POISSY et al., 2020).

Nesta população, a candidemia é a principal causa de mortes referentes a doenças adquiridas em hospitais. Pesquisas indicam que cerca de 15% dos casos de sepse se originam devido a dispositivos médicos. Ainda de acordo com alguns relatórios recentes, 63,5% dos pacientes de 224 pacientes que sofrem de

choque séptico e apresentaram hemocultura positiva para *Candida* resultam em óbito (POISSY et al., 2020).

No entanto, esses números podem ser subestimados visto que em alguns centros médicos, os casos de candidemia não são diagnosticados em tempo hábil. Na Índia, apenas 6 a 18% dos casos de candidemia são relatados. Além disso, pesquisas apontam que os episódios que tendem a se repetir, durante o tempo de internação. Alguns dados demonstraram que podem ocorrer até 53 episódios repetidos de candidemia em 48 pacientes no intervalo de 1,5 anos (POISSY et al., 2020).

O número de casos são notavelmente maior em pacientes hospitalizados, com a maior incidência em pacientes internados em unidades terapia intensiva. Neonatos, especialmente se nascidos prematuros, também estão em maior risco de candidemia. Consistente com outras faixas etárias, a maioria desses neonatos que se encontra na UTI, tem um cateter venoso central e recebe nutrição parenteral. A maioria dos dados disponíveis diz respeito à candidemia; no entanto, a incidência de candidíase abdominal invasiva sem ou apenas candidemia transitória é provavelmente muito maior (LASS-FLÖRL et al., 2024).

Análises multicêntricas relatam uma taxa de incidência geral de 3,88 por 100.000 habitantes por ano, com uma tendência crescente da década de 90 para os períodos seguintes. Essa tendência pode ser justificada pelo aumento progressivo da população de alto risco relacionado à sobrevida prolongada de pacientes gravemente enfermos e ao envelhecimento da população (TORTORANO et al., 2021).

Atualmente, a candidemia é a quarta principal causa de infecções nosocomiais da corrente sanguínea nos Estados Unidos da América (EUA) e a sétima na Europa. Em outras regiões como a China chegam a 0,32 para 1.000 admissões, 0,76 na Espanha e de até 2,5 casos no Brasil (BARANTSEVICH; BARANTSEVICH, 2022).

Em países da América do Norte e da Europa há um aumento do número de casos entre idosos e populações imunocomprometidas. Como consequência, há um aumento do número das taxas de mortalidade ao longo do tempo. Essas mudanças epidemiológicas não foram observadas apenas na Europa e na América do Norte, mas também na Ásia e no hemisfério sul (LASS-FLÖRL et al., 2024).

Pra os casos de candidemia, as taxas de mortalidade são notavelmente mais elevadas nos países da América Latina quando comparadas com as dos países europeus. Quanto a estes dados, uma série recente de estudos de 21 anos de candidemia no Brasil, apontam que as taxas de mortalidade chegam a 59%. Particularmente no Brasil, as tendências da mortalidade praticamente não mudaram nos últimos vinte anos. Alguns fatores contribuem para essas porcentagens, incluindo educação insuficiente em cuidados de saúde e controle de infecções, bem como diferenças nas práticas profiláticas e empíricas (AGNELLI et al., 2022).

2.3 DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES

O gênero *Candida* inclui cerca de 150 espécies, sendo várias destas endossimbiontes em seres humanos, causando infecções principalmente em hospedeiros imunossuprimidos. Dentre as espécies pelo menos 17, são associadas as infecções e mais de 95% das doenças invasivas são causadas por cinco patógenos: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (CIUREA et al., 2020; GONZALEZ-LARA; OSTROSKY-ZEICHNER, 2020).

Um estudo retrospectivo relatou as últimas estatísticas globais de 1997 a 2016 isolaram vinte mil cepas de *Candida* spp. de locais estéreis e observaram que *C. albicans* era responsável por 46,9%. Esses dados não sofreram alterações ao longo dos anos, visto que *C. albicans* ainda é relatada como a causa mais frequente de candidemia e infecções invasivas (BOHNER; PAPP; GÁCSER, 2022).

E, embora continue sendo o patógeno mais comumente associado a infecções fúngicas invasivas, a prevalência de outras espécies vem aumentando ao longo do tempo. Uma das razões por trás dessa mudança de distribuição está relacionada à resposta caracteristicamente diversa aos antifúngicos por diferentes espécies de *Candida* (TORTORANO et al., 2021).

Entre as espécies não-*albicans*, *C. glabrata* é a causa mais prevalente de candidíase invasiva, com um número consistentemente crescente de casos relatados nos últimos anos. Além disso, é a espécie mais frequentemente isolada em pacientes idosos, 22% dos casos acometendo pacientes com idade superior

a 70 anos, resultando em uma maior distribuição geográfica em países de rendimento elevado e regiões com populações envelhecidas (LASS-FLÖRL et al., 2024; LEE et al., 2021).

Na América do Sul, relatórios publicados durante os últimos cinco anos indicam que *C. albicans* continua sendo a espécie mais prevalente, enquanto a espécie não albicans mais frequente é *C. parapsilosis*, seguida por diferentes espécies, dependendo do país. Além disso, alguns estudos demonstraram que o complexo de espécies *C. parapsilosis* infectam frequentemente neonatos e bebês, 28–42% dos casos de candidemias nessas faixas etárias (LASS-FLÖRL et al., 2024; RIERA et al., 2022).

C. parapsilosis é uma ameaça bem conhecida para pacientes submetidos a intervenções médicas invasivas, por ser considerada uma das principais causas de infecções relacionadas a cateteres. Além disso, consegue produzir biofilmes robustos em cateteres venosos centrais e outros implantes médicos. O complexo *C. parapsilosis* inclui três espécies diferentes: *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* (RIERA et al., 2022).

Na região central da Argentina, pacientes com infecções sistêmicas em UTIs tiveram uma prevalência de 48% para *C. albicans*, seguido por 28% para *C. parapsilosis*. Essas duas espécies foram as únicas isoladas em pacientes com menos de 60 anos, enquanto os idosos também foram infectados com *C. tropicalis* (8,7%), *C. krusei* (5,7%) e *C. glabrata* (2,3%) em uma proporção menor (RIERA et al., 2022).

Recentemente, uma nova espécie de *Candida* surgiu como uma emergência de saúde pública. *C. auris* foi descrita pela primeira vez no canal auditivo de um paciente no Japão em 2009. Esta espécie surgiu e se espalhou rapidamente para diferentes partes do mundo e se tornou uma preocupação devido a resistência aos antifúngicos comumente usados, limitando drasticamente as opções terapêuticas e associada a altas taxas de mortalidade (30–60%) (LASS-FLÖRL et al., 2024).

O primeiro surto relatado de *C. auris* na América ocorreu na Venezuela em março de 2012. Desde então, diferentes países americanos publicaram surtos e casos isolados. Entre eles estão a Colômbia, os Estados Unidos, o Panamá e o Canadá, a Costa Rica e o Chile, bem como o Peru e o Brasil em 2020. Este organismo multirresistente está causando surtos nosocomiais em

ambientes de terapia intensiva em populações pediátricas e adultas (GONZALEZ-LARA; OSTROSKY-ZEICHNER, 2020).

2.4 FATORES DE RISCO

Os fatores de risco para candidemia são diferentes entre pacientes hospitalizados dentro e fora das UTIs. Fatores importantes que contribuem para o risco de candidíase invasiva na UTI incluem o uso de antimicrobianos de amplo espectro, medicamentos imunossupressores e nutrição parenteral. Isso ocorre juntamente como causas iatrogênicas do rompimento de barreiras naturais por uso de cateteres e outros dispositivos médicos invasivos (MCCARTY; WHITE; PAPPAS, 2021).

A imunossupressão intrínseca ou adquirida aumenta significativamente a suscetibilidade à candidíase invasiva. Pacientes em extremos de idade, portadores de diabetes mellitus e pessoas com infecções virais graves, como a COVID-19, apresentam resposta imunológica comprometida ou disfuncional, proporcionando um ambiente ideal para as espécies de *Candida* invadirem os tecidos e órgãos (LASS-FLÖRL et al., 2024).

Há também fatores epidemiológicos que influenciam o risco de candidíase invasiva que incluem disparidades étnicas, raciais, específicas de gênero e específicas de sexo. O sexo masculino é frequentemente relatado como um fator de risco para candidíase invasiva, com uma incidência de 8 casos a cada 100.000 em pacientes do sexo masculino em comparação com 6 por 100.000 em pacientes do sexo feminino (LASS-FLÖRL et al., 2024).

Nos EUA pacientes negros são frequentemente afetados desproporcionalmente, com incidência 2,3 vezes maior. Isso se deve presumivelmente como consequência de fatores socioeconômicos, incluindo acesso precário a serviços de saúde e maiores taxas de doenças subjacentes que comprometem a resposta imune, como doença renal crônica que requer hemodiálise e doença hepática (LASS-FLÖRL et al., 2024).

2.5 PATOGÊNESE DA CANDIDÍASE INVASIVA

As espécies de *Candida* são patógenos adaptados ao hospedeiro humano e podem se comportar como microrganismos comensais ou oportunistas. Em condições normais, colonizam a pele e a mucosa em indivíduos saudáveis. Seu crescimento é estritamente controlado pelo sistema imunológico do hospedeiro e por mecanismos reguladores fornecidos pela microbiota normal (RIERA et al., 2022).

No entanto, alterações neste equilíbrio, como rompimento da pele e membranas mucosas, permitem a translocação intestinal ou acesso à corrente sanguínea. Isto, somado ao comprometimento das defesas do hospedeiro, determinam o crescimento excessivo do fungo. Estas leveduras podem colonizar praticamente qualquer tecido e as manifestações clínicas são diversas dependendo do local afetado, entretanto, a preferência por um órgão específico depende na maioria das vezes, da via de infecção, características intrínsecas do patógeno e condições subjacentes de cada paciente (PAPPAS et al., 2018).

Características do sistema imunológico do hospedeiro também são determinantes para o estabelecimento da candidíase. Mais especificamente, o sistema imunológico inato desempenha um papel muito importante na luta antifúngica. Durante a tentativa de estabelecimento da infecção, os neutrófilos, por mecanismos oxidativos ou pela liberação de armadilhas extracelulares, inibem a conversão de levedura em hifas. Os monócitos e macrófagos, juntamente com o sistema de complemento, agem sinergicamente para reconhecer padrões moleculares fúngicos específicos (ácidos nucleicos, manana, -glucana), e induzem a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que modulam a resposta imune do hospedeiro (GONZALEZ-LARA; OSTROSKY-ZEICHNER, 2020).

Além disso, devido ao seu caráter oportunista, e além da resposta imunológica do hospedeiro, a presença de fatores de risco também representa um papel importante durante o processo infeccioso. O uso de antibióticos de amplo espectro altera a composição das bactérias comensais competitivas na microbiota, levando ao crescimento excessivo de *Candida* em membranas mucosas e trato genitourinário. Quanto a isolados exógenos de *Candida*, estes, colonizam a pele e aderem para formar biofilmes em superfícies corporais e

dispositivos médicos, como dispositivos intravenosos ou cateteres urinários (CIUREA et al., 2020)

Traumas induzidos por quimioterápicos também contribuem para infecções invasivas. Após a translocação, as leveduras podem causar candidemia, infecção profunda ou doença localizada. Inicialmente ocorre a candidemia de foco local, e em seguida focos infecciosos se estabelecem nos pulmões, fígado, baço, rins, ossos os olhos, cada um pode levar à candidemia secundária. Além disso, infecções do trato urinário por *Candida* podem gerar complicações como pielonefrite ascendente resultando assim em candidemia (GONZALEZ-LARA; OSTROSKY-ZEICHNER, 2020)

2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA

A relação entre *Candida* spp. e a candidíase considera fatores relacionados aos microrganismos e fatores relacionados ao hospedeiro. Um desequilíbrio entre estes, está associado a patogenicidade nesses patógenos. E para tal, os microrganismos possuem estratégias para superar os mecanismos de defesa naturais dos hospedeiros (CIUREA et al., 2020).

A virulência se refere à capacidade de um microrganismo em causar o processo infeccioso. Os fatores de virulência das células de *Candida*, auxiliam no estabelecimento da infecção, e agem facilitando a invasão, disseminação e seu estabelecimento em órgãos. Essa capacidade não é uma propriedade constante, ao poder ser aumentada, perdida e até restaurada em várias circunstâncias (LASS-FLÖRL et al., 2024).

A presença desses fatores garante a *Candida* spp. uma gama de variações morfológicas que permite sua persistência em diferentes tecidos do hospedeiro. Mais especificamente, na capacidade de algumas espécies de mudar a morfologia de leveduras para hifas e assim romper barreiras mucosas e estabelecer a forma invasiva da doença (LOPES; LIONAKIS, 2022).

Estes fungos possuem grande versatilidade, e capacidade de alterar sua morfologia e passar de comensal inofensivo a um patógeno oportunista. Normalmente considerada forma comensal, a levedura permite a colonização de nichos superficiais estando associada à colonização e disseminação. Enquanto a forma hifal é considerada forma invasiva, permitindo que penetre nas barreiras

do hospedeiro e ganhe acesso aos tecidos profundos estando ligada à invasão e evasão imunológica (CIUREA et al., 2020).

2.6.1 Adesão e invasão das células hospedeiras

A adesão é um processo multifatorial mediado pelas características das células fúngicas e hospedeiras (bióticas ou abióticas), incluindo hidrofobicidade da superfície celular, composição da parede celular e condições de crescimento. Inicialmente, a adesão das células de levedura é altamente dependente de interações entre o microrganismo e as superfícies do hospedeiro (RIERA et al., 2022).

O dimorfismo representa um fator de virulência principalmente por que a formação de hifas facilita o processo de invasão e auxilia na evasão ao sistema imunológico. As hifas perfuram as células hospedeiras e, por serem maiores do que as células de levedura, são mais difíceis de serem eliminadas pelo sistema imunológico. Além disso, a formação de hifas, seguida de alongamento, podem perfurar as membranas celulares dos macrófagos (CIUREA et al., 2020).

É importante ressaltar, que o dimorfismo não é utilizado por todas as espécies de *Candida*. *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* exibem uma forma hifal, mas seu papel na doença invasiva não é totalmente elucidado (GONZALEZ-LARA; OSTROSKY-ZEICHNER, 2020).

Em *Candida*, a capacidade de adesão é codificada por várias famílias de genes. Grandes diferenças nos genes e sua regulação podem ser notadas ao longo da infecção. Além disso, a variabilidade genética depende da espécie de levedura. Existem vários níveis de variabilidade, incluindo diferenças específicas de cepa e alelo em tamanho para o mesmo gene, diferenças específicas de cepa na regulação genética e a ausência de genes ou regiões genéticas específicas em certos isolados. O mais típico para *C. albicans* é a família de genes ALS que codifica grandes glicoproteínas de superfície celular que estão implicadas no processo de adesão às superfícies do hospedeiro (MALINOVSKÁ; ČONKOVÁ; VÁCZI, 2023).

Essas proteínas demonstraram a capacidade de interagir com uma ampla gama de moléculas exibidas em superfícies de células epiteliais e endoteliais. A expressão dessas proteínas em vários ambientes necessita um alto grau de

adaptabilidade das células fúngicas, aumentando a sobrevivência, patogenicidade e resistência às defesas do hospedeiro alcançadas por meio dessa expressão proteica (LASS-FLÖRL et al., 2024).

A família de genes ALS (sequência semelhante à aglutinina) foi descoberta com base em sua semelhança com *Saccharomyces cerevisiae* SAG1, que codifica a α aglutinina. A família de genes ALS tem oito membros (ALS1 a ALS7 e ALS9) que codificam proteínas da superfície celular e compartilham a mesma estrutura (LIU; FILLER, 2011).

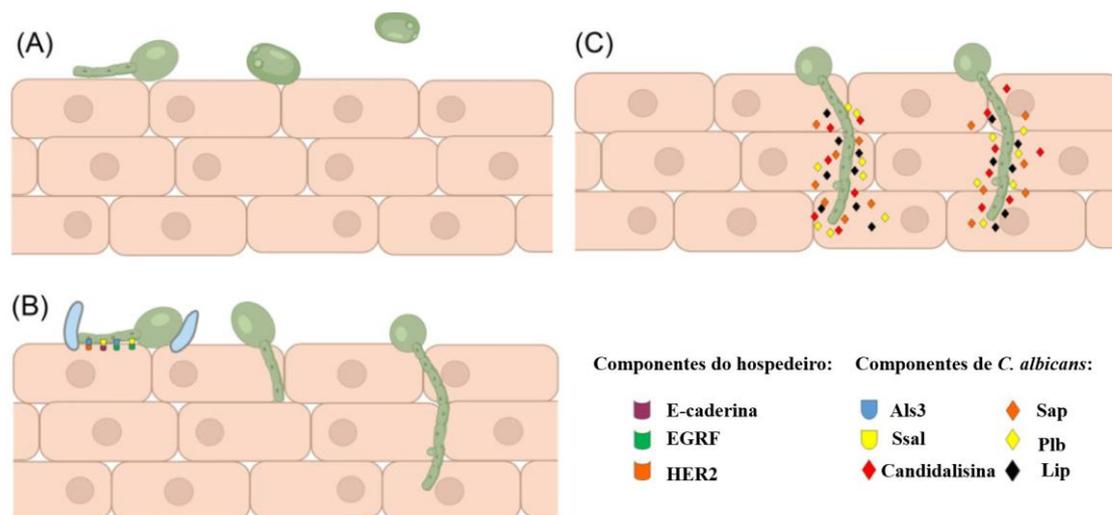
Essas proteínas são conhecidas por promover a adesão às células epiteliais e foram identificadas pela primeira vez em *C. albicans*. No entanto, também ocorrem em outras espécies como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. auris*. Em *C. glabrata*, um grupo principal de adesinas é codificado pela família de genes EPA (adesina epitelial)(MALINOVSKÁ; ČONKOVÁ; VÁCZI, 2023).

A importância dos fatores de adesão e invasão para o sucesso desta levedura como patógeno é destacada pelos diferentes tipos de superfícies, que vão desde tecidos mucosos do hospedeiro até dispositivos e instrumentos médicos, que *C. albicans* pode colonizar (LOPES; LIONAKIS, 2022).

Algumas adesinas, como ALS1 e ALS3, têm papéis bem descritos em vários aspectos de adesão, interações hospedeiro-patógeno, filamentação e virulência fúngica. Als3 é uma proteína de superfície que medeia a ligação das células de levedura às células endoteliais e epiteliais, bem como às proteínas da matriz extracelular. Ao se ligar a receptores celulares como a E-caderina, Als3 induz a endocitose do microrganismo e, ao se ligar à ferritina das células hospedeiras, permite que *Candida* use a ferritina como fonte de ferro. Als3 desempenha um papel fundamental, não apenas na endocitose induzida, mas também na penetração ativa do tecido (LIM et al., 2021)

Para que isto ocorra, é necessária a extensão e invasão das hifas entre ou através das células epiteliais. Neste processo descrito na figura 1, enzimas hidrolíticas como as proteinases aspárticas (Saps) (especialmente Sap3), lipases (Lip) e fosfolipases (PLB), estão envolvidas no dano epitelial induzido por fungos e na passagem através do epitélio. Além disso, a toxina peptídica citolítica candidalisina foi recentemente reconhecida como participante do dano aos enterócitos do hospedeiro (ROSIANA et al., 2021)

Figura 1 — Estágios da patogênese de *C. albicans*. (A) Células de *Candida* se ligam a células epiteliais) e formam pseudohifas. (B) Hifas invadem as células epiteliais via endocitose induzida (esquerda) ou penetração ativa (meio). Durante a endocitose induzida, a à aglutinina (Als3) e a (Ssa) interagem com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), uma proteína relacionada (HER2) e E-caderina na junção aderente. As células hifas também podem se alongar e causar danos mecânicos às células hospedeiras (direita). (C) As células hifais interepiteliais extensamente alongadas liberam vários fatores de virulência, como candidalísina, aspartil proteinases secretadas (Sap), fosfolipase B (Plb) e lipase (Lip) para danificar as células epiteliais do hospedeiro.



