

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO FARMACODINÂMICA/FARMACOCINÉTICA *IN VIVO* DO
EFEITO ANTIFÚNGICO DO CLIOQUINOL E SEUS DERIVADOS
SINTÉTICOS EM MODELO DE CANDIDÍASE SISTÊMICA**

KELI JAQUELINE STAUDT

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO FARMACODINÂMICA/FARMACOCINÉTICA *IN VIVO* DO
EFEITO ANTIFÚNGICO DO CLIOQUINOL E SEUS DERIVADOS
SINTÉTICOS EM MODELO DE CANDIDIASE SISTÊMICA**

KELI JAQUELINE STAUDT

Orientadora: Prof^a Dr^a Bibiana Verlindo de Araújo

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Staudt, Keli Jaqueline
AVALIAÇÃO FARMACODINÂMICA/FARMACOCINÉTICA IN VIVO
DO EFEITO ANTIFÚNGICO DO CLIOQUINOL E SEUS DERIVADOS
SINTÉTICOS EM MODELO DE CANDIDÍASE SISTÊMICA / Keli
Jaqueline Staudt. -- 2018.
65 f.
Orientadora: Bibiane Verlindo de Araújo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2018.

1. Candida albicans. 2. 8-hidroxiquinolina. 3.
Farmacodinâmica. 4. Farmacocinética. 5. Atividade
antimicrobiana. I. de Araújo, Bibiane Verlindo,
orient. II. Título.

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.

(Isaac Newton)

RESUMO

Introdução: Infecções fúngicas estão entre as maiores causas de morbi-mortalidade no mundo. Dentre as infecções mais prevalentes, destacam-se as candidemia e as criptococoses. O tratamento das infecções limita-se ao uso de cinco classes de antifúngicos, que apresentam problemas em relação à toxicidade, propriedades farmacocinéticas e efeitos colaterais indesejáveis entre outros fatores, o que mostra a necessidade do desenvolvimento de novos antifúngicos. Dessa forma, estudos *in vitro* avaliando a atividade antifúngica vêm sendo realizados com compostos que apresentam ação antimicrobiana, como é o caso da 8-hidroxiquinolina, buscando assim protótipos para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. **Objetivo:** Avaliar o efeito farmacodinâmico e farmacocinético do composto clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina) e dos derivados hidroxiquinolínicos (PH151 e PH153) em camundongos infectados com *C. albicans*. **Materiais e métodos:** Foi desenvolvido um modelo de candidíase disseminada em camundongos imucompetentes, para avaliar a atividade antifúngica do clioquinol, da 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil) sulfonamida (PH151) e da 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-metoxifenil) sulfonamida (PH153), em doses múltiplas de 100 mg/kg para o clioquinol e 10 mg/kg, para os compostos 8-hidroxiquinolina-5-sulfonamida, administradas por via oral e intravenosa, respectivamente. Duas horas após a infecção os animais eram tratados, e em tempos determinados eutanasiados, metade dos órgãos foram congelados para quantificação e a outra metade foi processada, diluída e plaqueada para a contagem das unidades formadoras de colônias. Após os estudos de farmacodinâmica, realizaram-se as quantificações dos tecidos, a fim de relacionar concentração e efeito gerado pelos compostos. Para isso, foi utilizada uma metodologia bioanalítica validada para o clioquinol e em processo de desenvolvimento para os demais compostos. Por fim, os resultados foram modelados com um modelo PK/PD. **Conclusão:** O modelo de infecção por *C. albicans* foi capaz de provocar candidíase disseminada. Através do estudo *in vivo* foi possível observar que são necessárias maiores concentrações para se obter efeito, quando comparado ao EC₅₀ obtido no estudo *in vitro*. Em relação à quantificação das concentrações teciduais, após 6 h o rim apresentou uma concentração de 18.19 µg/mL e o fígado de 4.57 µg/mL, e no cérebro as concentrações apresentaram-se abaixo do limite de quantificação. Com os resultados obtidos dos compostos PH151 e PH153, pode-se observar que os compostos apresentam uma melhor atividade,

principalmente o PH153, que apresentou uma redução a partir de 12 h e em 36 h uma redução mais pronunciada de 2 LOG no rim e 2.5 LOG no fígado quando comparados ao estudo *in vitro* realizado.

Palavras-chaves: *Candida albicans*, 8-hidroxiquinolina, farmacodinâmica, farmacocinética, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Introduction: Fungal infections are among the largest cause of morbidity and mortality in the world. Among the most prevalent infections are candidemia and cryptococcosis. The treatment of infections is limited to the use of five classes of antifungals, which present problems in relation to toxicity, pharmacokinetic properties and undesirable side effects among other factors, which shows the necessity of the development of new antifungals. Thus, *in vitro* studies evaluating antifungal activity have been performed with compounds that present antimicrobial action, such as 8-hydroxyquinoline, thus seeking prototypes for the development of new antifungal agents. **Aim:** To evaluate the pharmacodynamic and pharmacokinetic effect of clioquinol compound (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline) and hydroxyquinoline derivatives (PH151 and PH153) in *C. albicans*-infected mice. **Materials and methods:** A model of disseminated candidiasis was developed in immunocompetent mice to evaluate the antifungal activity of clioquinol, 8-hydroxyquinoline-5- (N-4-chlorophenyl) sulfonamide (PH151) and 8-hydroxyquinoline-5- (N-4- methoxyphenyl) sulfonamide (PH153) at multiple doses of 100 mg/kg for clioquinol and 10 mg/kg for 8-hydroxyquinoline-5-sulfonamide compounds, administered by oral or intravenous route. Two hours after infection the animals were treated and, at predetermined times euthanized, half of the organs were frozen for quantification and the other half was processed, diluted and plated for counting of colony forming units. After the pharmacodynamic studies, the tissue quantifications were performed in order to relate concentration and effect generated by the compounds. For this, a validated bioanalytical methodology was used for clioquinol and for the other compounds are still in development process. Finally, the results were modeled with a PK / PD model. **Conclusion:** The model of *C. albicans* infection was able to cause disseminated candidiasis. Through the *in vivo* study it was possible to observe that higher concentrations are necessary to obtain effect, when compared to the EC_{50} obtained in the *in vitro* study. Regarding the quantification of the tissue concentrations, after 6 h the kidney had a concentration of 18.19 $\mu\text{g/mL}$ and the liver had a concentration of 4.57 $\mu\text{g/mL}$, and in the brain the concentrations were below the limit of quantification. With the results obtained of the compounds PH151 and PH153, it can be observed that the compounds present a better activity, mainly the PH153, which showed a reduction from 12 h and at 36 h a more pronounced reduction of 2

LOG in the kidney and 2.5 LOG in the liver when compared to the *in vitro* study performed.

Keywords: *Candida albicans*, 8-hydroxyquinoline, pharmacodynamics, pharmacokinetics, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estrutura química da 8-hidroxiquinolina

Figura 2. Estrutura química do clioquinol

Figura 3. Estrutura química dos derivados da 8-hidroxiquinolina

Figura 4. Índices PK/PD utilizados para a otimização de doses

Figura 5. Marco conceitual sobre as infecções fúngicas e desenvolvimento de novos fármacos, usando a modelagem PK/PD para otimização de doses

ARTIGO

Figure 1. CFU count in mice tissues submitted to experimental infection with 10^6 CFU inoculum

Figure 2. Simulations of fungal growth (dashed line) and kill for CLQ (full line) against *C. albicans* ATCC 18804, in kidney (A), liver (B) and brain (C)

Figure 3. Plasma and tissue levels in (A) kidney and (B) liver of CLQ in mice treated with multiple doses of 100 mg/kg and simulation of the plasma concentration (C)

Figure 4. Representative chromatograms of blank kidney (A); blank kidney spiked with CLQ (B); mice kidney sample 6 h after p.o. administration of 100 mg/kg (C); blank liver (D); blank liver spiked with CLQ (E); mice liver sample 6 h after p.o. administration of 100 mg/kg

Figure 5. Fungal growth (dashed line) and kill for PH151 (full line) against *C. albicans* ATCC 18804, in kidney (A), liver (B) and brain (C)

Figure 6. Fungal growth (dashed line) and kill for PH153 (full line) against *C. albicans* ATCC 18804, in kidney (A), liver (B) and brain (C)

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Estratégia de busca utilizada para obter as informações

ARTIGO

Table 1. CFU/g tissue count in mice infected with 10^6 CFU inoculum of *C. albicans*

Table 2. Pharmacodynamic parameters determined to clioquinol and goodness of fit criteria

Table 3. Simulated plasma concentrations and tissue concentrations of clioquinol with multiple dose treatment of 100 mg/kg

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
ABCL	Anfotericina B Complexo Lipídico
ABCD	Anfotericina B em Dispersão Coloidal
L-Amb	Anfotericina forma Lipossomal
CLQ	Clioquinol
SMON	Neuropatia Meiolo-Óptica Subaguda
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
CIM	Concentração Inibitória Mínima
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
PH151	Ácido 8-hidroxiquinolinil-5-sulfônico
PH153	Ácido 7-iodo-8-hidroxiquinolinil-5-sulfônico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
EC ₅₀	<i>Half maximal effective concentration</i>
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CFM	Concentração Fungicida Mínima
PD	Farmacodinâmica
PK	Farmacocinética
PK/PD	Farmacocinética/Farmacodinâmica
C _{max}	Concentração máxima
ASC ₀₋₂₄	Área Sob a Curva de 24 horas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações	16
2.2. Infecções fúngicas por <i>Candida albicans</i>	16
2.3. Tratamento antifúngico e seus desafios	18
2.4. Desenvolvimento de novos antifúngicos	19
2.5. Derivados da 8-hidroxiquinolina	19
2.6. Modelos de avaliação de moléculas antifúngicas	23
2.6.1. Modelos <i>in vitro</i>	23
2.6.2. Modelos <i>in vivo</i>	24
2.7 Modelagem PK/PD	25
3. MARCO CONCEITUAL.....	29
4. JUSTIFICATIVA.....	30
5. OBJETIVOS.....	30
5.1. Objetivo primário.....	30
5.2. Objetivos secundários	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
7. ARTIGO.....	38
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	61
10. ANEXOS	62
10.1 Anexo 1 - CONSORT 2010.....	63
10.2 Anexo 2 - Carta de aprovação do CEUA.....	67

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas estão entre as maiores causadoras de doenças e mortes no mundo todo, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Dentre os patógenos frequentemente isolados nessas infecções estão as leveduras *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., e *Pneumocystis*.

O gênero *Candida* é composto de diversas espécies e *C. albicans* é a mais frequente no mundo e a maior causadora das infecções, embora outros gêneros como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* também estejam relacionadas a infecções fúngicas e casos de resistência aos antifúngicos sistêmicos disponíveis no mercado. A candidíase é uma infecção oportunista provocada pelas leveduras do gênero *Candida*, que envolve desde doenças superficiais até invasivas. Para tratar essas infecções fúngicas tem-se cinco classes principais de fármacos antifúngicos: azóis, poliênicos, alilaminas, análogos de pirimidina e equinocandinas.

Apesar da disponibilidade desses fármacos, ainda existe uma alta mortalidade associada a essas infecções, associadas a problemas de diagnóstico incorreto dessas infecções, restrito número de antifúngicos, utilização incorreta dos mesmos, entre outros fatores, os quais levam a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos.

Ciente deste cenário, onde é necessário o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, alguns compostos, dentre esses a 8-hidroxiquinolina, que pertencente à classe das quinolinas, apresenta um anel heterocíclico de seis membros fundido a um anel benzênico, tem mostrado excelente potencial em ensaios *in vitro*. Este núcleo ocorre em uma série de compostos naturais e substâncias que exibem atividades biológicas tais como antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasitária.

Avaliações da atividade do ácido 8-hidroxi-5-quinolinilsulfônico e do ácido 7-iodo-8-hidroxi-5-quinolinilsulfônico contra isolados patogênicos e multirresistentes de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichosporon mentagrophytes* e *T. rubrum*, apresentaram atividade relevante para estas cepas com concentrações inibitórias mínimas abaixo de 50 µg/mL, sendo muito mais ativas nestas cepas do que nas avaliadas anteriormente por Gershon e colaboradores, constituindo promissores protótipos para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

Dessa forma, dando continuidade a esse processo de investigação do potencial antifúngico desses compostos, neste trabalho, foi investigado *in vivo* o efeito antifúngico do clioquinol e de duas novas entidades químicas (PH151 e PH153), através de modelos de infecção experimental em animais. O modelo *in vivo* empregado nas investigações farmacodinâmicas de antifúngicos escolhido foi o modelo de candidíase sistêmica em camundongos. Os camundongos são os animais de experimentação mais utilizados por serem mais susceptíveis à infecção e apresentarem baixo custo, fácil manuseio, além da necessidade de doses menores para os ensaios, o que viabiliza a avaliação na fase pré-clínica. Para avaliar os resultados desses ensaios, uma estratégia que permite uma comparação mais adequada, é através de modelagem farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD) na qual modelos farmacodinâmicos que descrevem a relação entre a concentração e o efeito dos fármacos são empregados e o termo concentração (C) é associado a equações de farmacocinética, permitindo a determinação de parâmetros como efeito máximo (k_{max}) e concentração necessária para produzir 50% do k_{max} (EC_{50}). Os modelos farmacodinâmicos mais utilizados para descrever a relação concentração *versus* efeito do fármaco são os modelos de E_{max} e E_{max} -Sigmoidal. Nesse trabalho essa estratégia foi utilizada para permitir uma comparação do efeito antifúngico dos compostos testados, com os resultados previamente obtidos dos ensaios *in vitro*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada na infecção fúngica *in vivo* utilizando um modelo de candidíase disseminada em camundongos causada por *Candida albicans*, e seu tratamento utilizando novos candidatos agentes antifúngicos, através de estudo de farmacodinâmica e farmacocinética.

