



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**MARIANA RAQUEL DA CRUZ VEGIAN**

**ESTUDO DO POTENCIAL DE REPOSICIONAMENTO DO  
COMPOSTO AURANOFINA NO CONTROLE DE INFECÇÕES POR  
*Candida albicans***

2022

**MARIANA RAQUEL DA CRUZ VEGIAN**

**ESTUDO DO POTENCIAL DE REPOSICIONAMENTO DO COMPOSTO  
AURANOFINA NO CONTROLE DE INFECÇÕES POR *Candida albicans***

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Microbiologia / Imunologia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Tit. Cristiane Yumi Koga Ito

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Vegian, Mariana Raquel da Cruz

Estudo do potencial de reposicionamento do composto auranofina no controle de infecções por *Candida albicans* / Mariana Raquel da Cruz Vegian. - São José dos Campos : [s.n.], 2022.

58 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientador: Cristiane Yumi Koga Ito

Coorientador: Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira

1. Auranofina. 2. *Candida albicans*. 3. Antifúngico. 4. Mecanismo de ação. 5. *Drosophila*. I. Ito, Cristiane Yumi Koga, orient. II. Ferreira, Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito** (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Dr. Antonio Carlos Victor Canettieri**

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Faculdade de Ciências da Saúde

São José dos Campos

**Profa. Dra. Márcia Hiromi Tanaka**

Pós-Graduação em Odontologia (Implantodontia)

Universidade Santo Amaro (Unisa)

Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Marianne Spalding**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 26 de julho de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente agradeço a DEUS, por ter me colocado nesse caminho e ter me proporcionado experiências e aprendizados duradouros, assim como as amizades de pessoas especiais, sem as quais certamente não teria dado conta!

Aos meus pais, Teresinha e Antonio, e meu avô, Gumercindo, e a toda minha família que mesmo com tantos obstáculos me apoiaram no que eu escolhi para minha carreira e me ajudaram de tantas formas para que eu chegasse até aqui! Obrigada!

Ao meu querido esposo, Josiel, por ser tão importante em minha vida e sempre me apoiar em todos os momentos difíceis. Por me levantar quando eu precisava e estar sempre a meu lado com pensamentos positivos. Obrigada pelo companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio e amor. Obrigada por tornar possível esse momento!

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Cristiane Yumi Koga Ito, por ter me acolhido e me orientado nas situações em que mais precisei, e por sempre estar disponível quando necessário. À técnica de laboratório e minha querida amiga, Clélia Paiva, por ter compartilhado muito conhecimento e sabedoria da prática em uma área que eu ainda não estava familiarizada. Sua disponibilidade em ajudar quando necessário contribuiu muito para que eu chegasse aonde estou agora!

À minha amiga de doutorado, Aline Sampaio, que esteve comigo todo o caminho que percorri e que nos últimos anos se tornou minha mais humilde confidente e conselheira, com seu conhecimento e capacidade extraordinária de resolver problemas de experimentos laboratoriais. À querida Lady Daiane Pereira, por tantas risadas e por ter me ensinado os primeiros passos de um biofilme, nunca vou esquecer! Agradeço às duas pelas conversas de laboratório e por todos os momentos que compartilhamos.

Aos meus colegas e equipe, Maria Alcionéia Campos, Leandro Figueira, Geraldo Magno de Abreu, Sabrina Rovetta, Diego Morais, Ana Bessa e Noala Milhan por terem proporcionado bons momentos de conversa e reuniões enriquecedoras. Às alunas de iniciação científica, Grazielle Garcia e Ellen de Souza Reis por se empenharem em seus projetos e estarem sempre dispostas a aprender o que pude

compartilhar e a fazer o que fosse necessário com muita disposição. Torço muito pelo sucesso de todos vocês!

Agradeço à Thaís Montanheiro, aluna de pós-doutorado do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA), por ter auxiliado na utilização do microscópio eletrônico de varredura (MEV) com tanta disposição e gentileza, sua ajuda foi muito importante!

A todos os funcionários dos Departamentos de Biociências e Diagnóstico Bucal e de Engenharia Ambiental, que contribuíram para que eu pudesse desenvolver esse projeto e realizar meus estágios de docência tão necessários para minha formação. Agradeço em especial aos professores doutores Antonio Canettieri, Márcia Tanaka, Maria Aparecida Jardim e Marianne Spalding por terem aceitado com muita disposição a participação na banca de defesa. Também agradeço aos professores doutores Sônia Khouri, Guilherme Teodoro, Janete Almeida e Sérgio Paiva pela mesma disposição e gentileza ao aceitarem a participação como suplentes da banca. A contribuição de vocês foi essencial!

Agradeço, também, à CAPES pela concessão da bolsa de nº 88887.529124/2020-00, de 10/2020 a 07/2022, que foi essencial para continuação de meus estudos.

Por fim, gostaria de agradecer ao Instituto de Ciência e Tecnologia por abrirem as portas e permitirem minha busca pelo conhecimento científico.

*Gratidão!*

## RESUMO

Vegian MRC. Estudo do potencial de reposicionamento do composto auranofina no controle de infecções por *Candida albicans* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

A ocorrência crescente de resistência antifúngica, a toxicidade, além do pequeno espectro de ação dos antifúngicos convencionais, limita o número de alternativas terapêuticas para doenças causadas por leveduras do gênero *Candida*. Uma das frentes de pesquisa é a proposta de novos usos para drogas existentes chamada de reposicionamento, que diminui o tempo e esforço na busca de novos compostos eficazes. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antifúngico e os mecanismos de ação do composto auranofina contra a espécie *Candida albicans*, além da toxicidade *in vivo*. Foram utilizadas cepas padrões de *C. albicans* (SC5314, ATCC 18804) e as concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) foram determinadas. Os mecanismos de ação dos compostos foram avaliados sobre a estrutura celular de *C. albicans*, com verificação de alterações na morfologia, na parede celular, sobre os fatores de virulência de *C. albicans*, como transição levedura-hifa e produção de exoenzimas, além do efeito do composto sobre o metabolismo de *C. albicans* e efeito antifúngico sob condições de estresse osmótico. Para avaliação da toxicidade das concentrações efetivas de auranofina *in vivo*, foi utilizado o modelo invertebrado, *Drosophila melanogaster*. Os dados obtidos no ensaio de transição levedura-hifa foram avaliados pelos testes ANOVA e de Tukey e os testes Kruskal-Wallis e de Dunn. foram utilizados na análise do efeito de auranofina sobre o metabolismo fúngico. O nível de significância para todos os testes foi de 5%. Foram verificadas concentrações inibitória e fungicida de auranofina sobre *C. albicans*. Apesar da ausência de efeitos sobre fatores de virulência, auranofina causou redução no metabolismo fúngico e no crescimento fúngico sob estresse osmótico, sugerindo, nesse caso, um possível efeito direto ou indireto na membrana celular fúngica. Além disso, nas concentrações efetivas não foi observada toxicidade relevante *in vivo*. Os resultados demonstraram, portanto, que auranofina tem potencial para seu reposicionamento como antifúngico, no entanto, mais estudos são necessários para mais esclarecimentos e utilização adequada do medicamento.

Palavras-chave: auranofina; *Candida albicans*; antifúngico; mecanismo de ação; *Drosophila*.

## ABSTRACT

Vegian MRC. Study on the potential for the repositioning of auranofin in the control of Candida albicans infections [thesis]. São José dos Campos (SP): Sao Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

The increasing occurrence of antifungal resistance, toxicity, in addition to the small spectrum of action of conventional antifungals, limits the number of therapeutic alternatives for diseases caused by yeasts of the genus *Candida*. One of the research fronts is the proposal of new uses for existing drugs called repositioning, which reduces the time and effort in the search for new effective compounds. In this context, the present study aims to evaluate the antifungal potential and mechanisms of action of the auranofin compound against Candida albicans, in addition to *in vivo* toxicity. Standard strains of C. albicans (SC5314, ATCC 18804) were used and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide concentration (MFC) were determined. The mechanisms of action of the compounds were evaluated on the cellular structure of C. albicans, with verification of changes in morphology, in the cell wall, on the virulence factors of C. albicans, such as yeast-hypha transition and production of exoenzymes, in addition to the effect of the compound on the metabolism of C. albicans and antifungal effect under osmotic stress conditions. To evaluate the toxicity of effective concentrations of auranofin *in vivo*, the invertebrate model, Drosophila melanogaster, was used. The data obtained in the yeast-hypha transition assay were evaluated by the ANOVA and Tukey tests and the Kruskal-Wallis and Dunn tests. were used to analyze the effect of auranofin on fungal metabolism. The significance level for all tests was 5%. Inhibitory and fungicidal concentrations of auranofin were verified on C. albicans. Despite the absence of effects on virulence factors, auranofin caused a reduction in fungal metabolism and fungal growth under osmotic stress, suggesting, in this case, a possible direct or indirect effect on the fungal cell membrane. Furthermore, at effective concentrations, no relevant *in vivo* toxicity was observed. The results showed, therefore, that auranofin has the potential for its repositioning as an antifungal, however, more studies are needed for further clarification and proper use of the drug.

Keywords: auranofin; Candida albicans; antifungal; mechanism of action; Drosophila

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	9
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	Aspectos gerais das infecções fúngicas invasivas .....	12
2.2	Infecções causadas por <i>Candida albicans</i> .....	14
2.3	Limitações de antifúngicos para infecções causadas por <i>C. albicans</i> .....	17
2.4	Aprovação x reposicionamento de compostos.....	18
2.5	Auranofina e seu reposicionamento .....	21
3	OBJETIVOS .....	24
3.1	Objetivos gerais.....	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	Cepas e condições de crescimento .....	25
4.2	Preparação das soluções dos fármacos utilizados.....	25
4.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) .....	25
4.4	Investigação dos mecanismos de ação de auranofina sobre <i>C. albicans</i> .....	26
4.4.1	Determinação do efeito sobre a morfologia da célula fúngica .....	27
4.4.2	Avaliação do efeito sobre a parede celular fúngica.....	28
4.4.3	Avaliação do efeito sobre a transição levedura-hifa .....	28
4.4.4	Avaliação do efeito sobre a produção de exoenzimas .....	29
4.4.5	Avaliação do efeito antifúngico de auranofina sob condições de estresse osmótico.....	30
4.4.6	Avaliação do efeito sobre o metabolismo celular de <i>C. albicans</i> .....	31
4.5	Avaliação do efeito de auranofina <i>in vivo</i> em modelo invertebrado <i>Drosophila melanogaster</i> .....	32
4.5.1	Avaliação da toxicidade nas concentrações efetivas.....	32
4.6	Análise estatística .....	33
5	RESULTADOS.....	34
5.1	Concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) .....	34
5.2	Investigação dos mecanismos de ação de auranofina .....	35

5.2.1	Efeito sobre a morfologia da célula fúngica.....	35
5.2.2	Efeito sobre a parede celular fúngica .....	36
5.2.3	Efeito sobre a transição levedura-hifa .....	37
5.2.4	Ação sobre a produção de exoenzimas.....	38
5.2.5	Efeito antifúngico de auranofina sob condições de estresse osmótico..	40
5.2.6	Efeito sobre metabolismo celular de <i>C. albicans</i> .....	41
5.3	Efeito de auranofina in vivo em modelo invertebrado <i>Drosophila melanogaster</i> .....	42
5.3.1	Toxicidade das concentrações efetivas de auranofina .....	42
6	DISCUSSÃO .....	43
7	CONCLUSÃO .....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas tem aumentado significativamente nas últimas décadas (Mount et al., 2018). Em particular, as infecções por espécies do gênero *Candida* são consideradas um problema relevante nas áreas médicas (Dadar et al., 2018). Essas infecções podem ser superficiais e sistêmicas (Williams et al., 2013). As infecções sistêmicas ocorrem quando o fungo invade a barreira epitelial e atinge a circulação sanguínea, causando a candidemia (Gow et al., 2013), a qual apresenta taxas de mortalidade de até 50% (Omrani et al., 2014).

Neste cenário, infecções causadas por fungos do gênero *Candida* são as principais causas de infecções nosocomiais da corrente sanguínea em hospitais terciários em todo o mundo (Dadar et al., 2018). Por ser um micro-organismo comensal é necessário um comprometimento do mecanismo de defesa do organismo do hospedeiro para se tornar um patógeno, o que pode ocorrer após mudanças nas barreiras naturais ou comprometimento do sistema imunológico (Pilmis et al., 2017). Situações clínicas de pacientes com doenças, como a COVID-19, podem ter complicações por infecções fúngicas com resultados desfavoráveis, o que tem sido demonstrado em um número crescente de relatos de casos e estudos observacionais (Arastehfar et al., 2020). Além disso, um estudo verificou que padrões específicos de exposição a antibióticos estão surgindo como novos fatores de risco para candidemia em pacientes internados ou não em unidades de terapia intensiva (Poissy et al., 2020)

*Candida albicans* é uma das espécies mais isoladas da cavidade bucal e está frequentemente associada às candidoses (Farah et al., 2010). Tem característica dimórfica e coloniza a mucosa bucal de forma comensal, tornando-se, no entanto, oportunista na presença de fatores predisponentes (Dadar et al., 2018). Sua capacidade de invasão tecidual, de adesão à células hospedeiras e formação de biofilme são ligadas à capacidade de transição de levedura para hifas, o que determina sua patogenicidade (Verma-Gaur, Traven, 2016). Além disso, a virulência de *C. albicans* envolve também componentes estruturais, como composição da parede celular, que podem diferir entre suas formas de hifa e levedura, apresentando um desafio para o sistema imunológico do hospedeiro (Gow et al.,

2013). A aderência às células epiteliais através de adesinas da parede também auxilia na invasividade do fungo, permitindo a fixação de hifas na mucosa (Chin et al., 2016).

A ocorrência crescente de resistência antifúngica, a toxicidade e interação com outras drogas dos fármacos antifúngicos existentes, além do pequeno espectro de ação, limita o número de alternativas terapêuticas para a candidose (Ford et al., 2015; Lewis, Graybill, 2008). O desenvolvimento de resistência aos agentes antifúngicos como da classe dos azóis, por exemplo, que tem ampla utilização clínica e são vendidos sem restrições, contra infecções por *Candida*, tem se tornado um problema na busca por tratamentos de candidemias (Arendrup, Patterson, 2017). A resistência em *C. albicans* está relacionada, principalmente, com a densidade celular e *quorum sensing* dos biofilmes, além da produção de matriz extracelular, que melhora a aderência e protege as células componentes do biofilme de condições ambientais adversas (Taff et al., 2013). Portanto, é necessária a busca por novos compostos químicos com potencial antifúngico para tratamentos alternativos aos procedimentos convencionais.

No entanto, o desenvolvimento de novos fármacos envolve processos custosos e prolongados, que precisam ser testados e aprovados por órgãos governamentais para garantir sua segura utilização (Siles et al., 2013). Dessa forma, medicamentos já aprovados para o tratamento de outras doenças, podem ser avaliados para diferentes ações e diminuir o tempo e esforço na busca de novos compostos eficazes (Wiederhold et al., 2017).