Fonte: LIM et al., (2021)

Outros fatores também podem afetar a propriedade adesiva destas leveduras. Um deles é a hidrofobicidade da superfície celular, que aumenta a adesão das células às superfícies, mas varia de espécie para espécie. O substrato é um dos fatores importantes que influenciam a adesão das leveduras *Candida* e a subsequente formação e tamanho do biofilme. Após o processo de adesão ocorre a transição fenotípica das leveduras (MALINOVSKÁ; ČONKOVÁ; VÁCZI, 2023).

A troca morfológica em *Candida* é controlada por produtos proteicos de genes específicos, que direcionam o esporo para se tornar um tubo germinativo ou micélio, e assim contribuem para a adesão. Evidentemente, a transformação de levedura em hifas se correlaciona com a infecção do hospedeiro, em que mais micélio causa maior virulência. A transição de levedura para hifa é importante para vários processos, como formação de biofilme e invasão de células hospedeiras (Fan et al., 2013).

2.6.2 Biofilmes

As espécies de *Candida* são os microrganismos mais frequentes em ambientes clínicos, sendo comumente encontrados na pele dos pacientes ou nas mãos da equipe de profissionais de saúde. Essas leveduras conseguem aderir a superfícies inertes e biológicas, e posteriormente formar biofilmes. A capacidade de adesão já foi bem estabelecida durante as últimas duas décadas e, entre os fungos patogênicos, estas leveduras são as mais frequentemente associadas à formação de biofilmes (RAMAGE et al., 2023).

A formação dessas comunidades microbianas é uma das principais razões para a morte em infecções fúngicas nosocomiais, visto que diminui a suscetibilidade das células fúngicas ao tratamento medicamentoso. Conseqüentemente, estudos apontam que a cada ano até 50% dos pacientes adultos com candidíase sistêmica, e aproximadamente 30% da população jovem perecem devido à candidíase associada a biofilmes. Além disso, há uma estimativa de 100 mil mortes anualmente devido à infecção iniciada pela formação de biofilme (ATRIWAL et al., 2021).

Os biofilmes são estruturas complexas compostas por uma comunidade de células microbianas ligadas ao tecido hospedeiro ou superfícies abióticas que desenvolvem imersas em uma substância polissacarídea extracelular, que fornece proteção aos microrganismos (DE BARROS et al., 2020).

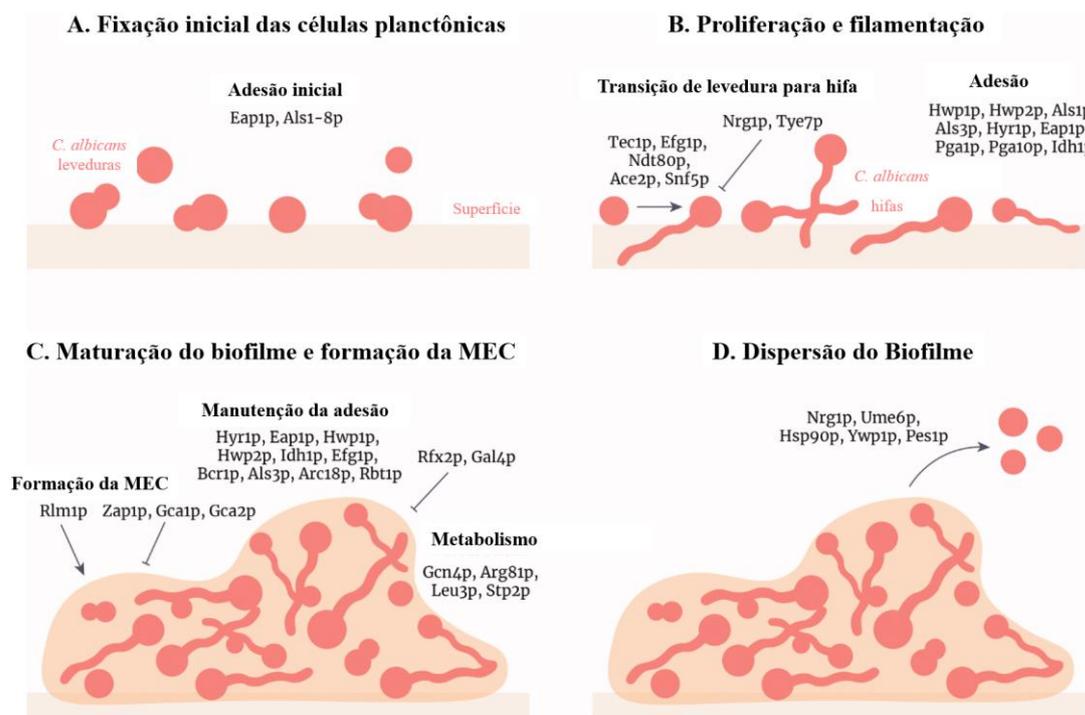
A estrutura dos biofilmes impede a penetração de substâncias através da matriz extracelular e, portanto, impede o efeito dos antifúngicos em todas as células durante o tratamento. É importante ressaltar que a resistência antifúngica, nesses casos, é multifatorial e mecanicamente complexa, e limita ainda mais o arsenal terapêutico. Além de resistir, essa estrutura também confere proteção as células fúngicas das respostas imunológicas do hospedeiro, permitindo assim a disseminação hematogênica das células, contribuindo para a disseminação da infecção (MALINOVSKÁ; ČONKOVÁ; VÁCZI, 2023).

O desenvolvimento dos biofilmes, ocorrem em três estágios: a adesão das células de levedura nos dispositivos médicos (estágio inicial), a diferenciação das células de levedura em células hifais (estágio intermediário) e um aumento na matriz que é a fase de maturação (DE BARROS et al., 2020).

Dispositivos médicos fornecem um nicho perfeito para células de levedura devido a sua estrutura e propriedades químicas, que variam de hidrofobicidade a rugosidade da superfície. Esses dispositivos são cercados por fluidos corporais, que fornecem principalmente glicose para as células fúngicas (ATRIWAL et al., 2021).

Foi observado que o desenvolvimento do biofilme segue etapas sequenciais ao longo de um período de 24–48 horas, conforme observado na figura 2.

Figura 2 – Estágios de formação e desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*. A) Fixação inicial das leveduras a uma superfície por meio de adesinas (Als). B) Proliferação e filamentação: as leveduras fazem a transição para hifas e esse processo é regulado por muitos fatores de transcrição e adesinas específicas (Hwp1p e Hyr1p). C) Maturação do biofilme e formação da matriz extracelular. D) Dispersão do biofilme: células se dispersam do biofilme para colonizar outras partes do corpo.



Fonte: PONDE et al., (2021)

Inicialmente, uma única célula de levedura adere ao substrato, formando uma base e subsequentes formam uma camada de células de leveduras (etapa de adesão). Após esta fase inicial, vem a fase de proliferação celular, onde as

células se projetam e continuam a crescer na estrutura filamentosa das células hifais através da superfície (DE BARROS et al., 2020; EIX; NETT, 2020).

Após a adesão, o desenvolvimento do biofilme é acompanhado por mudanças na morfologia, onde as células se replicam e crescem, levando a uma estrutura organizada para formar micro colônias. A fase subsequente de “maturação” é caracterizada pela produção da matriz extracelular que encapsula toda a estrutura (MEC) (PONDE et al., 2021).

À medida que o biofilme amadurece, a biomassa aumenta com células de levedura, hifas, pseudo-hifas e a MEC respondendo por uma grande proporção do biofilme. As hifas são componentes fundamentais que sustentam a integridade estrutural do biofilme e fornecem uma estrutura para a fixação de células de levedura adicionais (PONDE et al., 2021).

Uma vez que o biofilme tenha atingido a maturidade, uma fase final de “dispersão” envolve o desprendimento de células de levedura não aderentes do biofilme totalmente amadurecido, para que todo o processo de desenvolvimento possa ser totalmente replicado em um local diferente. É assim que a candidíase invasiva geralmente se origina após a dispersão e subsequente disseminação hematogênica de um biofilme formado em um cateter venoso central (DE BARROS et al., 2020).

A disseminação de células de levedura associadas a biofilme possui grande significância clínica, pois podem iniciar a formação de novos biofilmes ou circular por toda a célula hospedeira e tecidos, levando a doenças invasivas disseminadas ou candidemia (MALINOVSKÁ; ČONKOVÁ; VÁCZI, 2023; ŘIČICOVÁ et al., 2010).

Quanto as espécies, apesar de *C. albicans* ser a espécie mais prevalente, não é a única que consegue formar biofilmes, já que muitas outras espécies *Candida* clinicamente relevantes, incluindo *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e o patógeno emergente *C. auris*, também o formam (EIX; NETT, 2020).

Ainda, sobre o desenvolvimento do biofilme de células de *Candida*, foi confirmado que até 1524 genes são significativamente alterados ao comparar a expressão gênica entre células planctônicas e de biofilme. Desde a fase de adesão a dispersão, as células são preparadas para um papel invasivo antes de serem liberadas do biofilme. As células dispersas são diferentes em termos de

desenvolvimento em comparação com células de biofilme e planctônicas da mesma idade e estão prontas para infecção imediata no organismo hospedeiro (MALINOVSKÁ; ČONKOVÁ; VÁCZI, 2023).

Além disso, estudos demonstram que os biofilmes são altamente regulados no nível molecular, isso foi melhor estudado e caracterizado em *C. albicans*, onde mais de cinquenta reguladores transcricionais foram descritos. Alguns destes reguladores podem ser observados na figura 2. Para *C. albicans*, um conjunto central de nove reguladores-chave dá origem a uma rede altamente orquestrada e interconectada na qual os reguladores individuais controlam-se mutuamente e aproximadamente mil outros genes-alvo, incluindo muitos outros reguladores transcricionais (PONDE et al., 2021)

O dimorfismo de levedura para hifas de *C. albicans* é outro fator de virulência associado à formação de biofilme e adesão celular. O desenvolvimento de hifas é crítico para a formação de biofilme e evasão imune, pois promove colonização, adesão, penetração celular e resistência à fagocitose (SUMLU et al., 2024).

A regulação da transição de levedura para hifa é ativada pela estimulação através de proteínas da membrana. O fator de transcrição *EFG1* é fundamental na formação de biofilme de *C. albicans*. Estudos demonstraram que *EFG1* diminui após a indução de hifas sendo, portanto, crucial na transição inicial para hifas. *EFG1* também regula a expressão de adesinas como *ALS*, *HWP1* e *ECE1* e fatores de transcrição de crescimento de hifas como *UME6* e *HGC1*. Estudos anteriores relataram que a expressão de *UME6* é suficiente para gerar uma população de hifas quase completa, bem como virulência atenuada e alongamento defeituoso de hifas durante a infecção tanto *in vitro* quanto *in vivo* em cepas silenciadas por *UME6* (KORNITZER, 2019).

UME6 é considerado um importante gene relacionado a mudanças morfológicas, os níveis de expressão neste regulador transcricional específico do filamento são necessários para determinar a morfologia em *Candida*. Na ausência da expressão do *UME6*, as células crescem como leveduras, baixos níveis de *UME6* exibem células principalmente na morfologia das pseudo-hifas e em altos níveis de expressão do *UME6* as células crescem como uma população de hifas quase completa (SUMLU et al., 2024).

2.7 DIAGNÓSTICO

A candidemia, como a infecção invasiva mais frequentemente diagnosticada, resulta em candidíase profunda em cerca de 50% dos casos devido à disseminação hematogênica. Desta forma, o diagnóstico laboratorial tem como padrão “ouro” a hemocultura (BARANTSEVICH; BARANTSEVICH, 2022).

Embora a sensibilidade da hemocultura seja relativamente baixa, esse teste continua sendo o teste mais fácil para diagnosticar candidíase invasiva. As células de *Candida* spp. são isoladas do sangue em apenas 21–71% dos pacientes com candidíase invasiva comprovada. A sensibilidade pode ser melhorada com um aumento no volume da amostra de sangue e frequência dos exames de sangue (SORIANO et al., 2023).

Esses métodos de cultura mantêm sua importância e continuarão a fazê-lo nos próximos anos, devido à possibilidade de isolamento, identificação e teste de suscetibilidade do agente infeccioso. A principal desvantagem dos métodos de cultura é que o tempo de resposta pode variar de 72–96 h, levando a atrasos no tratamento adequado, o que resulta em aumento da mortalidade (MCCARTY; WHITE; PAPPAS, 2021; SORIANO et al., 2023).

Biomarcadores que detectam metabólitos fúngicos ou DNA fúngico podem ser utilizados para auxiliar no diagnóstico. Os testes de IgG manana e anti-manana e ensaios de anticorpos do tubo germinativo de *C. albicans* foram associados a sensibilidade e especificidade limitadas; para anticorpos anti-*C. albicans* tubo germinativo, melhor sensibilidade foi relatada para diagnóstico de candidíase profunda em relação a candidemia (LASS-FLÖRL et al., 2024; SORIANO et al., 2023).

Amostras de tecido ou citologia devem ser submetidas a microscopia e exame histopatológico, usando coloração especial para visualização de fungos. A identificação de espécies geralmente pode ser obtida por meio de sistemas comerciais de identificação de leveduras disponíveis, como Vitek-2, BD Phoenix, API-20, MicroScan e espectrometria de massa de tempo de voo por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF). Essas técnicas têm um tempo de resposta de 48 a 72 horas (LASS-FLÖRL et al., 2024).

2.8 TRATAMENTO

Apesar do impacto prejudicial que os fungos têm na saúde humana, apenas algumas classes de medicamentos antifúngicos estão atualmente disponíveis. Em geral, o desenvolvimento de novos agentes tem sido lento, na maioria das vezes, devido à natureza eucariótica das células fúngicas, aos desafios associados à permeabilidade do composto através da parede e membrana celular do fungo e ao interesse limitado da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novas drogas (TORTORANO et al., 2021).

Na prática clínica, uma nova classe de antifúngicos não é utilizada clínica desde meados dos anos 2000. Esse fato, ameaça nosso repertório limitado de antifúngicos clinicamente relevantes contrapondo a prevalência crescente de cepas fúngicas com resistência intrínseca ou adquirida, a uma ou mais classes de fármacos (LEE et al., 2021).

A estratégia para tratamento de candidíase invasiva depende do estado imunológico do paciente, localização e gravidade da infecção. Além de um controle de fonte adequado, a remoção de dispositivos médicos infectados e agentes antifúngicos têm sido ferramentas terapêuticas importantes (GONZALEZ-LARA; OSTROSKY-ZEICHNER, 2020).

Em relação mais especificamente a candidemia, a escolha da terapia antifúngica deve considerar diversas variáveis como tipo de paciente (neutropênico ou não), presença de comorbidades agudas e crônicas, presença de dispositivos médicos invasivos, como cateteres, a gravidade da doença de base, exposição recente a antifúngicos, epidemiologia local, espécies de *Candida* associada (TORTORANO et al., 2021).

Comumente, na prática clínica a terapia antifúngica empírica é iniciada em pacientes febris ou sépticos na unidade de terapia intensiva com um cateter venoso central permanente, cirurgia abdominal recente ou quimioterapia na ausência de resposta à terapia antimicrobiana. Esta abordagem pode levar ao uso desnecessário de agentes antifúngicos e promover o surgimento de resistência em indivíduos sem *candidíase* invasiva ou um atraso na terapia antifúngica eficaz para aqueles que estão infectados (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

Atualmente, apenas três classes principais de medicamentos antifúngicos com atividade estão disponíveis: equinocandinas (anidulafungina, caspofungina ou micafungina), azóis (fluconazol, voriconazol, itraconazol, posaconazol, isavuconazol) e regimes baseados em anfotericina B (SORIANO et al., 2023).

2.8.1 Equinocandinas

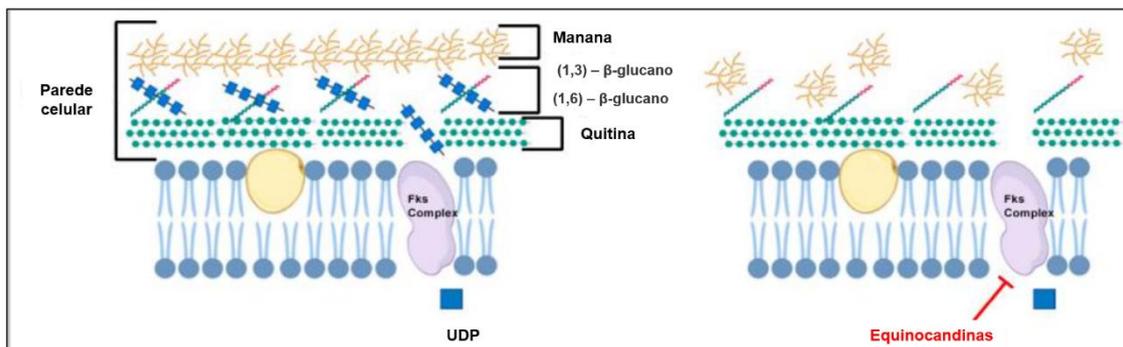
As equinocandinas foram descobertas pela primeira vez na década de 1970, embora seu desenvolvimento tenha ocorrido principalmente na década de 1990, foi somente no início dos anos 2000 que a caspofungina, o primeiro membro aprovado desta classe, entrou no mercado (AJETUNMOBI et al., 2023).

Atualmente, esta classe inclui a caspofungina, micafungina e anidulafungina, e têm como alvo a parede celular fúngica. A parede celular é a camada externa rígida da célula fúngica e é a primeira linha de defesa, protegendo as células fúngicas do estresse osmótico. As células de mamíferos não têm paredes celulares e, portanto, as enzimas das vias biossintéticas da parede celular são alvos antifúngicos importantes (CZAJKA et al., 2023).

Esses medicamentos apresentam potente atividade fungicida contra a maioria das espécies do gênero *Candida*, e sua ação inclui cepas resistentes a azol e biofilmes. Além disso, são comumente escolhidos porque apresentam baixa toxicidade para humanos. Esse fato contribuiu para que as equinocandinas se tornassem a terapia de primeira linha para o tratamento da candidíase (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; CZAJKA et al., 2023).

As paredes celulares fúngicas são compostas de (1,3)- β -D-glucano covalentemente ligado a (1,6)- β -D-glucano, bem como quitina e manana. As equinocandinas como é possível observar na figura 3, impedem a síntese de (1,3)- β -D-glucano inibindo a (1,3)- β -D-glucano sintase isso resulta em perda de integridade da parede celular, levando a instabilidade osmótica, lise celular e conseqüentemente a morte para a maioria das espécies (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

Figura 3 – Mecanismo de ação das equinocandinas.



Fonte: Adaptado de BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, (2020)

As equinocandinas são geralmente administradas a pacientes com doença grave, a moderadamente grave ou a pacientes com exposição prévia a azóis. Possuem efeito fungicida, pois a integridade da parede celular é comprometida, com aumento da permeabilidade e subsequente vazamento de aminoácidos (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

Embora o uso de equinocandinas como terapia de primeira linha tenha aumentado e o papel principal do fluconazol no tratamento atual da candidíase invasiva, seja a terapia de redução gradual, o fluconazol às vezes ainda é usado como terapia de primeira linha. Dados recentes demonstraram que as equinocandinas são eficazes e seguras, apoiando a recomendação como opção de primeira linha em caso de infecções da corrente sanguínea. No entanto, o surgimento de resistência, mediante mutações no gene que codifica a enzima alvo, pode limitar a sua eficácia (COSTA-DE-OLIVEIRA; RODRIGUES, 2020).

A resistência nessa classe, aumenta em particular, em cepas de *C. parapsilosis* que tendem a estar associada ao aumento das concentrações inibitórias mínimas *in vitro*, levantando preocupações de que tais medicamentos facilitem o desenvolvimento de altos níveis de resistência (BRANCO; MIRANDA; RODRIGUES, 2023).