A estratégia de busca envolveu a base de dados PubMed, bem como livros, dissertações, teses e artigos contidos em suas referências no período de 1973 a 2018.

Os artigos foram selecionados primeiramente pelo título, em seguida pelo resumo e texto completo. Os artigos que não condiziam ao tema buscado foram descartados.

Tabela 1. Estratégia de busca utilizada para obter as informações.

Descritores	Total de artigos encontrados	Artigos utilizados
<i>fungus infections</i>	133.353	
<i>Candida albicans</i>	38.054	
<i>antifungal treatment</i>	108918	
<i>development of new drugs</i>	54569	50
<i>8-hidroxyquinoline</i>	8415	
<i>models of infection in vitro</i>	12853	
<i>models of infection in vivo</i>	11974	
<i>PK/PD modeling</i>	538	

2.2. Infecções fúngicas por *Candida albicans*

A frequência de infecções fúngicas vem aumentando nas últimas décadas e a maioria delas são superficiais e de fácil tratamento. Porém, nos últimos anos essas infecções tem modificado seu perfil de desfecho, sendo associadas a doenças invasivas que apresentam-se como causas de morbidades e mortalidades, causadas por

diagnósticos inadequados e pela falha dos antifúngicos disponíveis no mercado (MCCARTY, PAPPAS, 2015; ARMSTRONG-JAMES, et al., 2017).

Cirurgias invasivas, transplantes de órgãos, quimioterapias, uso de antibióticos de amplo espectro, pacientes com HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) entre outros fatores, contribuem para o surgimento de infecções fúngicas oportunistas. E dentre os patógenos frequentemente isolados nessas infecções estão às leveduras *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., e *Pneumocystis* (ROEMER, KRYSAN, 2014; ARMSTRONG-JAMES, et al., 2017; THAMMAHONG, et al., 2017; LI et al., 2018).

A candidíase é uma infecção oportunista causada pelas leveduras do gênero *Candida*. Ela envolve doenças superficiais como candidíase oral, candidíase vaginal, intertriginosa, paroníquia e onicomicose, até doenças invasivas como a candidemia que ocasiona uma invasão da corrente sanguínea e posterior disseminação para os órgãos, incluindo pulmão, fígado e rins (CARDOSO, 2013; GEHRING et al., 2015; LI et al., 2018).

As espécies de *Candida* são microrganismos comensais, das quais muitas habitam naturalmente o corpo humano. Fatores como imunossupressão levam a expressão da virulência dessas espécies, causando as infecções. As espécies de *Candida* mais importantes do ponto de vista clínico e epidemiológico são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (VIEIRA, NASCIMENTO, 2017; SILVA et al., 2018).

A *C. albicans* é a espécie mais frequente no mundo, sendo responsável por mais de 50% dos casos de infecções fúngicas (YAPAR, 2014). A *C. albicans* é um fungo diploide e polimórfico, seus isolados apresentam acentuada produção de fatores de virulência, que contribuem para a instalação da infecção, sendo a alteração da forma leveduriforme para a forma de hifa um desses fatores, além de ser um fator importante para a formação de biofilme. As hifas apresentam características essenciais para a interação com o hospedeiro tais como: adesão epitelial e endotelial e dificultar a fagocitose extra e intracelular pelo sistema imunológico (IRFAN et al., 2017; ALLERT et al., 2018; LI et al., 2018)

Geralmente não apresenta resistência aos antifúngicos, porém alguns isolados podem apresentar resistência ou sensibilidade diminuída principalmente frente aos azólicos (TELLAPRAGADA et al., 2014; MCCARTY, PAPPAS, 2015).

2.3. Tratamento antifúngico e seus desafios

O tratamento das infecções fúngicas invasivas apresenta dificuldades na prática clínica, tanto em relação ao restrito número de agentes antifúngicos disponíveis e quanto às dificuldades de diagnóstico correto, o que pode propiciar a utilização incorreta dos fármacos, não apresentando sucesso terapêutico e levando cada vez mais a causas de resistência o que diminui ainda mais a opção de antifúngicos para o tratamento (NETT, ANDES, 2016; VIEIRA, NASCIMENTO, 2017).

Um grande avanço da micologia médica e que serviu como base para a terapia antifúngica foi o lançamento da anfotericina B, nos anos 50. Seu uso se limita a infecções sistêmicas, e ainda hoje é considerado o antifúngico de referência para o tratamento da maioria das infecções (ASHLEY et al., 2006; COLOMBO et al., 2013).

Pelo fato da anfotericina B, mesmo sendo muito eficaz no tratamento, apresentar toxicidade sistêmica e local seu uso se tornou restrito. Formas como anfotericina B complexo lipídico (ABCL), anfotericina B em dispersão coloidal (ABCD) e ainda a forma lipossomal (L-Amb) foram desenvolvidas (CASTRO et al., 2006; FLEVARI, et al., 2013, NET, ANDES, 2016).

Atualmente tem-se disponíveis para tratar infecções fúngicas cinco classes principais: azóis, poliênicos, equinocandinas, alilaminas e análogos de pirimidina. O tratamento antifúngico deve ser escolhido de acordo com o local da infecção, estado imunológico do paciente e a doença subjacente. Também, deve-se levar em consideração o espectro de atividade do fármaco, pois agentes pertencentes à mesma classe podem exibir atividade distinta contra os patógenos (ANDES, 2013; FLEVARI, et al., 2013; PAPPAS, et al., 2016; VIEIRA, NASCIMENTO, 2017).

Além disso, relatos da literatura mostram que os antifúngicos apresentam problemas em relação à toxicidade, baixa tolerância a altas doses, espectro de atividade estreito, propriedades farmacocinéticas e efeitos colaterais indesejáveis (NETT, ANDES, 2016; COMPOY, ADRIO, 2016).

O crescente número de casos de infecções, eficácia limitada e relatos de resistência dos antifúngicos estimulam o estudo e uso de combinações entre antifúngicos e novos compostos no tratamento dessas infecções. Essa combinação tem por objetivo potencializar os efeitos antifúngicos, aumentar a taxa de sucesso no tratamento e reduzir sua duração, diminuir ou evitar os casos de resistência, como também ampliar o

espectro de ação dos mesmos (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2014; ROBBINS et al., 2015).

2.4. Desenvolvimento de novos antifúngicos

Quando comparamos o número de novos antimicrobianos com ação bacteriana, pode-se observar que o desenvolvimento de antifúngicos enfrenta desafios, pois os fungos apresentam semelhanças celulares ao hospedeiro, ambos são eucarióticos, e substâncias que serão tóxicas ao patógeno, não devem causar danos ao paciente. Dessa forma, o reduzido número de antifúngicos atualmente utilizados têm como alvo estruturas pertencentes apenas aos fungos (ROEMER, KRYSAN, 2014; COMPOY, ADRIO, 2016).

Juntamente ao número limitado de antifúngicos e os problemas que os mesmos apresentam, tem-se a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, adicionada à necessidade de proteger a eficácia dos antifúngicos já existentes.

Dessa forma, uma opção que torna-se viável é o estudo de novas rotas sintéticas alternativas de compostos com potencial ação antimicrobiana com objetivo de melhorar sua eficácia. Entre esses, a 8-hidroxiquinolina, que pertence à classe das quinolinas, que consiste de um anel heterocíclico de seis membros fundido a um anel benzênico, que permite várias modificações podendo levar a obtenção de novos candidatos a fármacos (figura 1), (SASHIDHARA et al., 2009; AL-BUSAFI, SULIMAN, AL-ALAWI, 2013).

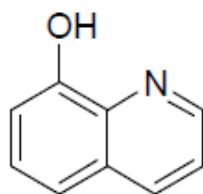


Figura 1. Estrutura química da 8-hidroxiquinolina.

2.5. Derivados da 8-hidroxiquinolina

O núcleo da 8-hidroxiquinolina está presente em uma série de compostos naturais e substâncias que exibem atividades biológicas tais como antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasitária (SASHIDHARA et al., 2009; AL-BUSAFI, SULIMAN, AL-

ALAWI, 2013). Também é utilizado como conservante nas indústrias têxtil, madeireira e papelaria e na agricultura como fungicida (OLIVERI, VECCHIO, 2016).

A estrutura da 8-hidroxiquinolina permite que sejam realizadas várias modificações em posições específicas da molécula, o que leva ao surgimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças (OLIVERI, VECCHIO, 2016).

O composto mais conhecido desse grupo é o clioquinol (CLQ) (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina) (figura 2), que foi comercializado como antimicrobiano oral entre os anos de 1950 a 1970 para o tratamento de várias doenças intestinais e infecções de pele (MAO, SCHIMMER, 2008, BAREGGI, CORNELLI, 2010).

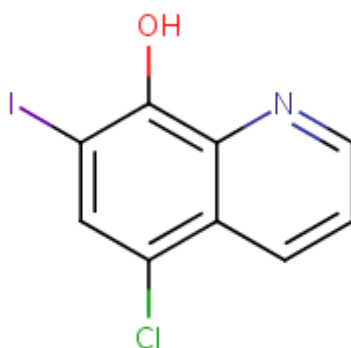


Figura 2. Estrutura química do clioquinol.

Entretanto em 1970, devido a relatos de neurotoxicidade em pacientes japoneses a formulação oral foi retirada do mercado, pelo fato de estar associada à neuropatia mielo-óptica subaguda (SMON). Essa síndrome causa alterações visuais e distúrbios sensoriais e motores dos membros inferiores. O esclarecimento dessa causa ainda não está comprovado, mas há estudos que relatam uma relação com a deficiência de vitamina B12 e a capacidade do CLQ em carrear metais para o sistema nervoso central que corroboram com esse fato (MAO, SCHIMMER, 2008; BAREGGI, CORNELLI, 2010; OLIVERI, VECCHIO, 2016).

Recentemente o CLQ vem sendo investigado para o tratamento de doenças como Alzheimer, Parkinson, Huntington e neoplasias, e atualmente é utilizado topicamente para infecções de pele (OLIVERI, VECCHIO, 2016).

Em relação à farmacocinética e metabolismo do CLQ em ratos, sua absorção é rápida e sofre metabolismo de primeira passagem, transformando-se nos conjugados

glucoronato e sulfato, que apresentam concentrações plasmáticas maiores que as do CLQ livre (CHEN et al., 1976; BAREGGI, CORNELLI, 2010). Em hamsters, as concentrações plasmáticas são muito baixas após a administração pela via oral, apresentando uma biodisponibilidade relativa de 12%, observada após administração de uma suspensão oral de CLQ em carboximetilcelulose (BONDILOTTI et al., 2007).

Os estudos de farmacocinética em humanos são escassos. Um estudo que administrou doses de 250 a 1500 mg de CLQ pela via oral em 6 indivíduos saudáveis, apresentou um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 11 a 14 horas e um pico de concentração em torno de 4 horas após a administração (JACK, RIESS, 1973). Nos humanos o CLQ apresenta uma menor metabolização na formação dos conjugados (CHEN et al., 1976).

Em relação à toxicidade do CLQ, além do que já foi relatado em humanos entre os anos de 50 a 70, um estudo com ratos que foram tratados com dose única de 100 mg/kg e doses múltiplas de 200 mg/kg e 400 mg/kg, foram observado sintomas neurológicos entre o 3º e 12º dia nas doses de 200 e 400 mg/kg (MAO, SCHIMMER, 2008).

Dessa forma, pode-se dizer que o CLQ apresenta-se como um candidato ao tratamento de infecções fúngicas, porém é necessário mais estudos sobre seu mecanismo de ação, sua farmacocinética e toxicologia, a fim de investigar seu real potencial como antifúngico seguro e eficaz.

Pippi e colaboradores (2017) avaliaram a atividade do CLQ, ácido 8-hidroxi-5-quinolinilsulfônico (composto 1) e do ácido 7-iodo-8-hidroxi-5-quinolinilsulfônico (composto 2) contra 73 cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichosporon mentagrophytes* e *Trichosporon rubrum*. Os 3 compostos inibiram o crescimento da *Candida* spp., *Microsporium* spp. e *Trichophyton* spp. com valores de CIM que variaram de 0,031 – 2 µg/mL para o CLQ, de 1 – 512 µg/mL para o ácido 8-hidroxi-5-quinolinilsulfônico e de 2 – 1024 µg/mL para o 7-iodo-8-hidroxi-5-quinolinilsulfônico (FUENTEFRÍA et al., 2017).

Em relação aos ensaios de *time-kill curves* realizados, todos os compostos apresentaram-se fungicidas frente a *C. albicans*. O CLQ produziu uma redução de UFC/mL maior que 50% do inóculo inicial de *C. albicans* em 12 horas de ensaio em uma concentração de 8 x CIM. Em relação ao composto 1 foi observado uma redução de 33 a 43% nas UFC/mL dependendo da concentração do composto. E com o composto 2 foi observado um efeito paradoxal já que a *C. albicans* apresentou maior

crescimento nas concentrações maiores, quando comparado a CIM e as concentrações menores que foram capazes de reduzir em mais de 50% o número de UFC/mL. Esse efeito paradoxal, de acordo com os autores, pode estar relacionado a uma adaptação metabólica dos microrganismos ou a uma ativação de mecanismos de resistência, no entanto para confirmação desse efeito seria necessário testar mais isolados (FUENTEFRÍA et al., 2017).