Auranofina, um medicamento com propriedades anti-inflamatórias utilizado desde 1985 para diminuir a progressão dos sintomas de artrite reumatoide (Siles et al., 2013; Wiederhold et al., 2017), tem demonstrado, em pesquisas da última década, atividades antiparasitária, antifúngica e antibacteriana (Debnath et al., 2012; Fuchs et al., 2016; Hokai et al., 2014). Além disso, auranofina apresenta biodisponibilidade oral e toxicidade sistêmica toleráveis, indicando um possível reaproveitamento para diferentes usos terapêuticos (Wiederhold et al., 2017). Estudos recentes verificaram efeito inibitório *in vitro* desse composto sobre células planctônicas e biofilme de *C. albicans* (Fuchs et al., 2016; She et al., 2019), incluindo isolados clínicos resistentes ao fluconazol, reforçando a importância da abordagem de reposicionamento desse medicamento (Wiederhold et al., 2017). Apesar disso,

são necessários estudos concentrados na caracterização do mecanismo de ação específico, responsável pela atividade antifúngica, assim como experimentos *in vivo*, para sua utilização de forma efetiva.

Em estudos *in vivo*, tem sido utilizados diversos modelos animais para investigar eventos como toxicidade de compostos e curvas de sobrevivência após infecções por *Candida* spp., dentre eles, modelos invertebrados como moscas da espécie *Drosophila melanogaster* (Glittenberg et al., 2011; Sampaio et al., 2018). Estudos anteriores verificaram que um hospedeiro simples, como *D. melanogaster*, pode ser um modelo adequado para estudos comparativos de candidose (Chamilos et al., 2006).

Contudo, apesar do potencial efeito antifúngico de auranofina sobre *C. albicans* foi recentemente descrito em estudos anteriores, como já mencionado, as informações disponíveis ainda não são suficientes para sugerir o reposicionamento dos fármacos para uso como antifúngico. Os mecanismos de ação, efeito sobre fatores de virulência e na interação patógeno-hospedeiro de *C. albicans*, não foram investigados. Dessa forma, o presente estudo busca elucidar esses efeitos sobre *C. albicans*, *in vitro* e *in vivo*, utilizando modelos experimentais de invertebrado, *Drosophila melanogaster*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais das infecções fúngicas invasivas

As doenças invasivas causadas por fungos, impactam profundamente a saúde humana. Com altas taxas de mortalidade, essas infecções permanecem pouco estudadas e subdiagnosticadas em comparação com outras doenças infecciosas (Brown et al., 2012). O diagnóstico e tratamento de infecções fúngicas invasivas, com terapia antifúngica, muitas vezes, ocorre após vários exames e consultas por causa de manifestações clínicas atípicas, baixa incidência de sinais específicos em exames e baixa sensibilidade na detecção microbiana (Zhang, Zhu, 2020), o que pode influenciar no desenvolvimento da doença no paciente.

Um estudo retrospectivo da incidência de infecções fúngicas durante 85 anos de serviço de necrópsia no Brasil, demonstrou que 19% dos casos foram suspeitos de diagnóstico clínico de infecção fúngica, mas sem classificação dos patógenos fúngicos no diagnóstico *post-mortem* (Dantas et al., 2021). Os autores descreveram que o uso progressivo de novas terapias imunossupressoras para transplante ou câncer podem dificultar a detecção de fungos e, o uso prévio de terapia antifúngica pode ter levado à descrição de baixas taxas de infecções fúngicas. Giacomazzi et al. (2016) demonstraram a existência de uma grande discrepância entre o número de infecções fúngicas notificadas ao Ministério da Saúde do Brasil e sua ocorrência estimada na população geral, principalmente, entre pacientes com doenças graves. Diante disso, com ausência de dados precisos, autoridades governamentais podem excluir tais doenças de seu plano de prioridades para a assistência à saúde.

As infecções fúngicas humanas diferem fundamentalmente de outras infecções. Patógenos fúngicos podem infectar uma ampla variedade de tipos celulares, o que pode levar à infecção de vários tecidos no mesmo hospedeiro (dependendo do seu estado imunológico), sofrendo alterações morfogênicas durante a infecção (Rodrigues, Nosanchuk, 2020). Uma infecção fúngica invasiva pode ser iniciada pela invasão fúngica da mucosa, pela inalação de esporos fúngicos do

ambiente ou por inoculação direta, que levam à colonização e disseminação do fungo no organismo (Firacative, 2020). No entanto, as manifestações clínicas das infecções não são específicas e a gravidade da doença depende das defesas do hospedeiro (Firacative, 2020). De acordo com uma revisão recente das definições e consenso sobre infecções fúngicas, uma doença fúngica invasiva ou sistêmica só é comprovada quando o dano tecidual, devido a elementos fúngicos, é observada por exame histopatológico e/ou quando o agente etiológico é isolado por cultura de amostras clínicas (Peter Donnelly et al., 2020). A candidíase hematogênica é uma complicação infecciosa que deve ser investigada em pacientes internados por um longo período e expostos a fatores de risco de candidemia, principalmente, exposição à antibioticoterapia de amplo espectro, procedimentos médicos invasivos, terapia imunossupressora e nutrição parenteral, porém, dados brasileiros sugerem que 40-50% desses pacientes estão na UTI no momento do diagnóstico, o que pode dificultar o controle da infecção e das opções de tratamento (Colombo et al., 2013).

Em circunstâncias normais, geralmente, o tecido epitelial humano intacto, a barreira mucociliar do trato respiratório e um sistema imunológico competente impedem a invasão fúngica (de Pauw, 2011). Diante disso, o risco de infecção fúngica aumenta com a presença de barreiras epiteliais disfuncionais e a introdução generalizada de sistemas venosos centrais, como ocorre em tratamentos com quimioterápicos, ou indivíduos imunocomprometidos (Papon et al., 2021; de Pauw, 2011).

Associação entre corticosteroides e predisposição para infecções fúngicas ou agravamento dessas infecções, também tem sido investigada. Apesar da terapia com esteroides para doenças alérgicas fúngicas ter uma longa história de uso bem-sucedido, alguns autores sugerem que o uso excessivo desses compostos possa favorecer o crescimento de fungos nos pulmões e a recorrência futura dos sintomas (Fraczek et al., 2018). Devido a redução da resposta imune induzida por corticoides, o risco de infecções oportunistas, incluindo fúngicas, deve ser considerado quando as decisões estão sendo tomadas sobre a dose e duração do tratamento utilizando esses compostos (Palmer et al., 1991; de Pauw, 2011). Há relatos também de possíveis associações entre antibioticoterapia e infecções fúngicas. Ao avaliar relatórios médicos de infecções fúngicas, Krcmery Jr. et al. (1999) verificaram que pacientes tratados com vários tipos de antibióticos de amplo espectro foram mais

propensos a desenvolver infecções fúngicas invasivas causadas, principalmente, por fungos *Aspergillus* spp. e *Candida albicans*. Em outro estudo observacional retrospectivo, realizado em um hospital pediátrico, houve também uma forte correlação entre a taxa de detecção de *Candida* spp. e os dias de terapia com antibióticos de amplo espectro, sugerindo que o uso de antibiótico promove a colonização ou infecção por *Candida* (Funaki et al., 2015).

## **2.2 Infecções causadas por *Candida albicans***

Em um dos primeiros a estimar a carga de doenças fúngicas no Brasil, Giacomazzi et al. (2016) forneceram uma estimativa de que infecções fúngicas graves afetam mais de 3,8 milhões de brasileiros. No mesmo estudo, realizado através da coleta de dados referentes à ocorrência de quadros invasivos de candidíase mucosa e esofagite no Brasil, os autores concluíram que 74% dessas infecções foram causadas por fungos do gênero *Candida*. Dentro desse gênero, o principal patógeno dos isolados de infecções fúngicas é a espécie *Candida albicans* (Costa-De-Oliveira et al., 2008; Junqueira et al., 2012; Santos et al., 2018; Terças et al., 2017; Zhang, Zhu, 2020). Esta é comumente encontrada em superfícies mucosas humanas como comensal inofensivo, porém pode se tornar um organismo oportunista na presença de fatores predisponentes (Dadar et al., 2018; Farah et al., 2010). As infecções por *C. albicans* apresentam consideráveis riscos associados, como antibioticoterapia acompanhada de acesso venoso central, neutropenia, procedimentos cirúrgicos, nutrição parenteral e cateter urinário (Canela et al., 2017).

*C. albicans* apresenta alto grau de adaptação em diferentes ambientes quanto à disponibilidade de nutrientes, variação de temperatura, pH, osmolaridade e quantidade de oxigênio disponível (Paramythiotou et al., 2014). Assim, essa espécie fúngica possui inúmeras estratégias para sobreviver que podem afetar seu crescimento excessivo e alterar seus perfis de suscetibilidade (Santos et al., 2018). A virulência de *C. albicans* tem sido objeto de extensa pesquisa e muitos fatores podem contribuir para a resistência clínica e para a discrepância entre o padrão de suscetibilidade laboratorial e o desfecho clínico (Costa-de-Oliveira, Rodrigues, 2020)

Os fatores de virulência são caracterizados como um conjunto de mecanismos específicos dos micro-organismos reconhecidos pelas células do hospedeiro e que podem superar sua resistência. A expressão desses fatores se dá pelo contato com as condições externas ao micro-organismo (composição, presença de oxigênio e temperatura), e pela relação entre o patógeno e diferentes tecidos ou agentes (Ghannoum, Radwan, 1990). Os principais fatores de virulência de *C. albicans* incluem liberação de exoenzimas, a presença de adesinas, a formação de tubos germinativos e de biofilme, além do dimorfismo (Polke et al., 2015)

A adesão à células hospedeiras e formação de biofilme estão relacionados à sua capacidade de transição de levedura para hifas, o que determina sua patogenicidade (Verma-Gaur, Traven, 2016). A produção de exoenzimas como proteinases e fosfolipases facilitam a invasão de hifas no epitélio e as adesinas promovem a aderência de *C. albicans* às células hospedeiras, permitindo a fixação de hifas na mucosa (Calderone, Fonzi, 2001; Chin et al., 2016; Silva et al., 2019). Além disso, a composição da parede celular também pode contribuir com a virulência de *C. albicans*, diferindo entre suas formas de hifa e levedura e apresentando um desafio para o sistema imunológico do hospedeiro (Gow et al., 2013).

A formação de biofilmes se apresenta como um dos principais mecanismos de resistência do microrganismo contra o sistema imune hospedeiro e os métodos de controle microbiano (Taff et al., 2013). Biofilmes de *C. albicans*, formados *in vitro*, compreendem células fúngicas, envoltas por uma matriz extracelular rica em polissacarídeos, encontradas em diferentes morfologias em coexistência (levedura, hifa e pseudo-hifas) (Chandra, Mukherjee, 2015; Kuhn et al., 2002). Quando formados *in vivo* ou em amostras obtidas de pacientes, como cateteres intravasculares ou urinários usados, esses biofilmes também contêm biomoléculas como fibrinogênio, células mortas, dentre outras, e sua formação é influenciada por variáveis derivadas do hospedeiro, incluindo fluxo de fluido, nutrientes e produtos microbianos (Chandra, Mukherjee, 2015).

Em um estudo realizado por Chandra et al. (2001), os autores verificaram as etapas de formação e a arquitetura do biofilme de *C. albicans* sobre amostras de silicone. Na fase inicial, foi observado que as células de *C. albicans* proliferaram na forma unicelular de levedura, aderindo à superfície e formando colônias distintas. Na

fase intermediária, as células fúngicas coagregadas formaram um filme rico em polissacarídeos, cobrindo e agregando colônias. Com o passar do tempo, o biofilme amadureceu e a quantidade de material extracelular aumentou, até que as comunidades de *C. albicans* foram completamente alojadas dentro dessa matriz extracelular. Diferenças na formação de biofilmes foram atribuídas a diferenças nas condições de nutrientes e propriedades do substrato no qual são formados.

A densidade celular e *quorum sensing*, além da produção de matriz extracelular, melhora a aderência e protege as células componentes do biofilme (Taff et al., 2013). A presença de biofilmes em infecções causadas por *C. albicans* podem ter consequências devastadoras e evoluir para infecções invasivas da corrente sanguínea com células resistentes às alternativas terapêuticas (Costa-de-Oliveira, Rodrigues, 2020).

O *quorum sensing* é um importante mecanismo de comunicação microbiana pela liberação contínua e monitoramento de moléculas semelhantes a hormônios, chamadas auto-indutores, ou moléculas de *quorum sensing* (*quorum-sensing molecules*, QSM) (Albuquerque, Casadevall, 2012). Uma das QSM mais conhecidas é o farnesol, que atua na regulação da formação de biofilmes influenciando no desenvolvimento micelial e, de acordo com alguns autores, pode atuar *in vivo* como um fator de virulência estimulando densidades celulares muito altas, facilitando a penetração nos tecidos do hospedeiro (Hornby et al., 2001). Além disso, Kruppa (2009) sugere que, em comunidades polimicrobianas, uma situação comum *in vivo*, QSM podem funcionar como moléculas de interação interespecies.

A presença de proteínas intracelulares, denominadas *moonlighting* que emergem na superfície da célula de *C. albicans* e se ligam a parede celular por um tempo suficiente, também desempenham um papel importante na adaptação do patógeno ao ambiente dentro do organismo humano e podem contribuir para fenômenos particulares essenciais para a colonização e infecção do hospedeiro, como a adesão direta às células do hospedeiro e tecidos, ativação de cascatas proteolíticas homeostáticas do hospedeiro e proteção contra estresse ambiental (Satala et al., 2020). Algumas proteínas *moonlighting* podem formar a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo gerado *in vivo* por células fagocitárias do sistema imunológico (Serrano-Fujarte et al., 2016).

### 2.3 Limitações de antifúngicos para infecções causadas por *C. albicans*

Muitos aspectos de tratamentos com antifúngicos tem limitado alternativas terapêuticas para tratamento de infecções causadas por *C. albicans*. Fatores como o limitado número de drogas antifúngicas atualmente disponíveis, a ocorrência crescente de resistência antifúngica, a possível toxicidade e interação com outras drogas dos fármacos antifúngicos existentes, são limitações que tem norteado a busca por alternativas terapêuticas para infecções fúngicas invasivas causadas por *C. albicans* (Ford et al., 2015; Lewis, Graybill, 2008; Mount et al., 2018).