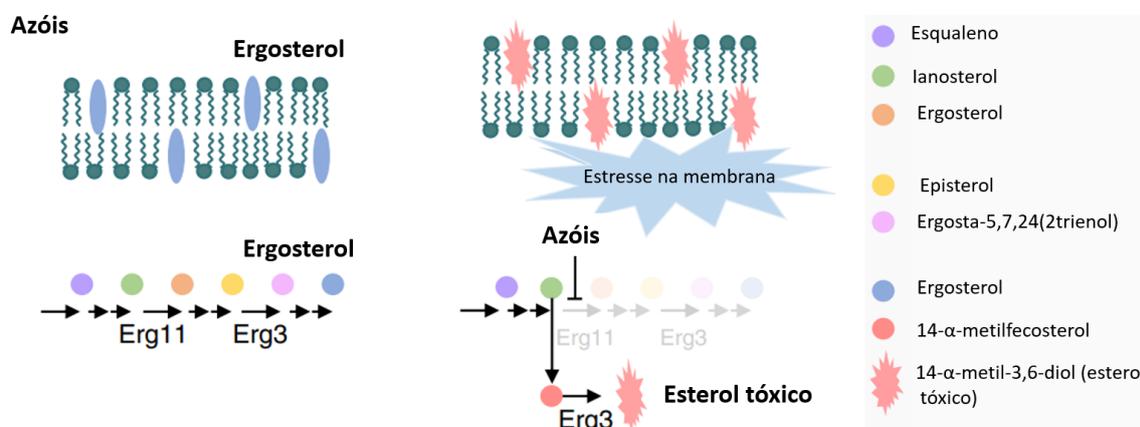
2.8.2 Azóis

Introduzidos pela primeira vez na década de 80, os azóis são a classe de medicamentos mais frequentemente empregada na clínica para o tratamento de infecções fúngicas. Eles são amplamente classificados em dois grupos que

incluem imidazol e triazol. Os imidazóis incluem os antifúngicos clotrimazol, econazol, cetoconazol, miconazol e tioconazol. Os triazóis incluem o fluconazol, itraconazol, voriconazol, isavuconazol e posaconazol (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020; LEE et al., 2021).

Esses compostos sintéticos heterocíclicos de cinco membros exercem atividade antifúngica bloqueando a síntese de ergosterol, um constituinte-chave da membrana celular fúngica, levando a interrupções na estabilidade da membrana, permeabilidade e função de enzimas ligadas à membrana. A exposição aos azólicos também causa o acúmulo de intermediários de esterol tóxicos, incluindo 14- α -metil-3,6-diol codificada por *ERG11* em espécies de *Candida* (Figura 4). Especificamente, os azóis inibem a enzima 14- α lanosterol desmetilase do citocromo P-450, uma enzima importante na biossíntese do ergosterol (LEE et al., 2021).

Figura 4 – Mecanismo de ação dos azóis. Os azóis exercem atividade fungistática ao inibir a lanosterol 14- α -desmetilase (codificada por *ERG11*), o que leva a um bloqueio na síntese de ergosterol e ao acúmulo de intermediários de esteróis tóxicos, incluindo 14- α -metil-3,6-diol produzido por *Erg3*.



Fonte: Adaptado de LEE et al., (2021)

O ergosterol é o principal componente esterol das membranas celulares fúngicas, incluindo as membranas plasmática e mitocondrial. Essa molécula é vital para os fungos manter a estrutura e a função dessas membranas. Juntos, esteróis e esfingolipídios formam balsas lipídicas na membrana celular. Essas balsas contêm muitas proteínas biologicamente importantes, que estão envolvidas na sinalização, resposta ao estresse e transporte de nutrientes (BARANTSEVICH; BARANTSEVICH, 2022).

A biossíntese do ergosterol constitui um alvo ideal para medicamentos porque o ergosterol é um lipídio muito importante para fungos, e que não está presente em humanos. Vários medicamentos têm como alvo a biossíntese do ergosterol, como os compostos azóis (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

Na prática clínica, o fluconazol é o antifúngico mais utilizado para o tratamento de infecções por *Candida*. Após sua introdução, rapidamente se tornou a terapia de primeira linha contra estas infecções, principalmente devido ao seu perfil de segurança melhorado em comparação à anfotericina B (LEE et al., 2021).

Em contraste com outros antifúngicos, os azólicos possuem biodisponibilidade oral excepcional e estão disponíveis em formulações orais e intravenosas. No entanto, uma desvantagem significativa dos azólicos inclui o alto potencial de interações com outros medicamentos, pois eles também inibem as enzimas do citocromo P450 de mamíferos, responsáveis pelo metabolismo dos medicamentos. Para superar essa limitação, o desenvolvimento de novos azólicos que possuem maior especificidade para enzimas fúngicas está em andamento (LEE et al., 2021).

Os azóis são geralmente bem tolerados, mas demonstraram ser cerca de 15% menos eficazes do que as equinocandinas em média. Eles são usados em vez de equinocandinas como terapia de primeira linha em algumas formas de candidíase profunda, como infecções cerebrais, intraoculares e do trato urinário, onde as equinocandinas têm menor penetração (SORIANO et al., 2023)

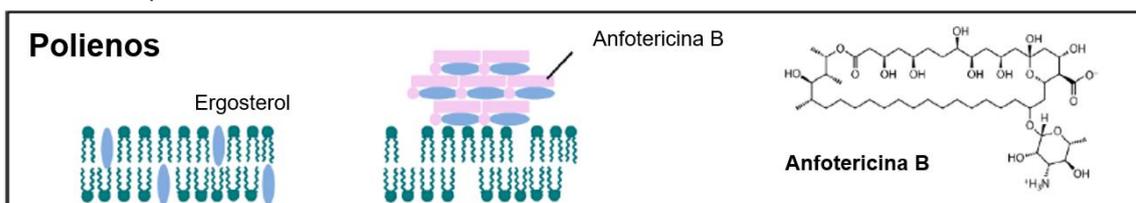
No entanto, o desenvolvimento de resistência e a diminuição da suscetibilidade de várias espécies de *Candida* (*C. glabrata* e *C. krusei*) representaram grandes desafios ao uso do fluconazol para o tratamento da candidíase (CZAJKA et al., 2023).

2.8.3 Polienos

Os polienos pertencem a uma classe de compostos naturais, que têm como alvo o ergosterol na membrana fúngica. Tradicionalmente, acreditava-se que os polienos se ligavam diretamente ao ergosterol, formando complexos fármaco-lipídio que se intercalam nas membranas celulares fúngicas, causando

vazamento de componentes intracelulares e, finalmente, morte celular. No entanto, como demonstrado na figura 5, recentemente esse modelo foi desafiado por estudos estruturais e biofísicos, que revelaram que a anfotericina B forma agregados extramembranosos que extraem ergosterol das membranas celulares fúngicas, agindo como uma “esponja de esterol” fungicida (LEE et al., 2021).

Figura 5 – Mecanismos de ação da anfotericina B e estrutura antifúngicas. (A) Polienos, como a anfotericina B, atuam formando agregados extramembranosos que extraem ergosterol de bicamadas lipídicas.



Fonte: Adaptado de LEE et al., (2021).

Os representantes dessa classe possuem atividade fungicida e apresentam amplo espectro de atividade contra fungos de importância médica, apesar das taxas relativamente mais altas de efeitos colaterais tóxicos, como problemas renais/hepáticos ou anafilaxia. Os agentes fungicidas podem matar células de levedura infecciosas diretamente. Para limitar a possibilidade de toxicidade do tratamento, essa classe é melhor usada para infecções tópicas, como na cavidade oral e por um tempo limitado (CZAJKA et al., 2023).

Apesar da excelente eficácia contra espécies do gênero *Candida*, a toxicidade limita seu uso, sendo assim o desoxicolato de anfotericina B nunca foi totalmente explorado clinicamente. No entanto, apesar de suas desvantagens inerentes, a anfotericina B permaneceu como o “padrão ouro” da terapia antifúngica por décadas, principalmente devido à falta de alternativas viáveis (AJETUNMOBI et al., 2023).

Atualmente, há preparações reformuladas à base de lipídios denominadas 'AmBisome' (anfotericina B lipossomal) que se beneficiam de um índice terapêutico e perfil de toxicidade aprimorados ao alterar a distribuição para os órgãos, embora a toxicidade significativa ainda seja persistente. Além disso, como a eficácia não é comprometida, o AmBisome é usado sob indicações específicas, particularmente em enfermarias de hematologia e oncologia (PARSLOW; THORNTON, 2022)

Relatos de cepas fúngicas isoladas com resistência adquirida ao polieno são relativamente raros, apesar de décadas de uso no ambiente clínico. A maioria das espécies de *Candida* incluindo *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, são geralmente consideradas suscetíveis a anfotericina B, com estudos de vigilância relatando uma taxa de suscetibilidade próxima a 100%. Recentemente, uma meta-análise de prevalência global agrupada estimou a resistência de *C. parapsilosis* em 1,3% (BRANCO; MIRANDA; RODRIGUES, 2023). Quando presente, essa resistência na maioria das vezes, resulta de mutações no gene *ERG3* (COSTA-DE-OLIVEIRA; RODRIGUES, 2020).

O ergosterol, o alvo primário de vários agentes antifúngicos, é um lipídio neutro da membrana celular fúngica que regula a fluidez, a função e a biogênese da membrana. A homeostase e a biossíntese do ergosterol são cruciais para vários processos celulares, incluindo a regulação da transcrição de genes e proteínas da via biossintética envolvidos no processamento e absorção de esterol; portanto, é fundamental para o crescimento fúngico.

Cerca de 20 genes afetam a biossíntese do ergosterol em *Candida* spp. o gene *ERG11*, o alvo dos antifúngicos azólicos, catalisa uma etapa intermediária na síntese de ergosterol a partir da lanosterol 14 α -desmetilase em fungos. A enzima esterol $\Delta^{5,6}$ -dessaturase é codificada pelo gene *ERG3*, e a mutação de *ERG3* alteram as vias do ergosterol, devido à inativação desse esterol, contribuindo assim para a resistência aos azólicos *in vitro* (HOSSEINI BAFGHI et al., 2022).

Além disso, estudos em *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* estabeleceram que mutações em *ERG3* levam à depleção de ergosterol e ao acúmulo de esteróis alternativos não tóxicos, resultando em resistência cruzada a azóis e polienos. Quanto ao papel do *ERG3* na virulência fúngica, este, permanece pouco elucidado. Embora estudos já demonstraram que a inativação do *ERG3* resulta em virulência reduzida em modelos murinos de candidíase disseminada e que isolados clínicos que abrigam mutações no *ERG3* apresentem defeitos no crescimento de hifas (HIRAYAMA et al., 2021).

2.9 RESISTENCIA ANTIFÚNGICA

A falha em tratar a candidemia está associada a um risco significativo de mortalidade, especialmente em casos graves que evoluíram para doenças fúngicas invasivas. Isso geralmente ocorre devido à resistência aos tratamentos antifúngicos tradicionais, aumento do número de pacientes imunocomprometidos, e o acesso limitado a opções de diagnóstico mais rápidas e eficazes (KAUR; NOBILE, 2023).

Infecções por isolados de *Candida* resistentes a um ou vários tipos de antifúngicos estão sendo cada vez mais diagnosticadas, com terapia antifúngica prévia sendo o principal fator para seleção de resistência (SORIANO et al., 2023).

Assim, uma classe de medicamentos antifúngicos tornando-se ineficaz reduz as opções terapêuticas em pelo menos 33% e frequentemente em 50% porque azóis e equinocandinas não são ativos contra todos os fungos (BERMAN; KRYSAN, 2020). E, os impactos dessa resistência incluem o aumento da carga sobre o sistema de saúde, custos mais altos e fatalidades decorrentes de falhas no tratamento (CZAJKA et al., 2023)

De acordo com um grupo da ONU sobre Resistência Antimicrobiana, até 2050, doenças resistentes a medicamentos podem causar cerca de 10 milhões de mortes anualmente e tornar-se uma catástrofe econômica. Até 2030, essa resistência pode afetar aproximadamente 24 milhões de pessoas. Ainda, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças, cerca de 7% de todas as amostras de sangue de pacientes que sofrem devido a infecções por *Candida* são resistentes ao fluconazol. No entanto, essa resistência ao azol tem sido persistente nos últimos 20 anos, no entanto a resistência às equinocandinas e outros medicamentos é uma grande preocupação (ATRIWAL et al., 2021).

2.10 COMPOSTOS TIOFENOS

A resistência antifúngica em *Candida* está crescendo nos últimos anos e ressalta a necessidade de novos antifúngicos para tratar isolados multirresistentes (TORTORANO et al., 2021).

O tiofeno é um farmacóforo vital devido à sua ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas. Os compostos heterocíclicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio desempenham um papel imprescindível na química medicinal devido ao seu perfil farmacológico diverso (ARCHNA; PATHANIA; CHAWLA, 2020).

Um desses compostos, é o tiofeno, um anel de cinco membros com um heteroátomo de enxofre (figura 6). Ele foi estabelecido como um elemento-chave devido à sua presença em muitos compostos farmacologicamente ativos. Foi descoberto em 1882 por Victor Meyer como um contaminante no benzeno. Ele isolou o tiofeno usando um derivado de ácido sulfônico e foi o primeiro a representar esse sistema de anel, que ele nomeou como tiofeno. O nome “tiofeno” foi derivado das palavras gregas '*theion*' para enxofre e '*phaino*' que significa brilhante. Em temperatura ambiente é um líquido tóxico, inflamável e incolor com odor semelhante ao benzeno, solúvel na maioria dos solventes orgânicos, incluindo éter e álcool, mas insolúvel em água (SINGH; SINGH; BEDI, 2020).

Figura 6 – Estrutura típica do anel tiofeno.



Fonte: Singh, Singh e Bedi (2020)

O tiofeno é um composto monocíclico e quando fundido com outros sistemas heterocíclicos, dá origem a novos sistemas heterocíclicos com atividades biológicas interessantes. Seu potencial farmacológico diversificado o torna a primeira escolha para incorporação pela abordagem híbrida, que está presente na maioria dos medicamentos necessários acessíveis no mercado. Estudos indicam que 20,5% dos medicamentos mais vendidos contendo enxofre em 2019 em todo o mundo, contêm um átomo de enxofre (IBRAHIM et al., 2022).

O núcleo de tiofeno é parte de certos produtos naturais e vários compostos farmacologicamente ativos e recebe grande atenção no campo medicinal devido às suas diversas atividades biológicas. Na química medicinal,

os derivados de tiofeno têm importância para suas aplicações terapêuticas. Os compostos derivados do tiofeno têm historicamente desempenhado um papel importante na busca por produtos bioativos. Observa-se que mais de 75% dos fármacos em uso clínico têm pelo menos um anel heterocíclico em sua estrutura química. Os derivados tiofeno fornecem intermediários úteis em várias áreas da ciência e indústria, com numerosas aplicações e propriedades terapêuticas. Quanto às suas aplicações biológicas e farmacológicas, os tiofenos possuem propriedades notáveis como agentes antipsicóticos, ansiolíticos, antifúngicos, antimicrobianos, antioxidantes, anticâncer e anti-inflamatórios (DA CRUZ et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antifúngico de derivados tiofênicos contra espécies de *Candida* spp. bem como seu efeito na expressão de genes relacionados a fatores de virulência como os genes *ALS3*, *UM6* e *ERG3*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o potencial antifúngico, *in vitro*, dos derivados tiofênicos de forma isolada e combinada com antifúngicos padrões frente a isolados clínicos de *Candida*;
- Avaliar a ação dos derivados na estrutura das células de *Candida*;
- Analisar a ação dos derivados na membrana celular dos isolados;
- Avaliar o efeito antibiofilme dos derivados nos isolados clínicos;
- Determinar o efeito citotóxico dos derivados tiofênicos;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio pelas células de *Candida* após tratamento com os derivados testados;
- Analisar a expressão dos genes *ALS3*, *UME6*, e *ERG3* nos isolados clínicos após exposição com os derivados tiofênicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CEPAS

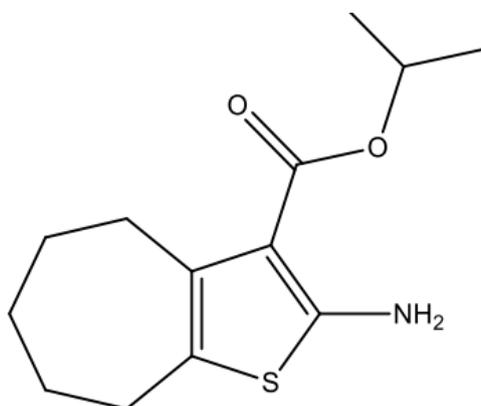
Onze isolados clínicos de *Candida* foram obtidos de amostras de sangue e identificados por MALDI TOF da Coleção de Culturas URM Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco.

4.2 OS COMPOSTOS

Os compostos tiofênicos 2AT e 2B-amino, representados na figura 7 e 8 respectivamente, foram sintetizados pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da Universidade Estadual da Paraíba. Nas figuras é possível notar que ambas as estruturas são caracterizadas como compostos heteroaromáticos de cinco membros contendo um átomo de enxofre, típico de compostos de tiofenos.

O composto 2AT representado na figura 7, foi sintetizado conforme procedimento previamente descrito por (DA CRUZ et al., 2020; GEWALD, 1965). Resumidamente, e utilizando a reação clássica de Gewald, quantidades equimolares de cicloheptano, enxofre elementar e acetato de isopropilciano foram feitas reagir num meio básico, através de um procedimento de um recipiente. Após conclusão da reação, o produto foi purificado por recristalização sucessiva em etanol absoluto.

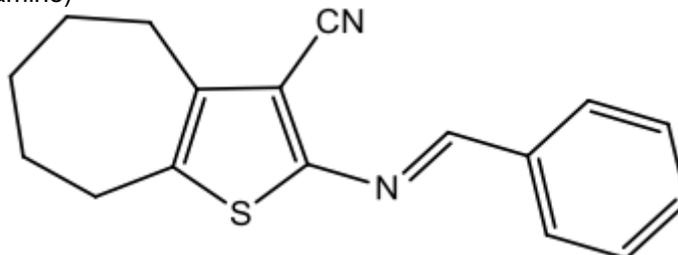
Figura 7 – Estrutura química do isopropil 2-amino-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carboxilato (2AT).



Fonte: A autora (2024).

Enquanto o composto 2B-amino foi sintetizado de acordo com método descrito por Mendonça et al., (2011).

Figura 8 – Estrutura química 2-(benzylideneamino)-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cyclohepta[b]-tefteno-3-carbonitrile (2B-amino)



Fonte: A autora (2024).

4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

Os testes foram realizados de acordo com o protocolo descrito no documento M27-A3 e M27-S4 (CLSI, 2008/2012). O isolado ATCC 14503 de *C. albicans* foi utilizado como controle.

O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; $0,165 \text{ mol. L}^{-1}$; Sigma-Aldrich). O agente antifúngico fluconazol (Pfizer) foi preparado em água deionizada todos diluídos em Dimetil-sulfóxido (DMSO).

Para os testes, foi preparada uma solução estoque na qual foram dissolvidos 10 mg dos compostos em uma mistura de etanol e dimetilsulfóxido. Esta solução foi então diluída em meio RPMI 1640, tamponado a pH 7,0 com ácido morfolinopropanossulfônico $0,165 \text{ M}$ (Sigma-Aldrich) para atingir concentrações variando de $2 \mu\text{g/mL}$ a $1,024 \mu\text{g/mL}$.

Para realização dos ensaios *in vitro*, as suspensões dos isolados serão preparadas em solução salina, e a densidade ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando espectrofotômetro a 530nm. O volume do inóculo será ajustado para 5,0mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2 \cdot 5 \times 10^3$ células/mL.