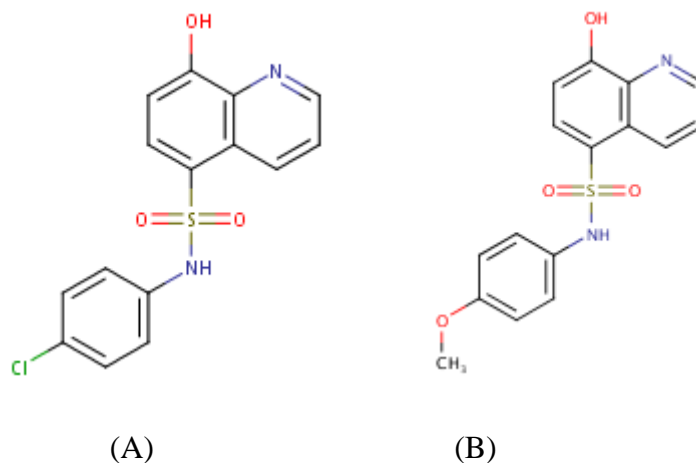


Figura 3. Estrutura química dos derivados da 8-hidroxiquinolina.
(A) 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil) sulfonamida (PH151);
(B) 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-metoxifenil) sulfonamida (PH153)

A conversão do ácido sulfônico em sulfonamida resultou em um aumento de efeito antifúngico, resultando em outros dois compostos, que apresentam um grande interesse como uma perspectiva de desenvolvimento de um medicamento tópico são os compostos 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-clorofenil) sulfonamida (PH151) e 8-hidroxiquinolina-5-(N-4-metoxifenil) sulfonamida (PH153), que em estudos toxicológicos *in vivo* em embriões de galinha não apresentaram toxicidade tóxica (JOAQUIM, et al., 2018).

Em relação aos estudos de *Time-Kill curves* realizados com os compostos, esses apresentaram atividade fungistática frente a *C. albicans* (ATCC 18804), com um valor de concentração inibitória mínima (CIM) de 2 µg/mL para o PH151 e um CIM de 8 µg/mL para o PH153. O composto PH153 atingiu um efeito máximo em 7 horas, mesmo seu EC₅₀ (7,28 µg/mL) sendo maior em relação ao composto PH151 (EC₅₀=

1.32 µg/mL), que apresentou um efeito máximo após 34 horas. A combinação entre os resultados obtidos de EC₅₀ e a CIM, juntamente com a ausência de irritação e toxicidade tóxica, corroboram no potencial antifúngico desses compostos (JOAQUIM, et al., 2018).

Dessa forma, esses compostos apresentam-se promissores para área micológica, apresentando bons resultados em experimentos *in vitro*, torna-se importante conhecer agora o comportamento desses compostos em modelo de infecção *in vivo*.

2.6. Modelos de avaliação de moléculas antifúngicas

O uso de modelos de infecção experimentais *in vitro* e *in vivo*, como também estudos de toxicidade são importantes no desenvolvimento de fármacos. Com esses modelos pode-se avaliar patologias e o comportamento de fármacos, além de apresentarem-se como alternativa no estudo com humanos. Esses modelos são exemplos de processo de doenças que devem ser adequados ao que se deseja estudar (MEDEIROS 2010; SCORZONI et al., 2015).

2.6.1. Modelos *in vitro*

Os métodos de diluição em caldo são os mais utilizados para definir a atividade antifúngica, e fornecem dados sobre a CIM, que é a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível de um microrganismo. O M60 do CLSI, é um método de referência para testes de macro e microdiluição *in vitro* de agentes antifúngicos direcionado para fungos leveduriformes como *Candida sp.* e *Cryptococcus neoformans* (SCORZONI et al., 2015; CLSI, 2017).

Para analisar se o antifúngico só inibe o crescimento ou é capaz de erradicar o microrganismo é realizado outro método, o ensaio de concentração fungicida mínima (CFM), que considera a menor concentração do antifúngico na qual não se observa crescimento do fungo. Ele é realizado através do plaqueamento de alíquotas do antifúngico do ensaio de CIM (SCORZONI et al., 2015).

Outro modelo *in vitro* amplamente utilizado é o *time-kill curves*, que fundamenta-se na análise de curvas de morte do fungo em função do tempo. Esse modelo consiste de vários frascos, onde se adiciona o inóculo do microrganismo e diferentes concentrações

do fármaco, múltiplos da CIM. Após tempos determinados são realizadas coletas de alíquotas do meio de cultura, que são diluídas, plaqueadas e incubadas. Após a contagem de microrganismos, são plotadas curvas de tempo *versus* LOG UFC/mL (ARAÚJO, 2011; VINKS, DERENDORF, MOUTON, 2014).

Os resultados obtidos através dos estudos de *time-kill curves* fornecem informações importantes sobre a atividade fungicida e características farmacodinâmicas (relação entre doses e o efeito). Apesar de que se têm mais informações sobre a dinâmica de morte de bactérias, os dados para fungos são poucos. Isso se dá pela escassez de diretrizes que descrevem sobre a metodologia e interpretação dos testes de susceptibilidade antifúngica (KLEPSEK, et al., 2000; PFALLER, et al., 2014).

Ainda existem poucos estudos publicados sobre a curva de morte microbiana produzida por antifúngicos, pois ainda se adapta os métodos utilizados para antibacterianos. Porém, cada vez mais os estudos com antifúngicos se mostram importantes pelo notável surgimento de resistência que os mesmos estão apresentando, e também pelo aparecimento de infecções fúngicas recorrentes o que está estimulando o uso de testes de susceptibilidade antifúngica permitindo uma escolha adequada do antifúngico para que um tratamento eficaz (SILVA, 2007).

2.6.2. Modelos *in vivo*

Diversos modelos de infecção experimental em animais são descritos na literatura e têm sua importância reconhecida pelo papel fundamental que exercem nos estudos de eficácia e avaliação de antimicrobianos.

Um modelo *in vivo* empregado nas investigações farmacodinâmicas de antifúngicos é o modelo de candidíase sistêmica em camundongos. Ela é causada pela injeção intravenosa de *C. albicans* em camundongos, traz elementos semelhantes à infecção humana. Após injeção na corrente sanguínea, o fungo se dissemina para múltiplos órgãos, sendo o rim o principal local que apresenta maior intensidade da infecção, em relação aos outros órgãos (SPELLBERG, et al., 2005; LIONAKIS, et al., 2011; XU, SHINOHARA, 2017). Os tecidos de interesse que podem ser coletados são: rins, cérebro, baço, fígado, pulmões, coração e sangue periférico para determinação da carga fúngica (CONTI, et al., 2015 ; LEPAK, et al., 2017).

As hifas de *Candida* são mais encontradas no rim do que nos outros tecidos. Essas hifas são avirulentas, por isso não ativam resposta inflamatória pronunciada, e também são mais resistentes aos fagócitos do que as leveduras, dessa forma, esses fatores morfológicos contribuem ao maior crescimento da *Candida* nos rins (SPELLBERG, et al., 2005; LIONAKIS, et al., 2011).

Lionakis et al (2011) observaram que após 1 hora da administração intravenosa do inóculo ($2,5$ a 5×10^5 de *C. albicans* SC5314) nos camundongos, tem-se uma rápida eliminação do fungo da corrente sanguínea, causando uma distribuição para todos os órgãos. Após 7 dias de infecção não é possível isolar o fungo na corrente sanguínea, mas se observa a morte dos animais pela acentuada colonização da levedura no rim (LIONAKIS, et al., 2011).

Os camundongos são os animais mais utilizados nesse modelo por serem mais susceptíveis à infecção e apresentarem baixo custo e fácil manuseio. A escolha da espécie depende do objetivo do estudo. (MEDEIROS, 2010). A via de administração do inóculo mais favorável para esses ensaios é a intravenosa, realizando-se a administração pela veia lateral ou dorsal da cauda que possibilita respostas sobre a disseminação do microrganismo para vários órgãos, já a via de administração do inóculo depende do tipo de resposta que se busca, se sistêmica ou local (CONTI, et al., 2015).

Os modelos de infecção em animais, utilizados nos estudos de antimicrobianos, para estudar a farmacodinâmica do mesmo, permitem que se estabeleça uma relação entre os estudos *in vitro* e um provável resultado clínico, sendo uma etapa intermediária entre esses dois processos. Apesar de que a avaliação final da eficácia clínica de um fármaco deve basear-se nas experiências clínicas, os modelos animais podem servir de base para prever determinadas respostas farmacológicas (SLOAN, PARIS, 2014).

2.7 Modelagem PK/PD

Com o crescente número de casos de infecções, eficácia limitada e relatos de resistência aos antifúngicos é necessária a otimização dos regimes de dosagens, que exigem o conhecimento dos mecanismos envolvidos no efeito dos antimicrobianos - a farmacodinâmica (PD) e o conhecimento sobre as concentrações que são atingidas no organismo do paciente - a farmacocinética (PK). Essa relação

farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) relaciona essas informações, definindo um regime de doses necessário para o sucesso terapêutico, como também minimiza os efeitos colaterais e o surgimento de resistência (KRISTOFFERSSON, et al., 2016; RATHI, LEE, MEIBOHM, 2016).

Os três principais índices PK/PD em que os antimicrobianos são relacionados são: tempo em que a concentração livre do fármaco permanece acima da CIM ($T > CIM$), razão entre a concentração máxima (C_{max}) e a CIM (C_{max}/CIM) e a razão entre a área sob a curva de 24 horas (ASC_{0-24}) e a CIM (ASC_{0-24}/CIM) (figura 3) (KRISTOFFERSSON, et al., 2016; LI, et al., 2016 ; RATHI, LEE, MEIBOHM, 2016).

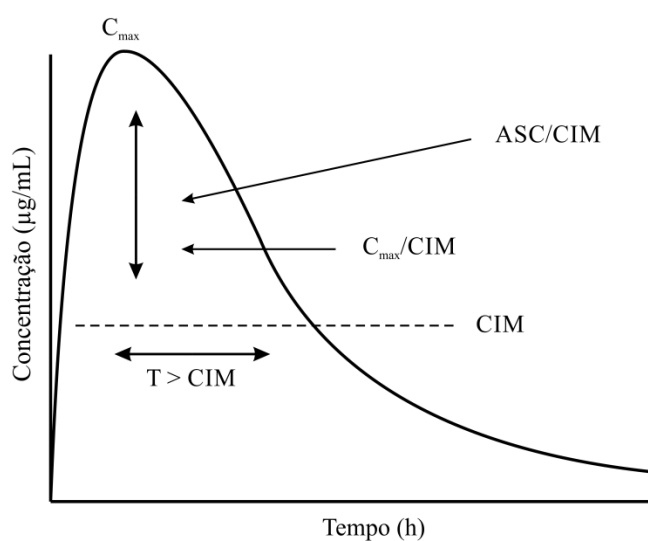


Figura 4. Índices PK/PD utilizados para a otimização de doses.

Uma evolução dos índices PK/PD que tem sido empregada nos últimos anos, é a utilização de modelagem PK/PD, que permite uma análise mais realística da influência da farmacocinética e da farmacodinâmica nos desfechos de resposta no tempo, à medida que deixam de utilizar um parâmetro pontual associado ao efeito, que é a CIM, e utilizem parâmetros mais descritivos como a concentração necessária para se obter 50% do efeito (EC_{50}) e o efeito máximo de morte microbiana produzida ($k_{máx}$).

Modelos PK/PD podem relacionar também a exposição (PK) e o efeito (PD) de um fármaco através de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Quando o estudo de PD está bem definido, ele pode ser combinado com o PK para auxiliar na previsão de um resultado clínico. Um exemplo seria através das *Time-Kill curves in vivo*, que apresentam a farmacodinâmica de antimicrobiano sem ser necessário realizar estudos *in vivo* em

humanos, servindo de subsídio para definição da primeira dose em humanos ou possíveis ajustes de dose em condições de doenças (SCHMIDT et al., 2008; HOPE; DRUSANO, 2009).

Os modelos farmacodinâmicos descrevem a relação entre a dose e o efeito de um fármaco ou, no caso desse projeto, de uma nova entidade química, candidata a fármaco. Quando aplicados para antimicrobianos, têm como vantagem o fato de que a célula alvo é a própria bactéria ou fungo. Com isso, podemos monitorar a atividade do fármaco de forma mais detalhada, apenas estudando o seu efeito no crescimento e/ ou morte (HOPE; DRUSANO, 2009; KHAN, FRIBERG, NIELSEN, 2016).

Os modelos farmacodinâmicos mais utilizados para descrever a relação concentração *versus* efeito do fármaco são os modelos E_{max} e E_{max} -Sigmoidal. O modelo E_{max} descreve o efeito do fármaco em relação à variação da concentração através de uma relação hiperbólica. O modelo de E_{max} -Sigmoidal, que é uma variação do anterior, e é utilizado quando a curva concentração-efeito não pode ser descrita de forma hiperbólica simples, sendo necessária a adição do fator Hill, denominado fator sigmoidal. Os modelos são descritos pelas seguintes equações (TREYAPRASERT, et al., 2007; VINKS, DERENDORF, MOUTON, 2014):

$$E = \frac{E_{max} \cdot C}{EC_{50} + C}$$

Eq. 1

$$E = \frac{E_{max} \cdot C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma}$$

Eq. 2

no qual E representa o efeito do fármaco; E_{max} é o efeito máximo observado em um determinado tratamento com o fármaco; C é a concentração do fármaco; EC_{50} é a concentração necessária para produzir 50% do efeito máximo; γ representa o fator sigmoidal que define o formato da curvatura da curva efeito-concentração, também denominado de fator de Hill (TREYAPRASERT, et al., 2007; VINKS, DERENDORF, MOUTON, 2014).