Sendo patógenos eucariotos, os fungos compartilham muitas semelhanças com as células do hospedeiro, o que prejudica o desenvolvimento de compostos antifúngicos. Entre os antifúngicos convencionais disponíveis, os azólicos são os mais utilizados para o tratamento de infecções causadas por espécies do gênero *Candida*, porém, dependendo do tipo de infecção e o perfil de sensibilidade das espécies, outros antifúngicos também podem ser usados (Santos et al., 2018). Fluconazol é um medicamento de preferência entre os azóis para tratamentos de infecções por *Candida*, devido ao seu baixo custo e toxicidade, porém tem apresentado atividade reduzida entre as espécies menos comuns de *Candida* (Pfaller et al., 2010). Outros antifúngicos utilizados são os polienos, como anfotericina B e nistatina, fluorocitosina e equinocandinas, como caspofunginas (Pappas et al., 2015; Spampinato, Leonardi, 2013). Em infecções sistêmicas as vias de administração e excreção são considerações importantes na seleção de um agente antifúngico apropriado, e fluconazol e caspofungina costumam ser medicamentos selecionados para o tratamento de infecções fúngicas do trato urinário devido a sua excreção na forma ativa, principalmente, pela urina (Spampinato, Leonardi, 2013). Em casos refratários aos azóis, a administração sistêmica de anfotericina B é a indicação mais comum (Colombo et al., 2013; Pappas et al., 2015).

Contudo, o monitoramento desses medicamentos é essencial para avaliar o risco de toxicidade. Existe uma hepatotoxicidade potencial do tratamento antifúngico, maior com a utilização de azólicos em comparação com preparações à base de anfotericina B e equinocandinas, que pode apresentar riscos aumentados com uso

de medicamentos concomitantes e doença hepática pré-existente, o que leva à consideração de cenários de tratamento e opções de agentes antifúngicos alternativos (Tverdek et al., 2016). Efeitos adversos como nefrotoxicidade e distúrbios eletrolíticos podem ser verificados também em interações medicamentosas de anfotericina B com outras drogas com efeitos colaterais renais semelhantes, como imunossupressores (Nett, Andes, 2015). Além disso, uma ampla utilização de alguns antifúngicos pode aumentar a pressão seletiva e levar ao desenvolvimento de resistência antifúngica.

Apesar de ser menos comum, em comparação com outras espécies do gênero *Candida*, a resistência antifúngica de *C. albicans* tem sido relatada após o uso de antifúngicos a longo prazo e com infecções recorrentes, como candidíase mucocutânea crônica ou candidíase orofaríngea recorrente em pacientes imunocomprometidos (Arendrup, Patterson, 2017). Há evidências também de resistência de *C. albicans* ao fluconazol e à classe azólica em mulheres após exposição prolongada ao medicamento para tratamento de vaginite clinicamente refratária (Marchaim et al., 2012). Ford et al. (2015) identificaram uma grande variedade genética entre isolados clínicos de *C. albicans* de pacientes tratados com fluconazol, sugerindo que seu efeito fungistático altera as proporções relativas dos diferentes genótipos e permite a sobrevivência de variantes resistentes.

Além da proteção do biofilme, que contribui para a resistência de *C. albicans*, as células fúngicas podem apresentar um mecanismo, verificado como principal responsável pela resistência contra medicamentos, conhecido como bomba de efluxo, que reduz a entrada do fármaco nos patógenos, reduzindo assim o efeito do fármaco (Taff et al., 2013; Zhang et al., 2020). Outros mecanismos de resistência já relatados envolvem mutações que afetam a biossíntese de ergosterol e conteúdo na membrana fúngica, diminuindo acesso de drogas com mecanismo de ação direcionado a esses alvos (Costa-de-Oliveira, Rodrigues, 2020; Spampinato, Leonardi, 2013). Além disso, *C. albicans* possui inúmeras vias de respostas ao estresse que permitem a sobrevivência durante a exposição a diversos estresses no hospedeiro, incluindo estresses induzidos por drogas antifúngicas (Mount et al., 2018).

## 2.4 Aprovação x reposicionamento de compostos

Para desenvolvimento e utilização de novos compostos com potencial terapêutico, é necessário ultrapassar várias etapas desde a formulação até a aprovação por órgãos governamentais. As etapas descritas pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) têm início com a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos através de testes moleculares para encontrar possíveis efeitos benéficos contra várias doenças. Após os primeiros testes, no entanto, apenas um pequeno número de compostos parece promissor e exige mais estudos para determinar diversos aspectos da utilização do fármaco como melhor dose, melhor forma de administração, efeitos adversos, dentre outros. A segunda etapa inclui estudos pré-clínicos para fornecer informações detalhadas sobre a dosagem e os níveis de toxicidade, o que permite decidir se o medicamento deve ser testado em pessoas. Passando por essas etapas, os pesquisadores projetam ensaios clínicos para responder a questões de pesquisa específicas relacionadas a um produto médico, seguindo um plano de estudo específico, chamado de protocolo, desenvolvido pelo pesquisador ou fabricante, e os ensaios clínicos seguem uma série típica de estudos iniciais, em pequena escala, de fase 1, até estudos de fase 3 em estágio avançado e em grande escala. Por fim, se houver evidências dos primeiros testes e pesquisas pré-clínicas e clínicas, de que um medicamento é seguro e eficaz para o uso pretendido, a empresa pode registrar um pedido para comercializar o medicamento, que será revisado e examinado para sua aprovação ou não. Após a aprovação, no entanto, são realizadas revisões periódicas de relatórios de problemas com medicamentos prescritos e de venda livre, pois apesar das etapas rigorosas no processo de desenvolvimento, existem limitações sobre a segurança que podem surgir durante o uso do composto.

No Brasil, a responsável pelo registro de medicamentos em todo o território nacional é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e o procedimento para que um medicamento seja registrado e comercializado é bem semelhante ao da FDA. Os critérios, no caso da ANVISA, para concessão e renovação do registro de medicamentos também levam em consideração normas específicas para cada categoria, tais como medicamentos sintéticos e semissintéticos, biológicos,

fitoterápicos, específicos, entre outros (ANVISA, 2018). Ao final do processo de avaliação da documentação sobre a qualidade, a segurança e a eficácia do medicamento, a aprovação no Brasil, de acordo com a lei 13.411 de dezembro de 2016 do governo brasileiro, que regulamenta o processo de concessão e renovação de registro de medicamento, é de 120 dias para casos prioritários (remédios para doenças raras) e de 180 dias para casos não prioritários. Todo o processo, portanto, desde o desenvolvimento até a aprovação dos compostos para sua utilização envolve processos custosos e prolongados (Siles et al., 2013).

Na tentativa de reduzir os prazos de pesquisa e desenvolvimento farmacêuticos o reposicionamento de medicamentos pode ser uma opção viável. O reposicionamento ou reaproveitamento de drogas (RD), também conhecido como *reprofiling*, resgate, reciclagem ou redirecionamento de drogas, ou ainda troca terapêutica, é um processo de identificação de novas indicações farmacológicas a partir de compostos já comercializados e aprovados por órgãos governamentais, para sua aplicação no tratamento de doenças diferentes do uso terapêutico pretendido inicialmente (Rudrapal et al., 2020). Fármacos candidatos ao reposicionamento muitas vezes passaram por vários estágios de desenvolvimento clínico e, portanto, têm perfis de segurança e farmacocinéticos bem conhecidos, o que garante rotas mais curtas para a clínica, pois a triagem *in vitro* e *in vivo*, otimização química, toxicologia, fabricação em massa, desenvolvimento de formulações e até mesmo desenvolvimento clínico inicial, em muitos casos, já foram concluídos (Ashburn, Thor, 2004). Estima-se que sejam gastos de 10 a 16 anos e US\$ 12 bilhões para o desenvolvimento de um novo medicamento na abordagem tradicional, enquanto no redirecionamento de compostos o tempo estimado é de 3 a 12 anos com gasto de US\$ 1,6 bilhão (Rudrapal et al., 2020).

Para prosseguir com o reposicionamento é necessário gerar um perfil de produto alvo comercialmente viável para identificar compostos com as características desejadas direcionados para uma determinada abordagem validada cientificamente (Ashburn, Thor, 2004). Em seguida, duas estratégias principais de redirecionamento podem ser desenvolvidas: no alvo (*on-target*) e fora do alvo (*off-target*). Na primeira, o mecanismo farmacológico conhecido de uma molécula de fármaco é aplicado a uma nova indicação terapêutica, na qual o alvo biológico da droga é o mesmo, mas a doença é diferente (Ferreira, Andricopulo, 2016). Já no

perfil *off-target*, o mecanismo farmacológico é desconhecido e o medicamento atua em novos alvos, fora do escopo original (Rudrapal et al., 2020).

Um sucesso notável de RD pode ser datado da década de 1970, quando o medicamento Minoxidil foi aprovado para tratar a perda de cabelo, além de seu uso direcionado para o tratamento da hipertensão, ou ainda o lançamento do Sildenafil, nas décadas de 1990 e 2000, um medicamento reposicionado para tratar a disfunção erétil além da indicação inicial para angina, e da droga Duloxetina, usada para incontinência urinária de esforço, originalmente destinada ao tratamento de depressão (Low et al., 2020). Um dos exemplos mais significativos de RD atualmente, é a busca por medicamentos disponíveis, comercialmente usados para tratar outras doenças, sendo cuidadosamente avaliados para tratamentos da COVID-19 (Low et al., 2020; Rudrapal et al., 2020).

## **2.5 Auranofina e seu reposicionamento**

Com base na hipótese de que um composto de ouro absorvido oralmente poderia oferecer eficácia e baixa toxicidade, quando administrado em uma dose baixa, vários compostos foram selecionados e avaliados na década de 70 para diminuir a progressão dos sintomas de artrite reumatoide (Blodgett, 1983). Após mais de 10 anos e vários testes clínicos o composto de ouro 2,3,4,6,-tetra-O-acetil-1-tiol- $\beta$ -D-glucopiranosato (trietilfosfina) ouro(I) conhecido como auranofina, começou a ser utilizado na década de 1980, devido a suas propriedades anti-inflamatórias (Madeira et al., 2012; Siles et al., 2013; Wiederhold et al., 2017).

Auranofina foi aprovado para o tratamento a longo prazo da artrite reumatoide não responsiva em adultos em doses orais de 3 mg uma ou duas vezes ao dia, com baixa toxicidade e efeitos adversos (Debnath et al., 2012). Sua atividade anti-inflamatória e imunorreguladora, afeta eventos inflamatórios agudos e crônicos e inibe eventos lesivos dos tecidos, como liberação de enzimas lisossômicas, produção de radicais de oxigênio e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Walz et al., 1983). O principal mecanismo de ação da auranofina, verificado em células animais, é através da inibição da enzima tiorredoxina redutase (TrxR), que

controla reações de oxidação e redução intracelular (Rigobello et al., 2005; Roder, Thomson, 2015).

Com biodisponibilidade oral e toxicidade sistêmica toleráveis, auranofina apareceu como um composto candidato para reaproveitamento para diferentes usos terapêuticos (Wiederhold et al., 2017) e o redirecionamento desse composto contra diversos micro-organismos tem apresentado resultados promissores. Em estudos *in vitro* utilizando auranofina contra bactérias, foram verificadas concentrações inibitórias contra diversas bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo cepas resistentes a medicamentos convencionais (Fuchs et al., 2016; Hokai et al., 2014; Jackson-Rosario, Self, 2009; She et al., 2019). Testes *in vivo* para confirmação do efeito antibacteriano foi avaliado em animais invertebrados da espécie *Caenorhabditis elegans* infectados com *Staphylococcus aureus*, com sobrevivência de mais de 90% dos animais após o tratamento com auranofina em concentrações verificadas como inibitórias do micro-organismo (Fuchs et al., 2016).

A atividade antiparasitária de auranofina também foi avaliada e confirmada contra espécies de protozoários como *Leishmania infatum* e *Entamoeba histolytica* (Debnath et al., 2012; Ilari et al., 2012). Os efeitos contra *E. histolytica* foram confirmados *in vivo* com tratamento de ratos infectados com o parasita com auranofina (Debnath et al., 2012). Baseado nesses resultados, um teste clínico de fase I foi iniciado com resultados promissores da segurança do uso de auranofina em terapia anti-infecciosa de curto prazo (Capparelli et al., 2017).

Em outro estudo, foi avaliado o efeito do tratamento de auranofina associada a antirretrovirais em pacientes infectados com o vírus HIV-1 (Diaz et al., 2019). A partir dos resultados, os autores sugeriram que auranofina pode ter um impacto na dinâmica do DNA viral do vírus HIV e intensificar a terapia antiviral. Mais recentemente, também foi verificado *in vitro* que auranofina inibe a replicação do vírus SARS-CoV-2 em células humanas a partir de uma baixa concentração, além de resultar em redução significativa na expressão de citocinas induzidas por infecção viral (Rothan et al., 2020).

O potencial antifúngico de auranofina também foi verificado *in vitro* em vários estudos ao inibir o crescimento planctônico de múltiplas espécies de fungos, incluindo espécies do gênero *Candida* (Fuchs et al., 2016; Stylianou et al., 2014; Thangamani et al., 2017) e isolados clínicos de *C. albicans* resistentes ao fluconazol,

reforçando a importância da abordagem de reposicionamento desse medicamento (Wiederhold et al., 2017). Em uma dessas pesquisas, os resultados indicaram que auranofina foi eficaz em romper o biofilme de *C. albicans*, reduzindo a atividade metabólica das células fúngicas presentes no biofilme em mais de 75% em comparação com o grupo controle.(Thangamani et al., 2017). Ainda em outro estudo mais recente, auranofina foi capaz de reduzir células de biofilmes dual-espécie de *C. albicans* e *S. aureus* (She et al., 2019). Avaliações da atividade antifúngica de auranofina *in vivo*, no entanto, são escassas. Até o momento, apenas um experimento foi realizado com tratamento de invertebrados *C. elegans* infectados com *Cryptococcus neoformans*, com redução significativa da carga fúngica média nos animais tratados em comparação com os grupos de controle (Thangamani et al., 2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste projeto é contribuir para a prospecção de alternativas terapêuticas inovadoras para as infecções por *Candida albicans*, avaliando os efeitos antifúngicos do composto auranofina *in vitro* e toxicidade *in vivo*, assim como investigar seus mecanismos de ação.

#### 3.2 Objetivos específicos

Em busca do objetivo geral, estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

- a) avaliar do potencial antifúngico de auranofina sobre *C. albicans*;
- b) avaliar a ação de auranofina sobre:
  - a morfologia celular e integridade da parede celular
  - fatores de virulência de *C. albicans*: produção de exoenzimas e transição de levedura-hifa;
  - células de *C. albicans* sob condições de estresse osmótico
  - o metabolismo de *C. albicans*;
- c) avaliar *in vivo*, em modelo invertebrado *Drosophila melanogaster*, a toxicidade das concentrações efetivas de auranofina;

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Cepas e condições de crescimento**

Foram incluídas no estudo cepas padrão de *Candida albicans* SC 5314 e ATCC 18804. Essas cepas permaneceram armazenadas em caldo Sabouraud com 20% de glicerol a -80°C. Os inóculos utilizados nos testes foram obtidos a partir da cultura desses micro-organismos em ágar Sabouraud dextrose (SD) ou em caldo YPD (*yeast peptone dextrose*), determinado por protocolos específicos, por 24 h a 37°C, em aerobiose.