Para os testes, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas a serem testadas, e as placas incubadas a 35°C durante 24 horas.

As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) foram determinadas com inibição de 100% para os derivados tiofênicos e 50% em relação ao poço controle para o fluconazol.

4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DOS DERIVADOS

Combinações dos derivados tiofênicos e os antifúngicos foram testados em triplicata utilizando o método de suscetibilidade descrito anteriormente. Para avaliar as interações dos antifúngicos, a Concentração Inibitória Fraccionada (FIC) será calculada para cada combinação.

4.4.1 Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FIC)

O Índice de Concentração Inibitória Fracionária foi avaliado através da combinação de derivados tiofênicos/antifúngicos utilizando o método de diluição checkerboard (Pfaller et al., 1989; Lewis et al., 2002).

O FIC foi calculado para cada agente dividindo a concentração de inibição de cada derivado, quando utilizados em combinação pelo seu valor de CMI. Valores FIC foram em seguida, adicionados em conjunto para definir a interação da combinação.

O sinergismo foi definido com uma $FIC < 0,5$, e aditividade definida como uma $FIC > 0,5$ e < 1 . Indiferença foi definido como um $FIC > 1$ e < 4 , ao passo que o antagonismo definido como um $FIC > 4$.

4.5 PRODUÇÃO DE BIOFILMES E EFEITO ANTIBIOFILME

4.5.1 Formação dos biofilmes *in vitro*

As cepas de *Candida* spp. foram cultivadas aerobiamente a 37 °C por 18 h em ágar Sabouraud dextrose (SAD). As suspensões foram preparadas em caldo YNB de base de nitrogênio de levedura (Difco) suplementado com glicose

50 mM. Após 18 h de incubação, as suspensões foram centrifugadas a 3200 rpm durante 4 min e depois lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2). Em seguida, as células foram ajustadas para uma concentração final de 10^7 células/mL em espectrofotômetro a 530 nm (M et al., 1999). Por fim, 100 μ L das suspensões celulares foram adicionados aos poços de placas de microdiluição de fundo plano de 96 poços (Techno Plastic Products, Suíça), mantido a 37 °C por 1,5 h a 75 rpm (fase de adesão).

Após a formação do biofilme, os poços foram lavados duas vezes com 200 μ l de PBS, depois foram adicionados 200 μ l de PBS e 12 μ l da solução XTT-menadiona a cada poço. Posteriormente, 100 μ l da solução reacional foram transferidos para uma nova placa de microtitulação e a absorbância foi medida com um leitor de placas espectrofotômetro a 530 nm.

4.5.2 Avaliação do efeito anti-biofilme dos compostos

Seguindo as etapas para formação de biofilme (descritas acima), 100 μ L dos compostos tiofenos e fluconazol (isolados e combinados) foram adicionados durante o período de adesão (1,5h) e sua ação antibiofilme foi avaliada nos períodos de biofilme (24, 48 e 72h).

A quantificação dos biofilmes foi realizada com o ensaio de redução de sal de tetrazólio, onde 20 μ L, na proporção de 5 μ L para 1mL de tampão PBS, esterilizado por filtração em membrana (Millipore, poros de 0,22 μ m) foi adicionado à cada poço da placa de microtitulação, inclusive nos controles. As placas foram incubadas na ausência de luz à temperatura de 37°C, por 18 horas.

Posteriormente, o corante foi aspirado e então adicionado 200 μ L de isopropanol (FREMOSIER et al., 1999; BERRIDGE; HERST; TAN; 2005; KROM et al., 2007). As placas foram mantidas em repouso por 15 minutos e em seguida foram transferidos 100 μ L do conteúdo de cada poço para nova placa de microtitulação afim de proceder à leitura em leitor de microplacas com 540nm de comprimento de onda (RAMAGE et al., 2002; KROM et al., 2006; PIERCE et al., 2008).

Por fim, o ensaio de redução do XTT foi realizado e o efeito isolado e sinérgico das drogas foi avaliado. Foram incluídos controles (positivos e

negativos), bem como a cepa de referência *C. albicans* ATCC 14053. O teste foi realizado em triplicado.

4.5.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 6 com nível de significância $\alpha = 0,05$. As variáveis dependentes (tempo de incubação e desenvolvimento de biofilme) e independentes (atividade oxidativa) foram analisadas estatisticamente.

A análise de variância foi utilizada para testar a hipótese nula quando não houve diferenças entre os tratamentos. O teste HSD de Tukey foi utilizado seguindo a ANOVA para comparações.

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os isolados foram expostos aos compostos utilizando as concentrações e critérios descritos nos testes de suscetibilidade. As células de levedura foram lavadas com 1x PBS (3 vezes) e centrifugadas suavemente para remover o meio de cultura.

Eles foram posteriormente fixados com Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 4,0% e tampão fosfato 0,1M). A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio a 1% (Electron Microscopy Science) seguida de desidratação crescente com etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Após a desidratação, o material foi levado ao ponto crítico para completa secagem das amostras e metalizado com ouro/paládio no equipamento FINE COAT ION SPUTTER JFC-1100, JEOL. A visualização de *Candida* spp. e a captura das imagens foi realizada em microscópio eletrônico de varredura EVO LS-15, ZEISS.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Células de levedura tratadas e não tratadas com os compostos foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão. As células foram fixadas durante 2 horas a 4°C numa solução de glutaraldeído e paraformaldeído (3% e 4% respectivamente) em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2. Após lavagem

no mesmo tampão, as células foram pós-fixadas durante 1 h com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1 M a pH 7,2. Eles foram então desidratados em séries graduadas com acetona e embebidos em Epon-82 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) por 72 horas a 60 °C. Secções ultrafinas foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo (5% e 2% respectivamente) e observadas em um FEI Tecnai™ Spirit G 2 BioTWIN (FEI, Oregon, EUA).

4.8 CITOTOXICIDADE

4.8.1 Cultura de Macrófagos

A linhagem de macrófagos J774 foram cultivados em RPMI (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e mantidos em estufa incubadora a 5% de CO₂, a 37 °C.

4.8.2 Análise de citotoxicidade de compostos

A citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada por meio de testes com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

Os macrófagos foram cultivados em placas de cultura celular de 96 poços a uma concentração de 2x10⁶ células por placa e incubados numa atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e as células foram incubadas com diversas concentrações dos compostos (variando de 4.000 a 250 µg/mL) por 72 horas.

As leituras de absorvância dos cristais de formazan solubilizados foram realizadas utilizando um espectrofotômetro ELISA Benchmark Plus (Bio-Rad, Califórnia, EUA) com comprimento de onda de 570 nm. A concentração na qual ocorreu uma redução de 50% na viabilidade celular foi determinada através de análise de regressão linear. Cada experimento foi conduzido em duplicata biológica. Macrófagos incubados em meio de cultura e no medicamento padrão fluconazol foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente.

4.9 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram medidas utilizando o diacetato de diclorofluoresceína 2',7' (DCFH-DA). Após teste de sensibilidade antifúngica, células de *C. albicans* tratadas e não tratadas (10^6 células/mL) com os tiofenos foram lavados e ressuspensos em 0,5 mL de PBS com 10 μ L de DCFH-DA (Sigma Aldrich) por 20 min.

Após a marcação, as células foram imediatamente analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur/Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA) e as intensidades de fluorescência para DCFH-DA foram quantificadas. A intensidade de fluorescência foi adquirida para 20.000 eventos na região fechada. Os dados foram analisados usando FlowJo (Tree Star Inc©, Ashland, EUA). Dois experimentos independentes foram realizados (n = 4).

Para os testes, ANOVA foi realizada para todas as médias obtidas ao nível de significância de 5%.

4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *ALS3*, *UM6* E *ERG3*

A expressão dos genes *ALS3*, *UME6* e *ERG11* foi avaliada e quantificada por transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Reverse Transcriptase Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* – RT-qPCR).

Para isso, foram utilizadas duas cepas de *C. albicans*, a cepa clínica HG04 e a cepa ATCC 14053 com perfis de suscetibilidade frente aos derivados 2AT e 2B-amino previamente determinados.

4.10.1 Detecção dos genes alvos

Os isolados foram repicados em tubos de ensaio contendo o meio Sabouraud Dextrose Ágar e mantidos a 37°C por 24 horas. O DNA foi extraído segundo o método proposto por Inácio et al. (2016). O DNA foi quantificado através da eletroforese em gel de agarose utilizando marcadores de peso molecular λ . O DNA após extraído foi armazenado a -20°C até o momento das análises (SAMBROOK et al., 2001; MASSIRER et al., 2004).

Foram utilizados os seguintes componentes nas reações de PCR, com volume final de 12,5 μ L: tampão de reação 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), MgCl₂ 2, 2,5 mM, dNTP 0,2 mM, iniciadores 0,5 μ M cada, Taq DNA polimerase 0,04 U/ μ L (Invitrogen Life Technologies) e 20 ng de DNA. As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos (1 ciclo), 94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos (35 ciclos) e extensão final a 72°C por 5 minutos (1 ciclo).

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%), a 3 V/cm de distância entre os eletrodos em tampão de corrida 1X TAE (pH 8,0), sendo utilizando o marcador de peso molecular 1KB-Plus DNA ladder. O gel foi visualizado em transluminador de ultravioleta.

4.10.2 Extração e quantificação do RNA

A extração do RNA das células foi realizada segundo o método do Hot Acidic Fenol, segundo Ausubel et al. (2000). Para extração do RNA, os isolados foram cultivados em ASD a 35°C durante 24 horas. O inóculo inicial foi preparado como descrito para a teste de susceptibilidade antifúngica. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) esterilizado em membranas de 0,22 μ m (Millipore, Darmstadt, Alemanha), com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e pH 7,0 \pm 0,1 tamponado com MOPS, 0,165 mol. L⁻¹ (Sigma-Aldrich) suplementado com 2% de glicose.

Para se analisar a influência das combinações sobre a expressão dos genes, os isolados, quando inoculados ao RPMI, foram tratados separadamente. De modo geral, seis tratamentos foram avaliados da seguinte forma: isolado clínico sem tratamento antifúngico, cepa ATCC sem tratamento antifúngico/composto, isolado clínico tratado com a CIM₅₀ do 2AT, cepa ATCC tratada com a CIM₅₀ do 2AT, isolado clínico tratado com a CIM₅₀ do 2B-amino e cepa ATCC tratada com a CIM₅₀ do 2B-amino.

Os isolados sem tratamento foram utilizados como controles. O ensaio de sensibilidade antifúngica foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços, sendo analisados nos tempos de 24h para o fluconazol, e 48h para os compostos. Após o tempo de incubação os poços foram lavados com tampão PBS, em água DEPC, e as células de *Candida* foram removidas com auxílio de

alças descartáveis e ressuspensas em tampão PBS H₂O-DEPC e transferidas para tubos eppendorf de 1,5mL.

A biomassa foi concentrada por centrifugação (15.000g por 3min) a 4°C e o sobrenadante desprezado. Em seguida, o pellet formado foi congelado a -80°C por 30min e ressuspensado em 200µL de tampão de extração (0,5% de SDS, 10mM de Tris-Cl, pH 7.5 e 10mM de EDTA). A cada amostra foi adicionado 200 µL de fenol ácido (pH 5), sendo a suspensão vortezada por 10s e incubada a 65°C por 30min. Ao fim do período de incubação, as amostras foram mantidas em gelo por 5min e centrifugadas a 10.000g, por igual período, a 4°C. Na etapa seguinte, foi possível visualizar três fases, consistindo da fase inferior, formada por detritos, uma intermediária contendo DNA e a porção superior, contendo o RNA.

Esta última fase foi transferida para tubos eppendorf limpos, sendo adicionado mesma proporção de fenol ácido e a amostra vortezada e centrifugada a 10.000g por 5min a 4°C. Novamente, foi recuperado a fase aquosa superior para tubos limpos e adicionado igual proporção de clorofórmio, sendo então a amostra vortezada e centrifugada a 10.000g por 5min a 4°C. Ao fim do processo, a fase aquosa superior foi transferida (~ 100 µL) para tubos de 600µL, sendo adicionado 20µL de acetato de sódio, pH 6, e 480 µL de etanol absoluto a -20°C para precipitação do RNA.

Os tubos foram centrifugados a 10.000g por 10min a 4°C e o pellet formado foi lavado com etanol 70% a -20°C. Por último, as amostras foram centrifugadas (10.000g por 5min a 4°C), sendo o etanol desprezado e o pellet seco por 10min a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspensado em H₂O-DEPC e eluído a 65°C por 10min. Em seguida, a integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose (1%) desnaturante (Hipoclorito de sódio a 2%) com tampão TBE 1X (Tris base 0,089M, Ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M pH 8,0) utilizando o marcador 1kbPlus DNA ladder.

Após a extração, o RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen, Foster City, California, USA), segundo recomendações do fabricante, para eliminar resquícios de DNA na amostra. Ademais, a qualidade e a quantificação do RNA total extraído foram aferidas a partir dos índices de absorbância das amostras, através de espectrofotometria em NanoDrop (Thermo Scientific). O RNA foi então mantido a -80°C até o momento das análises.

4.10.3 RT-PCR e PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A produção do cDNA, a partir do RNA total, foi realizada através do kit M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA-Madison, Wisconsin, USA) segundo recomendações do fabricante. O cDNA obtido foi conservado à -80°C , até a realização da qPCR. Os cDNAs dos genes *ALS3*, *UME6* e *ERG11* com o gene constitutivo *ACT1*, foram amplificados através do sistema de amplificação SYBR™ Green PCR Master Mix, no aparelho ABI 7500 fast (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), em volumes finais de 12 μL , sendo os testes realizados em triplicata.

Para a amplificação do cDNA, o processo seguiu com um ciclo inicial de 2 min a 95°C , e 30 ciclos de 95°C por 1min, 57°C por 1 min e 72°C por 1min. A análise dos dados foi realizada pelo programa 7500 Software v 2.0.6 (Applied Biosystems, Foster City, CA EUA). Os parâmetros fornecidos nos ciclos Cycle threshold (Ct) e as curvas de 53 melting foram utilizadas para validação do primer e do experimento. Adicionalmente, a determinação da eficiência do primer foi aferida através da fórmula: $E = \frac{Ct_f}{Ct_i} \times 100$, sendo considerados valores $\geq 90\%$.

A análise dos níveis de expressão dos genes através da técnica de RT-qPCR foi realizada utilizando o SSOAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) e um termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, EUA). O gene *ACT1* foi utilizado como controle interno. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1– Sequência de primers utilizados no estudo para RT-qPCR.

Região	Sequência do primer	Referência
ALS3-F	CAACTTGGGTTATTGAAACAAAACA	(KIM et al., 2017)
ALS3-R	AGAAACAGAAACCCAAGAACAACC	
UME6-F	ACCACCACTACCACCACCAC	
UME6-R	TATCCCATTTC CAAGTCCA	
ERG3- F	AGTGGGTGCAGTGATACAGT	(ZHOU et al., 2018)
ERG3-R	TGCGGGTAAGAAGGTTGGTT	
ACT1-F	CTCTTCTGGTAGAACACCGGTAT	(ŘIČICOVÁ et al., 2010)
ACT1-R	TAAAGAGAAACCAGCGTAAATTGGA	

Foram efetuadas amplificações dos genes alvos, sendo o coeficiente de expressão avaliado em relação ao gene constitutivo e pela diferença dos Ct do

gene alvo e do gene constitutivo. Os testes foram realizados em duplicata técnica e triplicata biológica, sendo o coeficiente de expressão determinado segundo o método de expressão relativa (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AÇÃO ANTIFÚNGICA E SINERGISMO

O antifúngico fluconazol faz parte dos compostos azóis, a qual é a classe de antifúngicos mais utilizada e a única opção de tratamento oral disponível para candidemia. No entanto, nos últimos anos sua utilidade é cada vez mais limitada devido ao surgimento de cepas resistentes, ameaçando sua eficácia em casos de candidíase invasiva (ESCRIBANO; GUINEA, 2022; TAN et al., 2021).

Conforme dados epidemiológicos, desde 2018 são relatados surtos graves entre adultos causados por cepas resistentes ao fluconazol. Estes surtos, estão associados a elevadas taxas de mortalidade, podendo persistir mesmo com estratégias rigorosas de controle da infecção (WIEDERHOLD, 2022).

As cepas resistentes ao fluconazol geram preocupação por vários motivos, incluindo a alta mortalidade de pacientes com doença invasiva. Além disso, em muitos países de baixa e média renda, o fluconazol é o antifúngico mais amplamente utilizado para tratar infecções por *Candida*, e tratamentos alternativos são caros ou não estão prontamente disponíveis (DANESHIA et al., 2023).

O surgimento de resistência ameaça a eficácia dos azólicos, visto que estudos apontam que até 2% dos isolados de *C. albicans* são resistentes a este medicamento, e a resistência em outras espécies pode chegar a 13%. De acordo com o relatório de 2019 do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA mais de 34.000 casos e 1.700 mortes anualmente foram devido à *Candida* spp. resistentes a medicamentos. Além disso, 323 casos de infecção emergente por *C. auris* multirresistente a medicamentos foram relatados (BHATTACHARYA; SAE-TIA; FRIES, 2020).

Derivados de tiofenos são compostos que apresentam características químicas versáteis e diversas atividades biológicas descritas. E, isto, os tornam moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos, e justifica o interesse em caracterizar suas propriedades antifúngicas, principalmente em casos de resistência (MABKHOT et al., 2016).

No presente trabalho, os compostos tiofênicos avaliados apresentaram atividade antifúngica frente a todas as cepas resistentes ao fluconazol. As cepas

apresentaram CMI de 8 a >64 µg/ml para o fármaco (Tabelas 2 e 3). Enquanto para os compostos tiofenos CMI de 100 a 200 µg/ml.

Para o composto 2AT com atividade descrita na tabela 2, apenas as cepas HG 03, HG 06, HG 09 e 10 apresentaram CMI de 200 µg/ml.

Tabela 2– Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Fracionada (FIC) de fluconazol (FLZ) do 2-amino-5,6,7,8-tetrahidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carboxilato (2AT) contra leveduras clínicas do gênero *Candida* spp.

Sinergismo 2AT/Fluconazol						
Código	Espécies	2AT (*)	FLZ (*)	2AT (**)	FLZ (**)	FIC
HG 01	<i>C. parapsilosis</i>	100	>8	0,12	0,3	0,03
HG 02	<i>C. tropicalis</i>	100	>64	0,4	0,6	0,01
HG 03	<i>C. tropicalis</i>	200	>64	0,4	0,6	0,01
HG 04	<i>C. albicans</i>	100	64	0,2	0,2	0,005
HG 05	<i>C. parapsilosis</i>	100	8	0,16	0,13	0,17
HG 06	<i>C. glabrata</i>	200	>64	0,16	0,3	0,004
HG 07	<i>C. albicans</i>	100	64	0,3	0,3	0,007
HG 08	<i>C. glabrata</i>	100	>8	0,2	0,3	0,03
HG 09	<i>C. glabrata</i>	200	>64	0,16	0,3	0,004
HG 10	<i>C. tropicalis</i>	200	16	0,4	0,6	0,03
HG 11	<i>C. albicans</i>	100	>8	0,2	0,3	0,03
HG 12	<i>C. tropicalis</i>	100	8	0,4	0,6	0,07
ATCC (14053)	<i>C. albicans</i>	100	>8	0,2	0,25	0,03

A interação da combinação foi definida pelos valores de FIC e o sinergismo foi definido por um $FIC \leq 0,5$, enquanto a aditividade foi definida como um $FIC > 0,5 < 1$. A indiferença foi definida como um $FIC > 1 < 4$, enquanto o antagonismo foi definido como um $FIC > 4$. (*) composto/ antifúngico isolados (**) composto/ antifúngico combinados. Fonte: A autora (2024).