O modelo de E_{\max} foi modificado por Nolting e colaboradores em 1996, com o objetivo de avaliar o efeito bactericida da piperacilina sobre *Escherichia coli in vitro*, realizando simulações do perfil de concentração tecidual livre esperado para tecidos humanos após administração *i.v. bolus* de piperacilina (NOLTING, et al., 1996).

Na ausência do fármaco, o efeito farmacodinâmico expresso pela variação do número de colônias em função do tempo (dN/dt), é função direta de k (constante de geração microbiana) e do número de unidades formadoras de colônias no tempo zero (N) ou inóculo:

$$\frac{dN}{dt} = k \cdot N \quad \text{Eq. 3}$$

No entanto, quando um antimicrobiano é inserido no sistema, sua concentração passa a influenciar negativamente na constante de geração microbiana, e a equação de E_{\max} modificado passa a ser (NOLTING, et al.,1996; TREYAPRASERT, et al., 2007; VINKS, DERENDORF, MOUTON, 2014).

$$\frac{dN}{dt} = \left(k - \frac{k_{\max} \cdot C}{EC_{50} + C} \right) \cdot N \quad \text{Eq. 4}$$

no qual dN/dt é a variação do número de microrganismos em função do tempo; k é a constante de geração microbiana na ausência do antimicrobiano; k_{\max} é a constante de morte microbiana máxima na presença do antimicrobiano; C é a concentração livre do fármaco no tecido infectado; EC_{50} é a concentração que produz 50% do efeito máximo e N é o número de microrganismos no inóculo inicial (NOLTING, et al.,1996; (TREYAPRASERT, et al., 2007; VINKS, DERENDORF, MOUTON, 2014).

Juntamente com a determinação da CIM este modelo estabeleceu três novos parâmetros para avaliar o efeito antimicrobiano sobre os microrganismos: k , k_{\max} e EC_{50} . Tendo assim a vantagem de prever o efeito do fármaco para diferentes concentrações no local da infecção, e que pode ser utilizado para comparar diferentes doses e regimes de administração de modo mais dinâmico e efetivo (NOLTING, et al.,1996).

3. MARCO CONCEITUAL

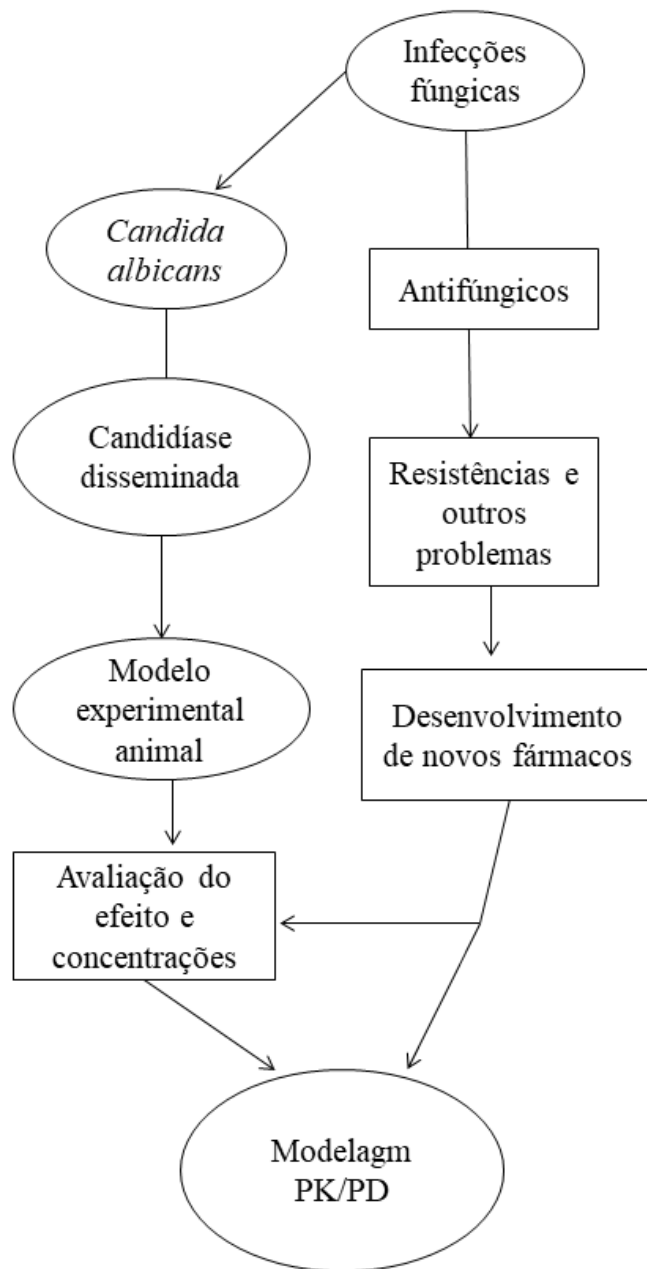


Figura 5. Marco conceitual sobre as infecções fúngicas e desenvolvimento de novos fármacos, usando a modelagem PK/PD.

4. JUSTIFICATIVA

As infecções fúngicas estão entre as maiores causadoras de doenças e mortes no mundo, e apesar da disponibilidade de fármacos, ainda existe uma alta mortalidade associada a essas infecções, sendo essas associadas a problemas de diagnóstico incorreto, a um restrito número de antifúngicos, e utilização incorreta dos mesmos, o que leva aos casos de resistência e inutilização dos antifúngicos.

Dessa forma, esse trabalho justifica-se pela importância de se conhecer o comportamento farmacodinâmico *in vivo* de três compostos que vem se apresentando como promissores candidatos a antifúngico em testes *in vitro* já realizados.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo primário

Avaliar o efeito farmacodinâmico e farmacocinético do composto clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina) e o efeito dos derivados hidroxiquinolínicos (PH151 e PH153) em camundongos infectados com *C. albicans*.

5.2. Objetivos secundários

- Adaptar modelo de infecção experimental por *C. albicans* em camundongos imunocompetentes;
- Avaliar o efeito farmacodinâmico dos compostos clioquinol, PH153 e PH151 em camundongos infectados com *C. albicans* na dose de 100 mg/kg e 10 mg/kg administrada pela via oral e *iv bolus* na veia caudal, através da contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de homogeneizado de tecidos em função do tempo;
- Adaptar metodologia bioanalítica para doseamento dos compostos em plasma e tecido de camundongos;
- Investigar os níveis de concentração em plasma e tecido obtidos após administração dos compostos em camundongos;
- Modelar os perfis de concentração *versus* tempo obtido para os compostos obtidos após análise de amostras de plasma e tecido;

- Modelar o efeito farmacodinâmico dos dados obtidos nos experimentos *in vivo* verificando sua adequabilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BUSAFI, S. N.; SULIMAN, F. E. O.; AL-ALAWI, R. Research and Reviews : Journal of Chemistry 8-Hydroxyquinoline and its Derivatives: Synthesis and Applications . **RRJC**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2013.

ALLERT, S.; *et al.* *Candida albicans* - Induced Epithelial Damage Mediates. **American Society for Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 1–20, 2018.

ANDES, D. Review Optimizing antifungal choice and administration. **Current Medical Research and Opinion**, v. 28, n. 4, p. 13–18, 2013.

ARAÚJO, B. V. Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica do Antifúngico Voriconazol. Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre, 2008.

ARMSTRONG-JAMES, D., *et al.* Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. **Lancet Infect Dis**, 2017.

ASHLEY, E. S. D., *et al.* Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. **Pharmacology of Systemic Antifungal Infections**, v. 43, n. 4, p. s28–s39, 2006.

BAREGGI, S. R. CORNELLI, U. Clioquinol: Review of its Mechanisms of Action and Clinical Uses in Neurodegenerative Disorders. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, 18 41–46, 2010.

BONDILOTTI, G., *et al.* Pharmacokinetics and distribution of clioquinol in golden hamsters. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 387–393, 2007.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, 2016.

CARDOSO, T. S. Papel do ATP na infecção de Macrófagos por *Candida albicans*. **Dissertação de Mestrado**, in Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 2013.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J., *et al.* Combination antifungal therapy : A strategy for the management of invasive fungal infections Review Combination antifungal therapy: A strategy for the management of invasive fungal infections. **Rev Esp Quimioter**, v. 27, n. 3, p. 141–158, 2014.

CHEN, C.-T., *et al.* Serum Levels of 5-Chloro-7-iodo-8-quinolinol and its toxicity in various animals. **Chem Pharm Bull**, v. 24, n. 9, 1976.

Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M60. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2017.

COLOMBO, A.L., *et al.* *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol.* 51(1):38-44. 2013.

CONTI, H. R. *et al.* Animal Models for Candidiasis. **Current Protocol Immunology**, n. 4, p. 1–23, 2015.

CASTRO, T. L., *et al.* Mecanismos de resistência da *Candida* sp WWA antifúngicos. **Infarma**, v. 18, p. 30–35, 2006.

FLEVARI, A., *et al.* Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. **Clinical Interventions in Aging**, 8 1199–1208. 2013.

FUENTEFRIA, A. M., *et al.* Editor's Choice Antifungals discovery: an insight into new strategies to. **Letters in Applied Microbiology**, n. 10, 2017.

GEHRING, G. M., *et al.* Candidemia: Revisão Bibliográfica. p. 1–19, [s.d.]. 2015.

IRFAN, M., *et al.* Effect of quinoline based 1, 2, 3-triazole and its structural analogues on growth and virulence attributes of *Candida albicans*. **PLoS ONE**, p. 1–23, 2017.

JACK, D.; RIESS, B.W. Pharmacokinetics of iodochlorhydroxyquin in man. **J. Pharm. Sci.** 62, 1929–1932. 1973.

KHAN, D. D.; FRIBERG, L. E.; NIELSEN, E. I. A pharmacokinetic – pharmacodynamic (PKPD) model based on in vitro time – kill data predicts the in vivo PK / PD index of colistin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 3, p. 1881–1884, 2016.

KLEPSER, M. E.; MALONE, D.; LEWIS, R. E. et al. Evaluation of Voriconazole Pharmacodynamics Using Time-Kill Methodology. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, p. 1917-20, 2000.

KRISTOFFERSSON, A. N., *et al.* Simulation-Based Evaluation of PK / PD Indices for Meropenem Across Patient Groups and Experimental Designs. **Pharmaceutical Research**, v. 33, p. 1115–1125, 2016.

LEPAK, A. J., *et al.* Pharmacodynamics of the long acting echinocandin, CD101, in the Neutropenic Invasive Candidiasis Murine Model Using an Extended Interval Dosing Design. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 12, 2017.

LI, Y., *et al.* Correlation of PK / PD Indices with Resistance Selection for Cefquinome against *Staphylococcus aureus* in an In Vitro Model. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 1–10, 2016.

LI, Y., *et al.* Promising Antifungal Targets Against *Candida albicans* Based on Ion Homeostasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. September, p. 1–13, 2018.

LIONAKIS, M. S., *et al.* Organ-Specific Innate Immune Responses in a Mouse Model of Invasive Candidiasis. **Journal of Innate Immunity**, v. 20892, n. 3, p. 180–199, 2011.

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

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of NA**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.013>>.

MEDEIROS, M. Avaliação *in vitro* e *in vivo* de Efeitos Sinérgicos de Antibacterianos para o Tratamento de Infecções por *Acinetobacter baumannii* Multirresistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêmicas no Brasil Micheli Medeiros Micheli Medeiros Avaliação *in vit.* **Dissertação de Mestrado**, Programa de pós graduação em análises clínicas, 2010.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal agents: Spectrum of activity, Pharmacology and Clinical Indications. **Infectious Disease Clinics of NA**, p. 1–33, 2015.

NOLTING, A., *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antibiotic effect of piperacillin *in vitro*. **Pharm. Res.**, v. 13, n.1, p. 91-96, 1996.

OLIVERI, V.; VECCHIO, G. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 5, p. EJMECH 8594, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.007>>.

PAPPAS, P. G., *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis : 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. 1–50, 2016.

PFALLER, M. A., *et al.* Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 Systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp . **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 2, p. 198–204, 2014.

RATHI, C.; LEE, R. E.; MEIBOHM, B. Translational PK/PD of Anti-Infective Therapeutics. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 21-22, p. 41–49, 2016.

ROBBINS, N., *et al.* An Antifungal Combination Matrix Identifies a Rich Pool of Adjuvant Molecules that Enhance Drug Activity against Diverse Fungal Pathogens Resource. **Cell Reports**, v. 13, n. 7, p. 1481–1492, 2015.

JOAQUIM, A. R., *et al.* Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. **Chem Biol Drug Des**, n. August, p. 1–11, 2018.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. **Cold Spring Harb Perspect MEd**, n. 4, p. a019703, 2014.

SASHIDHARA, K. V., *et al.* European Journal of Medicinal Chemistry Antidyslipidemic and antioxidative activities of 8-hydroxyquinoline derived novel keto-enamine Schiff's bases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1813–1818, 2009.

SCHMIDT, S., *et al.* PK/PD: new insights for antibacterial and antiviral applications. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 549–556, out. 2008.

HOPE, W., *et al.* The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Micafungin in Experimental Hematogenous *Candida* Meningoencephalitis. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 1, p. 163–171, 1 jan. 2008.

SILVA, E. G. Avaliação da criptococose experimental sistêmica em camundongos BALB/c e terapêutica com anfotericina B, fluconazol e associação. Tese. USP. Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo. 2007.