### **4.2 Preparação das soluções dos fármacos utilizados**

A solução estoque de auranofina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, São Paulo, Brasil) na concentração de 5 mg/ml, de acordo com o fabricante, e mantida no escuro a -20°C. Da mesma forma foi preparada a solução de caspofungina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e anfotericina B (Inlab, São Paulo, Brasil). Ambos os compostos foram utilizados como controle positivo em testes específicos. Durante a utilização dos compostos nos experimentos, as soluções foram diluídas nos meios de cultura de cada teste, nas concentrações mencionadas.

### **4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)**

Foram obtidos valores de CIM e CFM dos compostos auranofina para as amostras padrão de *C. albicans* utilizando a técnica da microdiluição em caldo RPMI

1640 (Inlab, São Paulo, SP) tamponado com ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico (MOPS) (Inlab, São Paulo, SP), descrita no documento M27-A3 (CLSI, 2008). As células da cultura de *C. albicans* foram suspensas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) até atingir a concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/ml, com o auxílio de espectrofotômetro ( $\lambda = 530$ ; DO = 0,138) (AJX-1600, AJ Micronal, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, a suspensão foi diluída novamente em RPMI até atingir a concentração de  $1 \times 10^3$  UFC/ml (inóculo).

A faixa de concentração de auranofina a ser testada foi de 64 a 0,125  $\mu\text{g/ml}$  (Fuchs et al., 2016). Para atingir a concentração inicial, a solução estoque de auranofina foi diluída em caldo RPMI com MOPS e 200  $\mu\text{l}$  da solução final foi adicionada ao primeiro poço da placa de 96 poços. O intervalo de teste foi preparado pela técnica de microdiluição com a passagem de 100  $\mu\text{l}$  de um poço para o outro. Poços foram selecionados para controles negativo (apenas com RPMI) e de crescimento (inóculo sem tratamento). Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular (inóculo) para os poços teste e controle de crescimento. A CIM do solvente da solução estoque de auranofina (DMSO) também foi verificada, para avaliar se não irá interferir na ação do composto, a partir da concentração de 1,28% (quantidade equivalente àquela utilizada como inicial para auranofina). Os procedimentos foram realizados em triplicata para cada cepa. A seguir, as placas foram incubadas por 24 h a 37°C, em aerobiose.

A CIM corresponderá à concentração que levou a mais de 80% de inibição em relação ao controle de crescimento, verificada visualmente e pela leitura em espectrofotômetro a 595 nm (Fuchs et al., 2016). A CFM foi obtida pela subcultura de 10  $\mu\text{l}$  de cada poço verificado sem crescimento do micro-organismo, em placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose (SD), incubadas por 24 h a 37°C, em aerobiose.

#### **4.4 Investigação dos mecanismos de ação de auranofina sobre *C. albicans***

Para estes ensaios foi utilizada a cepa padrão *C. albicans* SC 5314 e o valor de  $\frac{1}{2}$  CIM previamente determinado para auranofina. Foram incluídos controle de

crescimento, controle solvente (DMSO) e controle positivo, quando necessário, conforme descrito em cada teste.

#### **4.4.1 Determinação do efeito sobre a morfologia da célula fúngica**

A morfologia celular após tratamento foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para obtenção das amostras, uma suspensão de *C. albicans* na concentração de  $10^7$  UFC/ml foi preparada em solução fisiológica e diluída para  $10^6$  UFC/ml em RPMI com MOPS. Foram acrescentados 100  $\mu$ l da suspensão em 100  $\mu$ l de RPMI com auranofina (1/2 CIM), em placa de 96 poços deixada em estufa a 37°C por 24 h. Após o período de incubação, as suspensões foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi retirado e os poços foram lavados com 200  $\mu$ l de solução fisiológica. A placa foi centrifugada novamente, sob as mesmas condições, e o sobrenadante foi descartado. A seguir, foram acrescentados 200  $\mu$ l de solução fisiológica e, a partir da suspensão formada, foram retirados 20  $\mu$ l acrescentados em lâminas de vidro (26x76 mm) e mantidos em temperatura ambiente para secagem. Foram preparadas, da mesma forma, amostras de controle de crescimento (sem tratamento) e controle solvente, expostas ao DMSO (0,04%).

As etapas seguintes foram realizadas de acordo com de Menezes et al. (2021) com pequenas modificações. Para tanto, as lâminas foram acondicionadas em placas de Petri, cobertas com glutaraldeído 2,5% tamponado com tampão fosfato de sódio (0,1 M) e deixadas no escuro por 24 h em temperatura ambiente para fixação. No dia seguinte, o excesso de glutaraldeído foi retirado das placas com auxílio de pipetas Pasteur e as lâminas foram cobertas com tampão fosfato de sódio por 10 min, duas vezes, para lavagem. Em seguida, foi realizada a desidratação das amostras cobrindo as lâminas com álcool em diferentes concentrações em ordem crescente (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%), deixadas por 10 min em cada concentração. Por fim, as lâminas foram deixadas em estufa a 65°C por 24 h para secagem.

Para observação no MEV, as amostras foram metalizadas com o equipamento Quorum Q150R (Quorum Technologies, East Sussex, Reino Unido) e

foi utilizado o microscópio de varredura Tescan Veja 3 (Tescan, Brun, Tchêquia) com detector de elétrons secundários (SE), a 10 kV. As imagens foram obtidas com aumentos de 5000x e 15000x em triplicata para avaliação qualitativa.

#### **4.4.2 Avaliação dos efeitos sobre a parede celular fúngica**

Os efeitos dos compostos sobre a parede celular fúngica foram avaliados utilizando o ensaio de proteção por sorbitol proposto por Frost et al. (1995), realizando o procedimento de microdiluição em caldo. Placas de 96 poços foram preparadas com diluições de auranofina em RPMI com MOPS, na faixa de concentração de 64 à 0,125 µg/ml. Em uma das séries de diluições foram acrescentados 50 µl de solução de sorbitol (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) a 0,8 M, preparada em RPMI e filtrada com filtro de 0,22 µm, em cada poço. Todos os poços foram inoculados com 100 µL de suspensão de células padronizadas ( $1 \times 10^3$  UFC/ml) e as placas foram incubadas a 37°C por 7 dias. Foram adicionados controles de crescimento e negativo (RPMI ou RPMI+sorbitol). A CIM foi definida como a concentração mais baixa que inibiu 80% do crescimento fúngico em comparação com o controle de crescimento. A CIM foi verificada também, com ou sem sorbitol, utilizando caspofungina, como controle positivo, na faixa de concentração de 8 a 0,015 µg/ml (Eksi et al., 2013). Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes em momentos diferentes.

#### **4.4.3 Avaliação do efeito sobre a transição levedura-hifa**

Os ensaios foram realizados com suspensão de *C. albicans* padronizada na concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/ml, em solução fisiológica (NaCl 0,9%). Em placa de 24 poços foram adicionados 500 µl das soluções de auranofina (concentração final =  $\frac{1}{2}$  CIM) e de DMSO (0,08%, v/v), como controle solvente, em duplicata, preparadas em RPMI com MOPS concentrado (2x) suplementado com 10% de soro fetal bovino

(LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram adicionados 500 µl da suspensão de *C. albicans* e as placas foram incubadas por 3 h a 37°C (Zuzarte et al., 2012).

Após o tempo de incubação, foi realizada contagem de acordo com Chevalier et al. (2012) em câmara de Neubauer através de um microscópio (Leica DMLB, Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera CMOS (Tucsen Photonics Co. Ltd., Fuzhou, China) acoplada. As imagens foram visualizadas e capturadas através do software TCCapture sob aumento de 200x. A contagem foi realizada somando números de hifas e pseudo-hifas, e a porcentagem de inibição de filamentação foi calculada em comparação com o controle sem tratamento. Os resultados foram apresentados como médias de três experimentos em momentos diferentes realizados em triplicata.

#### **4.4.4 Avaliação do efeito sobre a produção de exoenzimas**

A avaliação dos efeitos sobre a produção de fosfolipase foi realizada e avaliada de acordo com metodologia proposta por Polak (1992) com ágar de meio-base de emulsão de gema de ovo a 50% preparado em água deionizada estéril. A partir de uma cultura de *C. albicans*, crescida em meio YPD, preparado com 10 g de extrato de levedura, 10 g de peptona e 10 g de glicose (Mardegan et al., 2006), a 37°C por 24 h, foi padronizada uma suspensão na concentração de  $1 \times 10^7$  UFC/ml, em espectrofotômetro. Em seguida, 100 µl dessa suspensão foram expostos à 100 µl da solução de auranofina (1/2 CIM), preparada em meio YPD, a partir da solução estoque, e a placa com as suspensões foi incubada a 37°C por 2 h. Após esse período, foram adicionados 2 µl das suspensões em placas com ágar com emulsão de gema de ovo, em pontos equidistantes, que foram incubadas a 37°C por 7 dias em câmara úmida. Controles de crescimento e solvente (DMSO, 0,04%, v/v) foram acrescentados. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata em três momentos diferentes.

A avaliação do efeito na produção de proteinase foi baseada na metodologia de Ruchel et al. (1982) e as suspensões de *C. albicans*, expostas ou não ao

tratamento, foram distribuídas em ágar YCB-BSA-Protovit preparado a partir de uma solução contendo 1,17 g de YCB (*yeast carbono base*), 0,4 g de soro de albumina bovina (BSA, Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido) e 0,25 ml de Protovit® plus (Bayer, Leverkusen, Alemanha), diluídos em 20 ml de água deionizada. Essa solução foi filtrada com filtro de 0,22 µm e misturada com 80 ml de solução de ágar-ágar, previamente esterilizada e resfriada a 50°C em banho-maria. A preparação das suspensões de *C. albicans*, exposição ao tratamento e incubação foram realizadas como descrito para o ensaio de produção da fosfolipase.

Os resultados foram expressos em Pz calculados pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação formada, sendo produção negativa ( $Pz = 1$ ), positiva ( $0,64 < Pz < 1$ ) e fortemente positiva ( $Pz \leq 0,64$ ).

#### **4.4.5 Avaliação do efeito antifúngico de auranofina sob condições de estresse osmótico**

O potencial antifúngico de auranofina sob condições de estresse osmótico foi avaliado de acordo com Brilhante et al. (2013). Inicialmente, foi determinada a concentração inibitória mínima de NaCl sobre *C. albicans*, dentro da faixa de concentração de 2-0,0025 M, utilizando a técnica de microdiluição descrita anteriormente. Após a observação do resultado em 24 h, foi determinada a concentração subinibitória de NaCl que permitia o crescimento de células fúngicas.

Foram preparadas placas de 96 poços com diluições de auranofina em RPMI com MOPS, na faixa de concentração de 64 à 0,125 µg/ml. Em uma das séries de diluições foram acrescentados 50 µl de solução de NaCl, preparada em água deionizada e filtrada com filtro de 0,22 µm, mantendo a concentração subinibitória de NaCl em cada poço. Todos os poços foram inoculados com 100 µL de suspensão de células padronizadas ( $1 \times 10^3$  UFC/ml) e as placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Após o período, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm, como descrito para o teste de concentração inibitória. Controles de crescimento e negativo (RPMI ou RPMI+NaCl) também foram

adicionados. A CIM foi definida como a concentração mais baixa que inibiu 80% do crescimento no poço em comparação com o controle de crescimento. Foi verificada também a CIM, com ou sem NaCl, utilizando anfotericina B como controle positivo, na faixa de concentração de 4 a 0,005 µg/ml (Eksi et al., 2013). Cada experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes em momentos diferentes.

#### **4.4.6 Avaliação do efeito sobre o metabolismo celular de *C. albicans***

O efeito de auranofina sobre o metabolismo de *C. albicans* foi avaliado utilizando o corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) sobre células em suspensão. A partir da cultura de 24 h de *C. albicans*, uma suspensão foi preparada em solução salina tamponada com fosfato (PBS), padronizada na concentração de  $10^7$  UFC/ml em espectrofotômetro ( $\lambda = 530$  nm, DO = 0,56). Em placa de 96 poços, 100 µl dessa suspensão foram adicionados em poços contendo 100 µl de meio base de nitrogênio e levedura (YNB) suplementado com 1% de glicose (Levitz, Diamond, 1985) preparado com auranofina (1/4 e 1/2 CIM) ou não (controle de crescimento). Controle negativo, com apenas o meio de cultura, também foi acrescentado. As placas foram, então, incubadas ao abrigo da luz em estufa a 37°C por 24 h.

No dia seguinte, foi realizada a centrifugação da placa a 3000 rpm por 5 min para deposição das células no fundo dos poços. Após a retirada do sobrenadante, foi acrescentado PBS, para lavagem dos resíduos do meio cultura, e a placa foi centrifugada novamente com os mesmos parâmetros. O PBS foi retirado e 200 µl da solução de MTT foram acrescentados. A preparação da solução final de MTT, e revelação do resultado foram realizadas de acordo com Chiou et al. (2001). Para tanto, a solução de MTT foi preparada a partir do pó de MTT (Inlab, São Paulo, SP) em PBS (5 mg/ml), filtrada em filtro de 0,22 µm, e diluída em YNB, atingindo a concentração final de 0,05 mg/ml. Com o acréscimo da solução nos poços, a placa foi incubada ao abrigo da luz por 3 h a 37°C (Levitz, Diamond, 1985). Controle solvente, com DMSO (0,04%), e controle negativo, contendo apenas a solução de MTT, também foram acrescentados para controles do ensaio. Após o período, a

placa foi centrifugada novamente, o sobrenadante foi retirado e foram acrescentados 200 µl de isopropanol (Merck Millipore, Massachusetts, EUA) para solubilização dos cristais de formazan. Houve mais uma centrifugação e 100 µl do sobrenadante foram coletados e acrescentados em poços vazios para leitura em espectrofotômetro a 570 nm.

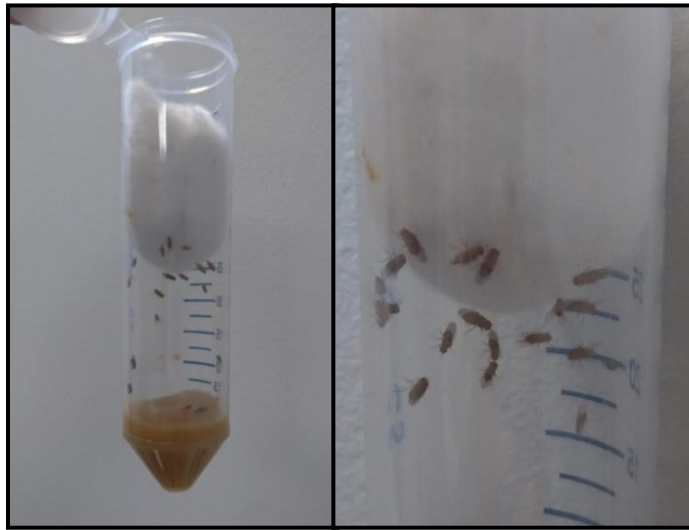
#### **4.5 Avaliação do efeito de auranofina *in vivo* em modelo invertebrado *Drosophila melanogaster***

O modelo invertebrado utilizado nos ensaios foi de moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, obtidas do Centro de Estoque de Bloomington, na Universidade de Indiana.