Essa atividade antifúngica dos compostos 2-aminotiofeno já vem sendo observada em diversos estudos (SINGH; SINGH; BEDI, 2020). Luna et al. (2021) observaram que esses compostos apresentaram promissora atividade antifúngica *in vitro* contra fungos dermatófitos e *C. parapsilosis*. Em outro estudo, Neves et al. (2020) também demonstraram atividade semelhante dessa classe de compostos frente a *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

Quanto a ação antifúngica do composto 2B-amino descritos na tabela 3, a maioria das cepas de *Candida* apresentaram CMI de 100 µg/ml, exceto os dois isolados de *C. glabrata* (HG 08 e 09).

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração inibitória fracionada (FIC) de fluconazol (FLZ) e do 2-(Benzilidenoamino)-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclohepta[b]-tefteno-3-carbonitrila (2B-A) contra leveduras clínicas do gênero *Candida* spp.

Sinergismo 2B-AMINO/Fluconazol						
Código	Espécies	2B-A (*)	FLZ (*)	2B-A (**)	FLZ (**)	FIC
HG 01	<i>C. parapsilosis</i>	100	>8	0,16	0,16	0,002
HG 02	<i>C. tropicalis</i>	100	>64	0,3	0,16	0,002
HG 03	<i>C. tropicalis</i>	100	>64	0,3	0,16	0,002
HG 04	<i>C. albicans</i>	100	64	0,2	0,2	0,002
HG 05	<i>C. parapsilosis</i>	100	8	0,2	0,16	0,003
HG 06	<i>C. glabrata</i>	100	>64	0,16	0,16	0,001
HG 07	<i>C. albicans</i>	100	64	0,2	0,3	0,003
HG 08	<i>C. glabrata</i>	200	>8	0,16	0,16	0,001
HG 09	<i>C. glabrata</i>	200	>64	0,16	0,16	0,001
HG 10	<i>C. tropicalis</i>	100	16	0,3	0,16	0,003
HG 11	<i>C. albicans</i>	100	>8	0,3	0,2	0,004
HG 12	<i>C. tropicalis</i>	100	8	0,3	0,16	0,004
ATCC (14053)	<i>C. albicans</i>	100	>8	0,2	0,3	0,004

A interação da combinação foi definida pelos valores de FIC e o sinergismo foi definido por um $FIC \leq 0,5$, enquanto a aditividade foi definida como um $FIC > 0,5 < 1$. A indiferença foi definida como um $FIC > 1 < 4$, enquanto o antagonismo foi definido como um $FIC > 4$. (*) composto/ antifúngico isolados (**) composto/ antifúngico combinados. (*) composto/ antifúngico isolados (**) composto/antifúngico combinados. Fonte: A autora (2024).

Atividade antifúngica dos benzotiofenos foram descritas por Zhao et al. (2022). Os autores sintetizaram uma série de derivados de 2-(benzo[b]tiofen-2-il)-4-fenil-4,5-diidrooxazol e observaram que estes compostos exibiram excelente atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. Mashid et al. (2022) também detectaram atividade antimicrobiana do 3-halobenzo[b]tiofenos frente a bactérias gram-positivas e *C. albicans*.

Além disso, é importante ressaltar que os compostos apresentaram atividade antifúngica frente a cepas resistentes ao fluconazol. Esses dados corroboram com Ajdacic et al. (2016) também observaram que compostos à base de tiofeno exibiram excelente atividade contra *C. albicans* resistentes ao antifúngico voriconazol. Em outro estudo, Yin et al. (2022) observaram que derivados de 5-feniltiofeno mostraram atividade fungicida e inibiram o crescimento de *C. albicans* resistente a fluconazol.

Apesar das pesquisas e consequentes descobertas de novos compostos com potencial antifúngico, o fluconazol continua sendo amplamente utilizado.

Este fármaco possui ação fungistática, o que significa que o medicamento inibe o crescimento, mas não elimina o patógeno fúngico. Isso, proporciona muitas vezes, a oportunidade para o desenvolvimento de resistência. Dada a utilidade do fluconazol, há um interesse considerável em prevenir essa resistência (LU et al., 2021). Uma estratégia promissora para aumentar a eficácia do fluconazol é identificar fármacos sinérgicos que possam aumentar seu efeito antifúngico, ou mesmo reduzir o surgimento dessa resistência, tornando-o fungicida (TORTORANO et al., 2021).

Sendo assim, os compostos tiofênicos (2AT e 2B-amino) foram avaliados de forma isolada e também em combinação com o fluconazol. Em ambas as situações os compostos demonstraram ação de 100% de inibição fúngica. Quando em associação com fluconazol, os derivados tiofênicos demonstraram efeito sinérgico frente a todas as cepas apresentando $FIC \leq 0.5$ como demonstrados nas tabelas 2 e 3.

Desta forma, neste estudo, foi observado forte efeito sinérgico do fluconazol com os compostos analisados. Achados semelhantes foram obtidos por Mohammed et al.(2022) que observaram efeito sinérgico do cetoconazol e derivados de tiazol-4-ona/tiofeno contra *C. albicans*.

A abordagem de potencialização de fármacos antifúngicos em associação com os compostos tiofenos têm sido pouco estudada, por isso os dados disponíveis que demonstrem essa atividade são escassos.

Quanto ao aumento da atividade de fluconazol, existem alvos que são conhecidos por aumentar sua eficácia. Em casos de resistência, o fluconazol pode ser sinergizado se um composto o ajudar a causar danos ao inibir funções que conferem essa resistência. Os fatores de transcrição Ndt80, que são conhecidos por desempenhar um papel importante na expressão de enzimas relacionadas à biossíntese de ergosterol, transição morfológica e também está relacionado à resistência a fluconazol (LU et al., 2021)

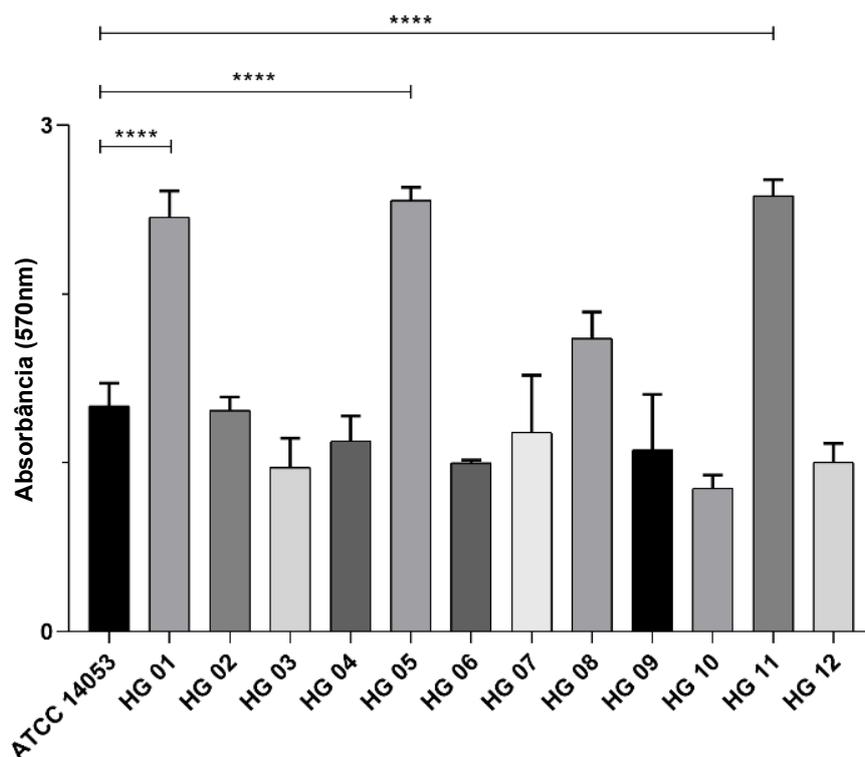
Além disso, Neto et al. (2017) observaram em seus estudos que derivados de 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazona N-substituídos são potenciais agentes antifúngicos com atividade associada à inibição de enzimas relacionadas à biossíntese de ergosterol. Portanto, a possível inibição de enzimas ou genes relacionados à síntese de ergosterol poderia ser um potencial alvo sinérgico do fluconazol quando associado aos compostos tiofenos.

5.2 PRODUÇÃO DE BIOFILME

Um sério agravante nas infecções por *Candida* é a capacidade dessas leveduras em formar biofilmes em superfícies do hospedeiro. Essas comunidades além de garantir resistência significativa ao tratamento antifúngico ao limitar a penetração de substâncias através da matriz, protegem as células das respostas imunológicas do hospedeiro e assim, representam uma ameaça do ponto de vista de uma fonte permanente de infecção (AJETUNMOBI et al., 2023).

A formação de biofilmes é de extrema relevância clínica, pois há uma ligação entre resistência antifúngica e virulência. Em nosso estudo, foi observado que todos os isolados conseguiram formar biofilme ativo em 48 horas (Gráfico 1).

Gráfico 1– Formação de biofilme por isolados clínicos de *Candida* spp.



Os símbolos "****" indicam diferenças significativas entre a porcentagem de produção de biofilme ($p \leq 0,0001$). Fonte: A autora (2024).

Nossos dados corroboram com Boher et al.(2022) que confirmaram em seus resultados que há uma correlação positiva entre as aumento CMI de azóis em algumas espécies de e a formação mais pronunciada de biofilme. E conforme dados de Eixx e Nett (2020) que além de *C. albicans*, outras espécies clinicamente relevantes, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* também formam biofilmes.

Como é possível observar no gráfico 1, os isolados do complexo *C. parapsilosis* (HG 01 e HG 05), juntamente com uma cepa de *C. albicans* (HG 11) apresentaram a maior produção de biofilme em comparação às demais cepas. Em contrapartida, as cepas de *C. glabrata* (HG 06, 08 e 09), demonstraram a menor capacidade de produção de biofilme, com exceção do isolado HG 08.

C. glabrata também é uma das principais espécies responsáveis pela candidíase e apresenta alta tolerância antifúngica, além de importantes características de adesão (MCCARTY; WHITE; PAPPAS, 2021). Martínez-Herrera et al. (2022) em seus estudos, destacaram a alta taxa de mortalidade relatada em casos de infecções invasivas por *C. glabrata*. Além disso, esta espécie pode secretar enzimas hidrolíticas e proteolíticas que permitem sua adesão às células hospedeiras e dispositivos médicos invasivos. Da mesma forma, é capaz de formar biofilmes que fornecem resistência antifúngica e também exibem grande plasticidade genômica (FRÍAS-DE-LEÓN et al., 2021)

Em nosso estudo, as cepas de *C. tropicalis* não demonstraram alta produção de biofilme, ao contrário dos resultados observados por Konečná et al. (2021) que descreveu que a espécie poderia ser categorizada como uma forte produtora de biofilme. Atiencia-Carrera et al. (2022) demonstraram que *C. tropicalis* é a espécie mais prevalente entre os organismos formadores de biofilme, ainda mais do que *C. albicans*.

Dos isolados de *C. albicans* (HG 04, 07, 11 e ATCC 14053), todos apresentaram moderada capacidade de formação de biofilme, exceto o isolado HG 11.

Apesar da bem documentada capacidade das espécies de *Candida* em formar biofilmes, cada espécie exibe diferenças em termos de formação, morfologia, características da matriz extracelular e capacidade de conferir resistência antifúngica. Esta variabilidade aumenta o desafio de encontrar uma solução eficaz para tratar os biofilmes de *Candida* como um problema único.

Devido ao surgimento destas infecções fúngicas, existe uma necessidade urgente de encontrar abordagens terapêuticas adequadas que possam ser capazes de tratar os pacientes de forma mais eficiente (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

5.3 EFEITO ANTIBIOFILME

Estudos apontam que a estratégia mais eficaz pode ser prevenir a formação de biofilme em vez de tratar o biofilme uma vez formado (FAN et al., 2022).

Em nossos resultados, quando expostas aos compostos tiofenos todas as cepas apresentaram significativa diminuição da produção de biofilme *in vitro* em até 48h quando comparadas com os controles (Gráfico 2 e 3).

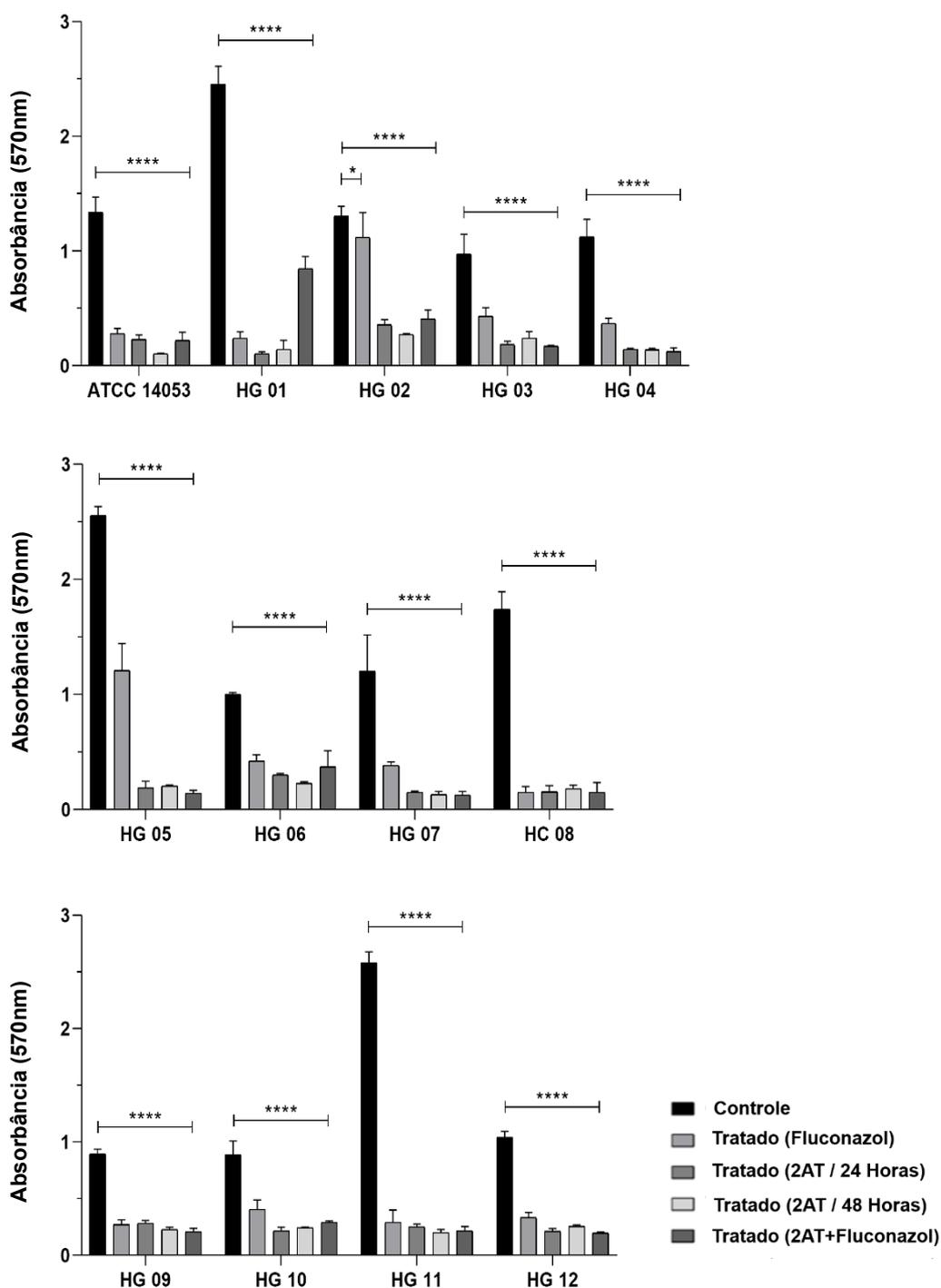
O composto 2AT inibiu a formação de biofilme das células fúngicas, ou seja, diminuiu a proliferação fúngica e a adesão das células fúngicas. Quando em combinação com o fluconazol resultou em um forte efeito antibiofilme, que também pode suprimir o crescimento local de células de *Candida* que não aderem à superfície (Gráfico 2).

Quanto ao composto 2B-amino, todas as cepas quando expostas ao composto apresentaram significativa diminuição da produção de biofilme *in vitro* em até 48h quando comparadas com os controles, com destaque para os isolados HG 01, 05, 08 e 10 como demonstrado no gráfico 3. Em nossos dados também observamos que o composto tiofeno foi mais efetivo em inibir a formação dos biofilmes de *Candida* em 48 h, superando assim os efeitos em 24h, ou até mesmo quando expostas à associação do 2B-amino e fluconazol.

Na literatura, poucos estudos recentes descreveram o efeito antibiofilme de derivados tiofênicos contra espécies de *Candida*. Em contrapartida, há vários demonstrando seus efeitos em biofilmes bacterianos como Çınarlı et al. (2024) que observaram que o composto 2-tiofeno carboxaldeído apresentou forte inibição de biofilme em isolados de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Mohamed et al. (2022) também observaram que derivados de tiazol-4-ona/tiofeno inibiram a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* e *S.*

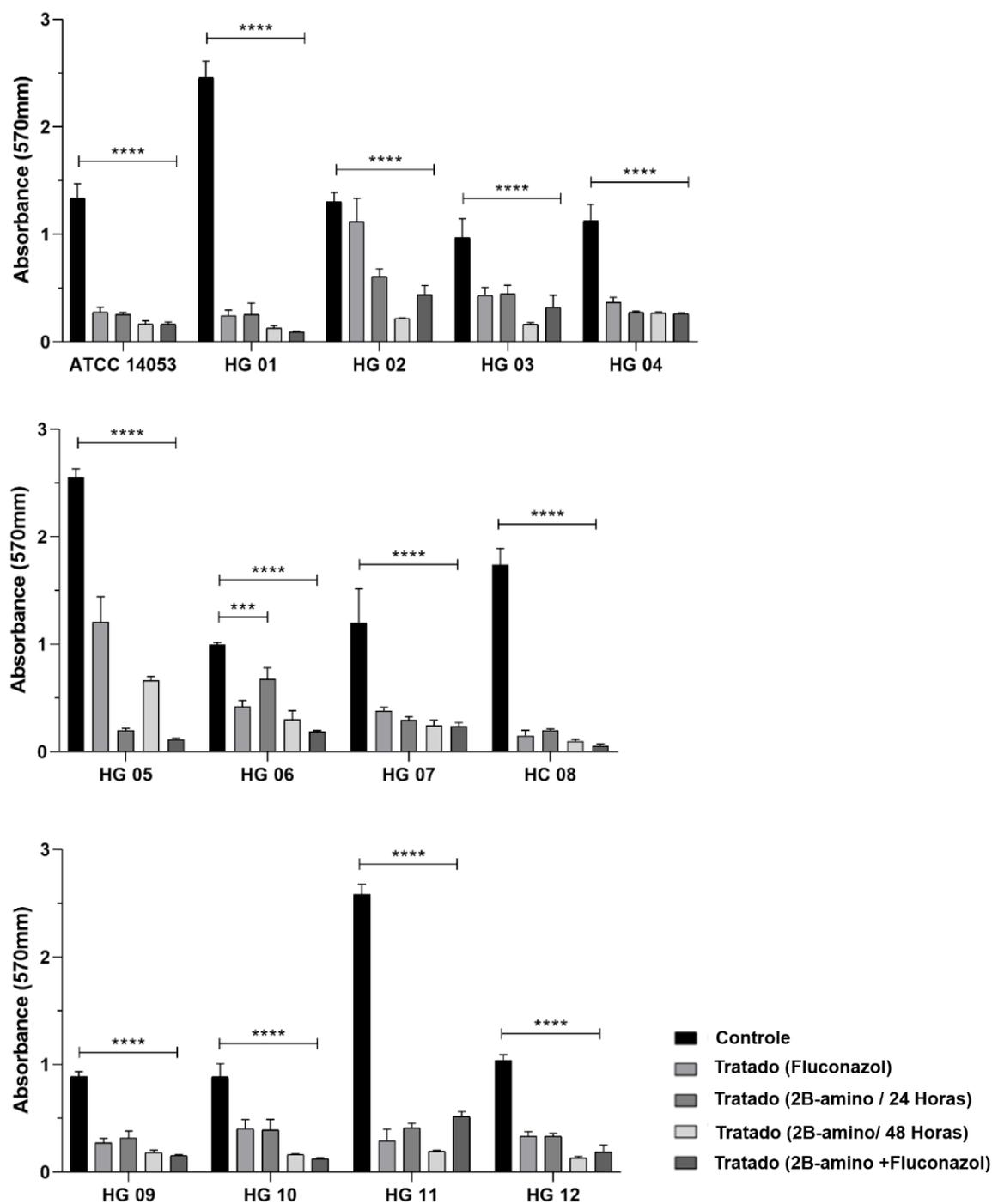
epidermidis. Com relação a patógenos fúngicos, atividade semelhante foi observada por Neves et al. (2020) contra *C. neoformans*.

Gráfico 2 – Efeito antibiofilme in vitro de cepas de *Candida* tratadas com 2AT. Os dados demonstram a atividade do composto e fluconazol isoladamente, e em combinação por 24 e 48 horas. Os símbolos “****” indicam diferenças significativas entre a porcentagem de produção de biofilme ($p \leq 0,0001$).



Fonte: A autora (2024).

Gráfico 3 – Efeito antibiofilme in vitro de cepas de *Candida* tratadas com 2B-amino. Os dados demonstram a atividade do composto e fluconazol isoladamente, e em combinação por 24 e 48 horas. Os símbolos “****” indicam diferenças significativas entre a porcentagem de produção de biofilme ($p \leq 0,0001$).



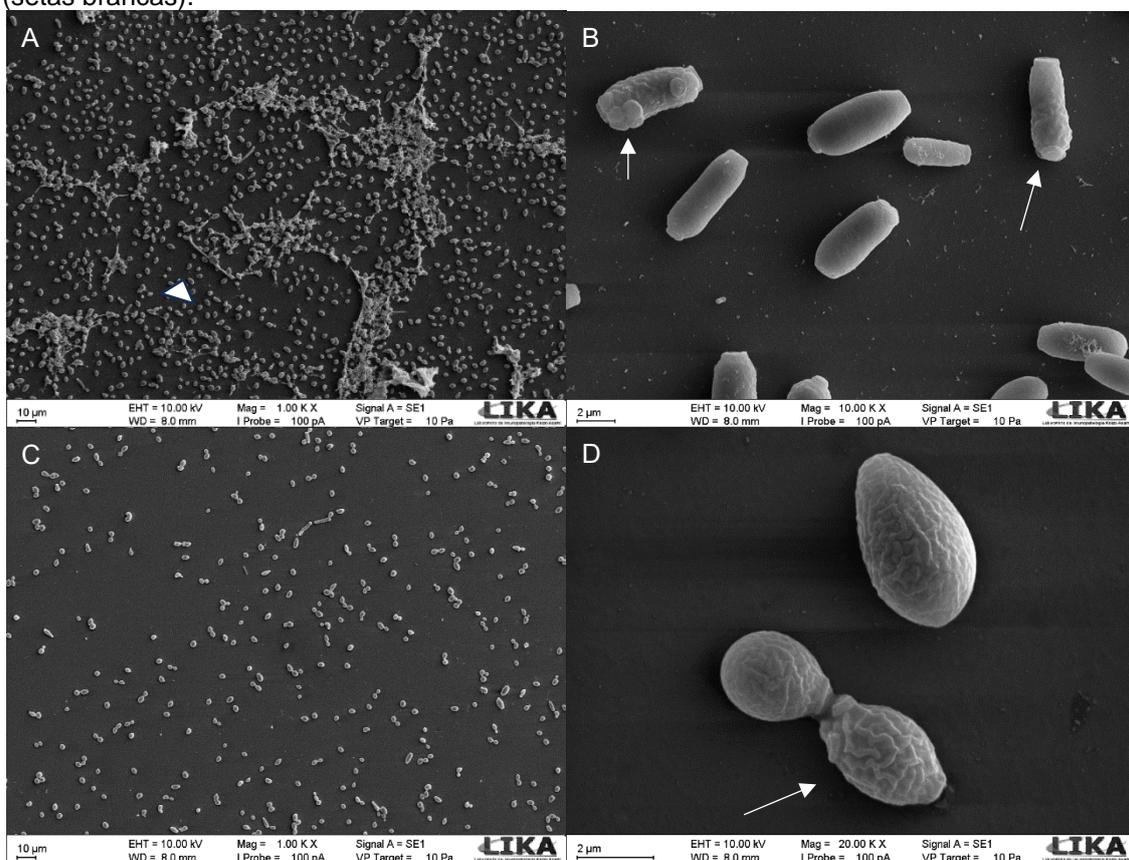
Fonte: A autora (2024).

5.4 MICROSCOPIA DE ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise ultraestrutural das células de leveduras tratadas com o composto tiofênico e visualizadas por microscopia eletrônica de varredura não mostraram alterações significativas na parede celular em *Candida* spp. em concentrações subinibitórias (50% de crescimento fúngico) (Figura 9 e 10).

Para o composto 2AT dentre as alterações observadas estão a redução da biomassa e presença de rugosidade das paredes celulares da levedura (Figura 9). Vale ressaltar que os resultados obtidos foram observados na concentração subinibitória de 0,78 µg/ml (50% de crescimento fúngico), pois na concentração de 100 µg/ml houve ação fungicida em 100% das células de *Candida*.

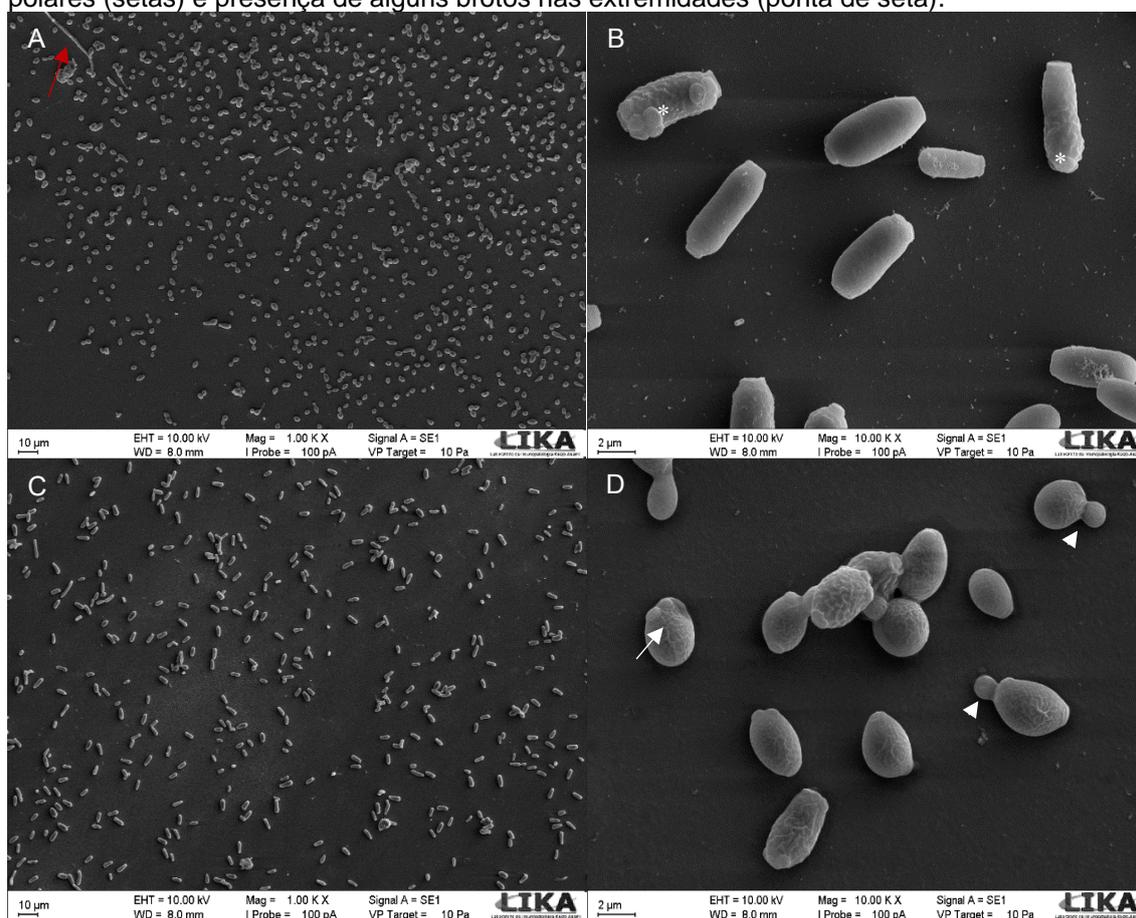
Figura 9 – Micrografias eletrônicas *C. albicans* ATCC 14053 (AB) na ausência do composto 2AT e (CD) sob efeito do composto. A) Presença de numerosas células fúngicas, filamentos de hifa (ponta de seta). B) Células fúngicas apresentam paredes intactas e lisas, com presença de cicatrizes polares (setas brancas). C) Sob efeito do composto tiofeno, há redução significativa de células e biomassa. D) Células tratadas com 2AT, apresentando paredes celulares rugosas (setas brancas).



Fonte: A autora (2024).

Apesar da forte inibição do composto 2B-amino frente a células sésseis, nas células planctônicas a análise por microscopia eletrônica de varredura não demonstrou alterações na superfície de células de *Candida*, indicando que o derivado tiofênico não causa danos estruturais nessa levedura (Figura 10). Esses resultados contrariam, Araujo Neto et al. (2017) que observaram os derivados de 5-nitro-tiofeno-tiossemicarbazonas causam redução da biomassa fúngica, bloqueio da filamentação, perda e irregularidades na integridade da parede celular e extravasamento de material celular nas células de *Candida*.

Figura 10 – Micrografias eletrônicas de *C. albicans* ATCC 14053 na ausência de 2B-amino (AB) e tratada em uma concentração subinibitória de 12,5 µg/mL (CD). A) Presença de numerosas células de levedura isoladas e filamento de hifas (seta vermelha). B) Células de *Candida* mostrando superfícies lisas e cicatrizes polares (asteriscos). C) Células fúngicas expostas a 2B-amino mostrando número reduzido de células e ausência de hifas. D) Células tratadas com tiofeno mostrando um pequeno aglomerado de células interconectadas, presença de cicatrizes polares (setas) e presença de alguns brotos nas extremidades (ponta de seta).

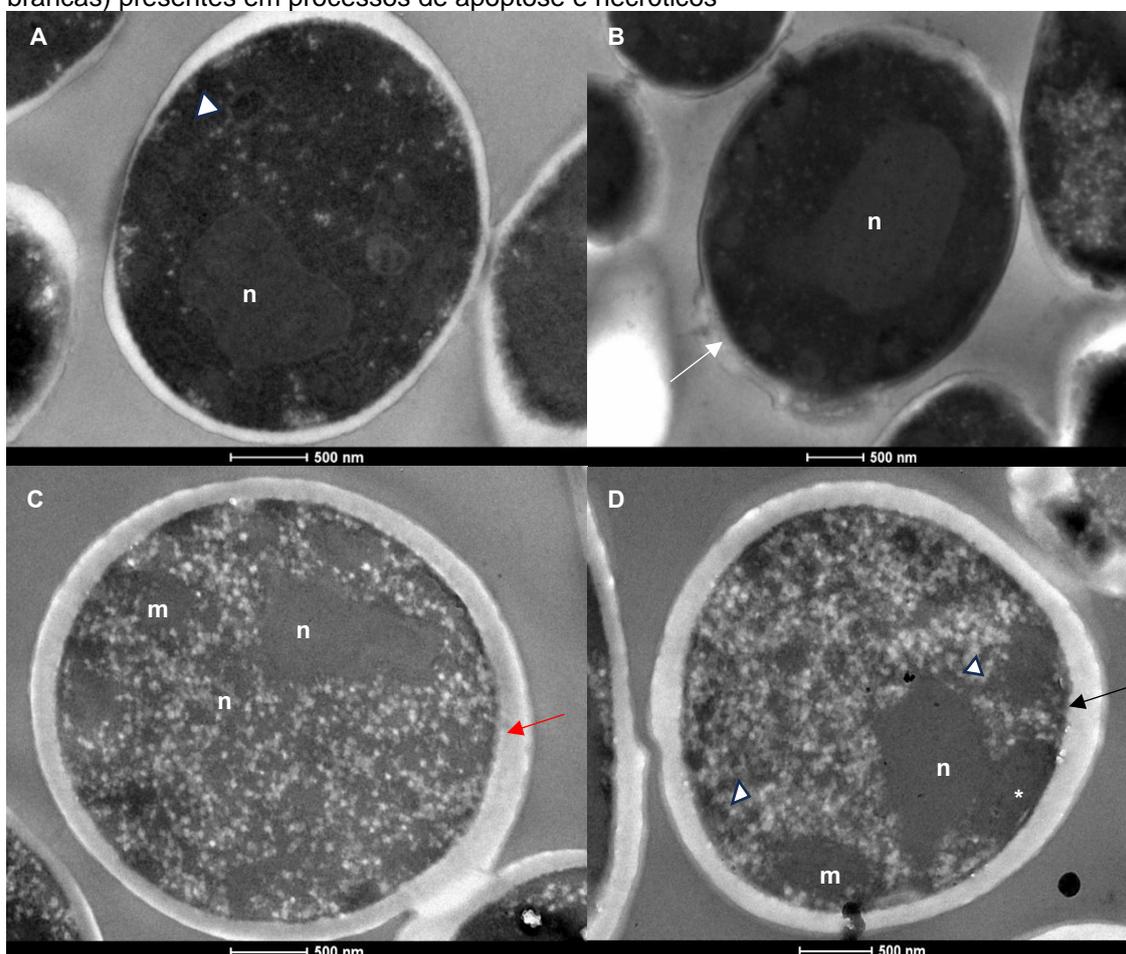


Fonte: A autora (2024).

5.5 MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO

A microscopia eletrônica de transmissão de células tratadas com o composto tiofeno 2AT em concentrações de 0,78 $\mu\text{g/ml}$ revelou alterações morfológicas características de apoptose, como condensação e marginação da cromatina (Figura 11).

Figura 11 – Micrografias de transmissão de células *C. albicans* ATCC 14053 na ausência de 2AT (AB) e tratadas em concentração subinibitória (CD). AB) Células de *C. albicans* não tratadas, mostrando núcleos (n) e mitocôndrias (pontas de setas brancas). CD) Células de *C. albicans* tratadas com o derivado de tiofeno, mostrando inchaço mitocondrial (m), espessamento da parede celular (seta vermelha) e desintegração da membrana (setas pretas) e migração da cromatina (asterisco branco), e presença de agregações de pequenos vacúolos (pontas de setas brancas) presentes em processos de apoptose e necróticos



Fonte: A autora (2024).

De Araújo et al. (2017) observaram achados semelhantes ao determinar que o tiofeno-tiossemicarbazona causou retração da membrana plasmática, alterações no formato das mitocôndrias e do núcleo, causando apoptose em células de *C. albicans* devido ao estresse oxidativo. Em outro estudo, Fayed et

al.(2022) observaram que o ciclohepta[b]tiofeno pode induzir danos a uma enzima importante em muitos processos biológicos básicos envolvendo o DNA de bactérias e leveduras.

Além desses achados, também é possível observar agregações de pequenos vacúolos (Figura 11), resultados também encontrados e compatíveis com o mecanismo de ação da anfotericina B. Esses resultados corroboram os estudos de Grela et al. (2019) que descobriram que as células de *Candida* apresentaram essa resposta quando expostas à anfotericina B. De acordo com o estudo, esses vacúolos fornecem um meio de autodefesa contra alguma atividade tóxica para células de levedura.

Em nosso estudo, o tiofeno pode ter induzido danos à membrana de *Candida* e, quando em combinação com fluconazol, também pode ter causado danos diretos ao DNA (DE ARAÚJO NETO et al., 2020). O aumento do efeito do fluconazol quando combinado com tiofeno exibiu alterações no nível nuclear em células de *Candida*, corroborando os dados de Lu et al. (2021). No estudo, os autores demonstraram que distúrbios na resposta a danos no DNA e nas funções do ciclo celular dessas leveduras podem melhorar a eficácia do fluconazol.

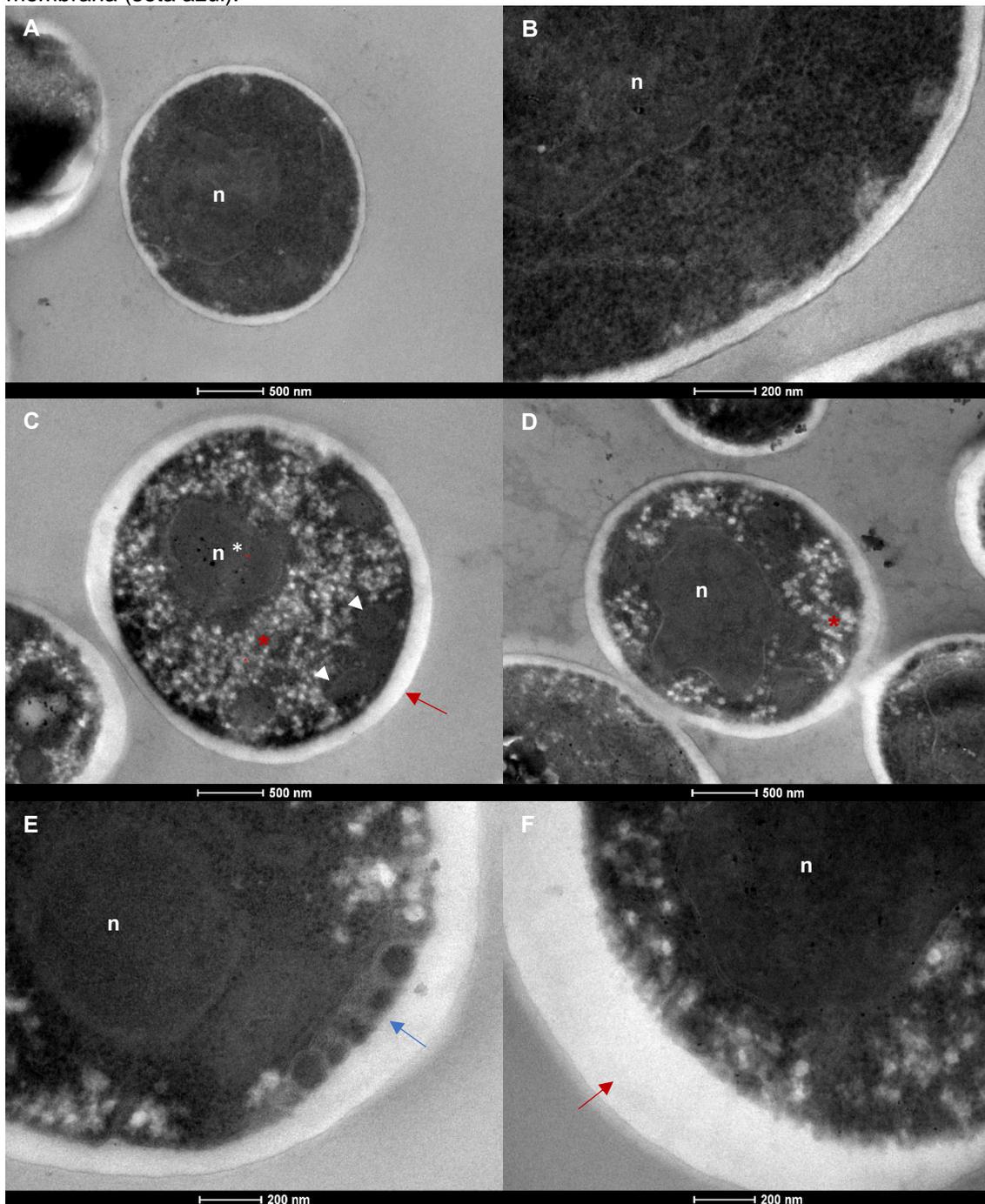
Além disso, o tiofeno também pode atuar nas mitocôndrias, uma vez que são decisivas para a morte celular, conforme observado por De Araújo Neto et al. (2017). A ação do tiofeno em conjunto com fluconazol pode causar distúrbios no potencial de membrana que levam à diminuição da produção de energia metabólica e à redução da transcrição e tradução de genes mitocondriais, levando à apoptose e/ou necrose (DE ARAÚJO NETO et al., 2020).

A análise por microscopia de transmissão das células tratadas com o composto 2B-amino, detectamos alterações importantes, como o espessamento da parede celular, desintegração da membrana e retração nuclear (Figura 12).

A parede celular e a membrana celular são essenciais não apenas para a viabilidade e morfologia das células *Candida*, mas também para a virulência através de diversas vias de sinalização. Portanto, alterações mínimas na integridade estrutural da parede celular ou da membrana podem resultar na morte. Especificamente, a integridade prejudicada da membrana celular é uma característica da necrose celular (DE ARAÚJO NETO et al., 2017). Portanto, nossos resultados indicam que quando expostas ao composto essas leveduras,

em concentrações subinibitórias já podem estar no início do processo de morte celular.

Figura 12 – Micrografias eletrônicas de transmissão de *C. albicans* ATCC 14053 na ausência do composto 2B-amino (AB) e tratadas com o composto em uma concentração subinibitória de 12,5 µg/mL (CDEF). A) Células de *C. albicans* não tratadas, mostrando núcleos (n) em aumento de 500 nm. B) Visualização do núcleo e da parede de *Candida* mostrando a espessura fina da parede celular, bem como a ausência de alterações na parede e na membrana em aumento de 200 nm. CD) Células de *Candida* tratadas com o composto, mostrando retração nuclear (n*), mitocôndrias (ponta de seta), espessamento da parede celular (seta vermelha) e a presença de agregações de pequenos vacúolos (asteriscos vermelhos). EF) *Candida* em aumento de 200 nm evidenciando espessamento da parede celular (seta vermelha), irregularidades e lesões na membrana (seta azul).



Fonte: A autora (2024).

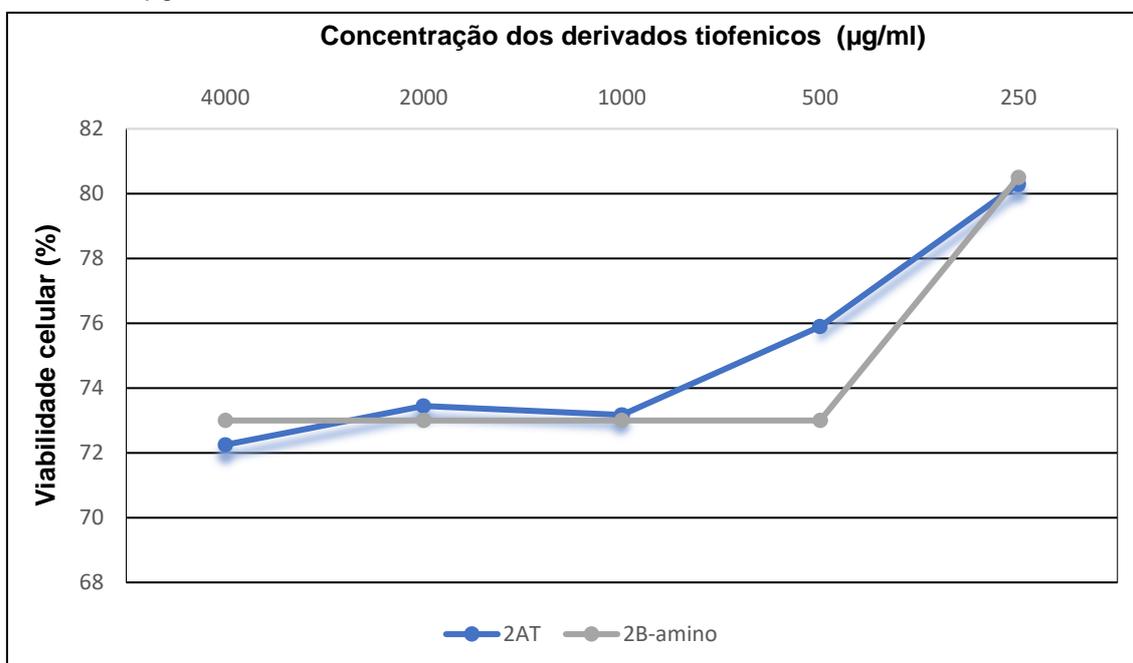
4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Em relação à citotoxicidade do derivado de tiofeno 2AT e 2B-amino, avaliamos a viabilidade celular de macrófagos J774 na presença do composto em concentrações que variaram de 250 a 4000 $\mu\text{g/mL}$.

Os dados revelaram que a linhagem celular avaliada não foi afetada quando incubada com os compostos na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, apresentando viabilidade celular de 72% para o 2AT e 73% para o 2B-amino até a concentração de 4000 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 4).

Nossos resultados indicam que há seletividade do composto com células fúngicas. Esses dados corroboram os de Sousa et al. (2023) que avaliaram a citotoxicidade do derivado de 2-amino-tiofeno SB-200 contra larvas de *Zophobas morio* e observaram 100% de sobrevivência. Al-Warhi et al. (2023) também não detectaram efeito citotóxico significativo em células vero sob efeito de híbridos baseados em benzo[b]tiofeno.

Gráfico 4 – Viabilidade celular do composto 2AT e 2B-amino em células de macrófagos J774. Dados obtidos através da redução do MTT, demonstrando a viabilidade celular (em porcentagem) de macrófagos quando expostos a concentrações dos compostos, variando entre 250 e 4000 $\mu\text{g/ml}$.



Fonte: A autora (2024)

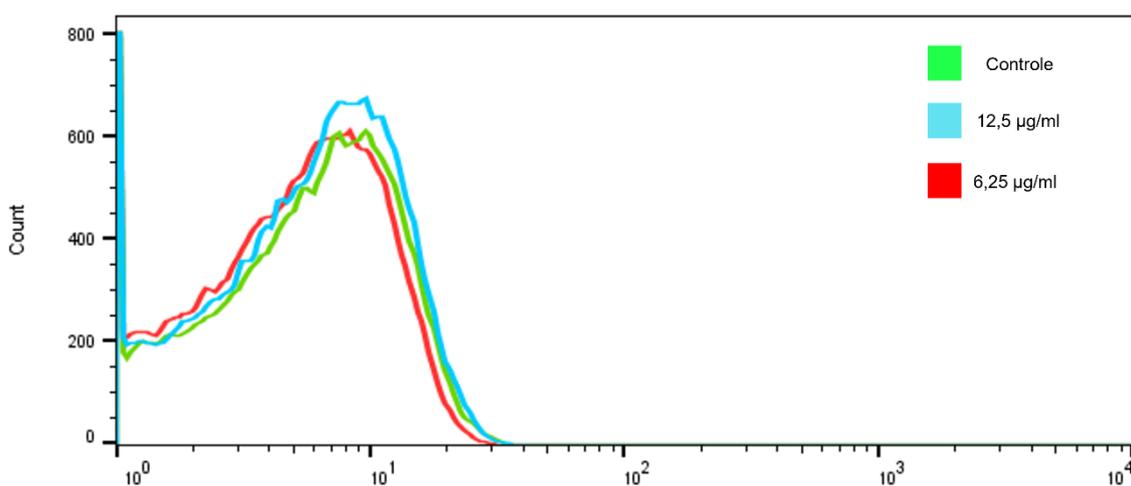
5.7 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Estudos apontam que níveis aumentados de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) no ambiente celular podem contribuir com para a necrose celular. As EROs são produzidas em condições fisiológicas normais e estão envolvidas em múltiplos processos biológicos, sendo produzidos principalmente pelas mitocôndrias (MA et al., 2023)

Quando as células de *Candida* spp. encontram estímulos externos, como oxidantes, choque térmico e íons metálicos, entre outros fatores, elas aumentam a geração de ERO para resistir à pressão do ambiente externo. Se as ERO produzidas pela célula excederem sua capacidade metabólica, o excesso de ERO intracelular induz dano oxidativo aos lipídios, DNA, proteínas e outros componentes celulares, como a membrana plasmática, o que pode levar à morte celular apoptótica ou necrótica (MA et al., 2023; SHAHINA ZINNAT AND AL HOMSI, 2022).

Neste contexto, afim de investigar o principal mecanismo de ação dos compostos tiofênicos a produção EROS por *Candida* foi avaliada. Sendo assim, foi possível observar que a cepa ATCC de *C. albicans* produziu espécies reativas de oxigênio na presença do composto tiofênico 2AT (Figura 13).

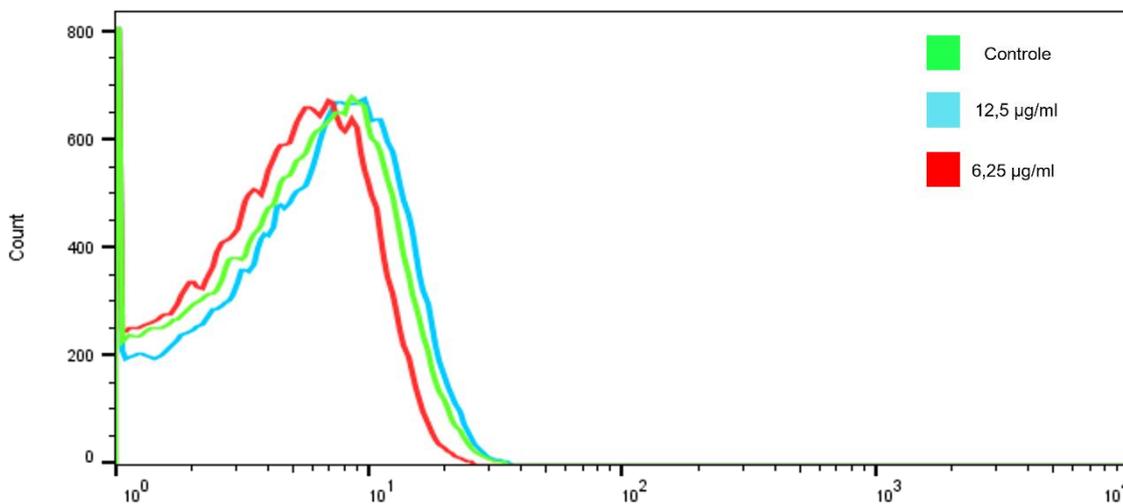
Figura 13 – Intensidades de fluorescência em células ATCC 14503 *C. albicans* tratadas (6,25 e 12,45 µg/mL), não tratadas (controle) com 2AT e marcadas com DCFH-DA.



Fonte: A autora (2024).

Diferentemente, o isolado clínico da mesma espécie HG 04, não produziu EROS nas concentrações analisadas, conforme observado na figura 14.

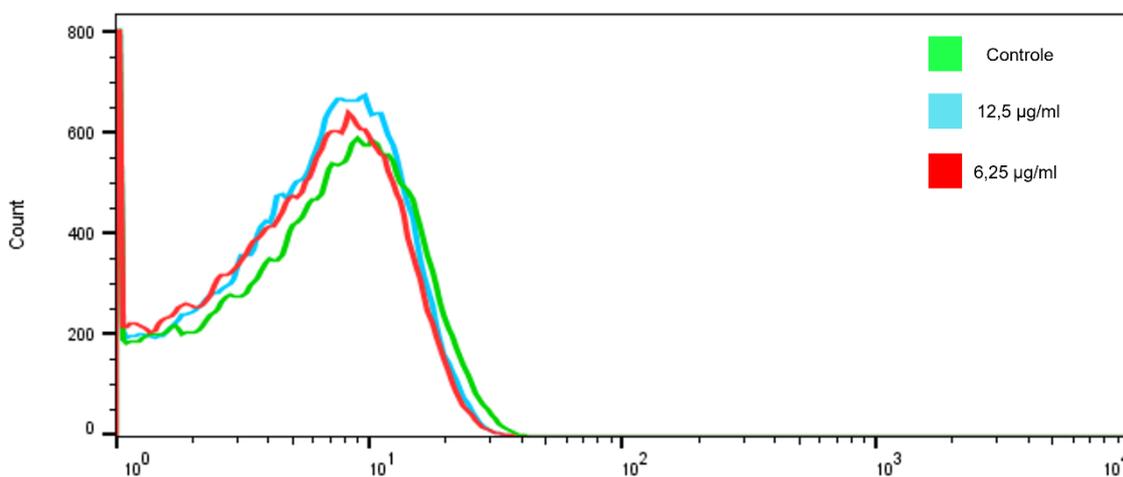
Figura 14 – Intensidades de fluorescência em células HG 04 *C. albicans* tratadas (6,25 e 12,45 µg/mL), não tratadas (controle) com 2AT e marcadas com DCFH-DA



Fonte: A autora (2024).

Para o derivado 2B-amino, tanto a cepa ATCC quanto o isolado clínico de *C. albicans* produziram EROS (Figuras 15 e 16).

Figura 15 – Intensidades de fluorescência em células ATCC 14503 *C. albicans* tratadas (6,25 e 12,45 µg/mL), não tratadas (controle) com 2B-amino e marcadas com H₂DCFDA



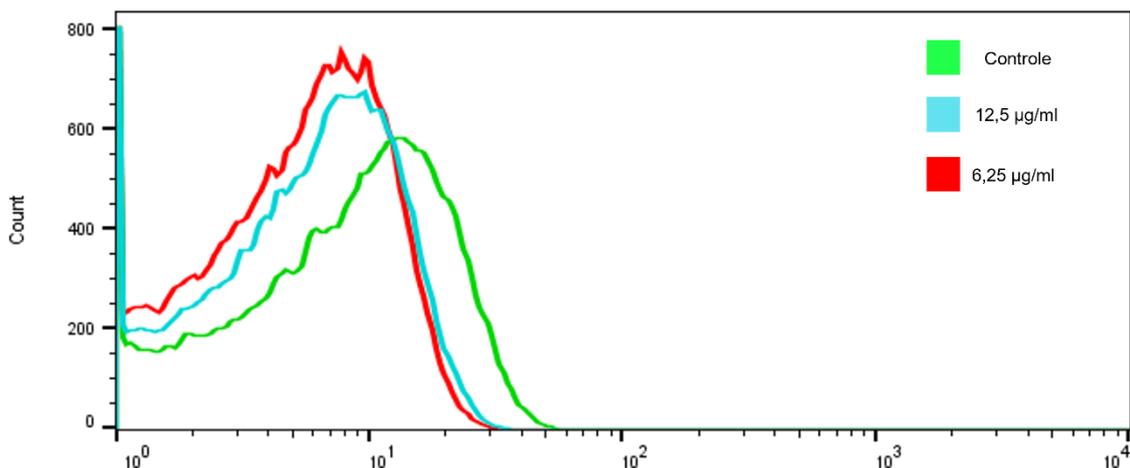
Fonte: A autora (2024).

Achados semelhantes foram detectados por Araujo Neto et al. (2017) também de um derivado de tiofeno-tiossemicarbazona. Espécies reativas de fontes exógenas podem induzir morte celular programada em *Candida*. EROS interagem com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, causando danos irreversíveis ao patógeno. Danos ao DNA causados por ROS podem resultar em

mudanças químicas de base, alterações estruturais, quebras de fita simples e dupla e reticulação (DANTAS et al., 2015).

Nossos dados sugerem que o dano à parede celular e à membrana induzido pelo 2B-amino pode levar ao estresse oxidativo causando danos ao DNA e assim induzir a apoptose.

Figura 16 – Intensidades de fluorescência em células HG 04 *C. albicans* tratadas (6,25 e 12,45 µg/mL), não tratadas (controle) com 2B-amino e marcadas com H₂DCFDA



Fonte: A autora (2024).

5.8 EXPRESSÃO DOS GENES ALS3, UME6 e ERG3

O sucesso das espécies de *Candida* como patógeno humano depende de múltiplas estratégias de virulência, incluindo plasticidade morfológica e formação de biofilme (ROSIANA et al., 2021).

Neste estudo, conforme demonstrado na tabela 4, foram observadas diminuições apenas nos níveis de expressão dos genes *ALS3* sob efeito do composto 2AT nas duas cepas de *C. albicans* avaliadas. Enquanto para o *UME6* e *ERG3* não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão.

Tabela 4– Níveis de expressão dos genes alvos nas cepas de *C. albicans* frente composto 2AT.

Cepa	2 ^{-ΔΔCt} ALS3	2 ^{-ΔΔCt} UME6	2 ^{-ΔΔCt} ERG3
ATCC 14503	-80,11	2,72	-9,36
HG 04	-52,94	3,39	-3,45

Fonte: A autora (2024).

A expressão do gene *ALS3* impacta na adesão e formação de biofilmes em *Candida* spp. uma possível interferência podem gerar defeitos no mesmo (BRANCO; MIRANDA; RODRIGUES, 2023). Uma cepa mutante de *C. albicans* incapaz de expressar *ALS3* forma biofilmes mais fracos e desorganizados. Além disso, a interrupção de *ALS3* reduz a biomassa do biofilme quando comparado com os controles (PONDE et al., 2021).

Segundo Kornitzer a exclusão de *ALS3* restringe a adesão a superfícies, portanto, cepas deficientes em *ALS3* ou com expressão reduzida podem formar micélios, mas não podem formar biofilmes. Ainda segundo o autor, *ALS3* é um alvo crucial para pesquisa sobre a eficácia de novos agentes antibiofilme.

Para o composto 2B-amino houve redução na expressão dos três genes para a cepa ATCC. No entanto, na cepa clínica apenas para o gene *UME6* não demonstrou redução nos níveis de expressão (Tabela 5).

Tabela 5 –Níveis de expressão dos genes alvos nas cepas de *C. albicans* frente composto 2B-amino.

Cepa	$2^{\Delta\Delta Ct}$ ALS3	$2^{\Delta\Delta Ct}$ UME6	$2^{\Delta\Delta Ct}$ ERG3
ATCC 14503	-16,21	-77,76	-17,55
HG 04	-111,61	-8,08	-45,62

Fonte: A autora (2024).

A expressão do gene *UME6* está intimamente relacionada a transição morfológica nas espécies de *Candida*. Atriwall et al. (2021) mostrou que expressão reprimida desse e de outros genes relacionados à transição da levedura para hifa, impede a formação de biofilmes. Além disso, cepas com grandes supressões do *UME6* exibem virulência atenuada e alongamento defeituoso de hifas durante a infecção *in vitro* e *in vivo* (SUMLU et al., 2024).

Os dois compostos apesar de causar algumas alterações similares em *Candida*, podem não compartilhar do mesmo mecanismo de ação, uma vez que apenas o composto 2B-amino apresentou supressão do *EGR3*. Indicando que os dois compostos podem não compartilhar do mesmo mecanismo de ação, visto que a interferência na expressão desse gene pode indicar alteração na biossíntese do ergosterol.

O gene *ERG3* é considerado um dos mais relevantes desta via, mutações nesse gene podem levar resistência aos azólicos. *ERG3* é responsável pelo bloqueio de uma etapa tardia da biossíntese de ergosterol, resultando em anormalidades na membrana e hipersensibilidade a alguns estresses fisiológicos. Em *C. albicans*, perda de atividade de *ERG3* também é associada a defeitos no crescimento hifal, uma das principais determinantes da virulência dessa espécie. Além disso, estudos já demonstraram que reduções drásticas na expressão dos genes *ERG3* podem resultar em restauração da sensibilidade aos azólicos (ARTURO et al., 2018; BRANCO et al., 2017).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora significativos progressos tenham sido feitos com relação ao manejo de pacientes com infecções invasivas por leveduras do gênero *Candida*, o aparecimento de cepas resistentes a antifúngicos são um problema sério em relação à profilaxia e estratégias de tratamento empírico.

Desta forma, aqui, são descritos dois candidatos promissores a fármacos para o tratamento de infecções fúngicas por *Candida*. Os derivados tiofenos 2AT e 2B-amino exibiram atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol. É importante ressaltar, que estas espécies são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas invasivas. Além de superar a resistência, também foi observado que os compostos potencializaram o efeito antifúngico do fármaco.

Além disso, sabe-se que essas leveduras são conhecidas por possuírem grande potencial patogênico, devido à produção de fatores de virulência com uma proporção substancial de casos associados a formação de biofilmes.

Sendo assim, foi detectado que os compostos também conseguem inibir os fatores de virulência, como a formação de biofilmes e interferir na expressão de genes relacionados a adesão, morfogênese e resistência destas espécies.

A formação de biofilme por essas leveduras impacta a suscetibilidade aos antifúngicos, levando à resistência, demonstrando a importância da pesquisa voltada para a prevenção e controle dessas comunidades microbianas.

Análises de microscopia demonstraram danos celulares e alterações estruturais que indicam perda da integridade da parede celular, bem como alterações na membrana, mitocôndrias e núcleo que acarretaram morte celular, provavelmente devido à produção de espécies reativas de oxigênio.

No mais, os compostos não demonstraram toxicidade *in vitro* em macrófagos J774, apresentando apenas toxicidades mínimas em concentrações muito altas assegurando sua seletividade em células fúngicas.

A partir desses resultados, enfatizamos que a inibição farmacológica das principais vias de virulência de *Candida* e o direcionamento de seus fatores de transcrição e interações moleculares podem ser alvos promissores de medicamentos para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

REFERÊNCIAS

AGNELLI, C. et al. Prognostic factors of *Candida* spp. bloodstream infection in adults: A nine-year retrospective cohort study across tertiary hospitals in Brazil and Spain Articles Research in context. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 6, p. 100117, 2022.

AJDAČIĆ, V. et al. Synthesis and evaluation of thiophene-based guanylhydrazones (iminoguanidines) efficient against panel of voriconazole-resistant fungal isolates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 1277–1291, 2016.

AJETUNMOBI, O. H. et al. Antifungal therapy of *Candida* biofilms: Past, present and future. **Biofilm**, v. 5, p. 100126, 2023.

ALI MOHAMED, H. et al. In Vitro Antimicrobial Evaluation, Single-Point Resistance Study, and Radiosterilization of Novel Pyrazole Incorporating Thiazol-4-one/Thiophene Derivatives as Dual DNA Gyrase and DHFR Inhibitors against MDR Pathogens. **ACS Omega**, v. 7, n. 6, p. 4970–4990, 15 fev. 2022.

ARCHNA; PATHANIA, S.; CHAWLA, P. A. **Thiophene-based derivatives as anticancer agents: An overview on decade's work**. **Bioorganic Chemistry** Academic Press Inc., , 1 ago. 2020.

ARTURO, L.-T. et al. Loss of Upc2p-Inducible ERG3 Transcription Is Sufficient To Confer Niche-Specific Azole Resistance without Compromising *Candida albicans* Pathogenicity. **mBio**, v. 9, n. 3, p. 10.1128/mbio.00225-18, 22 maio 2018.

ARUMUGAM, G. et al. Anti-candidal and anti-virulence efficiency of selected seaweeds against azole resistance *Candida albicans*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101195, 2019.

ATIENCIA-CARRERA, M. B. et al. Evaluation of the biofilm life cycle between *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 18 ago. 2022.

ATRIWAL, T. et al. **Mechanistic Understanding of Candida albicans Biofilm Formation and Approaches for Its Inhibition.** *Frontiers in Microbiology*Frontiers Media S.A., , 30 abr. 2021.

BARANTSEVICH, N.; BARANTSEVICH, E. Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. *Antibiotics*, v. 11, n. 6, 2022.

BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. **Drug resistance and tolerance in fungi.** *Nature Reviews Microbiology*Nature Research, , 1 jun. 2020.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics*, v. 9, n. 6, 2020.

BOHNER, F.; PAPP, C.; GÁCSEK, A. **The effect of antifungal resistance development on the virulence of Candida species.** *FEMS Yeast Research*, 2022.

BRANCO, J. et al. Impact of ERG3 mutations and expression of ergosterol genes controlled by UPC2 and NDT80 in Candida parapsilosis azole resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 23, n. 8, p. 575.e1-575.e8, 1 ago. 2017.

BRANCO, J.; MIRANDA, I. M.; RODRIGUES, A. G. Candida parapsilosis Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 1, 2023.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. **Candida Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies.** *Frontiers in Medicine*Frontiers Media S.A., , 1 fev. 2018.

ÇINARLI, M.; KIRAY, E.; ATAOL, Ç. Y. Synthesis, characterization, antimicrobial and anti-biofilm studies of Ni(II) complex with Schiff base derived from 2-thiophene carboxaldehyde and phenyl acetic hydrazide. *Journal of Molecular Structure*, v. 1307, p. 138007, 2024.

CIUREA, C. N. et al. **Candida and candidiasis—opportunism versus pathogenicity: A review of the virulence traits.** *Microorganisms* MDPI AG, , 1 jun. 2020.

COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES, A. G. **Candida albicans antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: The triad yeast-host-antifungal.** *Microorganisms*, 2020.

CZAJKA, K. M. et al. Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic Candida Species. *Cells*, v. 12, n. 22, 2023a.

CZAJKA, K. M. et al. **Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic Candida Species.** *Cells* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 nov. 2023b.

DA CRUZ, R. M. D. et al. Synthesis and Evaluation of 2-Aminothiophene Derivatives as Staphylococcus aureus Efflux Pump Inhibitors. *ChemMedChem*, v. 15, n. 8, 2020.

DANTAS, A. D. S. et al. Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, Candida albicans. *Biomolecules*, v. 5, n. 1, p. 142–165, 2015.

DE ARAÚJO NETO, L. N. et al. Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. *Chemico-Biological Interactions*, v. 272, 2017.

DE ARAÚJO NETO, L. N. et al. Thiophene-thiosemicarbazone derivative (L10) exerts antifungal activity mediated by oxidative stress and apoptosis in C. albicans. *Chemico-Biological Interactions*, v. 320, 1 abr. 2020.

DE BARROS, P. P. et al. **Candida Biofilms: An Update on Developmental Mechanisms and Therapeutic Challenges.** *Mycopathologia* Springer, , 1 jun. 2020.

EIX, E. F.; NETT, J. E. **How Biofilm Growth Affects Candida-Host Interactions.** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., , 25 jun. 2020.

ESCRIBANO, P.; GUINEA, J. **Fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: A new emerging threat in the fungi arena.** *Frontiers in Fungal Biology*Frontiers Media S.A., , 2022.

FAN, F. M. et al. ***Candida albicans* biofilms: antifungal resistance, immune evasion, and emerging therapeutic strategies.** *International Journal of Antimicrobial Agents*Elsevier B.V., , 1 nov. 2022.

FAYED, E. A. et al. Novel cyclohepta[b]thiophene derivative incorporating pyrimidine, pyridine, and chromene moiety as potential antimicrobial agents targeting DNA gyrase. ***Journal of Molecular Structure***, v. 1262, p. 133028, 2022.

FRÍAS-DE-LEÓN, M. G. et al. *Candida glabrata* Antifungal Resistance and Virulence Factors, a Perfect Pathogenic Combination. ***Pharmaceutics***, v. 13, n. 10, 2021.

GEWALD, K. Heterocyclen aus CH-aciden Nitrilen, VII. 2-Amino-thiophene aus α -Oxo-mercaptanen und methylenaktiven Nitrilen. ***Chemische Berichte***, v. 98, n. 11, 1965.

GONZALEZ-LARA, M. F.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Invasive Candidiasis. ***Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine***, v. 41, n. 1, p. 3–12, 2020.

GRELA, E. et al. Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against *Candida albicans*. ***Scientific Reports***, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

HIRAYAMA, T. et al. ERG3-Encoding Sterol C5,6-DESATURASE in *Candida albicans* Is Required for Virulence in an Enterically Infected Invasive Candidiasis Mouse Model. ***Pathogens***, v. 10, n. 1, 2021.

HOSSEINI BAFGHI, M. et al. Green synthesis of selenium nanoparticles and evaluate their effect on the expression of ERG3, ERG11 and FKS1 antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. ***Letters in Applied Microbiology***, v. 74, n. 5, p. 809–819, 1 maio 2022.

IBRAHIM, S. R. M. et al. **Thiophenes—Naturally Occurring Plant Metabolites: Biological Activities and In Silico Evaluation of Their Potential as Cathepsin D Inhibitors.** *PlantsMDPI*, , 1 fev. 2022.

KAUR, J.; NOBILE, C. J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 71, p. 102237, 2023.

KHAN, M. S. A. et al. **Virulence and biofilms as promising targets in developing antipathogenic drugs against candidiasis.** *Future Science OAFuture Medicine Ltd.*, , 2020.

KIM, D. J. et al. Inhibitory activity of hinokitiol against biofilm formation in fluconazole-resistant *Candida* species. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, 1 fev. 2017.

KIOSHIMA, E. S. et al. Selection of potential anti-adhesion drugs by in silico approaches targeted to ALS3 from *Candida albicans*. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 12, p. 1391–1401, 2019.

KONEČNÁ, K. et al. The Impact of Cultivation Media on the In Vitro Biofilm Biomass Production of *Candida* spp. **Current Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 2104–2111, 2021.

KORNITZER, D. Regulation of *Candida albicans* Hyphal Morphogenesis by Endogenous Signals. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, 2019.

LASS-FLÖRL, C. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2024.

LEE, Y. et al. **Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond.** *Chemical Reviews*American Chemical Society, , 24 mar. 2021.

LIM, S. J. et al. **Opportunistic yeast pathogen *Candida* spp.: Secreted and membrane-bound virulence factors.** *Medical Mycology*Oxford University Press, , 1 dez. 2021.

LIU, Y.; FILLER, S. G. **Candida albicans Als3, a multifunctional adhesin and invasin. Eukaryotic Cell**, fev. 2011.

LOGAN, C.; MARTIN-LOECHES, I.; BICANIC, T. **Invasive candidiasis in critical care: challenges and future directions. Intensive Care Medicine** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 nov. 2020.

LOHSE, M. B. et al. Combination of Antifungal Drugs and Protease Inhibitors Prevent *Candida albicans* Biofilm Formation and Disrupt Mature Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 25 maio 2020.

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89–121, 31 dez. 2022.

LU, H. et al. **Candida albicans targets that potentially synergize with fluconazole. Critical Reviews in Microbiology** Taylor and Francis Ltd., , 2021.

LUNA, I. S. et al. Design, synthesis and antifungal activity of new schiff bases bearing 2-aminothiophene derivatives obtained by molecular simplification. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 5, p. 1017–1029, 2021.

M, F. F. et al. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3727–3729, 1 ago. 1999.

MA, H. et al. Antimicrobial peptide AMP-17 exerts anti-*Candida albicans* effects through ROS-mediated apoptosis and necrosis. **International Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 81–90, 1 jan. 2023.

MABKHOT, Y. N. et al. Synthesis and structure-activity relationship of some new thiophene-based heterocycles as potential antimicrobial agents. **Molecules**, v. 21, n. 8, 1 ago. 2016.

MALINOVSKÁ, Z.; ČONKOVÁ, E.; VÁCZI, P. Biofilm Formation in Medically Important *Candida* Species. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 10, 2023.

MARTÍNEZ-HERRERA, E. et al. Antifungal Resistance in Clinical Isolates of *Candida glabrata* in Ibero-America. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, 2022.

MASIH, P. J. et al. Synthesis and Evaluation of 3-Halobenzo[b]thiophenes as Potential Antibacterial and Antifungal Agents. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 1, 2022.

MCCARTY, T. P.; WHITE, C. M.; PAPPAS, P. G. **Candidemia and Invasive Candidiasis. Infectious Disease Clinics of North America**, 2021.

MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. et al. Synthesis and Evaluation of the Antifungal Activity of 2-(Substituted-Amino)-4,5-Dialkyl-Thiophene-3-Carbonitrile Derivatives. **Am. J. Pharm**, v. 30, n. 8, p. 1492–1501, 2011.

MURPHY, S. E.; BICANIC, T. **Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches in Invasive Candidiasis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** Frontiers Media S.A., , 14 dez. 2021.

NEVES, W. W. et al. Incorporation of 2-amino-thiophene derivative in nanoparticles: enhancement of antifungal activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 647–655, 1 jun. 2020.

OLIVER, J. C. et al. *Candida* spp. and phagocytosis: multiple evasion mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 10, p. 1409–1423, 2019.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, 11 maio 2018.

PARSLOW, B. Y.; THORNTON, C. R. Continuing Shifts in Epidemiology and Antifungal Susceptibility Highlight the Need for Improved Disease Management of Invasive Candidiasis. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, 2022.

POISSY, J. et al. Risk factors for candidemia: a prospective matched case-control study. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 109, 2020.

PONDE, N. O. et al. **Candida albicans biofilms and polymicrobial interactions. Critical Reviews in Microbiology** Taylor and Francis Ltd., , 2021.

RAMAGE, G. et al. **Our current clinical understanding of Candida biofilms: where are we two decades on? APMIS**, 2023.

ŘIČICOVÁ, M. et al. Candida albicans biofilm formation in a new in vivo rat model. **Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 909–919, 2010.

RIERA, F. O. et al. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, 2022.

ROSIANA, S. et al. Comprehensive genetic analysis of adhesin proteins and their role in virulence of Candida albicans. **Genetics**, v. 217, n. 2, p. iyab003, 1 fev. 2021.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SHAHINA ZINNAT AND AL HOMSI, R. A. N. D. P. J. D. W. A. N. D. W. M. A. N. D. S. T. A. N. D. D. T. E. S. Rosemary essential oil and its components 1,8-cineole and α -pinene induce ROS-dependent lethality and ROS-independent virulence inhibition in Candida albicans. **PLOS ONE**, v. 17, n. 11, p. 1–31, ago. 2022.

SINGH, A.; SINGH, G.; BEDI, P. M. S. **Thiophene derivatives: A potent multitargeted pharmacological scaffold. Journal of Heterocyclic Chemistry** HeteroCorporation, , 1 jul. 2020.

SORIANO, A. et al. Invasive candidiasis: current clinical challenges and unmet needs in adult populations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 78, n. 7, p. 1569–1585, 1 jul. 2023.

SOUSA, J. P. A. DE et al. Antileishmanial activity of 2-amino-thiophene derivative SB-200. **International Immunopharmacology**, v. 123, p. 110750, 2023.

SUMLU, E. et al. Artemisinin May Disrupt Hyphae Formation by Suppressing Biofilm-Related Genes of *Candida albicans*: In Vitro and In Silico Approaches. **Antibiotics**, v. 13, n. 4, 2024.

TAN, J. et al. Antifungal Activity of Minocycline and Azoles Against Fluconazole-Resistant *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 13 maio 2021.

TORTORANO, A. M. et al. **Candidemia: Evolution of Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches**. *Infection and Drug Resistance* Dove Medical Press Ltd, , 2021a.

TORTORANO, A. M. et al. **Candidemia: Evolution of Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches**. *Infection and Drug Resistance* Dove Medical Press Ltd, , 2021b.

WIEDERHOLD, N. P. **Emerging Fungal Infections: New Species, New Names, and Antifungal Resistance**. *Clinical Chemistry*, 2022.

YIN, W. et al. Design, synthesis, and evaluation of novel 3-thiophene derivatives as potent fungistatic and fungicidal reagents based on a conformational restriction strategy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 233, p. 114195, 2022.

ZHAO, L. et al. Design, synthesis, and biological activity evaluation of 2-(benzo[b]thiophen-2-yl)-4-phenyl-4,5-dihydrooxazole derivatives as broad-spectrum antifungal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 228, p. 113987, 2022.

ZHOU, Y. et al. ERG3 and ERG11 genes are critical for the pathogenesis of *Candida albicans* during the oral mucosal infection article. **International Journal of Oral Science**, v. 10, n. 2, 1 dez. 2018.

ANEXO A – ARTIGO 1

Brazilian Journal of Microbiology
<https://doi.org/10.1007/s42770-024-01470-3>



MEDICINE AND PUBLIC HEALTH - RESEARCH PAPER



Synergistic antifungal effect of thiophene derivative as an inhibitor of fluconazole-resistant *Candida* spp. biofilms

Adryelle Idalina da Silva Alves¹ · Bruna Rodrigues de Sousa² · Janderson Weydson Lopes Menezes da Silva³ · Dyana Leal Veras³ · Fábio André Brayner³ · Luiz Carlos Alves³ · Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior⁴ · Cicero Pinheiro Inácio² · Rejane Pereira Neves²

Received: 1 May 2024 / Accepted: 18 July 2024

© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2024

Abstract

Candida species resistant to fluconazole have raised concern in the scientific medical community due to high mortality in patients with invasive disease. In developing countries, such as Brazil, fluconazole is the most commonly used antifungal, and alternative treatments are expensive or not readily available. Furthermore, the occurrence of biofilms is common, coupled with their inherent resistance to antifungal therapies and the host's immune system, these microbial communities have contributed to making infections caused by these yeasts an enormous clinical challenge. Therefore, there is an urgent need to develop alternative medicines, which surpass the effectiveness of already used therapies, but which are also effective against biofilms. Therefore, the present study aimed to describe for the first time the antifungal and antibiofilm action of the derivative 2-amino-5,6,7,8-tetrahydro-4 H-cyclohepta[b]thiophene-3-isopropyl carboxylate (2AT) against clinical strains of *Candida* spp. resistant to fluconazole (FLZ). When determining the minimum inhibitory concentrations (MIC), it was found that the compound has antifungal action at concentrations of 100 to 200 µg/mL, resulting in 100% inhibition of yeast cells. Its synergistic effect with the drug FLZ was also observed. The antibiofilm action of the compound in sub-inhibitory concentrations was detected, alone and in association with FLZ. Moreover, using scanning electron microscopy, it was observed that the compound 2AT in isolation was capable of causing significant ultrastructural changes in *Candida*. Additionally, it was also demonstrated that the compound 2AT acts by inducing characteristics compatible with apoptosis in these yeasts, such as chromatin condensation, when visualized by transmission electron microscopy, indicating the possible mechanism of action of this molecule. Furthermore, the compound did not exhibit toxicity in J774 macrophage cells up to a concentration of 4000 µg/mL. In this study, we identify the 2AT derivative as a future alternative for invasive candidiasis therapy, in addition, we highlighted the promise of a strategy combined with fluconazole in combating *Candida* infections, especially in cases of resistant isolates.

Keywords Antifungal resistance · *Candida* · Thiophenes · Biofilms · Virulence · Antifungals

Responsible Editor: Rosana Puccia.

✉ Rejane Pereira Neves
 rejadel@yahoo.com.br

¹ Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil

² Department of Mycology, Medical Mycology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Av. Moraes Rego s/n, University City, Recife, PE 50670-901, Brazil

³ Aggeu Magalhães Research Center (FIOCRUZ) and Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife 50740-465, Brazil

⁴ Laboratory of Synthesis and Drug Delivery, State University of Paraíba, João Pessoa 58071-160, Brazil

Introduction

Biofilms are defined as structured microbial communities surrounded by a protective extracellular matrix, attached to a biotic (host tissues) or abiotic (medical devices) surface. These communities can initiate or prolong infections by providing a safe, treatment-resistant environment from which cells can invade local tissue and simultaneously establish new foci of infection [1, 2].

Among the most frequent pathogens that occur forming biofilms, yeasts of the genus *Candida* stand out. Infections caused by these microorganisms can occur in superficial or invasive forms. These, when disseminated, reach high

Published online: 07 August 2024

Springer