SCORZONI, L., *et al.* Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 123, p. 68–78, 2015.

SILVA, D. R., *et al.* In silico approaches for screening molecular targets in *Candida albicans*: A proteomic insight into drug discovery and development Diego. **European Journal of Pharmacology**, n. 10, p. EJP72022, 2018.

SLOAN, D.J.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clin Epidemiol.* p.169–182. 2014.

SPELLBERG, B., *et al.* Mice with Disseminated Candidiasis Die of Progressive Sepsis. **Journal of Infectious Disease**, v. 15, n. 7, p. 192, 2005.

TELLAPRAGADA, C., *et al.* Antifungal Susceptibility Patterns, In Vitro Production of Virulence Factors, and Evaluation of Diagnostic Modalities for the Speciation of

Pathogenic *Candida* from Blood Stream Infections and Vulvovaginal Candidiasis. **Journal of Pathogens**, 2014.

THAMMAHONG, A.; PUTTIKAMONKUL, S.; PERFECT, J. R. Central Role of the Trehalose Biosynthesis Pathway in the Pathogenesis of Human Fungal Infections: Opportunities and Challenges for Therapeutic Development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 2, p. 1–31, 2017.

TREYAPRASERT, W., *et al.* Pharmacokinetic / pharmacodynamic modeling of in vitro activity of azithromycin against four different bacterial strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 263–270, 2007.

VIEIRA, F.; NASCIMENTO, T. Resistência a Fármacos Antifúngicos por *Candida* e Abordagem Terapêutica. **Rev Port Farmacoter**, v. 9, p. 161–168, 2017.

VINKS, A. A., *et al.* Fundamentals of antimicrobial pharmacokinetics and pharmacodynamics. DOI: 10.1007/978-0-387-75613-4_4, Medi.

7. ARTIGO

O artigo intitulado: “Evaluation of the antifungal activity of 8-hydroxyquinoline derivatives in a model of disseminated candidiasis in mice”, será submetido na *Chemical Biology & Drug Design*.

Evaluation of the antifungal activity of 8-hydroxyquinoline derivatives in a model of disseminated candidiasis in mice

Short running title: Antifungal activity of 8-hydroxyquinoline derivatives

Authors: Keli Jaqueline Staudt¹, Guilherme Saldanha Henkin², Izabel Almeida Alves³, Fernando Carreño³, Angélica Rocha Joaquim³, Saulo Fernandes de Andrade^{2,3}, Diogo dos Santos Miron^{2,3}, Alexandre Meneghello Fuentefria^{2,3}, Bibiana Verlindo de Araújo^{1,2,3}.

Affiliation: ¹Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ³Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of Clioquinol, 8-hydroxyquinoline-5- (N-4-chlorophenyl) sulfonamide (PH151) and 8-hydroxyquinoline-5- (N-4-methoxyphenyl) sulfonamide (PH153) in a model of disseminated candidiasis in mice. *In vivo* results have shown that higher concentrations than *in vitro* are necessary for some effect. Tissue concentrations were 18.19 and 4.57 µg/mL after 6 h in the kidney and liver respectively. The results of the PH151 and PH153 compounds showed a better activity, mainly PH153, which showed a reduction of 2 LOG in the kidney and 2.5 LOG in the liver, when compared to the control in 36 h.

Keywords: Clioquinol, 8-hydroxyquinoline-5- sulfonamide, candidiasis.

1. INTRODUCTION

Fungal infections are among the biggest cause of disease and death in the world, especially in immunocompromised patients. Candidiasis is an opportunistic infection caused by yeasts of the genus *Candida*. It involves superficial and invasive diseases such as candidemia that causes an invasion of the bloodstream and subsequent dissemination to the organs.^[1,2,3]

The increasing number of patients with fungal infections and the limitations in the drugs available to the treatment of these diseases makes it necessary to search for new antifungal agents.^[5,6,7] The study of new alternative synthetic routes of compounds with potential antimicrobial action is a possibility in the search of new therapies. Among them, 8-hydroxyquinoline, which allows several modifications in its structure may lead to the attainment of new drug candidates^[8,9]

Clioquinol (CLQ) (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline), is the best known compound of this group, was marketed as oral antimicrobial between the years 1950 to 1970 for the treatment of various intestinal diseases and skin infections. However, in 1970, due to reports of neurotoxicity in Japanese patients, the oral formulation was withdrawn from the market, because it was associated with subacute meiolo-optic neuropathy (SMON). Recently CLQ has been investigated for the treatment of diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's and neoplasms, and is currently used topically for skin infections.^[10, 11, 12]

Two other 8-hydroxyquinoline derivatives that are candidates for new drugs are 8-hydroxyquinoline-5- (N-4-chlorophenyl) sulfonamide (PH151) and 8-hydroxyquinoline-5- (N-4-methoxyphenyl) sulfonamide compounds (PH153), which in *in vivo* toxicological studies on chicken embryos showed no topical toxicity. In the *Time-Kill curves* studies showed fungistatic activity against *C. albicans* (ATCC 18804), with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2 µg/mL and EC₅₀ of 1.32 µg/mL for PH151 and an MIC of 8 µg/mL for PH153 and EC₅₀ = 7.28 µg/mL. The combination of EC₅₀ and MIC results, together with the absence of irritation and topical toxicity, corroborate the antifungal potential of these compounds.^[13]

One way of evaluating the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of novel drug candidates is through animal models. An *in vivo* model used for antifungal evaluation is the model of systemic candidiasis in mice. Caused by the intravenous

injection of *C. albicans* in mice, it brings elements similar to human infection. After injection into the bloodstream, the fungus spreads to multiple organs.^[14, 15, 16, 17, 18]

Thus, the objective of this study is to evaluate the pharmacodynamic and pharmacokinetic effect of clioquinol compound and hydroxyquinoline derivatives (PH151 and PH153) in *C. albicans* infected mice.

2. METHODS AND MATERIALS

2.1 Microorganisms

Strain of *C. albicans* (ATCC 18804) - originally isolated from human skin lesion of erosio interdigitalis, was employed in this study. Before use, the strain was plated on agar Sabouraud dextrose agar (SDA) 4 % for 24 - 48 h at 37 ± 1 °C.

2.2 Animals

All experiments were approved by the Ethics Committee of Animal Use of Federal University of Rio Grande do Sul (Protocol # 34774). Male CF-1 mice (6 - 8 weeks old) were purchased from CREAL (Center of Reproduction and Experimental Animals Laboratory). The mice were maintained under controlled temperature and humidity, with 12 h light-dark cycle. Water and standard food was allowed ad libitum until the experiments.

2.3 Inoculum Preparation

The protocol described by CLSI for antifungal susceptibility testing of yeasts was used to prepare the standardized inoculum.

2.4 Model of disseminated candidiasis

The mice model of disseminated candidiasis infection proposed by Conti et al., (2014) was used with some modifications.^[17] Infection was induced by injecting 100 µL of inoculum ($1-5 \times 10^6$ CFU/mL) intravenously into the lateral tail vein of the animal.

Initially, the course of infection was evaluated in two and four (n = 3 animals/group) days after inoculation. The growth of yeasts (kidneys, brain, liver, lungs, heart, fat and muscle) (Log₁₀ UFC/g) was evaluated.

2.5 Determination of CFU in the organs

To CFU counting in the tissues, first the animals were euthanized according to the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) recommendations by cervical dislocation and the tissues were removed, weighed, crushed and homogenized with 0.9% sterile saline. Aliquots of the homogenate were diluted 10 times sequentially for each organ. Dilutions were plated in SDA 4%, incubated at 37 ± 1 °C for 24 h before yeasts counting.

2.6 Pharmacodynamic evaluation

The mice were divided into three treatment groups: clioquinol (dose 100 mg/kg - oral administration), compounds PH151 and PH153 (dose 10 mg/kg - intravenous administration), with 10 treated mice and 12 control mice per group. Animals receiving clioquinol underwent fasting of food and water for 12 hours. Two hours after inoculation, following the protocol described by Lepak et al., (2017), the compound was administered to the animals and new doses were given after 12 and 24 hours.^[18] At the predetermined times (0, 3, 6, 12, 24 and 36 hours) the animals were euthanized, blood and organs (kidneys, liver and brain) were collected and processed as previously described for CFU counting.

2.7 Materials

Clioquinol was obtained from commercial suppliers (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Acetonitrile (LCgrade) was obtained from Tedia (Fairfield, USA), acid orthophosphoric from. LabSynth (Water was purified by a Mili-Q system (Milipore, MA, USA).

2.8 Chromatographic conditions

The Chromatographic analysis were performed in a Shimadzu (Kyoto, Japan) HPLC consisting of a pump (LC-20AT), a diode array detector (SPD-M10A), a system controller (CBM-20A), an autoinjector (SIL-20A), Phenomenex® (Torrance, CA, USA) Kinetex C18 column (100x4.6 mm, i.d. 2.6 μm , 100 Å) kept at room temperature. Class-VP 6.14 SP2 software controlled the HPLC system, data acquisition and processing. The flow rate was 0.9 mL/min, injection volume of 20 μL , detector set at 254 nm and mobile phases composed of A (aqueous phosphoric acid 1%, v/v) and B (acetonitrile) in gradient mode (0-5 min 20% B, 5-6 min 70% B, 6-13 min 70% B, 13-14 min 20% B, followed by a re-equilibration time of 6 min and a total run time of 20 min).

2.9 Preparation of standard solution, analytical curves and quality controls

The stock solution of clioquinol (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was prepared in acetonitrile and 1% solution of orthophosphoric acid in acetonitrile (60:40) and stored at $-80 \pm 1^\circ \text{C}$. Standard curves (0.8, 1, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were prepared by adding 90 μL of the supernatant of the centrifugation of the tissue homogenate and 10 μL of 10-fold work solution. Quality control (QC) was performed at low (QCL: 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), medium (QCM: 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and high (QCH: 7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) concentrations.

2.10 Clioquinol extraction from tissues samples

Clioquinol was extracted from tissue sample by precipitation of proteins using acetonitrile:acid ortophosphoric 1% as the extraction solvent. First, around 200 - 300 μL of solution acetonitrile:acid ortophosphoric 1% was added to tissue sample and crushed, then centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min at $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Then, 100 μL liquid supernatant was transferred to another eppendorf and added 200 μL of solution acetonitrile:acid ortophosphoric 1%, vortex-mixed for 30 s, shaken for 5 min in maximum speed and centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min at $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Then, 150 μL was transferred to glass inserts and injected.

2.11 PK analysis in plasma

For PK analysis in plasma, data from literature in mice after the administration of 100 mg/kg of clioquinol per oral, previously published by Chen et al., (1976)^[19] were employed. The non-compartmental analysis (NCA) was performed using equations described by Gibaldi e Perrier (1992) (eq. 1, 2, 3, 4) allowing the determination of the PK parameters $t_{1/2}$, $ASC_{0-\infty}$, CL and Vd. Following, the data were modeled by a two-compartmental model (eq. 5) and the parameters were used to simulate the plasma concentration levels achieved after multiple doses of 100 mg/kg q12h (Phoenix®).^[20] The concentration profile shows that the absorption of CLQ is almost instantaneous, even if it is administered orally, thus a k_a of 4 h^{-1} was estimated by simulation and used.

$$t_{1/2} = 0.693 * MRT = \frac{1}{\frac{k_{10}}{1 + k_{12}} + k_{21}}$$

Eq. 1

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + \frac{Ct}{\lambda}$$

Eq. 2

$$CL_{tot} = \frac{D}{AUC_{iv}}$$

Eq. 3

$$Vd_{ss} = MRT_{iv} * CL_{tot}$$

Eq. 4

$$Cp = A * e^{-\alpha * t} + B * e^{-\beta * t}$$

Eq. 5

Where $t_{1/2}$ is the half-life, λ is the elimination rate constant, MRT is the mean resident time, k_{10} is the microconstant for elimination of the central compartment, k_{12} is the microconstant for distributing the central compartment to the peripheral, k_{21} is the , $AUC_{0-\infty}$ is the area under the concentration-time curve, CL is the total clearance, Vd_{ss} is the volume of distribution at steady state, Cp is the plasmatic concentration, α and β are

hybrid constants for the distribution and elimination phases, respectively, and A and B are the corresponding time zero intercepts.

2.12 Mathematical Modeling PK/PD

The data obtained in the pharmacodynamic assay was used to apply mathematical modeling. Adapted E_{max} models described by Araújo (2011) and two-compartment model equation were used in the modeling of *C. albicans* (eq. 5, 6, 7).^[20]

$$\frac{dN}{dt} = k_0 * N$$

Eq. 6

$$\frac{dN}{dt} = \left[k_0 - \frac{k_{max} C}{EC_{50} + C} \right] N$$

Eq. 7

Where dN/dt is the variation of the number of fungal cells as a function of time; k_0 (h^{-1}) is the rate constant of fungal generation in the absence of antifungal agent; k_{max} (h^{-1}) is the maximum death rate constant (maximum effect); EC_{50} ($\mu g/mL$) is the concentration of antifungal agent needed to obtain 50% of maximal effect; C ($\mu g/mL$) is the concentration of antifungal agent at a given time (t); N (\log_{10} CFU/mL) is the number of viable fungal cells.

The mathematical modeling of the data was performed with the non-linear regression software Scientist® 3.0 (Micromath, Salt Lake, USA). The graphs were visually inspected for fit quality, model selection criterion (MSC), coefficient of determination (R^2) and correlation between measured and calculated points.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The animal model of disseminated candidiasis in immunocompetent mice induced by *C. albicans* inoculum $1-5 \times 10^6$ (CFU) was able to sustain the infection up to 4 days and to present fungal growth in all organs analyzed, as can be observed in figure 1 and table 1.