##### **4.5.1 Avaliação da toxicidade nas concentrações efetivas**

A avaliação da toxicidade *in vivo* foi baseada na metodologia de Sampaio et al. (2018). Para o ensaio foram utilizadas 50 moscas fêmeas, com idade entre 4 e 6 dias, separadas randomicamente, para cada concentração. A solução estoque de auranofina foi misturada ao meio base de alimentação das moscas valores de 1xCIM e 10xCIM. Inicialmente, as moscas foram armazenadas em tubos e mantidas sem alimentação por 6 h. Após o período, foram transferidas para tubos com meio com substância teste com trocas do meio em dias alternados (Figura 1). Também foi avaliada a sobrevivência de moscas com comida padrão sem auranofina, como controle. A toxicidade foi avaliada em 8 dias consecutivos com verificação do número de sobreviventes e a análise de sobrevivência foi realizada através do teste não paramétrico de Kaplan-Meier.

Figura 1 – Tubos com alimento para manutenção de *D. melanogaster*



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.6 Análise estatística

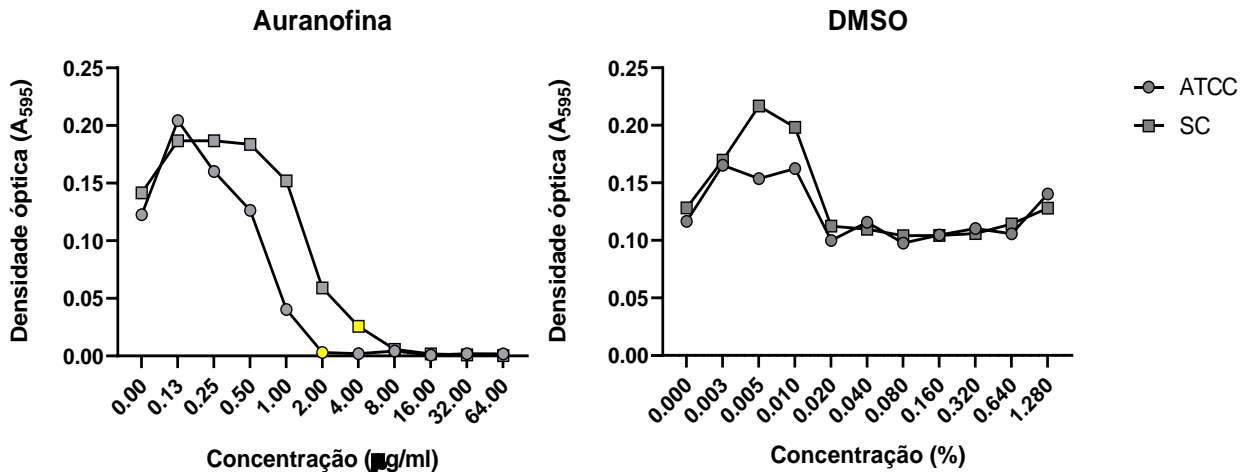
Os dados obtidos nos ensaios foram analisados estatisticamente com auxílio do programa GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Nos experimentos para investigação do efeito de auranofina sobre exoenzimas e células fúngicas sob estresse osmótico, os dados foram avaliados qualitativamente utilizando os critérios descritos em cada experimento. Os resultados do ensaio de transição levedura-hifa foram avaliados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk e a análise estatística foi realizada pelos testes ANOVA e de Tukey para comparações entre os grupos. Na análise do efeito de auranofina sobre o metabolismo fúngico, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e, para múltiplas comparações, o teste de Dunn. No ensaio *in vivo*, foi utilizada a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier. O nível de significância para testes estatísticos foi estabelecido em 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM)

As concentrações inibitórias observadas foram de 2 e 4 µg/ml, para as cepas ATCC 18804 e SC 5314, respectivamente, confirmadas de forma visual e através da avaliação das densidades ópticas obtidas (Figura 2). Após a distribuição das suspensões na placa com ágar SD, foi possível verificar também concentração fungicida mínima (CFM) de 32 µg/ml para ambas as cepas (Quadro 1). Não foram observadas CIM ou CFM para os experimentos realizados apenas com DMSO, demonstrando que a ação efetiva foi do composto.

















Figura 2 – Valores de densidade óptica verificados após teste de microdiluição com auranofina e DMSO sobre cepas de *C. albicans*



Legenda: As concentrações com >80% de redução da DO em relação ao controle foram consideradas inibitórias mínimas (CIM) e estão indicadas pelo símbolo amarelo. Estão representadas as médias de cada triplicata. A leitura das placas foi realizada de forma visual e em espectrofotômetro a 595 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Quadro 1 – Crescimento de *C. albicans* verificado na avaliação da concentração fungicida mínima (CFM) após exposição ao composto auranofina

Cepas de <i>C. albicans</i>	Concentrações (µg/ml)							
	0	1	2	4	8	16	32	64
SC 5314								
ATCC 18804								

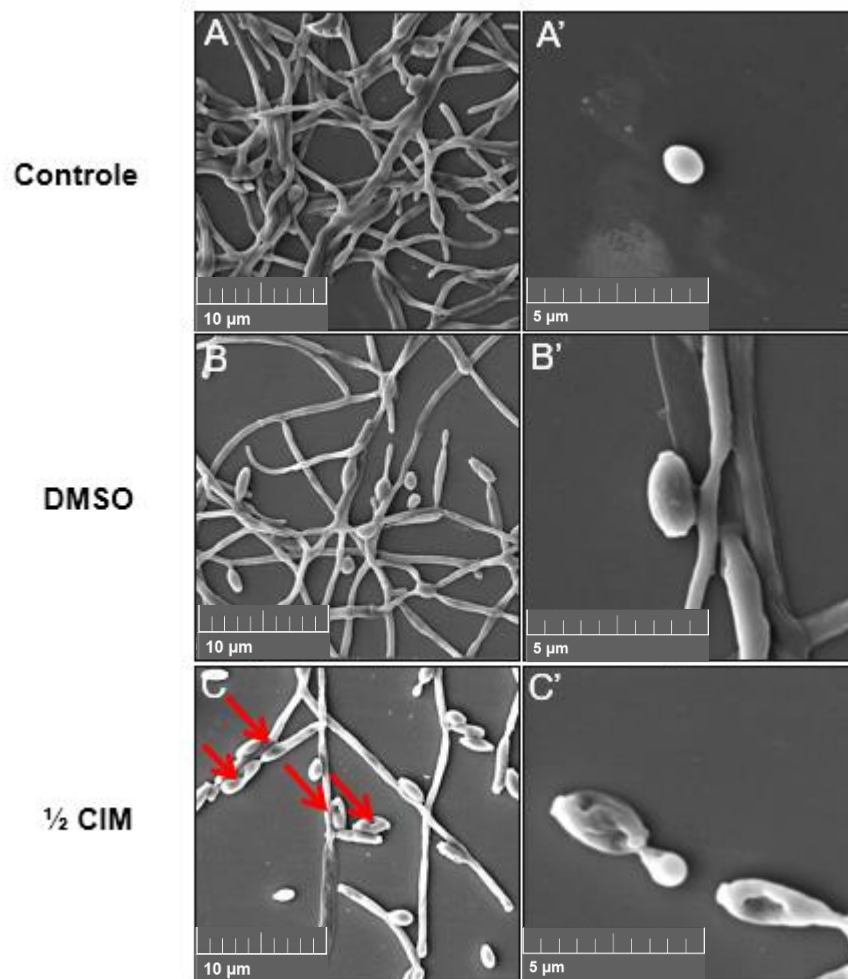
Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.2 Investigação dos mecanismos de ação de auranofina

### 5.2.1 Efeito sobre a morfologia da célula fúngica

O efeito de auranofina sobre a morfologia celular de *C. albicans* foi investigado utilizando microscopia eletrônica de varredura. As imagens, obtidas a partir de triplicatas, demonstraram que o tratamento com  $\frac{1}{2}$  CIM de auranofina (2 µg/ml) por 24 h, provocaram perfurações na estrutura celular fúngica com frequência, o que não foi observado quando as células foram expostas apenas ao DMSO ou ficaram sem tratamento (controle) (Figura 3). Os danos também foram verificados nas hifas após o tratamento com auranofina.

Figura 3 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *C. albicans* com e sem tratamento com auranofina



Legenda: grupo controle = células sem tratamento; grupo DMSO = células tratadas com concentração de DMSO correspondente a quantidade presente na solução de 1/2 CIM de auranofina, sendo 0,04%; grupo 1/2 CIM = células tratadas com 2 μg/ml.de auranofina. Figuras A, B, C indicam imagens realizadas no aumento de 5000x. Figuras A', B' e C' indicam imagens realizadas a 15000x. Setas vermelhas indicam perfurações observadas na estrutura celular de *C. albicans*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados demonstram, portanto, que auranofina altera a morfologia celular de *C. albicans* levando à inibição do crescimento fúngico. A quantidade de células observadas também foi menor em comparação com os outros grupos, apesar da concentração utilizada ser subinibitória.

### 5.2.2 Efeito sobre a parede celular fúngica

O efeito sobre a parede celular fúngica foi investigado através do ensaio de proteção com sorbitol e demonstrou que o composto auranofina não tem mecanismo de ação direcionado a esse componente celular. A CIM, observada com acréscimo de sorbitol, avaliada em 7 dias, foi de 8 µg/ml, o que se manteve na ausência do sorbitol (Tabela 1). A efetividade do ensaio foi confirmada com acréscimo de caspofungina (controle positivo), composto já descrito com efeito sobre a parede celular de *C. albicans* (Odds et al., 2003), que apresentou maior CIM na presença de sorbitol (2 µg/ml) em comparação com a CIM verificada no teste sem o sorbitol (1 µg/ml). Microdiluições com controle solvente não foram acrescentadas neste experimento, pois não foi verificado valor de CIM na presença de DMSO.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM), em µg/ml, observada com ou sem sorbitol, para avaliar o efeito de auranofina ou caspofungina (controle positivo) sobre a parede celular de *C. albicans*

Cepa	Auranofina				Caspofungina			
	2 dias		7 dias		2 dias		7 dias	
	S (-)	S (+)	S (-)	S (+)	S (-)	S (+)	S (-)	S (+)
SC 5314	4	4	8	8	1	2	1	2

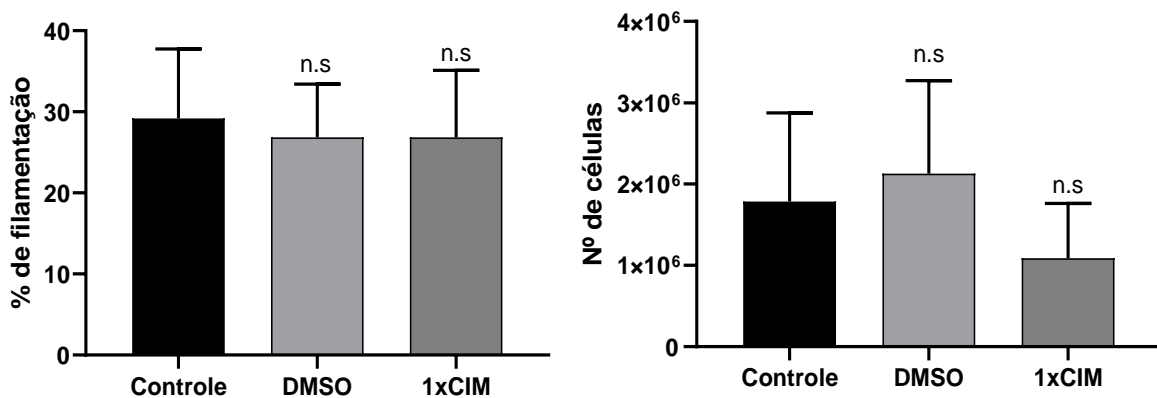
Legenda: S (+) = teste realizado com 50 µl de sorbitol (0,8 M); S (-) = teste realizado sem sorbitol.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.2.3 Efeito sobre a transição levedura-hifa

Após tratamento das suspensões de *C. albicans* com a CIM de auranofina, em soluções enriquecidas com 10% de soro fetal bovino, foi possível observar uma diminuição no número de células após o tratamento com auranofina. No entanto, após a realização do teste estatístico ANOVA, os resultados não demonstraram

diferença significativa ( $p > 0,05$ ) com relação à quantidade de células e à porcentagem de filamentação entre as células tratadas, o controle de crescimento (sem tratamento) e o controle solvente (DMSO) (Figura 4).

Figura 4 – Porcentagem de filamentação e número de células observadas após incubação de células de *C. albicans* com auranofina



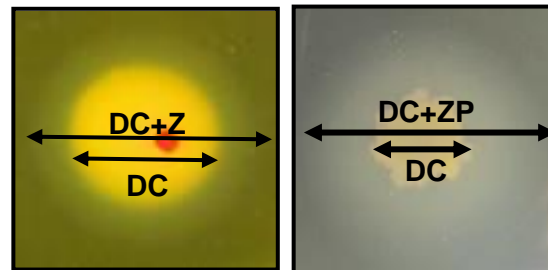
Legenda: 1xCIM = células tratadas com a CIM (4 µg/ml) de auranofina; Controle = controle de crescimento com células não tratadas; DMSO = controle solvente com células expostas a DMSO 0,08%; n.s = diferença não significativa ( $p > 0,05$ ). Porcentagem (%) de filamentação calculada pela quantidade de células em filamentação (hifas + pseudo-hifas) / total de células · 100.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 5.2.4 Ação sobre a produção de exoenzimas

O efeito de auranofina sobre a produção de fosfolipase e proteinase foi avaliado com a distribuição de suspensões de *C. albicans* em ágar com meio-base de emulsão de gema de ovo a 50% e ágar YCB-BSA, respectivamente, após tratamento com ½ CIM (2 µg/ml) ou DMSO (0,04%) por 2 h. Foi realizada a medição do diâmetro da colônia (DC) e do diâmetro da colônia mais a zona de precipitação formada (DC+ZP) (Figura 5) e o valor de Pz foi quantificado ( $Pz = DC/DC+ZP$ ).

Figura 5 – Colônia e halo de precipitação formados após 7 dias de incubação da suspensão de *C. albicans* tratada com auranofina



Legenda: estão representadas as precipitações verificadas no teste do efeito sobre fosfolipase (à esquerda) e sobre proteinase (à direita). DC = diâmetro da colônia; DC+ZP = diâmetro da colônia + zona de precipitação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados demonstraram que não houve diferença entre a produção de fosfolipase e proteinase das colônias tratadas com auranofina e os controles de crescimento (sem tratamento) e solvente (DMSO) (Tabela 2), indicando que o composto não afetou a produção dessas exoenzimas por *C. albicans*.