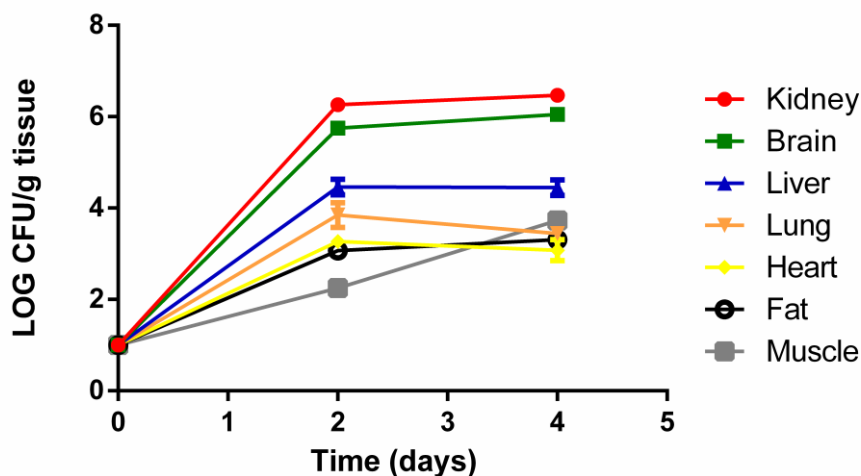


Figure 1. CFU count in mice tissues submitted to experimental infection with 10^6 CFU inoculum.

Regarding the number of colonies counts, the kidneys were the organs that presented the highest number of LOG CFU/g tissue, in the two infection periods analyzed (6.26 ± 0.06 , 6.46 ± 0.09 CFU/g tissue). Brieland et al., (2001) administered an inoculum of *C. albicans* (5×10^6 organisms/mouse) and obtained a count of 6.5 to 8.0 LOG CFU/tissue, with 1 to 3 days of infection, similar with our findings. [21]

It has also been observed in other studies that the hyphae of *C. albicans* present a greater affinity for the kidney, since the hyphae are avirulent and they do not activate a marked inflammatory response, and it is not easy to be phagocyte, which may explain the fact of a higher CFU count in this tissue. [14, 15, 16]

Two other tissues that showed a greater growth in relation to all that were evaluated were the brain and liver. Thus, we chose to continue the experiments evaluating the effect of the compounds on these three organs, which presented higher CFU count.

The results of the CFU count of the kidneys and liver were modeled by the equations (6, 7) already described, and generated the parameters that are listed in Table 2, the adjusted clioquinol curves in the three organs are shown in figure 2. It was only possible to perform the modeling with data from the kidney and liver, since the data from the brain showed that clioquinol did not present antifungal activity in this tissue, which made it impossible to model any effect.

Table 2. Pharmacodynamic parameters determined to clioquinol and goodness of fit criteria.

Parameters	<i>C. albicans</i> (ATCC 18804)	
	Kidney	Liver
MIC* ($\mu\text{g/mL}$)	0.25	0.25
K_0 (h^{-1})	0.02	0.006
K_{max} (h^{-1})	0.03	0.01
EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	7.46	11.98
MSC/R ²	2.26/0.99	0.34/0.99

*Previously determined by broth microdilution⁵.

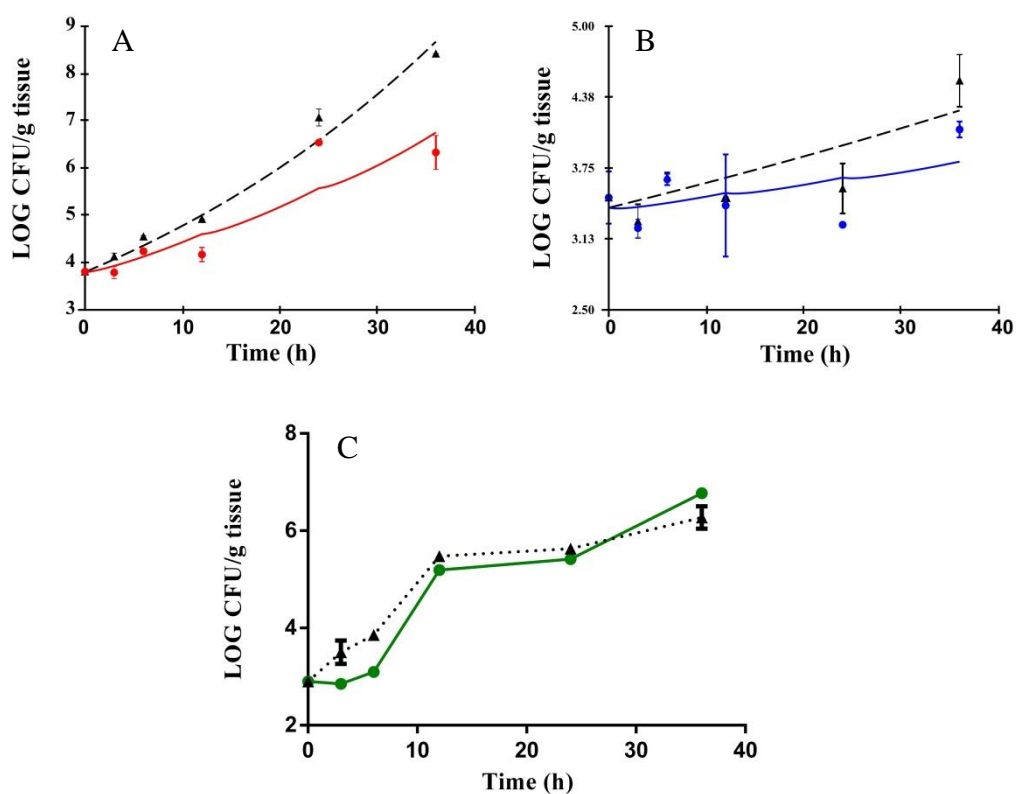


Figure 2. Simulations of fungal growth (dashed line) and kill for CLQ (full line) against *C. albicans* ATCC 18804, in kidney (A), liver (B) and brain (C).

Studies evaluating clioquinol as an antifungal are few so far, so in our study we compared the antifungal effect of clioquinol *in vitro* and *in vivo*. In the study by Pipi and co-workers (2018) a *Time-kill curves* test was performed using clioquinol and MIC multiples (MIC, 2xMIC, 4xMIC and 8xMIC). The modeling of these data shows the

following parameters: $EC_{50} = 0.31 \mu\text{g/mL}$, reaching a maximum effect after 13 hours, $K_0 = 0.15 \text{ h}^{-1}$ and a $k_{\text{max}} = 0.05 \text{ h}^{-1}$.^[22]

Comparing the EC_{50} obtained *in vitro* with that of the tissues, it can be observed that *in vitro* the clioquinol presented activity, having a reduction of 2.5 LOG compared to the control, in the concentration of $2 \mu\text{g/mL}$ (8xMIC). In tissues, it can be observed that after the third dose of 100 mg/kg there is a decrease of 2 LOG in the kidney and 1 LOG in the liver.^[22]

The EC_{50} in the kidney was 25 times higher than *in vitro* and 40 times higher in the liver. This shows that *in vivo* higher concentrations are needed to observe some effect, or shows that the compound no exhibits activity when tested *in vivo*, as observed in the brain.

A study that evaluated the antifungal activity of another 8-hydroxyquinoline derivative, bromoquinol, in a model of invasive pulmonary aspergillosis by *Aspergillus fumigatus* (Af293) in immunosuppressed mice, with doses of 3 mg/kg and 8 mg/kg for 3 days was ineffective when compared to treatment with amphotericin B, which reduced animal mortality.^[23] Although not the same microorganism and compound, these similarity between the bromoquinol results demonstrates the weak potential of these derivatives in present pronounced antifungal activity.

Bromoquinol was effective against *C. albicans* with an MIC between 0.30 and $0.60 \mu\text{g/mL}$, similar to the MIC of $0.25 \mu\text{g/mL}$ that Pippi et al. (2018) found.^[22] These results show that although these compounds have *in vitro* activity, when they are tested in *in vivo* models with mice this result does not reproduce.

Regarding the structure-activity, the MIC for the three compounds that underwent modifications was $0.3 \mu\text{g/mL}$. Modifications of Br in positions 5 and 6 in bromoquinol with Cl (in dichloro-8-hydroxyquinoline) or I and Cl (in CLQ) did not improve antifungal activity.^[24]

The results of clioquinol concentration reached in the tissues, and the levels of plasma concentrations extracted and simulated of mice can be observed in figure 3 and table 3.

The concentration reached in the kidney after 6 hours was 9.37 times greater than the simulated concentration in plasma, in the liver the concentration was 2.35 times higher and in the brain the concentrations were below the limit of quantification that was $0.8 \mu\text{g/mL}$.

Representation of the chromatograms with tissue samples are presented in figure 4

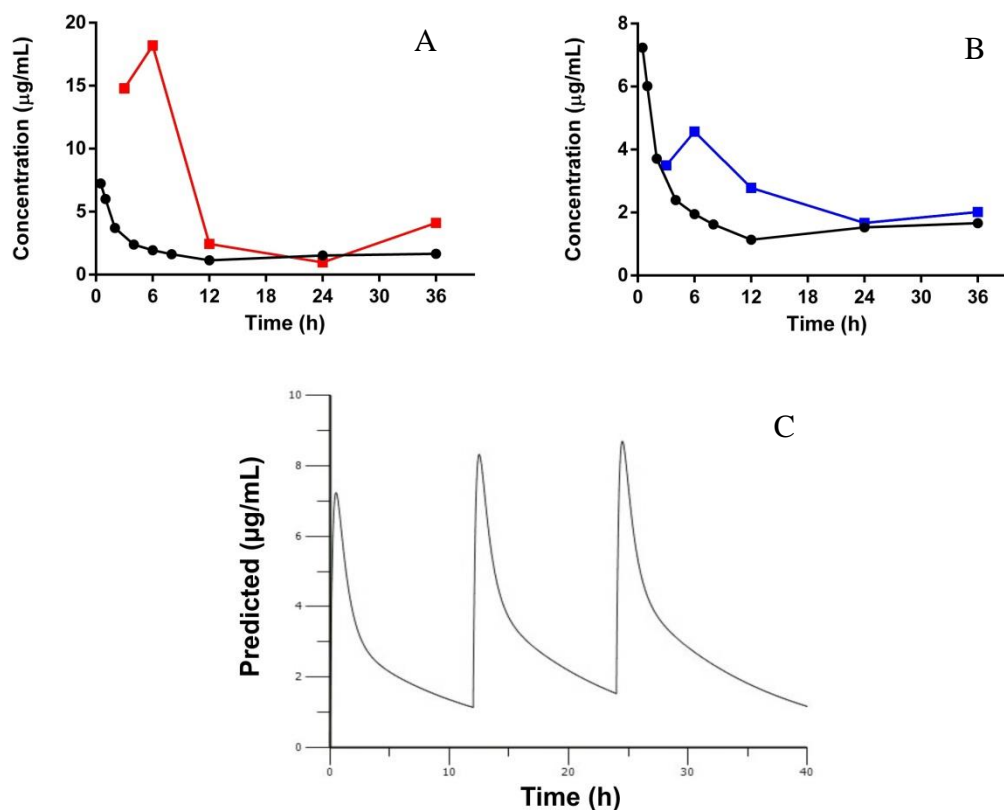


Figure 3. Plasma and tissue levels in (A) kidney and (B) liver of CLQ in mice treated with multiple doses of 100 mg/kg and simulation of the plasma concentration (C).

Table 3. Simulated plasma concentrations and tissue concentrations of clioquinol with multiple dose treatment of 100 mg/kg.

Time (h)	Plasma (µg/mL)	Kidney (µg/mL)	Liver (µg/mL)
0.5	7.23		
1.0	6.01		
2.0	3.71		
3.0	-	14.80	5.15
4.0	2.39		
6.0	1.94	18.19	4.57
8.0	1.62		
12.0	1.13	2.44	2.78
24.0	1.53	0.96	1.66
36.0	1.66	4.10	2.01

Table 1. CFU/g tissue count in mice infected with 10^6 CFU inoculum of *C. albicans*.

Time (days)	Kidney (Mean \pm SD)	Brain (Mean \pm SD)	Liver (Mean \pm SD)	Lung (Mean \pm SD)	Heart (Mean \pm SD)	Fat (Mean \pm SD)	Muscle (Mean \pm SD)
0	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
2	6.26 \pm 0.06	5.75 \pm 0.02	4.46 \pm 0.17	3.85 \pm 0.27	3.27 \pm 0.02	3.07 \pm 0.06	2.25 \pm 0.00
4	6.47 \pm 0.09	6.05 \pm 0.11	4.45 \pm 0.17	3.44 \pm 0.05	3.08 \pm 0.23	3.31 \pm 0.10	3.73 \pm 0.02

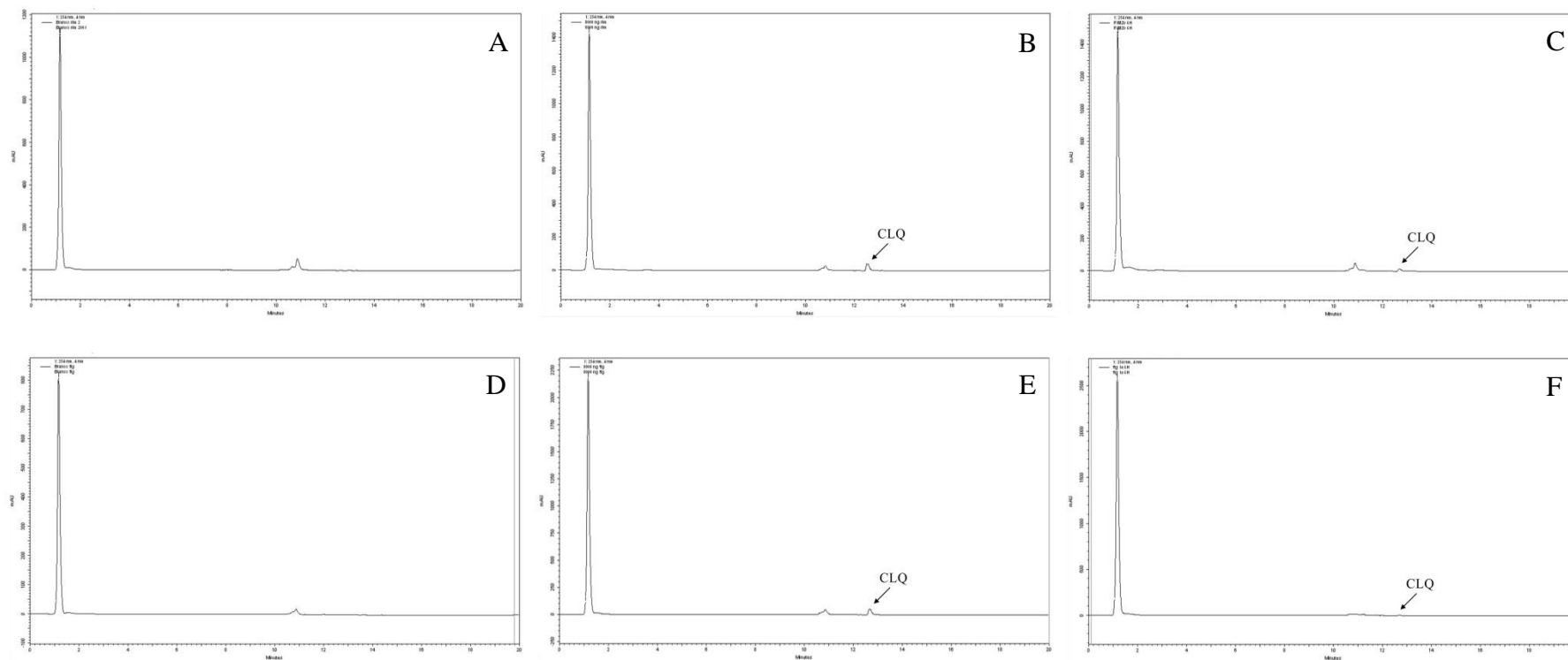


Figure 4. Representative chromatograms of blank kidney (A); blank kidney spiked with CLQ (B); mice kidney sample 6 h after p.o. administration of 100 mg/kg (C); blank liver (D); blank liver spiked with CLQ (E); mice liver sample 6 h after p.o. administration of 100 mg/kg (F).

Concerning the quantification of CLQ concentrations in plasma and other tissues, the study by Bondiolotti et al. (2006) quantified plasma, brain and liver concentrations of hamsters (n = 6) after 1 h of oral administration of a dose of 50 mg/kg. The concentrations found were 0.983 µg/mL in the plasma, 0.081 µg/mL in the brain and 0.395 µg/mL in the liver. Results showing that the concentration observed in the brain was also much lower compared to plasma and liver, also observed that the concentrations after repeated doses resemble those obtained after a single dose, so there is no accumulation in the peripheral tissue or in the brain, these two findings by Bondiolotti et al. corroborate the results we found where the concentrations in the brain were much smaller, so much that their quantification was not possible, and there was no accumulation of the drug in the tissues after multiple doses.^[24]

Inserting the molecular structure of clioquinol in the software "*Swiss ADME*", we obtained information about the logP that is 2.96, being considered a liposoluble drug suggesting that it crosses the blood-brain barrier (BBB), however our findings as well as those of Bondiolotti did not present high concentrations in the brain.

Yassin et al. (2000), treated mice with 10 mg/kg CLQ for intra-peritoneal (i.p.) administration for 20 days. After 20 days, they administered vitamin B₁₂ to assess whether CLQ interfered with vitamin absorption. They observed that the absorption of vitamin B₁₂ was significantly reduced in the brain (control 8.9 ± 0.7, CLQ 4.4 ± 1.5). Thus, this would be a way in which CLQ causes neurodegeneration in patients with SMON. Reports also show that vitamin B₁₂ deficiency can cause pernicious anemia, which causes lesions in the central nervous system (CNS).^[25]

There have been reports in the literature on the link between vitamin B₁₂ deficiency in diseases such as Alzheimer's where low levels of vitamin B₁₂ were observed in brain tissue or cerebrospinal fluid in patients with dementia.^[25]

Thus, it can be assumed that the neurological effects observed after administration of CLQ are caused by the decrease in vitamin B₁₂ uptake in the brain and not by the concentration of CLQ in that tissue, since our study and the Bondiolotti study showed low concentrations in the brain. However, these are assumptions, since neither study quantified the amount of vitamin B₁₂ in this tissue.

The results of the other compounds studied, PH151 and PH153 expressed by the growth curve are shown in figures 5 and 6, respectively.

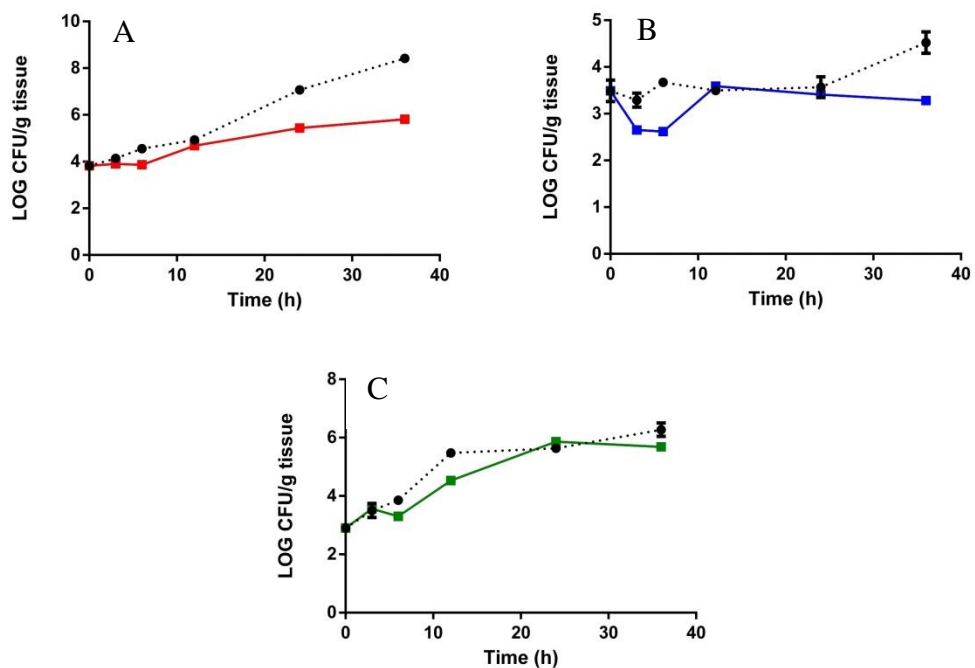


Figure 5. Fungal growth (dashed line) and kill for PH151 (full line) against *C. albicans* ATCC 18804, in kidney (A), liver (B) and brain (C).

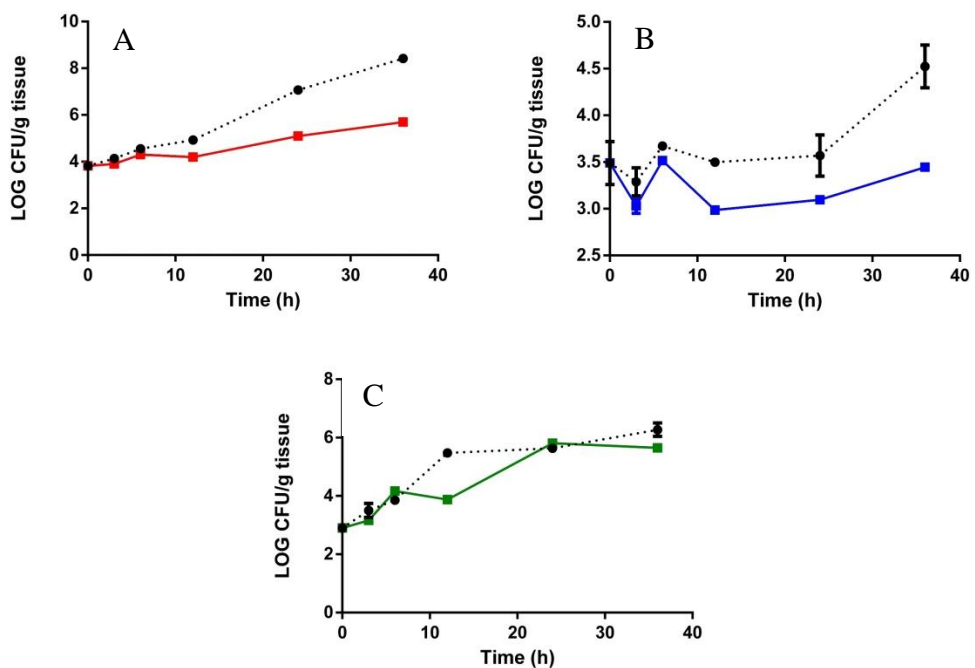


Figure 6. Fungal growth (dashed line) and kill for PH153 (full line) against *C. albicans* ATCC 18804, in kidney (A), liver (B) and brain (C).

By analyzing the growth curves of the compounds, it can be seen that the compound PH151 showed a reduction in growth from 12 h in the kidney, and in the

liver a reduction is obtained between 3 to 6 h with a growth in 12 h and from 24 h a reduction again, already in the brain the growth resembles the growth of the control.

The compound PH153 showed a greater reduction in the growth of the colonies in both the kidney and liver, where a reduction was observed from 12 h and in 36 h a reduction of 2 LOG in the kidney and 2.5 LOG in the liver. In the brain we can observe a reduction of 1 LOG only in 12 h, followed by regrowth, resembling the control in the rest of the time.

Comparing the results of the *in vitro* study with our findings, it can be observed that the compounds PHs present a better activity, mainly PH153, but it is still necessary to analyze the concentrations that this dose reached in plasma and in the tissues.

In relation to *Time-Kill curves in vitro* the compounds had fungistatic activity against *C. albicans* (ATCC 18804), with a MIC of 2 µg/mL for PH151 and 8 µg/mL for PH153. Compound PH153 reached a maximum effect in 7 hours, even its EC₅₀ (7.28 µg/mL) being higher relative to PH151 (EC₅₀= 1.32 µg/mL), which showed a maximum effect after 34 hours.^[13]

The results of the compounds were not modeled, as it was not yet possible to quantify the plasma and tissue concentrations. Because they are new molecules, there are still no studies quantifying their concentrations *in vivo* and also have no analytical methodology for quantification.

Using the "*Swiss ADME*" we obtained information about the molecules, where the logP of both compounds is 2.17, do not permeate to BBB and show a high absorption. During the animal experiments, it can be seen that the i.v. administration of these compounds did not cause marked death of the animals when the clioquinol was administered via the i.v. route where 100% death occurred after administration. This may have occurred because the CLQ dose was 100 mg/kg (to compare with the plasma concentrations of Chen et al., 1976) and the dose chosen for the compounds was 10 mg/kg, another explanation may be due to the fact of the CLQ could permeate BBB and the compounds did not.^[19]

4 CONCLUSION

In conclusion, we have described the pharmacodynamic evaluation of CLQ in a *C. albicans* disseminated infection model, where it was observed that in vivo larger concentrations are needed to see if there is an effect on the EC₅₀ in the kidney, the concentration was 25 times greater than in vitro, in the liver 40 times greater. The tissue concentrations found kidney after 6 hours were 9.37 times greater than the simulated plasma concentration, in the liver the concentration was 2.35 times higher and in the brain the concentrations were below the limit of quantification. Regarding the neurological effects caused by the CLQ that are reported it can be assumed that they are caused by the decrease of the absorption of vitamin B12 in the brain and not by the concentration of CLQ in that tissue, since our study showed concentrations below the limit of quantification in a dose of 100 mg/kg. Comparing the results obtained with the in vitro study of the PH151 and PH153 compounds, it can be observed that the compounds have a better activity, mainly PH153, which showed a reduction from 12 h and at 36 h a more pronounced reduction of 2 LOG in the kidney and 2.5 LOG in the liver. but it is still necessary to analyze the concentrations that this dose reached in plasma and in the tissues to see effectively the effects of these compounds.