Tabela 2 – Média dos valores de Pz (n = 9) referente à produção de fosfolipase e proteinase após tratamento com auranofina

Tratamento	Valores de Pz	Classificação
Auranofina (2 µg/ml)	0,66 (F)	Positiva
	0,36 (P)	Fortemente positiva
DMSO (0,04%)	0,72 (F)	Positiva
	0,36 (P)	Fortemente positiva
Controle de crescimento	0,68 (F)	Positiva
	0,33 (P)	Fortemente positiva

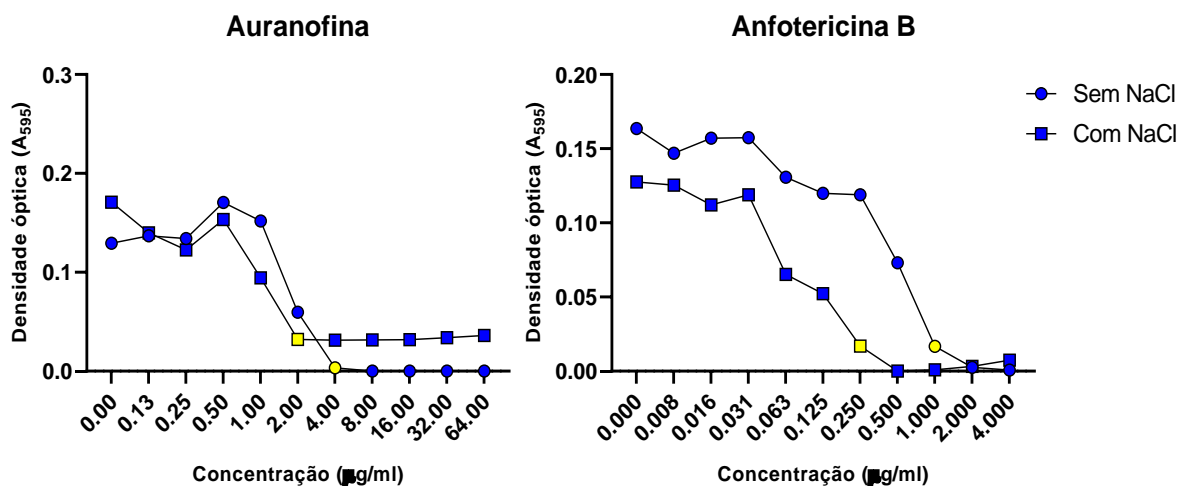
Legenda: classificação baseada em Price et al. (1982), sendo produção negativa (Pz = 1), positiva ( $1 > Pz > 0,64$ ) e fortemente positiva (Pz < 0,64). F = teste de produção de fosfolipase; P = teste de produção de proteinase.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.2.5 Efeito antifúngico de auranofina sob condições de estresse osmótico

Inicialmente, foi obtida a CIM de NaCl de 1 M e os ensaios seguintes foram realizados com a concentração subinibitória de 0,5 M. Com acréscimo de NaCl, que proporcionou condições de estresse osmótico sobre *C. albicans*, foi verificada uma menor CIM de auranofina após 48 h, em comparação com o teste realizado na ausência de NaCl (Figura 6).

Figura 6 - Gráficos de densidades ópticas verificadas após tratamento de *C. albicans* sob estresse osmótico



Legenda: a concentração média que inibiu mais de 80% do crescimento fúngico está indicada pelo símbolo amarelo.

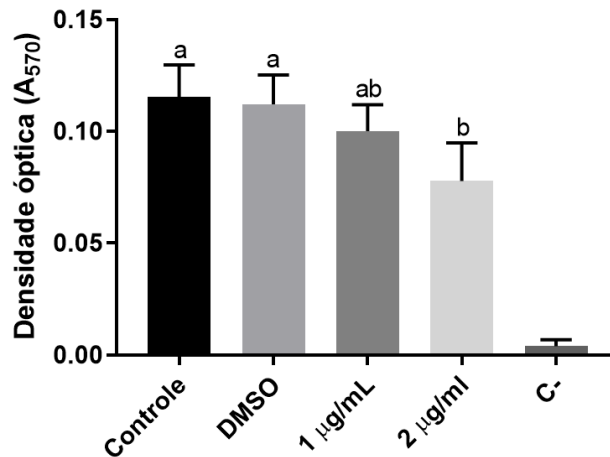
Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao provocar um estresse osmótico com o acréscimo de NaCl, substâncias que atingem a membrana celular podem ter seus efeitos potencializados. Os resultados sugerem, portanto, que auranofina apresenta efeito direto na membrana celular fúngica ou em processos moleculares que afetam a membrana. A diminuição da CIM no teste com anfotericina B, um controle positivo com mecanismo de ação já conhecido sobre a membrana fúngica, demonstra que o ensaio pode indicar efeitos diretos na membrana.

### 5.2.6 Efeito sobre o metabolismo celular de *C. albicans*

O efeito de auranofina sobre o metabolismo de *C. albicans*, verificado através do ensaio com MTT, demonstrou que as concentrações de auranofina utilizadas (1 e 2 µg/ml) reduziram o metabolismo celular fúngico com diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores de DO, em comparação com o controle de crescimento e controle solvente (DMSO), após o tratamento com 2 µg/ml (Figura 7).

Figura 7 – Valores de DO verificados no ensaio com MTT após tratamento de suspensões de *C. albicans* com auranofina e DMSO



Legenda: Ensaio realizado com ¼ CIM (1 µg/ml) e ½ CIM (2 µg/ml). Controle = controle de crescimento sem tratamento; DMSO = controle solvente com DMSO 0,04%; C- = controle negativo com solução de MTT. Barras indicam o desvio-padrão (n=12) e letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

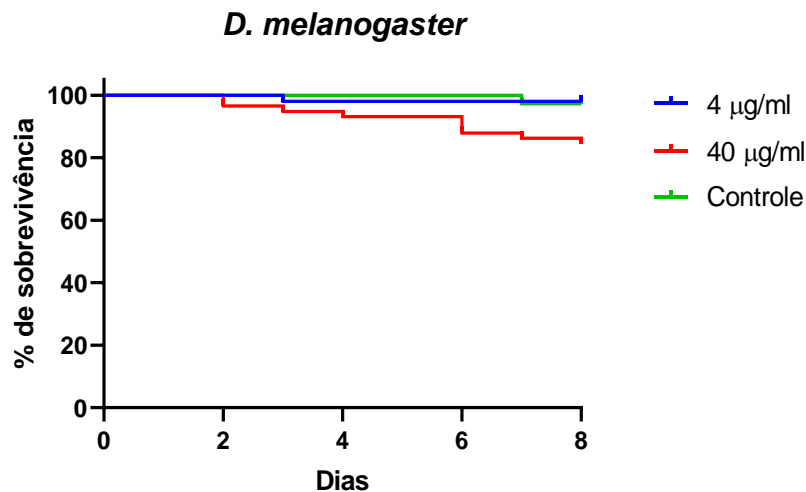
O tratamento com apenas DMSO, na concentração equivalente à maior concentração de auranofina utilizada, não demonstrou efeitos no metabolismo, indicando a ação efetiva do composto. Além disso, o controle negativo, contendo apenas solução de MTT, indicou que a formação dos cristais de formazan ocorreram apenas devido ao metabolismo celular.

### 5.3 Efeito da auranofina *in vivo* em modelo invertebrado *Drosophila melanogaster*

#### 5.3.1 Toxicidade das concentrações efetivas de auranofina

Na avaliação de toxicidade de auranofina sobre moscas da espécie *D. melanogaster*, foi observada de 80-100% de sobrevivência dos animais, após ingestão do alimento com concentrações de auranofina (Figura 8). Nas concentrações utilizadas (4 e 40 µg/ml) o composto demonstrou, portanto, baixa toxicidade, sendo a maior concentração acima da observada como CFM. O período de avaliação foi de 8 dias, com trocas do alimento contendo o composto ou não (controle) em dias alternados.

Figura 8 – Curva de sobrevivência de *D. melanogaster* após ingestão do alimento com auranofina



Fonte Elaborada pelo autor.

## 6 DISCUSSÃO

A disponibilidade de medicamentos para combater infecções fúngicas sistêmicas ainda é muito limitado, apesar do desenvolvimento de pesquisas dedicadas ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Kim et al., 2015). Diante disso, a triagem por “medicamentos reposicionáveis”, que podem atuar também como adjuvantes a antifúngicos convencionais pode ser uma opção para tratamento dessas infecções (Eldesouky et al., 2020). Ao redirecionar compostos já aprovados, por órgãos governamentais, e comercializados, para fins diferentes dos que foram direcionados inicialmente, os prazos de pesquisa e desenvolvimento farmacêutico são reduzidos, pois são compostos com perfis de segurança e farmacocinéticos bem conhecidos e com triagem *in vitro* e *in vivo* já concluída, o que permite caminhos mais curtos para a utilização clínica (Ashburn, Thor, 2004).

Auranofina, um composto de ouro com propriedades anti-inflamatórias usado por via oral no tratamento da artrite reumatóide há mais de 30 anos, tem apresentado resultados promissores para reposicionamento como antimicrobiano e antiparasitário (Peroutka-Bigus, Bellaire, 2019; Rothan et al., 2020; Siles et al., 2013; Thangamani et al., 2016). Neste contexto, o presente trabalho buscou elucidar os possíveis mecanismos de ação de auranofina sobre a estrutura celular e processos moleculares de *C. albicans*, além de verificar a toxicidade do composto *in vivo* nas concentrações antifúngicas efetivas, o que pode contribuir em investigações clínicas de utilização desse composto para tratamentos de candidoses sistêmicas.

O efeito inibitório de auranofina sobre *C. albicans* foi verificado em nosso estudo, nas concentrações de 2 e 4 µg/ml (cepas ATCC 18804 e SC 5314, respectivamente) após 24 h de incubação. Diferentes valores de CIM de auranofina foram verificados em estudos anteriores com cepas diferentes das que foram utilizadas em nosso estudo. Wiederhold et al. (2017) encontraram CIM de 0,25 a 1 µg/ml ao analisar treze cepas clínicas de *C. albicans*. Neste caso, os autores consideraram uma redução de 50% com relação ao controle de crescimento. Em outro estudo, de She et al. (2019), a CIM encontrada para auranofina foi de 8 µg/ml para duas cepas padrões de *C. albicans*, com incubação das placas por 48 h.

Ao utilizar a cepa SC 5314, como em nosso estudo, Fuchs et al. (2016),

descreveram um valor de CIM de 8 µg/ml. No entanto, neste estudo, os autores utilizaram uma concentração de micro-organismos de  $5 \times 10^4$  a  $2,5 \times 10^6$  células/ml para o teste de microdiluição, concentrações diferentes da que foi utilizada em nosso estudo ( $10^3$  UFC/ml). Ainda assim, no mesmo trabalho é possível observar, no gráfico com as concentrações utilizadas, uma redução do crescimento de *C. albicans* em relação ao controle sem tratamento, a partir de 4 µg/ml em 24 h, corroborando com nossos resultados. Essas variações, portanto, podem ocorrer com a utilização de diferentes cepas e de diferentes protocolos para verificação da CIM. A CFM também pode variar pelos mesmos motivos. Apesar disso, estudos anteriores demonstraram ação fungicida de auranofina com concentrações de 8 e 32 µg/ml (She et al., 2019) e acima de 16 µg/ml (Wiederhold et al., 2017), valores similares ao que foi observado em nossos resultados de CFM de 32 µg/ml para ambas as cepas. Fuchs et al. (2016), porém, não verificaram efeito fungicida para a cepa SC 5314 até 64 µg/ml de auranofina, uma variação que pode ter sido encontrada devido à concentração da suspensão de *C. albicans* utilizada, e meio de cultura diferente do que foi utilizado em nosso estudo, para avaliação da CFM.

Apesar de ser um medicamento já conhecido, o mecanismo de ação de auranofina sobre *C. albicans* foi pouco explorado em estudos anteriores. Quando o reposicionamento é direcionado para atuação do medicamento como antimicrobiano, os mecanismos de ação são pontos importantes a serem avaliados, pois o estudo dos principais mecanismos-alvo sobre estrutura antimicrobiana são pontos de partida clássicos para o estudo de novas técnicas terapêuticas para evitar falhas no processo de aprovação com essa finalidade (Singh et al., 2021).

Durante a investigação desses mecanismos neste trabalho, foi possível observar, através da análise de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), que auranofina diminuiu visivelmente a quantidade de células e afetou a morfologia celular de *C. albicans* em culturas planctônicas. As células ficaram em contato com o composto em concentração subinibitória (2 µg/ml) por 24 h antes da preparação para o MEV. Essa foi a primeira observação dos efeitos de auranofina em células planctônicas, porém outros autores utilizaram MEV para avaliar a ação de auranofina sobre biofilmes de *C. albicans*, formados em cateteres, e observaram a diminuição de células no biofilme e de sua estrutura em tratamentos com 8 µg/ml por 24 h (She et al., 2019).

Apesar do efeito observado sobre a estrutura celular fúngica, não foi verificada ação de auranofina sobre a parede celular de *C. albicans* no ensaio realizado com sorbitol. Nessa metodologia, o sorbitol aumenta a osmolaridade externa da célula, reduzindo a pressão de turgescência para fora e estabiliza a parede celular (Popolo et al., 2001). Dessa forma, na presença de sorbitol, as células ficam menos inchadas e as propriedades da parede celular retornam ao normal, aumentando os valores de CIM se a substância testada atuar diretamente sobre a parede celular, o que é verificado no teste com caspofungina, utilizada como controle positivo por ser um medicamento já conhecido que desestabiliza a integridade da parede celular fúngica, levando a instabilidade osmótica e morte celular (Kofla, Ruhnke, 2011; Wiederhold, Lewis, 2003). Os valores de CIM de auranofina foram semelhantes na presença ou ausência de sorbitol, o que sugere, portanto, que a inibição do crescimento fúngico ocorreu sem afetar especificamente esse componente celular.

Não foi verificado também efeito de auranofina, na concentração subinibitória, sobre fatores de virulência de *C. albicans* como transição hifa-levedura e produção de exoenzimas. Com relação à mudança na morfologia, a porcentagem de filamentação foi muito semelhante entre os grupos tratado e controles sem tratamento e DMSO. Da mesma forma, a produção das exoenzimas, fosfolipase e proteinase, foi similar em todos os grupos. A classificação da produção das enzimas foi baseada no cálculo da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a precipitação observada em ágaros específicos, sendo “positiva” para fosfolipase e “fortemente positiva” para proteinase.

Apesar disso, o efeito de auranofina foi observado sobre suspensões de *C. albicans* sob condições de estresse osmótico, com diminuição da CIM. Neste ensaio, células fúngicas foram expostas a uma concentração subinibitória de NaCl e auranofina. A quantidade de NaCl alterou a pressão osmótica no meio e o acréscimo de auranofina pode ter ocasionado um aumento do extravasamento do conteúdo celular, diminuindo a CIM. Dessa forma, os resultados sugerem que o composto atue direta ou indiretamente sobre a estrutura da membrana celular fúngica, o que pode estar relacionado com a alteração observada no MEV. O resultado do efeito direto na membrana pode ser observado com o controle positivo, anfotericina B, que também teve a diminuição da CIM nas mesmas condições, e já tem mecanismo de

ação conhecido sobre a membrana celular fúngica, através da ligação com a molécula de ergosterol e indução da formação de poros na membrana (Mesa-Arango et al., 2012).

Outro possível mecanismo de ação de auranofina sobre *C. albicans* foi avaliado utilizando o composto brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A molécula de MTT é clivada em cristais de formazan por células com mitocôndrias ativas, o que é verificado através da espectrofotometria (Mosmann, 1983). Diante disso, nossos resultados demonstraram que as concentrações de  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$  CIM de auranofina foram suficientes para induzir a redução da atividade mitocondrial de *C. albicans*, sendo significativa com a concentração subinibitória (2  $\mu\text{g/ml}$ ) em relação aos controles não tratado e DMSO. Nessas concentrações não houve diminuição do crescimento fúngico, de acordo com o teste de microdiluição, indicando que houve apenas a redução do metabolismo sem afetar a quantidade de células na suspensão.

Com sua atuação bioenergética, as mitocôndrias são qualificadas como principais organelas responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que participam da indução do estresse oxidativo celular (Nohl et al., 2003; Zhao et al., 2019). Uma das espécies reativas produzidas é o peróxido de hidrogênio, que pode ser controlado pela oxidação da proteína tioredoxina (Trx). Alguns autores observaram que auranofina impede fortemente a atividade da enzima tioredoxina redutase (TrxR) em mitocôndrias de células de mamíferos, o que impede a redução da Trx e resulta na abertura de poros ou aumento da permeabilidade da membrana externa mitocondrial (Rigobello et al., 2005). Dessa forma, o efeito de auranofina na inativação das mitocôndrias verificadas no ensaio do MTT, pode ter levado a um aumento do estresse oxidativo, com liberação de ROS para o meio intracelular.

Moléculas semelhantes às TrxR e Trx de animais estão presentes em *C. albicans* e atuam como antioxidante, regulando respostas ao estresse induzido por peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Dantas et al., 2010). É possível, portanto, que auranofina, além de atuar na atividade mitocondrial, tenha interferido na resposta ao estresse oxidativo gerado ao impedir a redução de Trx, por inibição de TrxR presente nas células fúngicas, causando o efeito fungicida verificado no ensaio de CFM. Além disso, Dantas et al. (2010) ainda observaram que, na ausência de Trx

reduzida, as células fúngicas apresentaram virulência significativamente atenuada *in vivo*.

No ensaio de toxicidade *in vivo* realizado com moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, foi possível observar a sobrevivência de mais de 80% dos animais que ingeriram alimento contendo 4 ou 40 µg/ml de auranofina, sendo esta última uma concentração acima da verificada como fungicida (32 µg/ml). Apesar da ausência de registros na literatura de ensaios *in vivo* de redirecionamento de auranofina para tratamento de infecções por *C. albicans*, alguns autores verificaram que concentrações até 25 µg/ml do composto proporcionou a sobrevivência de mais de 80% de vermes da espécie *Caenorhabditis elegans* infectados com *Staphylococcus aureus*, indicando a baixa toxicidade do composto e ação antimicrobiana (Fuchs et al., 2016). Outros ainda observaram que o tratamento de *C. elegans* infectados com fungos *Cryptococcus neoformans*, com 8 µg/ml de auranofina, diminuiu a UFC/animal após 24 h (Thangamani et al., 2017), o que poderia garantir a sobrevivência em um período prolongado.

Por fim, este estudo demonstrou que o composto auranofina tem sua eficácia contra *C. albicans* com mecanismos de ação direcionado, preferencialmente, ao metabolismo fúngico e possível inibição da resposta ao estresse oxidativo, com baixa toxicidade em modelo invertebrado nas concentrações efetivas. Apesar disso, mais investigações são necessárias, como avaliação do efeito em infecções fúngicas *in vivo* e farmacocinética nas concentrações efetivas, dentre outras, para determinar a eficácia e a dose ideal *in vivo* ao redirecionar auranofina para tratamento de infecções fúngicas causadas, principalmente, por *C. albicans*.

## 7 CONCLUSÃO

Apesar da ausência de efeitos sobre fatores de virulência, auranofina teve efeito fungistático e fungicida em determinadas concentrações e causou redução no metabolismo fúngico e no crescimento fúngico sob estresse osmótico, sugerindo, nesse caso, um possível efeito direto ou indireto na membrana celular fúngica. Além disso, nas concentrações efetivas não foi observada toxicidade relevante *in vivo* utilizando o modelo animal *Drosophila melanogaster*. Os resultados demonstraram, portanto, que auranofina tem potencial para seu reposicionamento como antifúngico. No entanto, mais estudos são necessários para mais esclarecimentos e utilização adequada do medicamento.

## REFERÊNCIAS

- Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi – a review. *Med Mycol*. 2012;50(4):337–45. doi: 10.3109/13693786.2011.652201. Quorum. PMID: 22268493.
- ANVISA AN de VS-M da S [internet]. Registro de novos medicamentos: saiba o que é preciso 2018. [cited 2022 Jun 15]; Available from: [http://antigo.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p\\_p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&\\_101\\_struts\\_action=%2Fasset\\_publisher%2Fview\\_content&\\_101\\_assetEntryId=5062720&\\_101\\_type=content&\\_101\\_groupId=219201&\\_101\\_urlTitle=registro-de-novos-medicamentos-saiba-o-que-e-preciso&inheritRedirect=true](http://antigo.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=5062720&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=registro-de-novos-medicamentos-saiba-o-que-e-preciso&inheritRedirect=true).
- Arastehfar A, Carvalho A, Hong Nguyen M, Hedayati MT, Netea MG, Perlin DS, et al. Covid-19-associated candidiasis (Cac): An underestimated complication in the absence of immunological predispositions? *J Fungi*. 2020;6(4):1–13. doi: 10.3390/jof6040211. PMID: 33050019.
- Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant candida: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis*. 2017;216(Suppl 3):S445–51. doi: 10.1093/infdis/jix131. PMID: 28911043.
- Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(8):673–83. doi: 10.1038/nrd1468. PMID: 15286734.
- Blodgett RC. Auranofin: Experience to date. *Am J Med*. 1983;75(6):86–9. doi: 10.1016/0002-9343(83)90480-1. PMID: 6419601.
- BRASIL. Lei Nº 13.411, de 28 de dezembro de 2016. Brasil: Diário Oficial da União; 2016.
- Brilhante RSN, De Lima RAC, Caetano EP, Leite JJG, De Souza Collares Maia Castelo-Branco D, Ribeiro JF, et al. Effect of farnesol on growth, ergosterol biosynthesis, and cell permeability in *Coccidioides posadasii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2167–70. doi: 10.1128/AAC.02457-12. PMID: 23459491.
- Brown GD, Denning DW, Levitz SM. Tackling human fungal infections. *Science*. 2012 May 11;336(6082):647. doi: 10.1126/science.1222236. PMID: 22582229.
- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *TRENDS Microbiol Microbiol*. 2001;9(7):327–35. doi: 10.1016/s0966-842x(01)02094-7. PMID: 11435107.
- Canela HMS, Cardoso B, Vitali LH, Coelho HC, Martinez R, Ferreira ME da S. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses*. 2017;61(1):11–21. doi: 10.1111/myc.12695. PMID: 28940753.
- Capparelli E V, Bricker-Ford R, Rogers MJ, McKerrow JH, Reed SL. Phase I clinical trial results of auranofin, a novel antiparasitic agent. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(1). doi: 10.1128/AAC.01947-16. PMID: 27821451.
- Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Lopez-Ribot JL, Saville SP, Albert ND, et al. *Drosophila melanogaster* as a Facile Model for Large-Scale Studies of Virulence Mechanisms and Antifungal Drug Efficacy in *Candida* Species. *J Infect Dis*. 2006;193(7):1014–22. doi:

10.1086/500950. PMID: 16518764.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm Formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001;183(18):5385–94. doi: 10.1128/JB.183.18.5385–5394.2001. PMID: 11514524.

Chandra J, Mukherjee PK. *Candida* biofilms: development, architecture, and resistance. *Microbiol Spectr.* 2015;3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015. PMID: 11514524.

Chevalier M, Medioni E, Prêcheur I. Inhibition of *Candida albicans* yeast-hyphal transition and biofilm formation by *Solidago virgaurea* water extracts. *J Med Microbiol.* 2012;61(PART7):1016–22. doi: 10.1099/jmm.0.041699-0. PMID: 22422572.

Chin VK, Lee TY, Rusliza B, Chong PP. Dissecting *Candida albicans* infection from the perspective of *C. Albicans* virulence and omics approaches on host–pathogen interaction: A review. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10). doi: 10.3390/ijms17101643. PMID: 27763544.

Chiou CC, Mavrogiorgos N, Tillem E, Hector R, Walsh TJ. Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomycin Z and the echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(12):3310–21. doi: 10.1128/AAC.45.12.3310-3321.2001. PMID: 11709302.

Colombo AL, Guimarães T, Camargo LFA, Richtmann R, de Queiroz-Telles F, Salles MJC, et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Brazi J Infect Dis.* 2013;17(3):283–312. doi: 10.1016/j.bjid.2013.02.001. PMID: 23693017.

Costa-De-Oliveira S, Pina-Vaz C, Mendonça D, Gonçalves Rodrigues A. A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27(5):365–74. doi: 10.1007/s10096-007-0448-4. PMID: 18204871.

Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: the triad yeast-host-antifungal. *Microorganisms.* 2020 Jan 22;8(2):154. doi: 10.3390/microorganisms8020154. PMID: 31979032; PMCID: PMC7074842.

Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microb Pathog.* 2018;117(December 2017):128–38. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.028. PMID: 29454824.

Dantas A da S, Patterson MJ, Smith DA, MacCallum DM, Erwig LP, Morgan BA, et al. Thioredoxin regulates multiple hydrogen peroxide-induced signaling pathways in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol.* 2010;30(19):4550–63. doi: 10.1128/mcb.00313-10. PMID: 20679492

Dantas KC, Mauad T, de André CDS, Bierrenbach AL, Saldiva PHN. A single-centre, retrospective study of the incidence of invasive fungal infections during 85 years of autopsy service in Brazil. *Sci Rep.* 2021;11(1):1–10. doi: 10.1038/s41598-021-83587-1. PMID: 33597620.

Debnath A, Parsonage D, Andrade RM, He C, Cobo ER, Hirata K, et al. A high-throughput drug screen for *Entamoeba histolytica* identifies a new lead and target. *Nat Med.* 2012;18(6):956–60. doi: 10.1038/nm.2758. PMID: 22610278.

Diaz RS, Shytaj IL, Giron LB, Obermaier B, della Libera E, Galinskas J, et al. Potential

impact of the antirheumatic agent auranofin on proviral HIV-1 DNA in individuals under intensified antiretroviral therapy: Results from a randomised clinical trial. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;54(5):592–600. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.08.001. PMID: 31394172.

Eksi F, Gayyurhan ED, Balci I. In vitro susceptibility of *Candida* species to four antifungal agents assessed by the reference broth microdilution method. *Sci World J*. 2013;2013. doi: 10.1155/2013/236903. PMID: 24250260.

Eldesouky HE, Salama EA, Li X, Hazbun TR, Mayhoub AS, Seleem MN. Repurposing approach identifies pitavastatin as a potent azole chemosensitizing agent effective against azole-resistant *Candida* species. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–12. doi: 10.1038/s41598-020-64571-7. PMID: 32372011.

Farah C, Lynch N, McCullough M. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J*. 2010;55:48–54. doi: 10.1111/j.1834-7819.2010.01198.x. PMID: 20553244.

FDA USF and DA [internet]. The Drug Development Process 2018. [cited 2022 Jun 15]; Available from: <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>.

Ferreira LG, Andricopulo AD. Drug repositioning approaches to parasitic diseases: a medicinal chemistry perspective. *Drug Discov Today*. 2016 Oct;21(10):1699-1710. doi: 10.1016/j.drudis.2016.06.021. Epub 2016 Jun 27. PMID: 27365271.

Firacative C. Invasive fungal disease in humans: Are we aware of the real impact? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2020;115(9):1–9. doi: 10.1590/0074-02760200430. PMID: 33053052.

Ford CB, Funt JM, Abbey D, Issi L, Guiducci C, Martinez DA, et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *Elife*. 2015;2015(4):1–27. doi: 10.7554/eLife.00662. PMID: 25646566.

Fraczek MG, Chishimba L, Niven RM, Bromley M, Simpson A, Smyth L, et al. Corticosteroid treatment is associated with increased filamentous fungal burden in allergic fungal disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(2):407–14. doi: 10.1016/j.jaci.2017.09.039. PMID: 29122659.

Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman R. A Whole-Cell *Candida albicans* Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. *J Antibiot (Tokyo)*. 1995;48(4):306–10. doi: 10.7164/antibiotics.48.306. PMID: 7775267.

Fuchs B, RajaMuthiah R, Souza A, Rossoni R, Santos D, Junqueira J, et al. Inhibition of bacterial and fungal pathogens by the orphaned drug auranofin. *Future Med Chem*. 2016;8(2):117–32. doi: 10.4155/fmc.15.182. PMID: 26808006.

Funaki T, Komura M, Miyairi I. Relationship between antimicrobial days of therapy and detection rate and antifungal susceptibilities of *Candida*. *Open Forum Infect Dis*. 2015;2(1):182. doi: 10.1093/ofid/ofv133.59.

Ghannoum MA, Radwan SS. *Candida* Adherence to Epithelial Cells. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 1990. doi: 10.1201/9781351070416

Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*. 2016;59(3):145–50. doi: 10.1111/myc.12427. PMID: 26691607.

Glittenberg MT, Silas S, MacCallum DM, Gow NAR, Ligoxygakis P. Wild-type *Drosophila*

- melanogaster as an alternative model system for investigating the pathogenicity of *Candida albicans*. *DMM Dis Model Mech*. 2011;4(4):504–14. doi: 10.1242/dmm.006619. PMID: 21540241.
- Gow NAR, Van De Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2013;10(2):112–22. doi: 10.1038/nrmicro2711. PMID: 22158429.
- Hokai Y, Jurkowicz B, Fernández-Gallardo J, Zakirkhodjaev N, Sanaú M, Muth TR, et al. Auranofin and related heterometallic gold(I)-thiolates as potent inhibitors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial strains. *J Inorg Biochem*. 2014;138:81–8. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.05.008. PMID: 24935090.
- Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(7):2982–92. doi: 10.1128/AEM.67.7.2982. PMID: 11425711
- Ilari A, Baiocco P, Messori L, Fiorillo A, Boffi A, Gramiccia M, et al. A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: The X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids*. 2012;42(2–3):803–11. doi: 10.1007/s00726-011-0997-9. PMID: 21833767.
- Jackson-Rosario S, Self WT. Inhibition of selenium metabolism in the oral pathogen *treponema denticola*. *J Bacteriol*. 2009;191(12):4035–40. doi: 10.1128/JB.00164-09
- Junqueira JC, Vilela SFG, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa ACBP, Rasteiro VMC, et al. Colonização oral por leveduras em pacientes HIV-positivos no Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012;54(1):17–24. doi: 10.1590/S0036-46652012000100004. PMID: 22370749.
- Kim K, Zilbermintz L, Martchenko M. Repurposing FDA approved drugs against the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14(1):1–11. doi: 10.1186/s12941-015-0090-4. PMID: 26054754.
- Kofla G, Ruhnke M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis - review of the literature. *Eur J Med Res*. 2011;16(4):159. doi: 10.1186/2047-783X-16-4-159. PMID: 21486730.
- Krcmery Jr. V, Matejicka F, Pichnova E, Jurga L, Sulcova M, Kunova A, et al. Documented Fungal infections after prophylaxis or therapy with wide spectrum antibiotics: relationship between certain fungal pathogens and particular antimicrobials? *J Chemother*. 1999;11(5):385–90. doi: 10.1179/joc.1999.11.5.385. PMID: 10632385
- Kruppa M. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses*. 2009;52(1):1–10. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01626.x. PMID: 18983434.
- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*. 2002 Feb;70(2):878–88. doi: 10.1128/IAI.70.2.878-888.2002. PMID: 11796623; PMCID: PMC127692
- Levitz SM, Diamond RD. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Infect Dis*. 1985;152(5):938–45. doi: 10.1093/infdis/152.5.938. PMID: 2413145.
- Lewis JS, Graybill JR. Fungicidal versus Fungistatic: what's in a word? *Expert Opin Pharmacother*. 2008;9(6):927–35. doi: 10.1517/14656566.9.6.927. PMID: 18377336.

Low ZY, Farouk IA, Lal SK. Drug repositioning: New approaches and future prospects for life-debilitating diseases and the COVID-19 pandemic outbreak. *Viruses*. 2020;12(9). doi: 10.3390/v12091058. PMID: 32972027.

Madeira JM, Gibson DL, Kean WF, Klegeris A. The biological activity of auranofin: Implications for novel treatment of diseases. *Inflammopharmacology*. 2012;20(6):297–306. doi: 10.1007/s10787-012-0149-1. PMID: 22965242.

Marchaim D, Lemanek L, Sobel JD, Kaye KS. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis 2012;120(6):1407–14. doi: 10.1097/aog.0b013e31827307b2. PMID: 23168767.

Mardegan RDC, Klein MI, Golvea MB, Oliveira Rodrigues JA, Gonçalves RB, Höfling JF. Biotyping and genotypic diversity among oral *Candida albicans* strains from caries-free and caries-active healthy children. *Braz J Microbiol*. 2006;37(1):26–32. doi: 10.1590/S1517-83822006000100005

de Menezes BRC, Sampaio A da G, da Silva DM, Montagna LS, Montanheiro TL do A, Koga Ito CY, et al. Nanocomposites obtained by incorporation of silanized silver nanowires to improve mechanical properties and prevent fungal adhesion. *Nano Sel*. 2021;2(12):2358–72. doi: 10.1002/nano.202100095.

Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol*. 2012 Aug 8;3:286. doi: 10.3389/fmicb.2012.00286. PMID: 23024638; PMCID: PMC3441194.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682.

Mount HO, Revie NM, Todd RT, Anstett K, Collins C, Costanzo M, et al. Global analysis of genetic circuitry and adaptive mechanisms enabling resistance to the azole antifungal drugs. *PLoS Genet*. 2018 Apr 27;14(4):e1007319. doi: 10.1371/journal.pgen.1007319. PMID: 29702647; PMCID: PMC5922528.

Nett JE, Andes DR. Antifungal agents: spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. *Infect Dis Clin North Am*. 2016 Mar;30(1):51-83. doi: 10.1016/j.idc.2015.10.012. Epub 2015 Dec 29. PMID: 26739608.

Nohl H, Kozlov AV, Gille L, Staniek K. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochem Soc Trans*. 2003 Dec;31(Pt 6):1308-11. doi: 10.1042/bst0311308. PMID: 14641050.

Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003;11(6):272–9. doi: 10.1016/S0966-842X(03)00117-3. PMID: 12823944.

Omrani AS, Makkawy EA, Baig K, Baredhwan AA, Almuthree SA, Elkhizzi NA, et al. Ten-year review of invasive candida infections in a tertiary care center in Saudi Arabia. *Saudi Med J*. 2014;35(8):821–6. PMID: 25129180.

Palmer LB, Greenberg HE, Schiff MJ. Corticosteroid treatment as a risk factor for invasive aspergillosis in patients with lung disease. *Thorax*. 1991;46(1):15–20. doi: 10.1136/thx.46.1.15. PMID: 1871691.

Papon N, Naglik JR, Hube B, Goldman GH. Fungal pathogenesis: a new venom. *Curr Biol*. 2021 Apr 26;31(8):R391-R394. doi: 10.1016/j.cub.2021.03.015. PMID: 33905698.

- Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016 Feb 15;62(4):e1-50. doi: 10.1093/cid/civ933. Epub 2015 Dec 16. PMID: 26679628; PMCID: PMC4725385.
- Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Invasive fungal infections in the icu: How to approach, how to treat. *Molecules*. 2014;19(1):1085–119. doi: 10.3390/molecules19011085. PMID: 24445340.
- de Pauw BE. What are fungal infections? *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2011;3(1):e2011001. doi: 10.4084/MJHID.2011.001. Epub 2011 Jan 14. PMID: 21625304; PMCID: PMC3103258.
- Peroutka-Bigus N, Bellaire BH. Antiparasitic activity of auranofin against pathogenic *naegleria fowleri*. *J Eukaryot Microbiol*. 2019;66(4):684–8. doi: 10.1111/jeu.12706. PMID: 30520183
- Peter Donnelly J, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the european organization for research and treatment of cancer and the mycoses study group education and research consortium. *Clin Infect Dis*. 2020;71(6):1367–76. doi: 10.1093/cid/ciz1008. PMID: 31802125.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al. Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: A 10.5-year analysis of susceptibilities of candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1366–77. doi: 10.1128/JCM.02117-09. PMID: 20164282.
- Pilmis B, Yang Z, Lanternier F, Lortholary O. Systemic Candidiasis. In: Cohen, J, Powderly, WG, Opal, SM. *Infectious Disease*. 4th ed. Elsevier Ltd; 2017. p. 439-445. ISBN n<sup>o</sup>. 978-0-7020-6285-8.
- Poissy J, Damonti L, Bignon A, Khanna N, Von Kietzell M, Boggian K, et al. Risk factors for candidemia: a prospective matched case-control study. *Crit Care*. 2020;24(1):1–11. doi: 10.1186/s13054-020-2766-1. PMID: 32188500.
- Polak A. Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses*. 1992;35(1–2):9–16. doi: 10.1111/j.1439-0507.1992.tb00813.x. PMID: 1406791.
- Polke M, Hube B, Jacobsen ID. *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol*. 2015;91:139–235. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.12.002. PMID: 25911234.
- Popolo L, Gualtieri T, Ragni E. The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol*. 2001;39(1):111–21. doi: 10.1080/mmy.39.1.111.121. PMID: 11800265.
- Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982 Mar;20(1):7-14. doi: 10.1080/00362178285380031. PMID: 7038928.
- Rigobello MP, Folda A, Baldoin MC, Scutari G, Bindoli A. Effect of Auranofin on the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Role of thioredoxin reductase. *Free Radic Res*. 2005;39(7):687–95. doi: 10.1080/10715760500135391. PMID: 16036347.
- Roder C, Thomson MJ. Auranofin: repurposing an old drug for a golden new age. *Drugs R D*. 2015;15(1):13–20. doi: 10.1007/s40268-015-0083-y. PMID: 25698589

- Rodrigues ML, Nosanchuk JD. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(2):1–9. doi: 10.1371/journal.pntd.0007964. PMID: 32078635.
- Rothan H, Stone S, Natekar J, Kumari P, Arora K. The FDA-approved gold drug auranofin inhibits novel coronavirus (SARS- COV-2) replication and attenuates inflammation in human cells. *Virology*. 2020;547:7–11. doi: 10.1016/j.virol.2020.05.002. PMID: 32442105.
- Ruchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20:233–44. doi: 10.1080/00362178285380341. PMID: 6753190.
- Rudrapal M, Khairnar SJ, Jadhav AG . Drug Repurposing (DR): an emerging approach in drug discovery. In: Badria FA. ed. Drug repurposing - hypothesis, molecular aspects and therapeutic applications [Internet]. London: IntechOpen; 2020 [cited 2022 Jun 15]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/72744> doi: 10.5772/intechopen.93193
- Sampaio A da G, Gontijo AVL, Araujo HM, Koga-Ito CY. In vivo efficacy of ellagic acid against *Candida albicans* in a drosophila melanogaster infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(12):10–2. doi: 10.1128/AAC.01716-18. PMID: 30249692.
- Santos GC d. O, Vasconcelos CC, Lopes AJO, Cartágenes M do S d. S, Filho AKDB, do Nascimento FRF, et al. *Candida* infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Front Microbiol*. 2018;9(JUL):1–23. doi: 10.3389/fmicb.2018.01351. PMID: 30018595.
- Satala D, Karkowska-Kuleta J, Zelazna A, Rapala-Kozik M, Kozik A. Moonlighting proteins at the candidal cell surface. *Microorganisms*. 2020;8(7):1–25. doi: 10.3390/microorganisms8071046. PMID: 32674422.
- Serrano-Fujarte I, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M. Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microb Pathog*. 2016;90:22–33. doi: 10.1016/j.micpath.2015.10.001. PMID: 26550764.
- She P, Liu Y, Wang Y, Tan F, Luo Z, Wu Y. Antibiofilm efficacy of the gold compound auranofin on dual species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* sp. *J Appl Microbiol*. 2019;128(1):88–101. doi: 10.1111/jam.14443. PMID: 31509623.
- Siles SA, Srinivasan A, Pierce CG, Lopez-Ribot JL, Ramasubramanian AK. High-throughput screening of a collection of known pharmacologically active small compounds for identification of *Candida albicans* biofilm inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(8):3681–7. doi: 10.1128/AAC.00680-13. PMID: 23689719.
- Silva DM da, Souza TC de, Alencar CF de C, Souza I da S de, Bandeira MFCL, Fernandes OCC. Virulence factors of *Candida* species from the oral mucosa and prostheses of elderly people from a riverside community in the Amazon state, Brazil. *Rev Odontol Da UNESP*. 2019;48(:e20190094):1–9. doi: 10.1590/1807-2577.09419.
- Singh SP, Qureshi A, Hassan W. Mechanisms of action by antimicrobial agents: A review. *McGill J Med*. 2021;19(1). doi: 10.26443/mjm.v19i1.217.
- Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int*. 2013;2013. doi: 10.1155/2013/204237. PMID: 23878798.
- Stylianou M, Kuleskiy E, Lopes JP, Granlund M, Wennerberg K, Urban CF. Antifungal

application of nonantifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):1055–62. doi: 10.1128/AAC.01087-13. PMID: 24277040.

Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol.* 2013;8(10):1325–37. doi: 10.2217/fmb.13.101. PMID: 24059922.

Terças AL, Marques SG, Moffa EB, Alves MB, de Azevedo CM, Siqueira WL, et al. Antifungal Drug Susceptibility of *Candida* Species Isolated from HIV-Positive Patients Recruited at a Public Hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. *Front Microbiol.* 2017 Mar 2;8:298. doi: 10.3389/fmicb.2017.00298. PMID: 28303122; PMCID: PMC5332371.

Thangamani S, Maland M, Mohammad H, Pascuzzi PE, Avramova L, Koehler CM, et al. Repurposing approach identifies auranofin with broad spectrum antifungal activity that targets *mia40-erv1* pathway. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Jan 18;7:4. doi: 10.3389/fcimb.2017.00004. PMID: 28149831; PMCID: PMC5241286.

Thangamani S, Mohammad H, Abushahba M, Sobreira T, Seleem Mn com zebrafish/Artigos/Thangamani2017-mecanismos de ação. pd. Repurposing auranofin for the treatment of cutaneous staphylococcal infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47(3):195–201. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.12.016. PMID: 2814983.

Tverdek FP, Kofteridis D, Kontoyiannis DP. Antifungal agents and liver toxicity: a complex interaction. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016;14(8):765–76. doi: 10.1080/14787210.2016.1199272. PMID: 27275514.

Verma-Gaur J, Traven A. Post-transcriptional gene regulation in the biology and virulence of *Candida albicans*. *Cell Microbiol.* 2016;18(6):800–6. doi: 10.1111/cmi.12593. PMID: 26999710.

Walz DT, DiMartino MJ, Griswold DE, Intoccia AP, Flanagan TL. Biologic actions and pharmacokinetic studies of auranofin. *Am J Med.* 1983 Dec 30;75(6A):90-108. doi: 10.1016/0002-9343(83)90481-3. PMID: 6318557.

Wiederhold NP, Lewis RE. The echinocandin antifungals: An overview of the pharmacology, spectrum and clinical efficacy. *Expert Opin Investig Drugs.* 2003;12(8):1313–33. doi: 10.1517/13543784.12.8.1313. PMID: 12882619.

Wiederhold NP, Patterson TF, Srinivasan A, Chaturvedi AK, Fothergill AW, Wormley FL, et al. Repurposing auranofin as an antifungal: In vitro activity against a variety of medically important fungi. *Virulence.* 2017;8(2):138–42. doi: 10.1080/21505594.2016.1196301. PMID: 27268469.

Williams DW, Jordan RPC, Wei X-Q, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J Oral Microbiol.* 2013;5:1–8. doi: 10.3402/jom.v5i0.22434. PMID: 24155995.

Zhang H, Zhu A. Emerging invasive fungal infections: Clinical features and controversies in diagnosis and treatment processes. *Infect Drug Resist.* 2020;13:607–15. doi: 10.2147/IDR.S237815. PMID: 32110071.

Zhang MR, Zhao F, Wang S, Lv S, Mou Y, Yao CL, et al. Molecular mechanism of azoles resistant *Candida albicans* in a patient with chronic mucocutaneous candidiasis. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):1–6. doi: 10.1186/s12879-020-4856-8. PMID: 32046674.

Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu Z Bin. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med.* 2019;44(1):3–15. doi:

10.3892/ijmm.2019.4188. PMID: 31115493.

Zuzarte M, Vale-Silva L, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Vaz S, Canhoto J, et al. Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. Essential oil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(7):1359–66. doi: 10.1007/s10096-011-1450-4. PMID: 22020493.