5 REFERENCES

- [1] Cardoso, T. S. Papel do ATP na infecção de Macrófagos por *Candida albicans*. Dissertação. Faculdade de Ciência e Tecnologia. Universidade de Coimbra. 2013.
- [2] Gehring, G. M. Carrilho, C.M.M. Pelisson, M. Perugini, M. Tano, Z. N. Candidemia: Revisão bibliográfica. *Journal of Infection Control*. v. 4, n. 4. 2015.
- [3] Li, Y. Sun, L. Lu, C. Gong, Y. Li, M. Sun, S. Promising Antifungal Targets Against *Candida albicans* Based on Ion Homeostasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:286. doi: 10.3389/fcimb.2018.00286. 2018.
- [4] Carrillo-Muñoz, A. J. Finkelievich, J. Tur-Tur, C. Eraso, E. Jauregizar, N. Quindós, G. Giusiano, G. Combination antifungal therapy: A strategy for the management of invasive fungal infections. *Rev Esp Quimioter.* Sep;27(3):141-58. 2014.
- [5] Robbins, N. Spitzer, M. Yu, T. Cerone, R. P. Averette, A. K. Bahn, Y. Heitman, J. Sheppard, D. C. Tyers, M. Wright, G. D. An Antifungal Combination Matrix Identifies a Rich Pool of Adjuvant Molecules that Enhance Drug Activity against Diverse Fungal Pathogens. *Cell Reports*. 13. P. 1481–1492. doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.018. 2015.
- [6] Nett, J. E. Andes, D. R. Antifungal Agents. *Infect Dis Clin N Am*. V. 30, March. P. 51-83. doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.012. 2015.
- [7] Campoy, S. Adrio, J. L. Antifungals. *Biochemical Pharmacology*. 133:86-96. doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019. 2016.
- [8] Sashidhara, K. V. Kumar, A. Bhatia, G. Khan, M.M. Khanna, A.K. Saxena, J.K. Antidyslipidemic and antioxidative activities of 8-hydroxyquinoline derived novel keto-enamine Schiff's bases. *Eur J Med Chem*. 44(4):1813-1818. doi:10.1016/j.ejmech.2008.08.004. 2009.

- [9] Al-Busafi, S. N. Suliman, F. E. O. Al-Alawi, Z. R. 8-Hydroxyquinoline and its Derivatives: Synthesis and Applications. *RRJC*. V. 3. January – March. 2014.
- [10] Oliveri, V. Vecchio, G. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: a structural perspective. *Eur. J. Med. Chem.* 120, P. 252-274. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.05.007. 2016.
- [11] Mao, X. Schimmer, A.D. The toxicology of Clotrimazole. *Toxicol. Lett.* 182, 1-6. doi:10.1016/j.toxlet.2008.08.015. 2008.
- [12] Bareggi, S. R. Cornelli, U. Clotrimazole: Review of its Mechanisms of Action and Clinical Uses in Neurodegenerative Disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. V. 18. P. 41–46. doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00231. 2010.
- [13] Joaquim, A. R. Pippi, B. Cesare, M. A. Rocha, D. A. Boff, R. T. Staudt, K. J. Ruaro, T. C. Zimmer, A. R. Araújo, B. V. Silveira, G. P. Martins, A. F. Teixeira, M. L. Santos, F. P. Fuentefria, A. M. Andrade, S. F. Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. *Chem Biol Drug Des.* P.1–11. DOI: 10.1111/cbdd.13435. 2018.
- [14] Spellberg, B. Ibrahim, A. S. Edwards Jr., J. E. Filler, S. G. Mice with Disseminated Candidiasis Die of Progressive Sepsis. *JID*. June. 2005.
- [15] Lionakis, M. S. Lim, J. K. Lee, C. R. Murphy, P. M. Organ-Specific Innate Immune Responses in a Mouse Model of Invasive Candidiasis. *J Innate Immun.* 3:180–199. DOI: 10.1159/000321157. 2011.
- [16] Xu, S. Shinohara, M. L. Tissue-Resident Macrophages in Fungal infections. *Front. Immunol.* 8:1798. doi: 10.3389/fimmu.2017.01798. 2017.
- [17] Conti, H. R. Huppler, A. R. Whibley, N. Gaffen, S. L. Animal Models for Candidiasis. *Curr Protoc Immunol.* 105: 19.6.1–19.6.17. doi:10.1002/0471142735.im1906s105. 2015.

- [18] Lepak, A. J. Zhao, M. VanScoy, B. Ambrose, P. G. Andes, D.R. Pharmacodynamics of the Long Acting Echinocandin, CD101, in the Neutropenic Invasive Candidiasis Murine Model Using an Extended Interval Dosing Design. *AAC*. doi:10.1128/AAC.02154-17. 2017.
- [19] Chen, C. Kodama, H. Egashira, Y. Samejima, K. Imanari, T. Tamura, Z. Serum levels of 5-chloro-7-iodo-8quinolinol and its toxicity in various animals. *Cham. Pharm. Buil.* 24(9). 1976.
- [20] Araújo, B. V. Modelagem Farmacocinética-Farmacodinâmica do Antifúngico Voriconazol. Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre, 2008.
- [21] Brieland, J. Essig, D. Jackson, C. Frank, D. Loebenberg, D. Menzel, F. Arnold, B. DiDomenico, B. Hare, R. Comparison of Pathogenesis and Host Immune Responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in Systemically Infected Immunocompetent Mice. *INFECTION AND IMMUNITY*. p. 5046–5055. DOI: 10.1128/IAI.69.8.5046–5055.2001. 2001.
- [22] Pippi, B. Merkel, S. Staudt, K. J. Teixeira, M. L. ARAÚJO, B. V. Zanette, R. A. Alves, R. J. Andrade, S. F. Fuentesfria, A. M. Oral clioquinol is effective in the treatment of Toll-deficient *Drosophila* flies infected with *Candida albicans*. *Mycoses*. 2018. Unpublished results.
- [23] Yaakov, D. B. Shadkchan, Y. Albert, N. Kontoyiannis, D. P. Osherov, N. The quinoline bromoquinol exhibits broad-spectrum antifungal activity and induces oxidative stress and apoptosis in *Aspergillus fumigatus* *J Antimicrob Chemother* 2017; 72: 2263–2272. doi.org/10.1093/jac/dkx117. 2017.
- [24] Bondiolotti, G. P. Pollera, C. Pirola, R. Bareggi, S. R. Determination of 5-chloro-7-iodo-8-quinolinol (clioquinol) in plasma and tissues of hamsters by high-performance

liquid chromatography and electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 837. 87–91. 2006.

[25] Yassin, M. S. Ekblom, J. Xilinas, M. Gottfries, M. G. Orelund, L. Changes in uptake of vitamin B12 and trace metals in brains of mice treated with clioquinol. *Journal of the Neurological Sciences*. 173. 40–44. 2000.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta desta dissertação foi avaliar o efeito farmacodinâmico e farmacocinético do composto clioquinol e dos derivados hidroxiquinolínicos (PH151 e PH153) em um modelo animal de candidíase disseminada em camundongos infectados com *C. albicans*. Para cumprir essa proposta foi necessário adaptar um modelo descrito na literatura de infecção experimental por *C. albicans* em camundongos imunossuprimidos para camundongos imunocompetentes.

O modelo de infecção utilizado reproduziu uma infecção disseminada, atingindo órgãos como o rim, fígado, cérebro, coração, pulmão, músculo e gordura, conforme é descrito na literatura.

Para a avaliação do efeito farmacodinâmico dos compostos clioquinol, PH153 e PH151 em camundongos infectados foram testadas doses múltiplas de 100 mg/kg pela via oral de clioquinol e 10 mg/kg *iv bolus* na veia caudal para os outros dois compostos. Em tempos pré-determinados os animais foram eutanasiados, seus tecidos foram retirados, pesados, triturados, homogeneizados, diluídos e plaqueados para a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de tecido.

Dando sequência no desenvolvimento dessa dissertação foi preciso adaptar e desenvolver uma metodologia bioanalítica para a quantificação dos níveis de concentração dos três compostos em amostras de plasma e tecido dos camundongos. Até o momento foi possível quantificar as amostras teciduais do clioquinol, porém estão sendo realizadas adaptações para quantificar as amostras de plasma, como também estão sendo desenvolvidos métodos para a quantificação das amostras dos derivados hidroxiquinolínicos.

Utilizando dados de concentrações plasmáticas de camundongos, com administração da mesma dose e mesma via de administração, foi possível simular concentrações plasmáticas para relacionar com as concentrações teciduais obtidas e assim modelar os perfis de concentração *versus* tempo obtido para o clioquinol. Também foi possível modelar curvas de efeito farmacodinâmico usando o modelo de Emax modificado.

Sendo assim, os resultados obtidos apontam que *in vivo* são necessárias concentrações maiores para se observar efeito, e que entre os tecidos estudados o rim apresentou maior crescimento fúngico e também maior concentração de clioquinol. Em relação aos derivados hidroxiquinolínicos, eles apresentaram um melhor atividade *in*

vivo, porém é necessário quantificar as amostras teciduais e plasmáticas para que seja possível a comparação quantitativa desses efeitos em termos de parâmetros PK/PD expressos em termos de k_{max} e EC_{50} .

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas principais tem-se o desenvolvimento de metodologia bioanalítica para quantificação das amostras plasmáticas e teciduais dos derivados hidroxiquinolínicos.

Após quantificação dessas amostras, modelar esses resultados buscando modelos que melhor descrevem o efeito observado.

Também se pretende realizar a histologia de animais hígidos e animais com candidíase disseminada por *C. albicans*, para visualizar as alterações que a infecção causa.

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1 - CONSORT 2010



CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomised trial*

Section/Topic	Item No	Checklist item	Reported on page No
Title and abstract	1a		37
	1b		37
Introduction Background and objectives	2a	Scientific background and explanation of rationale	38
	2b	Specific objectives or hypotheses	39
Methods Trial design	3a	Description of trial design (such as parallel, factorial) including allocation ratio	
	3b	Important changes to methods after trial commencement (such as eligibility criteria), with reasons	
Participants	4a	Eligibility criteria for participants	
	4b	Settings and locations where the data were collected	
Interventions	5	The interventions for each group with sufficient details to allow replication, including how and when they were actually administered	

Outcomes	6a	Completely defined pre-specified primary and secondary outcome measures, including how and when they were assessed	<hr/>
	6b	Any changes to trial outcomes after the trial commenced, with reasons	<hr/> Identification as a randomised trial in the title
Sample size	7a	How sample size was determined	<hr/> Structured summary of trial design, methods, results, and conclusions (for specific guidance see CONSORT for abstracts)
	7b	When applicable, explanation of any interim analyses and stopping guidelines	<hr/> <hr/>
Randomisation:			
Sequence generation	8a	Method used to generate the random allocation sequence	
	8b	Type of randomisation; details of any restriction (such as blocking and block size)	<hr/>
Allocation concealment mechanism	9	Mechanism used to implement the random allocation sequence (such as sequentially numbered containers), describing any steps taken to conceal the sequence until interventions were assigned	<hr/> <hr/>

Implementation	10	Who generated the random allocation sequence, who enrolled participants, and who assigned participants to interventions	_____
Blinding	11a	If done, who was blinded after assignment to interventions (for example, participants, care providers, those assessing outcomes) and how	_____
	11b	If relevant, description of the similarity of interventions	_____
Statistical methods	12a	Statistical methods used to compare groups for primary and secondary outcomes	_____
	12b	Methods for additional analyses, such as subgroup analyses and adjusted analyses	_____
Results			
Participant flow (a diagram is strongly recommended)	13a	For each group, the numbers of participants who were randomly assigned, received intended treatment, and were analysed for the primary outcome	43
	13b	For each group, losses and exclusions after randomisation, together with reasons	_____
Recruitment	14a	Dates defining the periods of recruitment and follow-up	_____
	14b	Why the trial ended or was stopped	_____
Baseline data	15	A table showing baseline demographic and clinical characteristics for each group	_____
Numbers analysed	16	For each group, number of participants (denominator) included in each analysis and whether the analysis was by original assigned groups	_____
Outcomes and estimation	17a	For each primary and secondary outcome, results for each group, and the estimated effect size and its precision (such as 95% confidence interval)	_____
	17b	For binary outcomes, presentation of both absolute and relative effect sizes is recommended	_____

Ancillary analyses	18	Results of any other analyses performed, including subgroup analyses and adjusted analyses, distinguishing pre-specified from exploratory	
Harms	19	All important harms or unintended effects in each group (for specific guidance see CONSORT for harms)	
Discussion			
Limitations	20	Trial limitations, addressing sources of potential bias, imprecision, and, if relevant, multiplicity of analyses	53
Generalisability	21	Generalisability (external validity, applicability) of the trial findings	
Interpretation	22	Interpretation consistent with results, balancing benefits and harms, and considering other relevant evidence	
Other information			
Registration	23	Registration number and name of trial registry	
Protocol	24	Where the full trial protocol can be accessed, if available	
Funding	25	Sources of funding and other support (such as supply of drugs), role of funders	

*We strongly recommend reading this statement in conjunction with the CONSORT 2010 Explanation and Elaboration for important clarifications on all the items. If relevant, we also recommend reading CONSORT extensions for cluster randomised trials, non-inferiority and equivalence trials, non-pharmacological treatments, herbal interventions, and pragmatic trials. Additional extensions are forthcoming; for those and for up to date references relevant to this checklist, see www.consort-statement.org.

10.2 Anexo 2 - Carta de aprovação do CEUA



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 34774

Título: Avaliação farmacodinâmica/farmacocinética in vivo do efeito antifúngico do clioquinol e seus derivados sintéticos em modelo de candidíase sistêmica

Vigência: 01/05/2018 à 31/12/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO - coordenador desde 01/05/2018
ALEXANDRE MENEGHELLO FUENTEFRIA - pesquisador desde 01/05/2018
SAULO FERNANDES DE ANDRADE - pesquisador desde 01/05/2018
Keli Jaqueline Staudt - Aluno de Mestrado desde 01/05/2018

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 30/04/2018 - Sala 323 do Anexo I do Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 90 camundongos machos adultos (de 6 a 8 semanas de idade), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL/UFRGS); de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 4 de Maio de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética