

CRISTINA DE CASTRO SPADARI

Miltefosina como alternativa para o tratamento da criptococose: mecanismo de ação e nanopartículas de alginato como carreadores.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2018

CRISTINA DE CASTRO SPADARI

Miltefosina como alternativa para o tratamento da criptococose: mecanismo de ação e nanopartículas de alginato como carreadores.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Ishida

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana B. Lopes

Versão original

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Castro Spadari, Cristina
Miltefosina como alternativa para o tratamento
da criptococose: mecanismo de ação e nanopartículas
de alginato como carreadores. / Cristina de Castro
Spadari; orientadora Kelly Ishida; coorientadora
Luciana B. Lopes. -- São Paulo, 2018.
108 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Criptococose. 2. Miltefosina. 3.
Nanopartículas. 4. Alginato. 5. Antifúngicos. I.
Ishida, Kelly, orientador. II. B. Lopes, Luciana,
coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cristina de Castro Spadari

Título da Dissertação/Tese: Miltefosina como alternativa para o tratamento da criptococose: mecanismo de ação e nanopartículas de alginato como carreadores.

Orientador: Kelly Ishida

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **68** nas fls. **20** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Kelly Ishida**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Encapsulamento da miltefosina em micropartículas de quitosana ou alginato e avaliação dos efeitos "in vitro" e "in vivo" em modelo murino de criptococose pulmonar*" do qual participam o(s) aluno(s) **Cristina Spadari** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **15.10.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 17 de outubro de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP



Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira - Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - Cx. 336 - 05508-900
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone: (11) 2061-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.048.2018

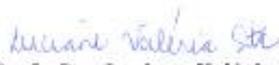
DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **68/2014/CEUA**, aprovado em 15/10/2014, relativo ao projeto intitulado "**Encapsulamento da miltefosina em micropartículas de quitosana ou alginato e avaliação dos efeitos "in vitro" e "in vivo" em modelo murino de criptococose pulmonar**", de responsabilidade da Profa. Dra. **Kelly Ishida**, do Departamento de Microbiologia, aprovo a seguinte alteração na metodologia, conforme detalhamento da solicitação:

- Criptococose sistêmica.

Informo também que, a pedido da responsável pela pesquisa, o título do projeto foi alterado para: **Miltefosina como alternativa para o tratamento da criptococose: mecanismo de ação e nanopartículas de alginato como carreadores.**

São Paulo, 09 de abril de 2018


Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP



Declaro, para os devidos fins, que

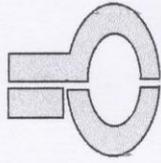
crisrina de castro spadari

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos", realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 2 maio 2016
(Declaração válida por 5 anos)

Helayne Freitas
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt
Diretor do ICB



Certificado



Certificamos que **Cristina de Castro Spadari** participou do Treinamento em Biossegurança realizado no Departamento de Microbiologia/ICB-USP, no dia 12 de Agosto de 2014, com carga horária total de 8 horas.

Gabriel Padilla

Prof. Dr. Gabriel Padilla
Responsável pelo Treinamento

Tatiana Alves dos Reis

Tatiana Alves dos Reis
Técnica Responsável pelo Treinamento

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado durante estes 4 anos, sem a qual seria inviável realizar a presente tese.

Muitas são as pessoas a quem agradeço pela realização deste trabalho.

Aos meus pais, que deixei com o coração apertadinho de saudade, sempre me apoiando e fazendo tudo que estava no alcance deles para me ajudar nesta etapa da vida.

À minha orientadora Prof. Dra. Kelly Ishida pela oportunidade de realizar este projeto me aceitando como sua primeira aluna da pós-graduação. Sendo sempre disponível para conversar e ajudar, me incentivando e ensinando tudo que podia.

À minha coorientadora Prof. Dra. Luciana Lopes que sempre estava disposta a me explicar sobre “minhas dúvidas de bióloga no mundo da farmacologia”.

Aos funcionários do departamento de microbiologia, em especial à Gisele por nunca me deixar perder um prazo; a Veridiana pelo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo; ao Marco pela paciência e ajuda no Biotério; e um agradecimento especial à Zita pela ajuda nos experimentos com camundongo e, principalmente pela convivência.

Ao Prof. Dr. Carlos Taborda e seus alunos pela convivência e aprendizados, principalmente no período inicial do doutorado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Quimioterapia Antifúngica e do Laboratório de Nanofármacos e Sistema de Liberação sempre dispostos a ajudar quando eu precisei e tornando os dias mais divertidos com conversas dos mais variados assuntos.

E não posso deixar de agradecer os presentes que o doutorado me deu para a vida: Marcelo (meu “marido”), Flavinho, Lucas, Aline (melhor IC), Ismael, Camila e Samuel. Vocês fazem minha vida mais feliz, cada um do seu jeitinho!

Aos amigos que sampa me trouxe e que tornaram esses anos melhores, em especial ao Rafael que dividiu comigo os momentos bons e ruins da vida.

Aos amigos que deixei no Rio Grande do Sul e que nunca deixaram de fazer parte da minha vida mesmo com a distância: Magali, Riotinha, Themis, Bá, Andrei e Vitor.

RESUMO

SPADARI, C.C. Miltefosina como alternativa para o tratamento da criptococose: mecanismo de ação e nanopartículas de alginato como carreadores. 2018. 105 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Estudos prévios apontam que a miltefosina (MFS) pode ser uma alternativa como agente antifúngico; possui amplo espectro de ação e perfil fungicida; porém apresenta alta toxicidade. O uso de sistemas carreadores de fármacos a base de alginato tem ganhado lugar ao longo da última década. Assim, o presente trabalho visa entender os efeitos fisiológicos da MFS sobre as leveduras de *Cryptococcus* spp.; e, também, desenvolver uma formulação da MFS em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) e posterior avaliação da eficácia antifúngica *in vitro* e em modelo murino de criptococose. Nossos resultados confirmam a atividade fungicida da MFS sobre *Cryptococcus* spp. e, também, mostram o efeito pós-antifúngico. Os efeitos fisiológicos causados nas leveduras sugerem que a MFS aumenta a permeabilidade da membrana plasmática via interação com o ergosterol, e também afeta a membrana mitocondrial, produzindo espécies reativas de oxigênio, fragmentação e condensação do DNA, levando a morte celular via apoptose. Com o intuito de reduzir os efeitos colaterais da MFS esta foi incorporada em nanopartículas de alginato (MFS.Alg), a formulação foi padronizada e caracterizada, obtendo tamanho médio de $314,0 \pm 32,6$ nm, índice de polidispersão em torno de 0,30 e potencial zeta de $-27,2 \pm 3,01$ mV. Além disso, essas nanopartículas incorporam $81,7 \pm 6,64$ % do fármaco e a liberação da MFS é lenta e prolongada. A grande vantagem da MFS em nanopartículas de alginato é a redução da toxicidade quando comparado com a MFS livre. A atividade antifúngica *in vitro* da MFS.Alg é semelhante e até 10 vezes maior quando comparado ao fármaco livre. Em contraste, no modelo de criptococose sistêmica em camundongos, tanto a MFS livre como MFS.Alg aumentam a sobrevivência dos animais quando comparado com o grupo não tratado; porém, somente o tratamento com a MFS.Alg reduz a carga fúngica nos pulmões e nos cérebros. Com os dados deste trabalho conseguimos elucidar mecanismos de ação da MFS em leveduras de *Cryptococcus* e, também, propor o uso de nanopartículas de alginato com MFS incorporada como uma potencial alternativa para tratamento da criptococose.

Palavras-chave: Criptococose. Miltefosina. Nanopartículas. Alginato. Antifúngicos.

ABSTRACT

SPADARI, C.C. Miltefosine as an alternative for the treatment of cryptococcosis: action mechanism and alginate nanoparticles as carriers. 2018. 105 p. Thesis (Doctorate in Microbiology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

Previous studies indicate that miltefosine (hexadecylphosphocholine, MFS) may be an alternative as an antifungal agent once that it has broad spectrum of action and fungicide profile; however, it presents high toxicity. The use of alginate-based drug delivery systems has been gaining ground over the last decade. Thus, the present project aims to understand the physiological effects of MFS on yeasts of *Cryptococcus* spp.; and develop a formulation of MFS in alginate nanoparticles (MFS.Alg) and subsequent evaluation of the antifungal efficacy *in vitro* and in the murine model of cryptococcosis. Our results confirm the fungicidal activity of MFS on *Cryptococcus* spp. and show the post-antifungal effect. Physiological effects on yeast suggest that MFS increases plasma membrane permeability through interaction with ergosterol and affects the mitochondrial membrane, producing reactive oxygen species, DNA fragmentation and condensation, leading to cell death via apoptosis. The MFS.Alg nanoparticles were standardized and characterized, having a mean size of 314.0 ± 32.6 nm, polydispersity index around 0.30 and zeta potential of -27.2 ± 3.01 mV. In addition, these nanoparticles incorporate 81.7 ± 6.64 % of the drug and the release of MFS is slow and protracted. The great advantage of MFS in alginate nanoparticles is the reduction of toxicity when compared to free MFS. The *in vitro* antifungal activity of MFS.Alg is similar and up to 10 times greater when compared to the free drug. In contrast, in the systemic cryptococcosis model in mice, both free MFS and MFS.Alg increase the survival of the animals when compared to the untreated group; however, only the treatment with MFS.Alg reduces the fungal load in the lungs and in the brains. With the data of this study, we elucidated the action mechanisms of MFS in *Cryptococcus* yeasts and also proposed the use of alginate nanoparticles with incorporated MFS as a potential alternative for the treatment of cryptococcosis.

Key words: Cryptococcosis. Miltefosine. Nanoparticles. Alginate. Antifungals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de infecção de <i>Cryptococcus</i> spp.	24
Figura 2. Fórmula estrutural da miltefosina (MFS).....	31
Figura 3. Representação de nanocápsulas e nanoesferas.....	36
Figura 4. Estrutura molecular dos ácidos α -L-gulurônico (G) e β -D-manurônico (M) do polímero de alginato.	37
Figura 5. Efeito pós-antifúngico (PAFE) da miltefosina (MFS) em leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> CAP59 (A) e H99 (B) e <i>Cryptococcus gattii</i> ATCC 56990 (C).....	48
Figura 6. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99.	50
Figura 7. Espessura da cápsula (μ m) de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	50
Figura 8. Curva do tempo de morte de <i>Cryptococcus neoformans</i> (CAP59 e H99) e <i>Cryptococcus gattii</i> (ATCC 56990)	52
Figura 9. Curva de permeabilidade da membrana quantificada por liberação de DNA de <i>Cryptococcus neoformans</i> (CAP59 e H99) e <i>Cryptococcus gattii</i> (ATCC 56990).....	53
Figura 10. Curva de permeabilidade da membrana quantificada por liberação de proteínas de <i>Cryptococcus neoformans</i> (CAP59 e H99) e <i>Cryptococcus gattii</i> (ATCC 56990).....	54
Figura 11. Efeitos fisiológicos da miltefosina (MFS) em leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99.	56
Figura 12. Modelo do mecanismo de ação da miltefosina (MFS) em leveduras de <i>Cryptococcus</i>	62
Figura 13. Fluxograma indicando as etapas realizadas para a produção e padronização das nanopartículas de alginato.	66
Figura 14. Etapas do processo de produção das nanopartículas de alginato utilizando o protocolo K.	74
Figura 15. Distribuição de tamanho médio e potencial zeta das nanopartículas utilizando o protocolo K.	75
Figura 16. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura das nanopartículas de alginato.	77
Figura 17. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	78
Figura 18. Liberação da miltefosina das nanopartículas de alginato.....	79
Figura 19. Atividade hemolítica da miltefosina livre (MFS) e incorporada nas nanopartículas de alginato (MFS.Alg).	80

Figura 20. Curva de sobrevida de camundongos infectados com <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 tratados e não tratados com miltefosina.	82
Figura 21. Carga fúngica pulmonar e cerebral de camundongos infectados com <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 tratados e não tratados com miltefosina.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade inibitória da miltefosina (MFS) sobre diferentes gêneros de fungos.	32
Tabela 2. Sistemas carreadores de fármacos à base de alginato para agentes antifúngicos, azóis e polienos.	39
Tabela 3. Suscetibilidade dos isolados de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i> a miltefosina, anfotericina B e fluconazol.	47
Tabela 4. Suscetibilidade das células sésseis e em dispersão do biofilme (CIM-B _S e CIM-B _D) e células planctônicas (CIM-P) de <i>Cryptococcus neoformans</i> (H99 e CAP59) e <i>Cryptococcus gattii</i> (ATCC 56990) à miltefosina.	47
Tabela 5. Efeito da presença de ergosterol exógeno na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da miltefosina e anfotericina B sobre <i>Cryptococcus</i> spp.	51
Tabela 6. Denominação e respectiva breve descrição das modificações realizadas nas formulações para os diferentes protocolos testados na padronização da produção das nanopartículas de alginato.	67
Tabela 7. Tamanho médio (nm), polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de alginato obtidas com os diferentes protocolos de produção.	73
Tabela 8. Resultados obtidos nas modificações avaliadas para obter o protocolo K com características das nanopartículas de alginato consideradas adequadas.	73
Tabela 9. Dados das características físicas (tamanho, polidispersão e potencial zeta) das nanopartículas de alginato vazias (Nano.Alg) e com miltefosina incorporada (MFS.Alg) produzidas seguindo o protocolo K.	74
Tabela 10. Dados das características físicas das nanopartículas de alginato liofilizadas com e sem crioprotetor, resuspendidas em isopropanol e diluídas em água (1:100, v/v).	75
Tabela 11. Características físicas das nanopartículas de alginato liofilizadas com trealose 10 %, reconstituídas diretamente em água estéril ou PBS e, posteriormente, diluídas em água (1:100) para avaliação.	76
Tabela 12. Características físicas das nanopartículas de alginato com miltefosina (MFS.Alg) antes da liofilização com trealose 10 % e o pó liofilizado reconstituído com PBS e diluídas em água (1:100) para avaliação.	76
Tabela 13. Estabilidade das características de tamanho, polidispersão (Pdi) e potencial zeta das nanopartículas de alginato com miltefosina incorporada estocadas a -22°C ao longo de 90 dias.	80

Tabela 14. Susceptibilidade de *Cryptococcus neoformans* (H99 e CAP59) e *Cryptococcus gattii* (ATCC 56990) à miltefosina livre (MFS), nanopartículas de alginato com (MFS.Alg) e sem MFS (Nano.Alg). 81

Tabela 15. Estabilidade da atividade antifúngica da nanopartículas de alginato com miltefosina sobre *Cryptococcus neoformans* (H99 e CAP59) e *Cryptococcus gattii* (ATCC 56990). 81

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-FC: 5-fluocitosina
- AMB: Anfotericina B
- CEUA-ICB: Comissão de Ética no Uso de Animais – Instituto de Ciências Biomédicas
- CFM: Concentração Fungicida Mínima
- CIM: Concentração Inibitória Mínima
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
- CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- COX: Citocromo oxidase c
- DCFH-DA: Diacetato de 2'7'-Diclorofluorescina
- DLS: Dynamic Light Scattering*
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- Dz: Média de tamanho
- EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- FLC: Fluconazol
- HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
- MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
- MFS: Miltefosina
- MFS.Alg: Nanopartículas de alginato com miltefosina
- MOPS: Ácido propano sulfônico 3-morfolino
- Nano.Alg: Nanopartículas de alginato
- PAFE: Efeito pós-antifúngico
- PBS: Tampão fosfato-salino
- Pdi: Polidispersão
- PI: Iodeto de Propídeo
- RNA: Ácido ribonucleico
- ROS: Espécies reativas de oxigênio
- RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*
- AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida
- SNC: Sistema Nervoso Central

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

UFC: Unidade Formadora de Colônia

XTT: [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide]

INPI: *Instituto Nacional da Propriedade Industrial*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS	21
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	22
3.1 CRIPTOCOCOSE	22
3.1.1 Agente etiológico.....	22
3.1.2 Epidemiologia.....	22
3.1.3 Infecção e Patogênese	23
3.1.4 Fatores de virulência.....	26
3.2 ANTIFÚNGICOS	28
3.3 MILTEFOSINA.....	31
3.4 SISTEMAS CARREADORES DE FÁRMACOS	35
3.5 ALGINATO	37
4 CAPÍTULO I.....	40
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1.1 Microrganismos.....	41
4.1.2 Antifúngicos.....	41
4.1.3 Concentração inibitória mínima (CIM-P) e concentração fungicida mínima (CFM-P) sobre células planctônicas	41
4.1.4 Concentração inibitória mínima sobre células do biofilme (CIM-B)	42
4.1.5 Efeito pós-antifúngico (PAFE).....	43
4.1.6 Efeitos da miltefosina nas leveduras de <i>Cryptococcus spp.</i>	43
4.1.6.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	43
4.1.6.2 Microscopia ótica	43
4.1.6.3 Curva do tempo de morte	44
4.1.6.4 Permeabilidade da membrana plasmática.....	44
4.1.6.5 Influência de ergosterol exógeno na CIM	44
4.1.6.6 Avaliação do efeito da MFS com uso de marcadores fluorescentes	44
4.1.7 Análise estatística.....	46
4.2 RESULTADOS	46

4.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM-P) e concentração fungicida mínima (CFM-P) das células planctônicas	46
4.2.3 Efeito pós-antifúngico (PAFE)	46
4.2.4 Efeitos da miltefosina nas leveduras de <i>Cryptococcus spp.</i>	49
4.2.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	49
4.2.4.2 Microscopia ótica	49
4.2.4.3 Curva do tempo de morte	49
4.2.4.4 Permeabilidade da membrana celular	51
4.2.4.5 Influência de ergosterol exógeno na CIM	51
4.2.4.6 Avaliação do efeito da MFS com uso de marcadores fluorescentes	55
4.3 DISCUSSÃO	56
4.4 CONCLUSÃO	63
5 CAPÍTULO II	64
5.1. MATERIAIS E MÉTODOS	65
5.1.1 Reagentes	65
5.1.2 Padronização da produção das nanopartículas de alginato	65
5.1.3 Determinação dos tamanhos dos complexos, polidispersão e potencial zeta	67
5.1.4 Liofilização e reconstituição das nanopartículas de alginato	68
5.1.5 Microscopia eletrônica	68
5.1.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	68
5.1.7 Determinação da eficiência de encapsulamento	69
5.1.8 Ensaio de liberação da MFS <i>in vitro</i>	69
5.1.9 Estabilidade das nanopartículas MFS.Alg	69
5.1.10 Avaliação da citotoxicidade	69
5.1.11 Atividade antifúngica <i>in vitro</i>	70
5.1.12 Eficácia antifúngica das nanopartículas em modelo murino de criptococose sistêmica	70
5.1.12.1 Animais	70
5.1.12.2 Modelo de criptococose sistêmica	70
5.1.12.3 Terapia	71
5.1.12.4 Avaliação do tratamento	71
5.1.13 Análise estatística	71
5.2 RESULTADOS	72

5.2.1 Padronização da produção das nanopartículas de alginato.....	72
5.2.2 Liofilização e reconstituição das nanopartículas de alginato.....	75
5.2.3 Microscopia eletrônica.....	76
5.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	77
5.2.4 Determinação da eficiência de encapsulamento	77
5.2.5 Ensaio de liberação da MFS in vitro.....	79
5.2.6 Estabilidade das nanopartículas MFS.Alg.....	79
5.2.7 Avaliação da citotoxicidade da formulação	80
5.2.8 Atividade antifúngica in vitro	81
5.2.9 Eficácia antifúngica das nanopartículas em modelo murino de criptococose sistêmica	82
5.3 DISCUSSÃO	83
5.4 CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICE	104

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção oportunista comum em pacientes com infecção avançada por HIV e, também, pode acometer pacientes imunocompetentes. A taxa de mortalidade é inaceitavelmente alta, principalmente em países de média e baixa renda. Além disso, os agentes antifúngicos disponíveis são poucos, sendo a anfotericina B e suas formulações lipídicas, fluconazol e a combinação de anfotericina B e 5-fluorocitosina as terapias indicadas para a criptococose. No entanto, o uso desses antifúngicos é limitado por problemas de toxicidade e perfis de resistência dos fungos aos antifúngicos disponíveis, além de alto custo.

Diante deste panorama, fica evidente a importância de novas terapias para o tratamento de criptococose. O processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos requer mais de 10 anos, em média, e a taxa de sucesso é muito baixa. Uma estratégia para novas terapias é o reposicionamento de fármacos usados em outras doenças, que tem as características farmacocinéticas e de segurança em humanos estabelecidas e vantagens em termos de custo e eficiência no tempo. A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um fármaco utilizado no tratamento de câncer de mama e leishmaniose visceral e cutânea. Estudos prévios apontam que a miltefosina pode ser uma alternativa como agente antifúngico, pois possui amplo espectro de ação frente a diferentes espécies fúngicas e perfil fungicida, porém apresenta alta toxicidade comparável a anfotericina B. Além disso, pouco é sabido sobre o mecanismo de ação da miltefosina em células fúngicas patogênicas.

O uso de sistemas carreadores de drogas vem sendo amplamente utilizado para melhorar o fornecimento direcionado de fármacos, solubilidade, tempo de retenção no organismo, estabilidade de fármacos lábeis, liberação controlada da droga e maior biodisponibilidade e diminuir efeitos colaterais. Adicionalmente, o alginato, um polímero natural usado em sistemas carreadores, possui características de não ser tóxico, ser biodegradável, ter baixo custo, estar prontamente disponível, ser mucoadesivo, biocompatível e uma substância não imunogênica.

Diante do exposto acima, acreditamos que a incorporação da miltefosina em sistemas carreadores de alginato possa contornar desvantagens de toxicidade e ser uma alternativa para o tratamento da criptococose. E, também, o estudo de mecanismo de ação da miltefosina em células fúngicas é um fator importante e pouco descrito na literatura.

2 OBJETIVOS

I - Avaliar a atividade antifúngica e os efeitos fisiológicos da miltefosina sobre leveduras de *Cryptococcus* spp.;

II - Padronizar e caracterizar nanopartículas de alginato como carreador da miltefosina; avaliar o efeito tóxico e a atividade antifúngica frente a *Cryptococcus* spp.

Com o intuito de facilitar o entendimento dos dados obtidos durante o doutorado, essa tese foi escrita em dois capítulos. O primeiro abordando o primeiro objetivo referente a atividade e mecanismo de ação da MFS sobre as leveduras de *Cryptococcus* spp., e o segundo contendo o objetivo referente a padronização, caracterização e atividade das nanopartículas de alginato com MFS incorporada.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Criptococose

3.1.1 Agente etiológico

Cryptococcus é um gênero de fungos basidiomicetos da ordem Tremellales, que são normalmente encontrados no solo (comumente contaminado com fezes de aves), árvores e madeira em decomposição (LIN; HEITMAN, 2006). Este gênero possui mais de 30 espécies distribuídas no ambiente, mas apenas 2 são comumente conhecidas por causar a criptococose em humanos: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Historicamente, esses fungos podem ser classificados em 5 sorotipos (A, B, C, D e AD) com base em diferenças estruturais na cápsula polissacarídica. Cepas do sorotipo A, D e o híbrido AD pertencem a espécie *C. neoformans*, sendo o sorotipo A, *C. neoformans* var. *grubii* e o D, *C. neoformans* var. *neoformans*; e os sorotipos B e C pertencentes a *C. gattii* (HAGEN et al., 2015; MAZIARZ; PERFECT, 2016). Com o uso de técnicas moleculares esses fungos também foram classificados em 8 subtipos moleculares: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) como VNI, VNII e *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo AD) como VNIII, *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) como VNIV e *C. gattii* (sorotipo B) como VGI e VGII e *C. gattii* (sorotipo C) como VGIII e VGIV (KWON-CHUNG et al., 2014; MEYER et al., 2011). Em 2015, com uso de análise filogenética de 11 locos genéticos uma nova proposta de classificação surgiu onde *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* se tornariam espécies separadas, sendo a variedade *grubii* equivalente a *C. neoformans* e a variedade *neoformans* ao *C. deneoformans*. E a espécie *C. gattii* seria dividida em 5 espécies: *C. gattii*, *C. deuterogattii*, *C. bacillisporus*, *C. tetragattii* e *C. decagattii* (HAGEN et al., 2015). No entanto, essa proposta de classificação tem gerado discussão no meio científico onde um grupo defende a antiga classificação em 2 espécies (KWON-CHUNG et al., 2017) e o outro é a favor da nova classificação (HAGEN et al., 2017). Depois de debates, ficou recomendado o uso de “complexo *C. neoformans*” e “complexo *C. gattii*”, reconhecendo a diversidade genética sem criar confusão (KWON-CHUNG et al., 2017).

3.1.2 Epidemiologia

A criptococose causada por *C. neoformans* tem distribuição mundial e a grande maioria dos pacientes com infecção sintomática disseminada são imunocomprometidos; já a infecção por *C. gattii* foi observada, inicialmente, como prevalente em regiões subtropicais e tropicais,

porém estudos indicaram que a espécie se expandiu para zonas temperadas. É importante ressaltar que a criptococose causada por *C. gattii* é significativamente menos frequente no mundo (20 %) do que a causada por *C. neoformans* (80 %) (KWON-CHUNG et al., 2014). No Brasil, infecções por *C. neoformans* estão distribuídas, porém a maioria dos casos ocorrem nas regiões Sul e Sudeste, enquanto *C. gattii* está mais relacionado com infecções endêmicas no Norte e Nordeste, ocorrendo casos esporádicos nas demais regiões (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; TRILLES et al., 2008)

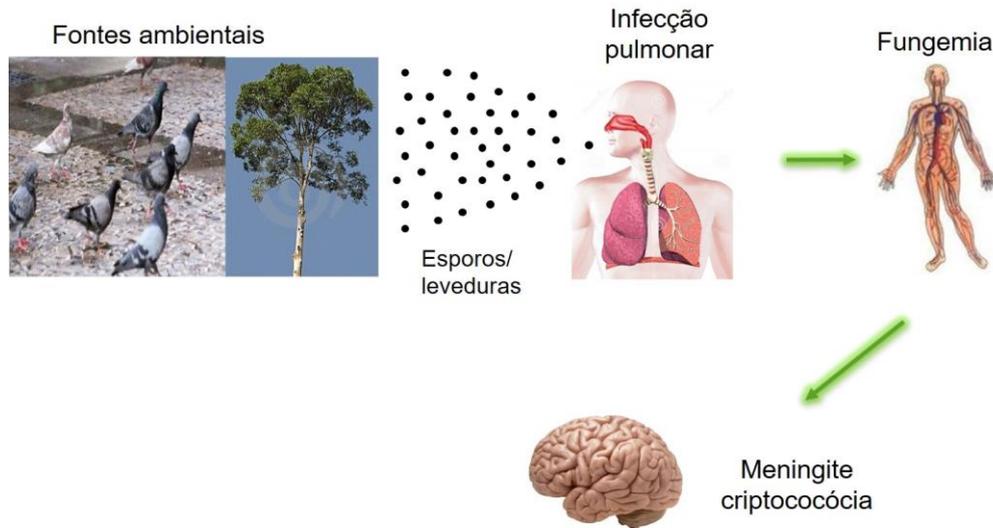
Como uma infecção oportunista comum em pacientes com infecção avançada por HIV, a criptococose é a principal causa de meningite ocorrendo ~223.100 casos/ano e mais de 81 % de mortalidade (RAJASINGHAM et al., 2017). Essas mortes ocorrem mais na África subsaariana onde a mortalidade chega a 70 % (LIMPER et al., 2017), e representa de 13 a 40 % de mortes em países com recursos limitados (ORGANIZATION WORLD HEALTH, 2011). A América Latina é a terceira região do mundo com a maioria dos casos. Nesta região, a criptococose representa a principal causa de meningite oportunista e a mortalidade continua a ser inaceitavelmente elevada (~55 %) (VIDAL et al., 2013). No Brasil, a taxa de mortalidade varia de 26 – 70 % (MEZZARI; WLIBBELLING, 2013; MORA et al., 2012; SOUZA et al., 2013). Em estudo recente foi observado casos de criptococose em 85 % dos pacientes HIV-positivos, com taxa de 58,5 % de mortalidade mesmo com os pacientes recebendo tratamento (AGUIAR et al., 2017). Embora o aumento do acesso à terapia com antirretrovirais tenha resultado em uma redução substancial na incidência de meningite por *Cryptococcus* spp. em países de alta renda, essas infecções provavelmente se mantêm como uma das principais causas de mortalidade relacionada com HIV em países de baixa e média renda, onde o tratamento antirretroviral é insuficiente/indisponível e tem início em fase avançada do HIV/AIDS (LOYSE et al., 2013).

3.1.3 Infecção e Patogênese

A infecção por *Cryptococcus* ocorre pela inalação de leveduras ou esporos presentes no ambiente, podendo causar a doença pulmonar, onde a infecção pode permanecer de forma latente ou oligossintomática por um longo período. Os casos podem evoluir com disseminação hematogênica, com predileção especial pelo sistema nervoso central (SNC). Adicionalmente, pode levar a infecções envolvendo quaisquer órgãos como a pele, os ossos, os olhos, os pulmões, a próstata ou o trato urinário, sinal grave de disseminação do fungo (Figura 1) (LIN; HEITMAN, 2006; LIN, 2009; O'MEARA; ANDREW ALSPAUGH, 2012; SLOAN; PARRIS,

2014). A criptococose vem assumindo papel relevante por ser considerada uma das micoses mais comuns em pacientes com AIDS, produzindo lesões, principalmente, no SNC (LIN; HEITMAN, 2006).

Figura 1. Ciclo de infecção de *Cryptococcus* spp.



O fungo sobrevive no ambiente dentro do solo (comumente contaminado com fezes de aves) e árvores. A infecção pulmonar humana ocorre pela inalação de esporos ou leveduras dessecadas presentes no ambiente. O fungo pode se reativar a partir de formas latentes e se disseminar, tendo predileção pelo sistema nervoso central (SNC) (LIN; HEITMAN, 2006).

É importante ressaltar que a espécie *C. neoformans* atinge, principalmente, os pacientes imunocomprometidos, enquanto que a espécie *C. gattii* pode, também, acometer os indivíduos imunocompetentes. *C. neoformans* causa infecção principalmente no SNC e apenas 35 % dos pacientes tem infecção pulmonar; por outro lado, *C. gattii* dissemina menos no SNC e aproximadamente 70 % dos casos de criptococose causados por *C. gattii* incluem evidência de infecção pulmonar (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012). Cheng e colaboradores (2009) avaliaram as respostas do hospedeiro a *C. neoformans* (H99) e *C. gattii* (R265) em modelo murino e observaram que *C. gattii* suprimiu as respostas imunes do hospedeiro de forma mais eficaz do que *C. neoformans* sugerindo explicar parcialmente por que *C. gattii* infecta pacientes imunocompetentes mais prontamente do que *C. neoformans* (CHENG; SHAM; KRONSTAD, 2009). Outro estudo observou em modelo murino de inalação que *C. neoformans* cresceu mais rapidamente no cérebro e causou morte por meningoencefalite, enquanto *C. gattii* cresceu mais rapidamente nos pulmões e causou a morte sem produzir meningoencefalite fulminante (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012). No entanto, quando a infecção foi realizada por

inoculação intravenosa *C. gattii* produziu meningoencefalite grave, demonstrando que as leveduras podem atravessar de forma eficaz a barreira hematoencefálica. Além disso, os autores observaram que leveduras de *C. neoformans* cresceram 10 a 100 vezes mais rápido que as de *C. gattii* no sangue ou no soro coletado e sugerem que a escassez de meningoencefalite por inalação de *C. gattii* pode ser em parte devido a um fator desconhecido do hospedeiro, juntamente com proteção imunológica que reduz a disseminação para o cérebro e promove a infecção pulmonar (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012).

Os pacientes com meningite criptocócica apresentam como sintomas, mais tipicamente, dor de cabeça, estado mental alterado, bem como febre, náusea e vômito. Muitos pacientes desenvolvem deterioração da visão e paralisia do nervo ótico (frequentemente devido ao aumento da pressão do líquido cefalorraquidiano). Sem tratamento a doença progride e os sintomas se estendem à confusão, convulsões, redução do nível de consciência e, eventualmente, coma (SCHWARTZ et al., 2018; WILLIAMSON et al., 2016). Muitos pacientes também tem infecção pulmonar concomitante embora, nos pacientes com HIV, isso seja frequentemente negligenciado ou diagnosticado erroneamente como tuberculose. E em pacientes sem infecção por HIV a apresentação clínica pode ser influenciada por respostas imunes do hospedeiro em particular e pelas espécies de fungo ou diferenças de linhagem. Além disso, em pacientes com HIV a duração média desde o início dos sintomas até a apresentação da doença é de 2 semanas, enquanto que em pacientes sem HIV é de 6 a 12 semanas (WILLIAMSON et al., 2016).

Além dos humanos, *Cryptococcus* spp. pode causar infecções em uma ampla gama de animais domésticos e selvagens. *C. neoformans* já foi identificado em invertebrados inferiores, como amebas, nematóides, baratas e ácaros que habitam o solo, até mamíferos superiores. Os gatos são os animais mais frequentemente infectados com o envolvimento do trato respiratório superior e inferior, granuloma subcutâneo e infecções disseminadas. Os cães podem apresentar sintomas semelhantes, mas o envolvimento do SNC é mais comum. Além disso, tem sido relatada criptococose causadora de mastite em animais leiteiros e infecções respiratórias em equinos (SEYEDMOUSAVI et al., 2018). Já *C. gattii* foi isolado de diferentes espécies de animais, incluindo gatos, cães, mamíferos marinhos, furões e lhamas nas regiões afetadas pelo surto que começou na Ilha de Vancouver e, posteriormente, se espalhou para as regiões Noroeste do Pacífico dos Estados Unidos. Infecções no trato respiratório superior e massas subcutâneas foram as lesões primárias mais frequentes, mas em vários casos o SNC, o tecido linfático, os pulmões, a cavidade oral e os olhos foram afetados. Entre os animais de estimação,

observou-se um maior número de acometimento do SNC em cães, enquanto massas subcutâneas foram mais frequentes em gatos (SEYEDMOUSAVI et al., 2018).

3.1.4 Fatores de virulência

Dentre os principais fatores de virulência de *C. neoformans* e *C. gattii*, que contribuem para a patogênese da criptococose, destacam-se a termotolerância, os componentes da parede celular e da cápsula de mucopolissacarídeo, presença de melanina, a capacidade de adesão, a produção de enzimas como as fosfolipases, proteinases, esterases DNAses e ureases (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; LIN; HEITMAN, 2006). Adicionalmente, a capacidade de formar biofilmes, a morfogênese e a produção de vesículas extracelulares tem sido relatadas como importantes aspectos para a patogênese e a disseminação da doença.

Tanto no ambiente como no hospedeiro infectado, *Cryptococcus* produz uma cápsula polissacarídica característica, constituída principalmente pelos açúcares glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM). Esta cápsula pode proteger o fungo da dessecação ambiental e/ ou predadores naturais, tal como nematoides ou amebas. No hospedeiro, a cápsula tem muitas funções de proteção, incluindo a redução das respostas imunes por regulação negativa de citocinas inflamatórias, esgotando os componentes do complemento e inibição da capacidade de apresentar antígeno de monócitos. A cápsula pode também atuar como um escudo na parede da célula para regular a fagocitose pelos macrófagos. Uma vez no interior de macrófagos, a cápsula serve como um dissipador de espécies reativas de oxigênio geradas pelo hospedeiro, assim proporcionando defesas antioxidantes eficazes (O'MEARA; ANDREW ALSPAUGH, 2012). A espessura da cápsula varia de acordo com o microambiente ao seu redor, sendo que cápsulas com maior espessura contribuem mais para a sobrevivência de *Cryptococcus* no hospedeiro. Porém, linhagens acapsulares podem ser capazes de expressar virulência e causar criptococose em pacientes susceptíveis (ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004).

O componente capsular, GXM liberado pela célula de *Cryptococcus*, é essencial para a formação de biofilme (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005) uma característica associada com as infecções crônicas que resulta a resistência aos mecanismos imunológicos do hospedeiro (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006a) e da ação dos agentes antifúngicos (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006b). *C. neoformans* forma biofilmes em placas de poliestireno (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005) e em materiais médicos-hospitalares, incluindo cateter de desvio arteriovenoso, fístula de diálise peritoneal, válvulas cardíacas e articulações protéticas

(BANERJEE; GUPTA; VENUGOPAL, 1997; BRAUN et al., 1994; WALSH et al., 1986). O aumento do uso destes dispositivos para o controle da hipertensão intracraniana associada a meningoencefalite criptocócica realça a importância de se investigar as propriedades dos biofilmes de *Cryptococcus*. Autores têm mostrado que células do biofilme de *C. neoformans* são menos susceptíveis ao estresse ambiental, como calor, frio e exposição aos raios UV, quando comparados com as células planctônicas (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007). Com avanços tecnológicos, estudos mostram alterações na expressão proteica do biofilme, quando comparado com células planctônicas, como o aumento de várias proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, adesão celular, invasão no hospedeiro e regulação de metabolismo. As proteínas envolvidas no estresse oxidativo e relacionadas à invasão tecidual foram super-reguladas, contribuindo para a resistência e dispersão do biofilme (SANTI et al., 2014).

A produção de melanina é um importante fator de virulência que confere ao patógeno resistência à fagocitose, termotolerância, proteção contra radiação ultravioleta e resistência a antifúngicos (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003). Células fúngicas melanizadas apresentam menor susceptibilidade à anfotericina B e à caspofugina, interferindo na efetividade do tratamento para criptococose (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). Esses pigmentos são de cor preta ou marrom e são resultado da atividade da lacase (BORAL et al., 2018). *Cryptococcus* sintetiza a melanina quando substratos como L-DOPA, monofenol, difenol e esculina estão presentes e existe uma correlação positiva entre a atividade da lacase e a sobrevivência do fungo no líquido cefalorraquidiano humano (SABIITI et al., 2014). O cérebro é enriquecido em DOPA e, portanto, *Cryptococcus* pode usá-lo durante infecções cerebrais para se proteger de danos oxidativos (BORAL et al., 2018; LIU et al., 2008).

Cryptococcus spp. produz várias lipases, proteases e DNases, durante o processo de infecção, essas enzimas degradativas contribuem para a virulência, destruindo os tecidos, promovendo a sobrevivência dos fungos e interferindo na efetividade das respostas imunes do hospedeiro (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015). Fosfolipases e proteases auxiliam na aderência, entrada e disseminação do fungo nos tecidos do hospedeiro por lisar componentes externos das membranas celulares e degradar proteínas como colágeno, imunoglobulinas e fatores do complemento (COLEMAN et al., 2011). A urease catalisa a hidrólise de uréia em amônia, a qual por ser tóxica para células de mamíferos enfraquece a parede endotelial da barreira hematoencefálica facilitando a entrada do patógeno no SNC (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015; OLSZEWSKI et al., 2004).

Vesículas extracelulares foram caracterizadas em diferentes fungos, elas estão relacionadas a diversos processos biológicos das células por conter várias enzimas envolvidas em vias metabólicas como a biossíntese de aminoácidos, o metabolismo dos ácidos graxos, e outros (ZAMITH-MIRANDA et al., 2018). Em *Cryptococcus* essas vesículas também têm relação com a patogênese, sendo responsáveis por exportar o componente glucuronoxilomanana (GXM) da cápsula, muitas proteínas associadas à virulência como lacase e urease e, também, RNA fúngico. Vesículas extracelulares mostram ter efeito sobre as células hospedeiras resultando em expressão de citosinas (TAYLOR-SMITH; MAY, 2016; ZAMITH-MIRANDA et al., 2018) e têm demonstrado aumentar a invasão criptocócica do SNC (HUANG et al., 2012). Além disso, podem ter papel na comunicação patógeno-patógeno durante a infecção (BIELSKA et al., 2018).

Outro fator importante na patogênese de *Cryptococcus* está relacionado com mudanças na morfologia das células. Normalmente a grande maioria das células encontradas durante a infecção são leveduriformes, no entanto há grande variação no tamanho dessas células. Células típicas de *C. neoformans* têm 5 a 7 μm de diâmetro, mas células de 50-100 μm podem ser encontradas *in vivo*, e são chamadas de “células titan” (TREVIANO-CONTADOR; RUEDA; ZARAGOZA, 2016). As “células titan” são caracterizadas, além do tamanho, por serem poliploides, terem parede celular espessa e uma cápsula significativamente mais densa (MUKAREMERA et al., 2018). Essas alterações são importantes para a sobrevivência no hospedeiro pois reduzem a fagocitose, podem proliferar e produzir progênie de células virulentas de tamanho normal e essas células apresentarem reduzida suscetibilidade a fatores de estresse, fornecendo novos mecanismos para adaptação do hospedeiro e evasão imune. Além disso, as “células titan” podem sobreviver no hospedeiro por longos períodos de tempo, sem causar doença, como uma forma latente (TAYLOR-SMITH; MAY, 2016; TREVIANO-CONTADOR; RUEDA; ZARAGOZA, 2016).

3.2 Antifúngicos

Até a década dos anos 70 do século passado, os agentes antifúngicos disponíveis para terapia eram os polienos e 5-fluorocitosina (BUTTS; KRYSAN, 2012). Com o surgimento maciço de doenças fúngicas associadas à AIDS na década de 1980 e ao uso crescente de terapias médicas imunossupressoras, houve a necessidade da busca de novos agentes antifúngicos (ODDS; BROWN; GOW, 2003). Atualmente, cinco classes principais de agentes antifúngicos são comumente usadas: azóis, equinocandinas, polienos, alilaminas e análogos de pirimidinas (CAMPOY; ADRIO, 2017). No entanto, o arsenal terapêutico é limitado por problemas de

seletividade, alta toxicidade e perfis de resistência dos fungos aos antifúngicos disponíveis. No caso da terapia das criptococoses, é ainda mais reduzida, sendo a anfotericina B (AMB) e suas formulações lipídicas, fluconazol (FLC) e a combinação de AMB e 5-flucitosina (5-FC), as terapias indicadas (PERFECT et al., 2010).

O tratamento da meningite criptocócica consiste em três fases: indução, consolidação e manutenção. As diretrizes da Sociedade de Doenças Infecciosas da América e da Organização Mundial da Saúde enfatizam a importância de fármacos fungicidas potentes durante a terapia de indução, sendo o regime primário indicado a AMB (0,7–1 mg/kg/dia) e 5-FC (100 mg/kg/dia) durante 2 semanas. Como regimes alternativos quando o regime primário não está disponível é indicado uso de AMB (0,7–1 mg/kg/dia) ou suas formulações lipídicas: AMB lipossomal (3-4 mg/kg/dia) ou complexo lipídico de AMB (ABLC) (5 mg/kg/dia) durante 4 – 6 semanas; AMB (0,7–1 mg/kg/dia) e FLC (800 mg/dia) por 2 semanas; ou FLC (800–2000 mg/dia, preferencialmente 1200 mg/dia) durante 10 – 12 semanas. A fase de consolidação é realizada com uso de FLC (400 mg/dia) por 8 semanas; e a manutenção do tratamento com FLC (200 mg/dia) por 1 ano ou mais dependendo do paciente (MAZIARZ; PERFECT, 2016; PERFECT et al., 2010; SLOAN; PARRIS, 2014). Nos casos de criptococose pulmonar leve a moderada é indicado uso de fluconazol (400 mg/dia) por 6 a 12 meses; e quando a infecção é severa o paciente recebe o mesmo tratamento da meningite criptocócica (PERFECT et al., 2010).

A AMB pertence à classe dos antifúngicos poliênicos e possui um amplo espectro de ação. O primeiro mecanismo de ação descrito é a ligação da molécula de AMB ao ergosterol de membrana, induzindo a formação de poros e o sequestro de ergosterol, levando ao aumento da permeabilidade da membrana fúngica aos cátions (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}), o que promove a rápida depleção de íons intracelulares e morte celular fúngica (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012; NETT; ANDES, 2016). Também foi demonstrado que o AMB causa morte das células por induzir dano oxidativo; o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) causam alterações em diferentes macromoléculas (proteínas, lipídios e DNA), causando danos celulares e morte (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012; MESA-ARANGO et al., 2014). Apesar da AMB ser considerada antifúngico padrão ouro para muitas infecções, o seu uso tem sido limitado devido ao seu alto grau de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010).

A flucitosina (5-fluorocitosina ou 5-FC) é um análogo de pirimidina que é importado para o citosol pela citosina permease fúngica e convertido em fluorouracil pela citosina

desaminase. O fluorouracil prejudica a síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA), acabando por interferir na síntese proteica (NETT; ANDES, 2016; ODDS; BROWN; GOW, 2003). A atividade da 5-FC é limitada às leveduras patogênicas (*Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.), mas seu uso em monoterapia não é indicado pois ocorre desenvolvimento de resistência rapidamente, frequentemente relacionada à diminuição da captação da droga pela citosina permease. Além disso, possui toxicidade para a medula óssea e toxicidade hepática (NETT; ANDES, 2016). O custo e a disponibilidade, também, são um desafio no uso da 5-FC que não está disponível em vários países, como África (LOYSE et al., 2013) e Brasil (AGUIAR et al., 2017).

Os agentes antifúngicos azólicos são divididos em duas classes, os imidazóis (clotrimazol, cetoconazol, miconazol e outros) e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol) que são denominados de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azólico. O principal efeito desses antifúngicos é inibir a 14 α -desmetilação do lanosterol na via biossintética do ergosterol; em que há a depleção de ergosterol na membrana citoplasmática dos fungos e o acúmulo de esteróis tóxicos (do tipo 14 α -metil-3,6-diol) alterando a permeabilidade e fluidez e, conseqüentemente, inibindo o crescimento fúngico (NETT; ANDES, 2016; ODDS; BROWN; GOW, 2003). O fluconazol (FLC) é utilizado para tratamento/supressão prolongada da criptococose e, em locais com poucos recursos, a monoterapia com FLC constitui o principal tratamento primário, frequentemente resultando em desenvolvimento de isolados de *Cryptococcus* de suscetibilidade reduzida ao FLC por meio de pressões seletivas (CHEONG; MCCORMACK, 2013; SMITH et al., 2015). Normalmente essa resistência ocorre por mutação no gene ERG11 (CnCYP51) resultando na substituição do aminoácido G484S na enzima alvo e conseqüente alteração da afinidade do fármaco com a enzima; também a superexpressão do gene CnAFR1, que codifica bombas de efluxo na membrana e reduz a quantidade de FLC celular diminuindo a suscetibilidade (ESPINEL-INGROFF et al., 2012).

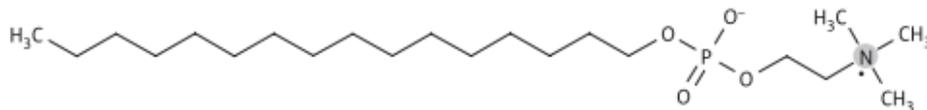
Existem pesquisas por novos compostos de origem natural ou sintética para ampliar o arsenal de agentes antifúngicos. No entanto, o reposicionamento de fármacos está se tornando um caminho cada vez mais popular na descoberta de novas terapias. Se refere ao estabelecimento de uma nova indicação para um fármaco que já tenha sido previamente aprovado para outra finalidade. O reposicionamento oferece benefícios atraentes, já que os perfis toxicológicos e farmacocinéticos foram estabelecidos anteriormente, acelerando o tempo

de desenvolvimento e evitando custos substanciais associados a dispendiosos testes clínicos (TRUONG et al., 2018).

3.3 Miltefosina

A miltefosina (MFS) pertence à classe das alquilfosfocolinas, são ésteres de fosfocolina de álcoois alifáticos de cadeia longa (Figura 2). Sua fórmula molecular é $C_{21}H_{46}NO_4P$, resultando em um peso molecular de 407,57 g/mol. A MFS é um composto anfifílico e zwitteriônico devido ao grupo amina quaternária carregada positivamente (permanentemente carregada) e ao grupo fosfórico carregado negativamente. Além disso, é um composto cristalino e prontamente dissolúvel em solventes aquosos e orgânicos (DORLO et al., 2012a).

Figura 2. Fórmula estrutural da miltefosina (MFS).



Fonte: DORLO et al., 2012a

Essa molécula foi sintetizada e avaliada, na década de 80, de forma independente como potencial droga antitumoral na Alemanha e como uma droga anti-*Leishmania* no Reino Unido (CROFT; ENGEL, 2006). Foram priorizados estudos da atividade da MFS em células de câncer, o que levou a aprovação de uma formulação tópica de MFS (Miltex®) como tratamento local para metástases cutâneas de câncer de mama (CROFT; ENGEL, 2006). Como a atividade antiparasitária também foi promissora *in vitro* sobre parasitas de *Leishmania*, estudos levaram a aprovação do uso oral da MFS no tratamento de Leishmaniose visceral na Índia em 2002 (DORLO et al., 2012a). Atualmente, a MFS é efetiva em casos de leishmaniose visceral e cutânea e está aprovada, na administração por via oral, na Argentina, Bangladesh, Bolívia, Colômbia, Equador, Alemanha, Guatemala, Honduras, Índia, México, Paquistão, Paraguai e Peru; embora tenha problemas de toxicidade (CROFT; BARRETT; URBINA, 2005; PACHIONI et al., 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). No Brasil, em 2016, a MFS foi aprovada para tratamento de Leishmaniose visceral canina (Milteforan®). Além da atividade anti-*Leishmania*, estudos *in vitro* tem mostrado efeito contra outras espécies de protozoários como *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis*, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum*, e amebas patogênicas *Entamoeba histolytica*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia*

mandrillaris, e *Acanthamoeba*; além de atividade antibacteriana e contra o vírus HIV (BLAHA et al., 2006; DORLO et al., 2012a; EISSA et al., 2011; PACHIONI et al., 2013; WALOCHNIK et al., 2002; WERNSDORFER et al., 2001).

Trabalhos demonstram que a MFS possui atividade antifúngica frente a diferentes gêneros de fungos (Tabela 1). Tong et al. (2007) mostraram atividade antifúngica da MFS sobre diferentes espécies de dermatófitos, enquanto Widmer et al. (2006) sobre espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus*. Em 2013, Vila et al. demonstraram a atividade inibitória sobre os biofilmes de *C. albicans*, também observando inibição sobre biofilmes de *C. albicans* e *F. Oxysporum* em unhas e em biofilme causado por candidíase oral em modelo murino (VILA; QUINTANILHA; ROZENTAL, 2015; VILA et al., 2015). Recentemente, foi demonstrada a atividade antifúngica da MFS sobre *Paracoccidioides* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides posadasii*, *Sporothrix* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Scedosporium* spp. e *Pythium* spp. (BORBA-SANTOS et al., 2015; BRILHANTE et al., 2014, 2015; COMPAIN et al., 2015; IMBERT et al., 2014; ROSSI et al., 2017; LORETO et al., 2018).

Tabela 1. Atividade inibitória da miltefosina (MFS) sobre diferentes gêneros de fungos.

Fungo	Faixa de CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Referência
<i>S. cerevisiae</i>	1 – 4	(ZUO et al., 2011)
<i>Candida albicans</i>	0,5 – 4	(RAVU et al., 2013; VILA; QUINTANILHA; ROZENTAL, 2015; VILA et al., 2013, 2015; WIDMER et al., 2006)
<i>Candida parapsilosis</i>	2 – 8	(WIDMER et al., 2006)
<i>Candida glabrata</i>	2 – 4	(RAVU et al., 2013; WIDMER et al., 2006)
<i>Candida krusei</i>	2 – 4	(RAVU et al., 2013; WIDMER et al., 2006)
<i>Candida tropicalis</i>	2 – 4	(WIDMER et al., 2006)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,25 – 4	(RAVU et al., 2013; WIDMER et al., 2006)
<i>Cryptococcus gattii</i>	0,5 – 2	(WIDMER et al., 2006)
<i>Aspergillus</i> spp.	2 – 32	(BISWAS et al., 2013a; IMBERT et al., 2014; WIDMER et al., 2006)
<i>Fusarium</i> spp.	1 – 16	(BISWAS et al., 2013a; IMBERT et al., 2014; VILA; QUINTANILHA; ROZENTAL, 2015; WIDMER et al., 2006)

<i>Scedosporium</i> spp.	2 - >32	(BISWAS et al., 2013a; COMPAIN et al., 2015; IMBERT et al., 2014; WIDMER et al., 2006)
<i>Bipolaris australiensis</i>	2 – 4	(WIDMER et al., 2006)
<i>Exophiala</i> spp.	2 – 4	(WIDMER et al., 2006)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	2 – 4	(WIDMER et al., 2006)
<i>Absidia corymbifera</i>	2 – 16	(BISWAS et al., 2013a; WIDMER et al., 2006)
<i>Rhizopus</i> spp.	2 – 64	(WIDMER et al., 2006)
<i>Cunninghamella bertholletia</i>	2 – 4	(WIDMER et al., 2006)
<i>Mucor</i> spp.	8	(BISWAS et al., 2013a)
<i>Rhizomucor</i> sp.	2	(BISWAS et al., 2013a)
<i>Trichophyton</i> spp.	0.25 – 2	(TONG et al., 2007)
<i>Microsporum</i> spp.	0.25 – 2	(TONG et al., 2007)
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	0,5 – 2	(BORBA-SANTOS et al., 2015; BRILHANTE et al., 2014)
<i>Sporothrix schenckii</i>	1 – 2	(BRILHANTE et al., 2014)
<i>Sporothrix mexicana</i>	1 – 4	(BRILHANTE et al., 2014)
<i>Sporothrix globosa</i>	2 – 4	(BRILHANTE et al., 2014)
<i>Histoplasma capsulatum</i> (micélio)	0,25 – 4	(BRILHANTE et al., 2014)
<i>Histoplasma capsulatum</i> (levedura)	0,125 – 2	(BRILHANTE et al., 2014)
<i>Coccidioides posadasii</i> (micélio)	1 – 4	(BRILHANTE et al., 2015)
<i>Paracoccidioides</i> spp.	0,12 – 1	(ROSSI et al., 2017)
<i>Pythium</i> spp.	0,5 – 4	(LORETO et al., 2018)

Em células tumorais a MFS atua inibindo a proteína kinase C e a biossíntese de fosfatidilcolina e esfingomiéline, mas o mecanismo de ação sobre os parasitas de *Leishmania* spp. ainda não está totalmente elucidado. Alguns estudos mostram que a miltefosina altera o metabolismo de lipídios e a composição das membranas de *Leishmania* spp., causa perturbação na homeostase de Ca^{2+} , causa morte celular pelo processo de apoptose (via citocromo c mitocondrial e fragmentação do DNA) e, também, apresenta efeito imunomodulador no hospedeiro (DORLO et al., 2012a; PINTO-MARTINEZ et al., 2018).

Em fungos, poucos estudos de mecanismo de ação da MFS têm sido realizados. Widmer et al. (2006) demonstraram ação inibitória da MFS sobre a fosfolipase B1 (PLB1) por ser uma substância análoga aos substratos dessa enzima e um importante fator de virulência de *C. neoformans*. Em 2014, Biswas e colaboradores, demonstraram que o efeito fungicida em

Sacharomyces cerevisiae é causado pela quebra do potencial de membrana da mitocôndria e morte celular por apoptose via subunidade Cox9p do citocromo oxidase c (COX). Recentemente, grupos de pesquisa tem observado o rompimento da membrana plasmática de leveduras de *Sporothrix brasiliensis* (BORBA-SANTOS et al., 2015) e de *Paracoccidioides* spp. (ROSSI et al., 2017); e inibição da síntese do ergosterol em *C. posadasii* e *H. capsulatum* (BRILHANTE et al., 2015). Além disso, estudos observaram a presença de grânulos de melanina em leveduras de *S. brasiliensis* (BORBA-SANTOS et al., 2015) e *Paracoccidioides* spp. (ROSSI et al., 2017) após a exposição com concentrações sub-inibitórias de MFS, sugerindo que esteja interferindo no metabolismo da melanina. MFS, de modo geral, apresenta amplo espectro de atividade e efeito fungicida; e desta forma, poucos estudos sobre mecanismos de resistência têm sido realizados. Entretanto, uma cepa de *S. cerevisiae* super-expressora de transportador de hexoses (gene HXT13) apresentou menor sensibilidade a MFS (BISWAS et al., 2013b).

Poucos estudos sobre a atividade antifúngica da MFS em modelos experimentais de infecção fúngica tem sido realizados. Widmer et al. (2006) demonstraram atividade *in vivo* em modelo de criptococose disseminada (infecção pela veia caudal e início do tratamento oral após 1,5 h da infecção) em doses efetivas de 7,2 e 3,6 mg/Kg/dia, mostrando aumento da sobrevivência e redução da carga fúngica nos pulmões e redução da disseminação do fungo para o SNC quando comparado com grupo controle infectado não tratado. Por outro lado, Wiederhold et al., (2013) avaliaram a atividade da MFS em modelo murino de criptococose disseminada e de meningoencefalite criptocócica obtida por infecção diretamente no cérebro; entretanto, este fármaco não foi capaz de reduzir significativamente a mortalidade dos camundongos e a carga fúngica no cérebro (início do tratamento após 1 dia após a infecção). É sabido que a absorção pelo trato gastrointestinal da miltefosina é baixa (taxa de 0,36 h²) e que se liga às proteínas plasmáticas do soro (96-98 %), o que pode explicar, em parte, a falta de atividade *in vivo* observada neste estudo por haver apenas uma pequena fração da droga disponível no organismo para agir no local da infecção (DORLO et al., 2012a; WIEDERHOLD et al., 2013). Além disso, ainda permanece desconhecido se a MFS consegue passar pela barreira hematoencefálica (DORLO et al., 2012a), o que seria mais uma característica impeditiva no controle, principalmente, da meningoencefalite.

Apesar de a MFS ser o fármaco de escolha para tratamento das leishmanioses, câncer de mama e muitos trabalhos tem demonstrado atividade antifúngica contra diferentes espécies; essa droga apresenta algumas desvantagens farmacocinéticas (como descritas em parágrafo

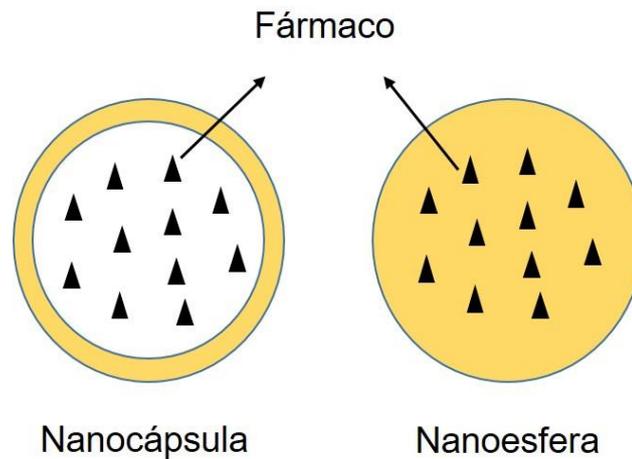
anterior) e de toxicidade que pode dificultar a sua utilização. A elevada toxicidade como os efeitos gastrointestinais (náuseas, vômito, diarreia) estão relacionados com a administração oral da MFS e das propriedades detergente da droga que afetam a mucosa gastrointestinal. Outras toxicidades relacionadas com MFS, frequentemente, observadas estão associadas principalmente com os rins e o fígado. Níveis séricos elevados de creatinina e de ambas enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartatoaminotransferase (AST) tendem a aumentar nas primeiras semanas de tratamento. Adicionalmente, observa-se efeito teratogênico e elevada atividade hemolítica (similar a anfotericina B deoxicolato) (revisado por DORLO et al., 2012a).

3.4 Sistemas carreadores de fármacos

O interesse em formulações farmacêuticas, onde a liberação do fármaco pode ser controlada, vem aumentando constantemente nos últimos 50 anos. Na maioria dos casos o objetivo é criar um produto que mantenha um efeito terapêutico prolongado em uma frequência de dosagem reduzida (TØNNESEN; KARLSEN, 2002). Vários sistemas carreadores de fármacos têm sido empregados na pesquisa de liberação de fármacos para melhorar o fornecimento direcionado de medicamentos, solubilidade, tempo de retenção no organismo, estabilidade de fármacos lábeis, liberação controlada do fármaco e maior biodisponibilidade devido ao fato de que sistemas carreadores na faixa nanométrica são eficientes em atravessar barreiras biológicas além de minimizar efeitos adversos, incluindo riscos de toxicidade (JEEVANANDAM; CHAN; DANQUAH, 2016; KUMAR et al., 2013; PANDEY et al., 2005).

Existem diferentes tipos de sistemas de liberação como dendrímeros, nanopartículas, lipossomas, nanoemulsões e micelas (JEEVANANDAM; CHAN; DANQUAH, 2016). As nanopartículas, por definição geral, variam em tamanho de 10 a 1000 nm e o fármaco é dissolvido, aprisionado, encapsulado ou ligado a uma matriz (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008). Essas por sua vez, podem ser nanocápsulas ou nanoesferas; nanocápsulas são sistemas vesiculares nos quais o fármaco está confinado a um núcleo líquido oleoso ou aquoso circundado por uma membrana polimérica, enquanto que as nanoesferas são partículas esféricas com um interior de matriz no qual o componente aprisionado é fisicamente disperso (PAQUES et al., 2014; SAHOO; LABHASETWAR, 2003) (Figura 3).

Figura 3. Representação de nanocápsulas e nanoesferas.



Fonte: modificado de SAHOO; LABHASETWAR, (2003)

Os sistemas baseados em polímeros têm atraído atenção significativa, pois oferecem diversas vantagens em relação as outras plataformas, principalmente devido à enorme versatilidade das matrizes poliméricas, que permite a adaptação das propriedades do transportador para atender à necessidade específica pretendida. Outras vantagens dos sistemas poliméricos incluem facilidade de produção, alta eficiência de encapsulação da molécula de interesse, proteção do fármaco contra degradação físico-química, flexibilidade de suas propriedades físico-químicas (como tamanho, carga superficial e hidrofobicidade), degradação lenta ou rápida do polímero e erosão do polímero em resposta a estímulos para controle temporal sobre a liberação dos fármacos (SPADARI; LOPES; ISHIDA, 2017; VOLTAN et al., 2016).

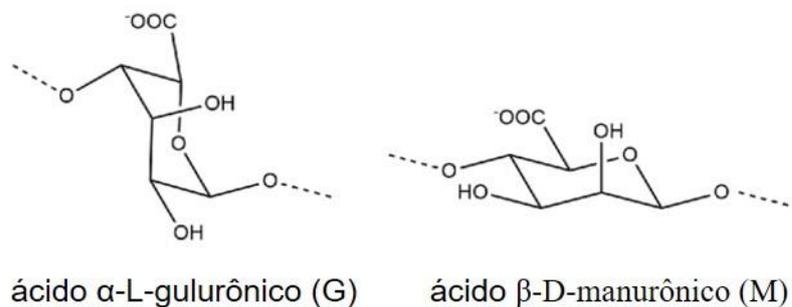
As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas com polímeros sintéticos como o ácido polilático (PLA) (TYLER et al., 2016), poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) (THOMAS et al., 2016), óxido de polietileno (PEG), poli(acetato de vinila) (PVA) (LI et al., 2015a); muitos polímeros naturais estão também sendo amplamente utilizados como alginato (ELSAYED; HUANG; EDIRISINGHE, 2015), quitosana (ISLAM; FERRO, 2016), gelatina (MAHOR et al., 2016) e dextran (GALLOVIC et al., 2016). Os polímeros naturais são vantajosos em comparação com os polímeros sintéticos devido à sua abundância na natureza, baixo custo de processamento, biocompatibilidade, biodegradabilidade, solubilidade em água, bioatividade e segurança ambiental (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016; SUNDAR; KUNDU;

KUNDU, 2010). Outra vantagem é que a estrutura dos polímeros naturais pode ser modificada para alcançar o efeito desejado (PAHUJA; ARORA; PAWAR, 2012).

3.5 Alginato

O interesse da comunidade científica pelo alginato para uso em sistemas de liberação de fármacos tem crescido ao longo da última década (SOSNIK, 2014). Ele é um polímero aniônico produzido por bactérias e algas marrons, constituído de ácidos α -L-gulurônico (G) e β -D-manurônico (M) com os resíduos linearmente ligados por ligações 1,4-glicosídicas (Figura 4) e exibindo homosequências de cadeia de MMMMM e GGGGG, interdispersas com heterosequências de MGMGMG (SOSNIK, 2014; SPADARI; LOPES; ISHIDA, 2017). O peso molecular é na faixa de 32-400 kg/mol, e variações na proporção e arranjos em cadeia dos blocos M e G podem ser encontrados dependendo do tipo de alga marinha da qual o alginato foi extraído (CARDOSO; COSTA; MANO, 2016; SOSNIK, 2014).

Figura 4. Estrutura molecular dos ácidos α -L-gulurônico (G) e β -D-manurônico (M) do polímero de alginato.



Fonte: SPADARI; LOPES; ISHIDA, 2017.

A extração do alginato de algas marrons é realizada com auxílio de soluções aquosas alcalinas, normalmente hidróxido de sódio, onde o alginato natural é convertido em alginato de sódio solúvel em água; esse extrato é filtrado e adicionado cloreto de sódio ou de cálcio para precipitar o alginato. Após purificação e conversões adicionais, o pó de alginato de sódio solúvel em água é produzido (LEE; MOONEY, 2012; QIN, 2008). Em peso seco, os teores de alginato obtidos são de 22 – 30 % para *Ascophyllum nodosum*, 25 – 44 % para *Laminaria digitata*, e 17 - 33 e 25 – 30 % para as frondes e caules, respectivamente, de *Laminaria hyperborea* (QIN, 2008). Outra fonte de alginato são bactérias *Azotobacter* e *Pseudomonas* que possuem a rota biosintética para produção desse polímero; no entanto, mesmo sob condições otimizadas de fermentação, os rendimentos de produção são bastante baixos (em torno de 4

g/L) e o processo não é considerado economicamente viável para aplicações comerciais (REMMINGHORST; REHM, 2006).

O alginato tem importantes características como não ser tóxico, ser biodegradável, ter baixo custo, estar prontamente disponível, ser mucoadesivo, biocompatível e uma substância não imunogênica (HOSSEINI et al., 2013; PAQUES et al., 2014). Outro fator importante é a habilidade desse polímero de formar estruturas tridimensionais quando em contato com cátions divalentes; esse mecanismo de gelificação é explicado pelo modelo “egg-box”, no qual um cátion divalente interage com 4 grupos carboxilas ($-\text{COOH}$) formando a estrutura tridimensional, podendo ser incorporado o fármaco desejado no interior dessa estrutura (SOSNIK, 2014). As partículas de alginato oferecem a flexibilidade de serem administradas por várias vias, incluindo a via oral, que continua a ser a mais indicada (PANDEY; KHULLER, 2004a, 2004b). Também, são bem absorvidas pelas mucosas (MARTÍN et al., 2015; MARTÍN-VILLENA et al., 2013) e possuem boa distribuição em vários órgãos, incluindo o sistema nervoso central (CHENG et al., 2012; HAQUE et al., 2014).

Além disso, agentes antifúngicos (azóis e polienos) têm sido incorporados em sistemas carreadores baseados em alginato, incluindo nanopartículas, micropartículas, hidrogéis, comprimidos e filmes, com grande sucesso mostrando resultados promissores *in vitro* e *in vivo* para atividade antifúngica, redução da toxicidade e da dose total do antifúngico usado no tratamento e melhor biodisponibilidade (Tabela 2) (SPADARI; LOPES; ISHIDA, 2017). Por exemplo, micropartículas de alginato contendo anfotericina B apresentaram melhor atividade no tratamento de candidíase sistêmica quando comparadas com o fármaco livre e, também, uma redução na dose total de medicamento utilizado para o tratamento (SANGEETHA et al., 2007). Econazol em micropartículas de alginato mucoadesivas foram efetivas inibindo o crescimento de *C. albicans*, sugerindo um efeito benéfico no tratamento de candidíase vulvovaginal com potencial redução na frequência de administração de doses (ALBERTINI et al., 2009). Martin et al. (2015) desenvolveram microesferas de alginato como transportadores de nistatina na mucosa oral para tratamento de candidíase oral e observaram ótimas propriedades mucoadesivas e efetiva atividade antifúngica.

Tabela 2. Sistemas carreadores de fármacos à base de alginato para agentes antifúngicos, azóis e políenos.

Antifúngico	Carreador	Objetivo terapêutico	Modelo experimental	Referência
Clotrimazol	Nanopartículas de alginato	Melhorar a biodisponibilidade	<i>In vivo</i> (rato)	(PANDEY et al., 2005)
	Filmes de alginato, hidroxipropilcelulose e propilenoglicol	Tratamento de candidíase vaginal	<i>In vitro</i>	(MISHRA; JOSHI; MEHTA, 2016)
Econazol	Nanopartículas de alginato	Melhorar a biodisponibilidade	<i>In vivo</i> (rato)	(PANDEY et al., 2005)
	Nanopartículas de alginato	Potencial quimioterapêutico contra a tuberculose	<i>In vivo</i> (rato)	(AHMAD; SHARMA; KHULLER, 2007)
Miconazol	Tabletes de alginato	Liberação lenta bucal	<i>In vitro e in vivo</i> (voluntário humano)	(MOHAMMED; KHEDR, 2003)
Fluconazol	Filmes de alginato e álcool polivinílico	Overcome the problems of high drug dose requirement and toxicity	<i>In vitro e ex vivo</i>	(PATEL; SHAH; TIWARI, 2015)
	Microesferas de etilcelulose com fase interna de alginato	Atividade contra <i>C. albicans</i>	<i>In vitro</i>	(MAITI et al., 2009)
	Filmes e discos mucoadesivos de alginato	Tratamento tópico para candidíase oral	<i>In vitro e in vivo</i> (voluntário humano)	(YEHA; EL-GAZAYERLY; BASALIOUS, 2008, 2009)
Voriconazol	Gel de alginato	Medicamento ocular contra <i>C. albicans</i> e <i>Asperigillus fumigatus</i>	<i>In vitro</i>	(PAWAR; EDGAR, 2012)
Anfotericina B	Nanoesferas de alginato	Tratamento de candidíase sistêmica	<i>In vitro e in vivo</i> (rato)	(SANGEETHA et al., 2007)
	Nanopartículas de alginato glycol e quitosana	Melhorar tratamento de leishmaniose visceral	<i>In vitro e in vivo</i> (hamster)	(GUPTA et al., 2015)
	Filmes de alginato	Tratamento de candidíase oral	<i>In vitro</i>	(COSSU et al., 2015)
	Anfotericina B lipídica revestida com alginato	Tratamento de leishmaniose visceral	<i>In vitro</i>	(SINGODIA et al., 2011)
Nistatina	“beads”, micro- e nanopartículas de alginato incorporados em creme dental	Tratamento de candidíase oral	<i>In vitro</i>	(REIS et al., 2015)
	Microesferas e hidrogel de alginato	Tratamento de candidíase oral	<i>In vitro e in vivo</i> (porco)	(MARTÍN et al., 2015)
	Micropartículas de alginato	Tratamento de candidíase vaginal	<i>In vitro e ex vivo</i>	(MARTÍN-VILLENA et al., 2013)

Fonte: SPADARI; LOPES; ISHIDA, 2017

4 CAPÍTULO I

Objetivo geral:

Avaliar a atividade antifúngica e os efeitos fisiológicos da miltefosina sobre leveduras de *Cryptococcus* spp.

Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade antifúngica da miltefosina sobre células planctônicas e de biofilme de *Cryptococcus* spp.;
- Analisar o efeito pós-antifúngico da miltefosina sobre as leveduras *Cryptococcus* spp.;
- Avaliar os efeitos morfológicos e fisiológicos da MFS sobre as leveduras de *Cryptococcus* spp.

Este capítulo gerou o artigo “Miltefosine has post-antifungal effect and induces apoptosis in *Cryptococcus* yeasts” Submetido em 14 de fevereiro de 2018 e aceito para publicação em 18 de maio de 2018 na revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Autores: Cristina de Castro Spadari, Taissa Vila, Sonia Rozental, Kelly Ishida.

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Microrganismos

Cryptococcus neoformans stricto sensu ATCC 208821 (ou H99), *Cryptococcus neoformans* CAP59 (mutante acapsular de H99), *Cryptococcus gattii* lato sensu ATCC 56990 e 5 isolados clínicos de cada espécie foram utilizados neste estudo. As cepas ATCC foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Susana Frases Carvajal (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, Brasil); E os isolados clínicos de *C. neoformans* lato sensu e *C. gattii* lato sensu, provenientes do líquido cefalorraquidiano, foram gentilmente cedidos pela Dra. Analy Salles do Laboratório Especial de Micologia (LEMI, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil). Os isolados estão estocados em glicerol a -80°C, são recuperados em meio Sabouraud dextrose, e mantidos em meio ágar Sabouraud a 4°C durante os ensaios. Antes de cada ensaio, as leveduras são duas vezes subcultivadas em Sabouraud dextrose por 72 h a 35°C.

4.1.2 Antifúngicos

Miltefosina (MFS, Cayman Chemical) e fluconazol (FLC, Sigma aldrich) foram mantidos como soluções estoques de 1.600 e 2.560 µg/mL, respectivamente, em água destilada estéril e a anfotericina B (AMB, Sigma aldrich) foi mantida como solução estoque de 1.600 µg/mL em Dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec). Todos os fármacos são armazenados a -20°C em solução estoque 100x mais concentrada que a solução de trabalho e diluídos para a concentração desejada antes da realização de cada experimento.

4.1.3 Concentração inibitória mínima (CIM-P) e concentração fungicida mínima (CFM-P) sobre células planctônicas

A CIM foi obtida através da técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2008). Previamente os isolados foram semeados em meio Sabouraud dextrose por 48-72 h a 35°C. Em seguida, as leveduras foram contadas em câmara de Neubauer e a suspensão fúngica ajustada para $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Os antifúngicos foram diluídos seriadamente (1:2) em meio RPMI 1640 tamponada com MOPS 0,165M em microplacas de 96 poços e fundo chato e 100 µL da suspensão fúngica adicionado aos poços obtendo uma concentração final de $0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL e as concentrações finais dos fármacos usados foram: MFS e AMB (16 a 0,031 µg/mL) e FLC (64 a 0,125 µg/mL). As microplacas foram incubadas a 35°C por 72 h. As menores concentrações de antifúngico que inibem 50 % e 90 % do crescimento fúngico foram

definidas como CI_{50} e CI_{90} , respectivamente. Os valores de CI_{50} e CI_{90} foram obtidos após a leitura espectrofotométrica a 492 nm (Epoch microplaca reader, Biotek) e confirmados visualmente. Os valores de CIM-P para o FLC foram definidos como valores de CI_{50} , para a AMB valores de CI_{90} (CLSI, 2008); e para MFS foi definido como CIM-P os valores de CI_{90} .

Posteriormente, alíquotas de 10 μ L de cada poço em que houve inibição de crescimento fúngico foram transferidas para ágar Sabouraud dextrose livre de fármaco, à 35°C por 72 h para determinar a CFM-P, a qual foi definida como a menor concentração do antifúngico na qual não houve crescimento fúngico (ISHIDA et al., 2006).

4.1.4 Concentração inibitória mínima sobre células do biofilme (CIM-B)

A atividade antibiofilme foi avaliada em células sésseis e em dispersão do biofilme pré-formado. Os isolados de *C. neoformans* (H99 and CAP59) e *C. gattii* (ATCC 56990) foram previamente cultivados em meio Sabouraud por 48-72 h a 35°C. As leveduras foram contadas em câmara de Neubauer e a suspensão fúngica ajustada para 1×10^7 UFC/mL em meio RPMI tamponado com MOPS 0,16 M. Em seguida, foi adicionado 100 μ L da suspensão nos poços de microplacas de 96 poços de fundo chato de poliestireno e incubado a 35°C sem agitação (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006a).

Depois de 48 h de formação do biofilme, o sobrenadante foi coletado e as células em dispersão do biofilme ajustadas para $1-5 \times 10^6$ UFC/ mL e a suscetibilidade à MFS foi determinada pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2008). Os valores de CIM-B_D (concentração inibitória mínima das células em dispersão do biofilme) foi definido como o valor de CI_{90} .

Para avaliar as células sésseis do biofilme os poços foram lavados 2 vezes com PBS e tratados com 100 μ L de solução de MFS (0.03 a 16 μ g/mL) por 48 h a 35°C. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e a atividade metabólica das células do biofilme foi determinada pelo método de redução do XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-car-boxanilide]. Para o ensaio do XTT uma alíquota de 100 μ L de uma solução de 0.1mg/mL de XTT com 10 μ M de menadiona em PBS foi adicionada aos poços da microplaca, esta foi incubada por 3 h a 37°C e protegida da luz. Após a microplaca foi centrifugada e 80 μ L do sobrenadante transferido para outra microplaca para a leitura da absorbância a 490 nm (LUIZ et al., 2015). Os valores de CIM-B_s (concentração inibitória mínima das células sésseis do biofilme) foi definido como o valor de CI_{90} .

4.1.5 Efeito pós-antifúngico (PAFE)

Suspensões fúngicas (1×10^4 UFC/mL) de *C. neoformans* (H99 e CAP59) e *C. gattii* (ATCC 56990) em meio RPMI 1640 com tampão MOPS 0,16 M foram expostas a MFS (CIM ou 4x CIM) por 1 h a 35°C. Posteriormente, MFS foi removida por centrifugação, as leveduras foram lavadas duas vezes com PBS e adicionado meio RPMI 1640 fresco. Leveduras não tratadas também foram incluídas no experimento (controle). As leveduras foram coletadas em vários tempos de incubação (0, 1, 4, 8, 12 e 24 h) e realizada diluição seriada (1:10) para posterior contagem de UFC após incubação das placas de Sabouraud a 35°C durante 72 h. O PAFE foi calculado como a diferença no tempo (em horas) necessário para o isolado não tratado e tratado com MFS crescer equivalente a um 1 log no número de UFC após a lavagem das células (ERNST; KLEPSEK; PFALLER, 2000).

4.1.6 Efeitos da miltefosina nas leveduras de *Cryptococcus* spp.

4.1.6.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A MET foi realizada com o isolado de *C. neoformans* H99. A suspensão de leveduras foi ajustada para 1×10^4 UFC/mL em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16 M, tratadas ou não com MFS na concentração subinibitória (1 µg/mL) por 72 h a 35°C. Após incubação as células foram coletadas por centrifugação e lavadas três vezes em PBS. Posteriormente, as leveduras foram fixadas com 2,5 % glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 2 h a temperatura ambiente. A pós-fixação foi realizada em 1 % de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato 0,1 M contendo 1,25 % de potássio ferrocianeto e 5 mM CaCl₂ por 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, as leveduras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30-100 %), seguido por 100 % de óxido propileno e embebidas em resina Spur. Secções ultrafinas foram coradas com acetato de uranila 5 % e citrato de chumbo a 0,5 %, e observadas em microscópio eletrônico de transmissão (modelo Jeol 100CX, JEOL, Japão).

4.1.6.2 Microscopia ótica

Leveduras de *Cryptococcus* spp. (1×10^4 UFC/mL) foram tratadas ou não com concentrações subinibitórias de MFS (1 µg/mL para *C. neoformans* H99 e 0,25 µg/mL para *C. gattii* ATCC 56990) em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16 M por 72 h a 35°C. Após o período de incubação as células foram misturadas com tinta da China e visualizadas no microscópio ótico e as imagens capturadas (microscópio invertido digital, Evos fl). Em seguida, 100 células de cada grupo tratado e não tratado (controle), foram analisadas usando o programa

ImageJ 1.49v (<https://imagej.nih.gov/ij/>). A medida da espessura da cápsula foi definida como a diferença entre o diâmetro total da célula (cápsula incluída) e o diâmetro do corpo da célula (definido pela parede celular) (ISHIDA et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010).

4.1.6.3 Curva do tempo de morte

Suspensões fúngicas padronizadas a 1×10^7 UFC/mL foram expostas a concentrações de CIM, 2x CIM e 4x CIM de MFS ou AMB diluídas em PBS e incubadas a 35°C. Após os períodos de 1, 4, 8 e 24 h de incubação as amostras foram diluídas seriadamente de 1:10 e plaqueadas em ágar Sabourand dextrose, incubadas por 72 h a 35°C e as UFC contadas para definir a curva do tempo de morte.

4.1.6.4 Permeabilidade da membrana plasmática

Suspensões fúngicas a 1×10^7 UFC/mL foram expostas a concentrações de CIM, 2x CIM e 4x CIM de MFS ou AMB diluídas em PBS e incubadas a 35°C. Leveduras não tratadas foram utilizadas como controle de integridade da membrana celular. Após os períodos de 1, 4, 8 e 24 h de incubação, as leveduras foram coletadas por centrifugação por 8 min a 13.000 g e o sobrenadante analisado no espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo scientific) para quantificação de DNA (260 nm) e de proteínas (280 nm) (DE AGUIAR CORDEIRO et al., 2014).

4.1.6.5 Influência de ergosterol exógeno na CIM

Um ensaio de competição usando ergosterol exógeno durante o ensaio de microdiluição em caldo foi realizado para determinar a atividade inibitória da MFS nestas condições. A CIM da MFS foi determinada de acordo com as orientações do CLSI, na presença e ausência de diferentes concentrações de ergosterol (Sigma aldrich) (50, 100, e 200 µg/mL) (MENDES DE TOLEDO et al., 2015). A AMB foi utilizada como antifúngico controle e a CIM determinada após 72 h de incubação a 35°C.

4.1.6.6 Avaliação do efeito da MFS com uso de marcadores fluorescentes

Leveduras de *C. neoformans* H99 a 1×10^7 CFU/mL em PBS foram expostas ou não a concentrações de 4x CIM e 8x CIM de MFS ou AMB. Após 24 h incubadas a 35°C as leveduras foram coletadas por centrifugação e lavadas com PBS e a suspensão fúngica ajustada para 1×10^6 UFC/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão foram marcados com diferentes fluorocromos

e analisados por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência. Para a citometria de fluxo, 100.000 eventos foram analisados por citômetro de fluxo (BD Accuri C6) e os dados processados usando o software BD Accuri C6. Para microscopia de fluorescência, as leveduras previamente marcadas foram aderidas em lâminulas de vidro revestidas com poli-L-lisina e montadas em lâmina contendo n-propilgalato para preservação da fluorescência. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (modelo DMI6000B/AF6000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e as imagens capturadas com câmera digital acoplada ao microscópio (modelo DFC 365 FX, Leica Microsystems).

Iodeto de propídeo (PI): para avaliar a permeabilidade da membrana plasmática, as leveduras foram fixadas com 2 % de paraformaldeído em PBS durante 30 minutos, lavadas com PBS e, em seguida, adicionado 100 µL de iodeto de propídeo (Invitrogen, Eugene, OR, EUA) a 5 µg/mL e incubadas durante 30 min no escuro e temperatura ambiente para análise no citômetro de fluxo.

Rodamina123: para analisar o potencial de membrana mitocondrial, as leveduras foram incubadas com 100 µL de rodamina123 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a 5 µg/mL durante 30 min no escuro a 35°C; lavadas com PBS, fixadas com 2 % de paraformaldeído durante 30 min no escuro e temperatura ambiente e avaliadas no citômetro de fluxo.

Diacetato de 2'7'-Diclorofluorescina (DCFH-DA): para quantificar as espécies reativas de oxigênio (ROS), 100 µL de DCFH-DA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a 40 µg/mL foram adicionados à suspensão fúngica. Após 30 min de incubação no escuro à temperatura ambiente, as leveduras foram lavadas com PBS e fixadas com 2 % de paraformaldeído em PBS durante 30 min no escuro e temperatura ambiente e avaliadas no citômetro de fluxo.

“Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling” (TUNEL): para avaliar a fragmentação de DNA, as leveduras foram fixadas com 2 % de paraformaldeído em PBS durante 30 min no escuro à temperatura ambiente, lavadas e permeabilizadas com 0,1 % de Triton X-100 durante 30 min à temperatura ambiente. As células foram lavadas e incubadas com TUNEL seguindo as recomendações do kit de ensaio APO-BrdUTM TUNEL (Invitrogen, Eugene, OR, EUA) e avaliada no citômetro de fluxo.

Hoechst 33342: para detectar condensação de cromatina, as leveduras foram fixadas com 2 % de paraformaldeído em PBS durante 30 min no escuro a temperatura ambiente, lavadas e coradas com 1 µg/mL de Hoechst 33342 (Invitrogen, Eugene, OR, EUA) durante 10 min e analisadas por microscopia de fluorescência.

4.1.7 Análise estatística

As análises estatísticas para a medida da espessura da cápsula foram realizadas pelo teste t de student e os dados obtidos pela citometria de fluxo foram avaliados pela análise de variância unidirecional (ANOVA) com teste Dunnett como pós-teste usando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). O nível de confiança de 95 % foi considerado significativo para todas as análises.

4.2 Resultados

4.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM-P) e concentração fungicida mínima (CFM-P) das células planctônicas

Os valores de CIM-P obtidos para os isolados de *Cryptococcus* spp. ficaram na faixa de 0,5 a 4 µg/mL para MFS, de 0,03 a 0,25 µg/mL para AMB e de 0,125 a 8 µg/mL para o FLC (Tabela 3). A MFS, assim como a AMB, apresentou atividade fungicida, ou seja, os valores de CFM estão próximos dos valores de CIM. Em contraste, os valores de CFM do fluconazol demonstram atividade fungistática (Tabela 3). Segundo Pfaller e colaboradores (2004), um antifúngico é fungicida se o valor CFM for igual ou 4 x maior que o valor da CIM, e se o valor da CFM for maior que 4 x a CIM o efeito antifúngico pode ser considerado fungistático.

4.2.3 Efeito pós-antifúngico (PAFE)

Após o tratamento com MFS durante 1h, foi observado PAFE para todos os isolados testados, embora não tenha sido observado PAFE após o tratamento de *C. gattii* com concentração de CIM de MFS (Figura 5). Os valores de PAFE variaram consideravelmente entre os três isolados de *Cryptococcus* spp. e aumentou com maiores concentrações de MFS (Figura 5). Com 4x CIM, o tratamento por 1h levou a uma perda total de viabilidade celular de *C. neoformans* CAP59 e o PAFE não pode ser determinado, enquanto na concentração de CIM foi consideravelmente alto (8,15 h) (Figura 5). Para *C. neoformans* H99 o PAFE foi de 2,71 h na concentração de CIM e 6,73 h para 4x CIM. *C. gattii* ATCC 56990 foi menos suscetível aos efeitos pós-antifúngicos do que os isolados de *C. neoformans*, apresentando PAFE (2,75 h) somente quando houve tratamento com 4x CIM. (Figura 5).

Tabela 3. Suscetibilidade dos isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* a miltefosina, anfotericina B e fluconazol.

Isolados	Miltefosina		Anfotericina B		Fluconazol	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. neoformans</i>						
CAP59	1	1	0,03	0,03	1	32
H99	2	2	0,25	0,25	4	4
L9485/13	4	4	0,25	0,25	0,125	4
L9486/13	4	4	0,125	0,5	8	>64
L9488/13	2	2	0,125	0,25	0,125	0,5
L9516/13	4	8	0,25	0,5	1	32
9513/13	4	4	0,125	0,25	2	4
<i>C. gattii</i>						
ATCC 56990	0,5	0,5	0,25	0,25	2	32
L9510/13	2	2	0,25	0,25	8	32
L9512/13	2	2	0,25	0,25	4	>64
L9682C	4	4	0,25	0,25	2	8
L9580/13	1	4	0,125	0,25	2	16
L9264/9531/13	4	4	0,25	0,25	2	16

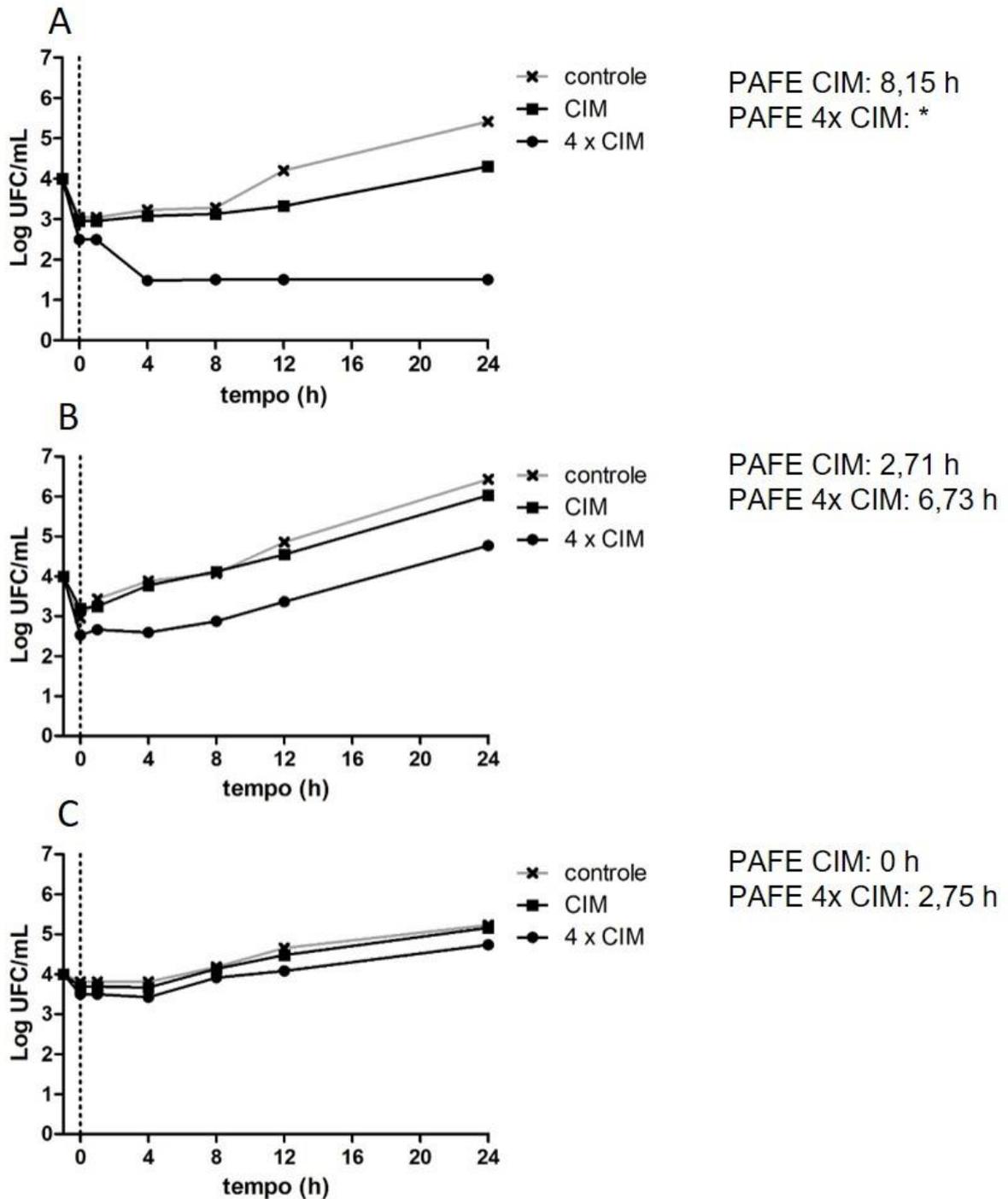
Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressas em µg/mL.

Tabela 4. Suscetibilidade das células sésseis e em dispersão do biofilme (CIM-B_S e CIM-B_D) e células planctônicas (CIM-P) de *Cryptococcus neoformans* (H99 e CAP59) e *Cryptococcus gattii* (ATCC 56990) à miltefosina.

	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>
	CAP59	H99	ATCC 56990
Células sésseis (CIM-B_S)	8	>16	16
Células em dispersão (CIM-B_D)	0,5	2	1
Células planctônicas (CIM-P)	1	2	0,5

Valores expressos em µg/mL.

Figura 5. Efeito pós-antifúngico (PAFE) da miltefosina (MFS) em leveduras de *Cryptococcus neoformans* CAP59 (A) e H99 (B) e *Cryptococcus gattii* ATCC 56990 (C).



Os valores de PAFE representam a diferença no tempo (em horas) necessária para um crescimento de 1 log (10 vezes) em meio de cultura livre de antifúngico entre culturas tratadas e não tratadas (controle), após uma exposição curta ao antifúngico (tratamento de 1 h com CIM ou 4x CIM de MFS/ linha tracejada). O limite de detecção da técnica é de 1.5 log. *Não determinado

4.2.4 Efeitos da miltefosina nas leveduras de *Cryptococcus spp.*

4.2.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As leveduras de *C. neoformans* H99 sem tratamento com antifúngico apresentaram uma ultraestrutura preservada com forma arredondada, cápsula (C) envolvendo a célula, parede celular (PC) compacta e regular e mitocôndrias com cristas bem definidas (m) (Figuras 6A-B). Por outro lado, leveduras tratadas com concentração subinibitória de MFS (1 µg/mL) apresentaram algumas alterações em relação às leveduras não tratadas como: mitocôndrias inchadas (m) e com cristas mitocondriais danificadas, aparente diminuição da parede celular e, também, perda/redução da cápsula (Figuras 6C-D).

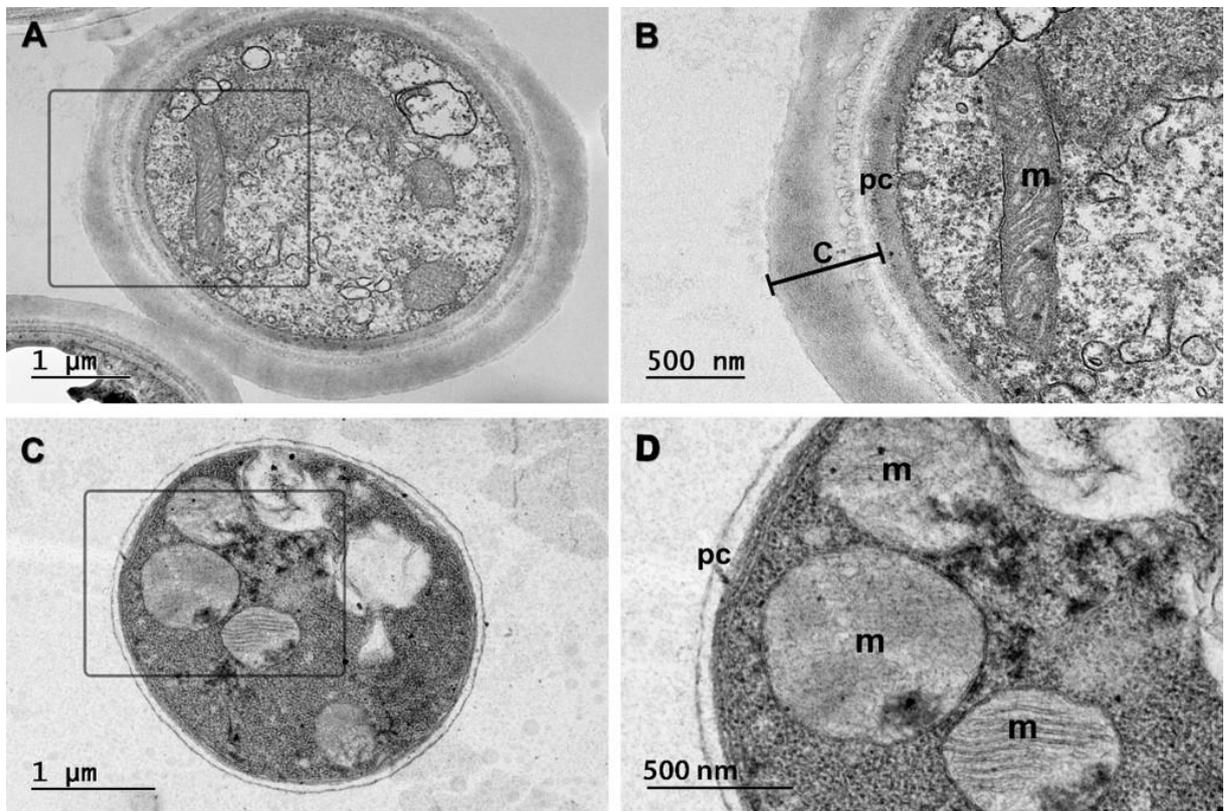
4.2.4.2 Microscopia ótica

Com o intuito de confirmar a redução da cápsula observada nas imagens de MET, foram realizadas medições da espessura das cápsulas usando a microscopia ótica. Concentração subinibitória de MFS frente aos isolados *C. neoformans* H99 (1 µg/mL) e *C. gattii* ATCC 56990 (0,25 µg/mL) foi capaz de reduzir significativamente a espessura da cápsula quando comparado às leveduras sem tratamento ($p < 0,0001$) (Figura 7).

4.2.4.3 Curva do tempo de morte

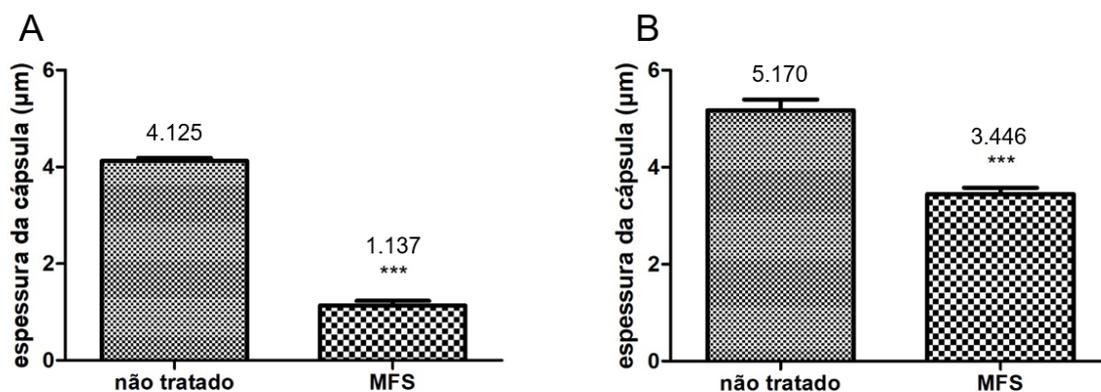
A análise da viabilidade fúngica realizada pelos dados de contagem de UFC/mL (curvas do tempo de morte, Figura 8) mostrou que o tratamento com MFS na concentração de 4x CIM reduziu a viabilidade celular de *C. neoformans* (CAP59 e H99) apenas após 4 h de tratamento; em concentrações mais baixas da MFS (CIM e 2x CIM) não diminuiu a viabilidade das leveduras mesmo após 24 h de tratamento (Figura 8). Em contraste, o tratamento com AMB diminuiu a viabilidade dos isolados de *C. neoformans* mesmo nas concentrações mais baixas (CIM e 2x CIM), particularmente após 24 h de tratamento. Para *C. gattii* ATCC 56990 a viabilidade não foi afetada pela MFS, mesmo na maior concentração testada (4x CIM); em contrapartida, o tratamento com AMB induziu morte celular após 4 h do início do tratamento (Figura 8).

Figura 6. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99.



C. neoformans H99 cultivado em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16M, por 72 h a 35°C. Leveduras controle não tratadas (A e B) e tratadas com concentração subinibitória de miltefosina (1µg/mL) (C e D). m - mitocôndria; pc- parede celular; C -cápsula.

Figura 7. Espessura da cápsula (µm) de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.



Leveduras tratadas com concentração subinibitória da miltefosina (MFS) e comparada com grupo não tratado. Leveduras de *C. neoformans* H99 (A); e de *C. gattii* ATCC 56990 (B). n = 100 células, *** P<0,0001 (teste t de Student).

4.2.4.4 Permeabilidade da membrana celular

Para avaliar os efeitos da MFS na permeabilidade da membrana plasmática de *Cryptococcus*, as leveduras foram tratadas com CIM, 2x CIM e 4x CIM de MFS (ou com AMB, como antifúngico de referência) por 1, 4, 8 e 24 h e a liberação de DNA e proteína no sobrenadante foi detectada por espectrofotometria. A MFS aumentou a quantidade de DNA (Figura 9) e proteína (Figura 10) no sobrenadante de maneira tempo dependente, sugerindo um aumento da permeabilidade da membrana após o tratamento, com efeitos semelhantes para todas os isolados testados. A miltefosina na CIM mostrou valores de absorbância similares ao grupo controle, nas concentrações de 2x e 4x a CIM foi observado aumento de DNA e proteínas no sobrenadante com o pico de extravasamento de DNA e proteínas após 4-8 h de exposição ao fármaco. O tratamento com o antifúngico padrão AMB resultou na liberação de DNA e proteínas em todas as concentrações testadas, em uma resposta dependente do tempo (Figuras 9 e 10).

4.2.4.5 Influência de ergosterol exógeno na CIM

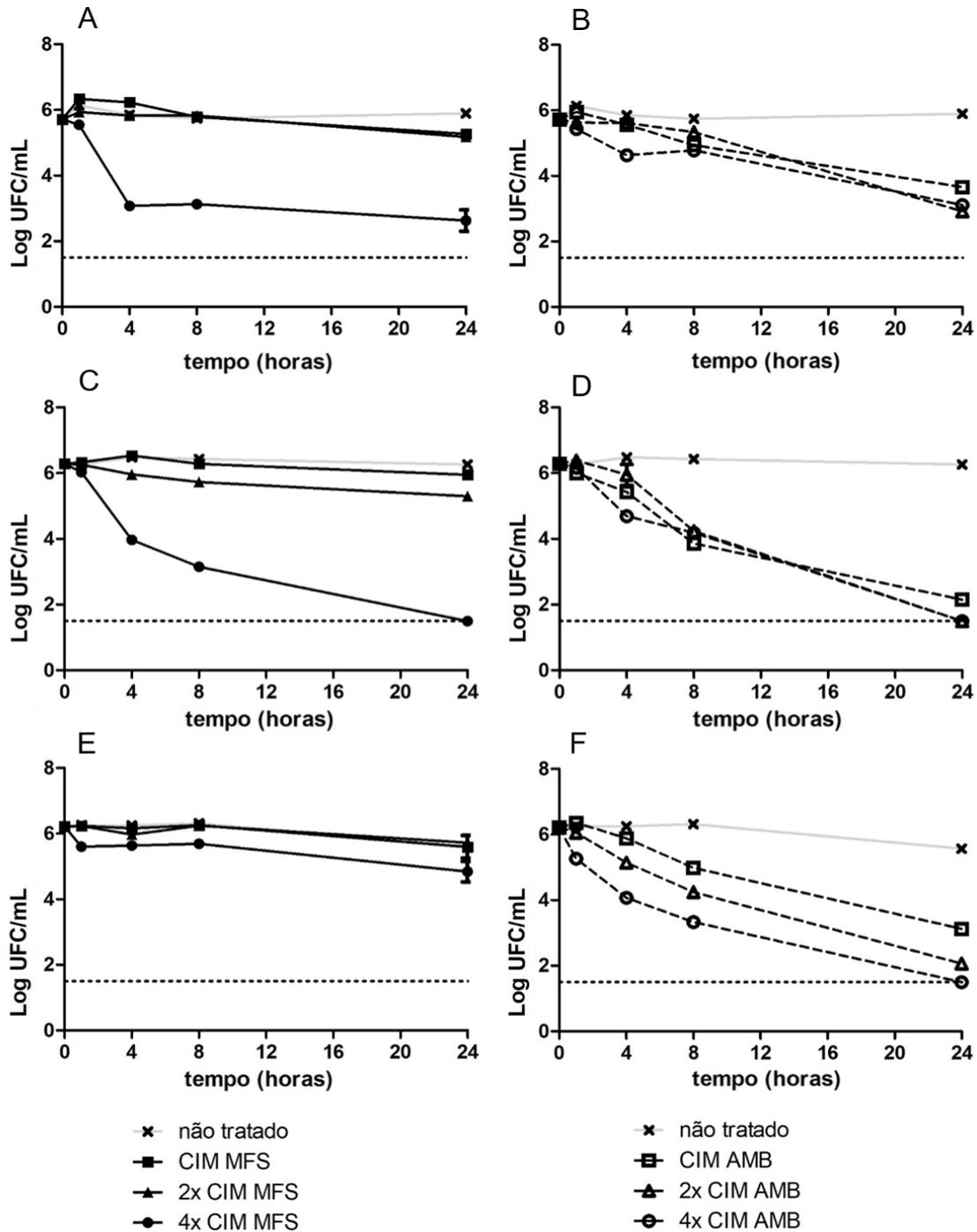
No ensaio de competição com ergosterol exógeno, adicionado ao meio de cultura, foi avaliado se o efeito antifúngico do MFS contra *Cryptococcus* spp. seria alterado. A presença de ergosterol no ensaio de microdiluição em caldo reduziu a atividade antifúngica da MFS, ocorrendo aumento no valor de CIM conforme aumento da concentração de ergosterol presente no meio (16 vezes com 200 µg/mL de ergosterol) (Tabela 5). Esse comportamento é semelhante à AMB (Tabela 5), um composto antifúngico que se liga diretamente ao ergosterol. Assim, os resultados do ensaio de competição de ergosterol sugerem que MFS pode interagir diretamente com moléculas de ergosterol na membrana plasmática fúngica.

Tabela 5. Efeito da presença de ergosterol exógeno na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da miltefosina e anfotericina B sobre *Cryptococcus* spp.

Ergosterol (µg/mL)	<i>C. neoformans</i> CAP59		<i>C. neoformans</i> H99		<i>C. gattii</i> ATCC 56990	
	MFS	AMB	MFS	AMB	MFS	AMB
0	1	0,031	1	0,125	0,5	0,25
50	4	0,125	8	0,5	2	0,5
100	8	8	16	1	8	1
200	16	16	16	2	8	8

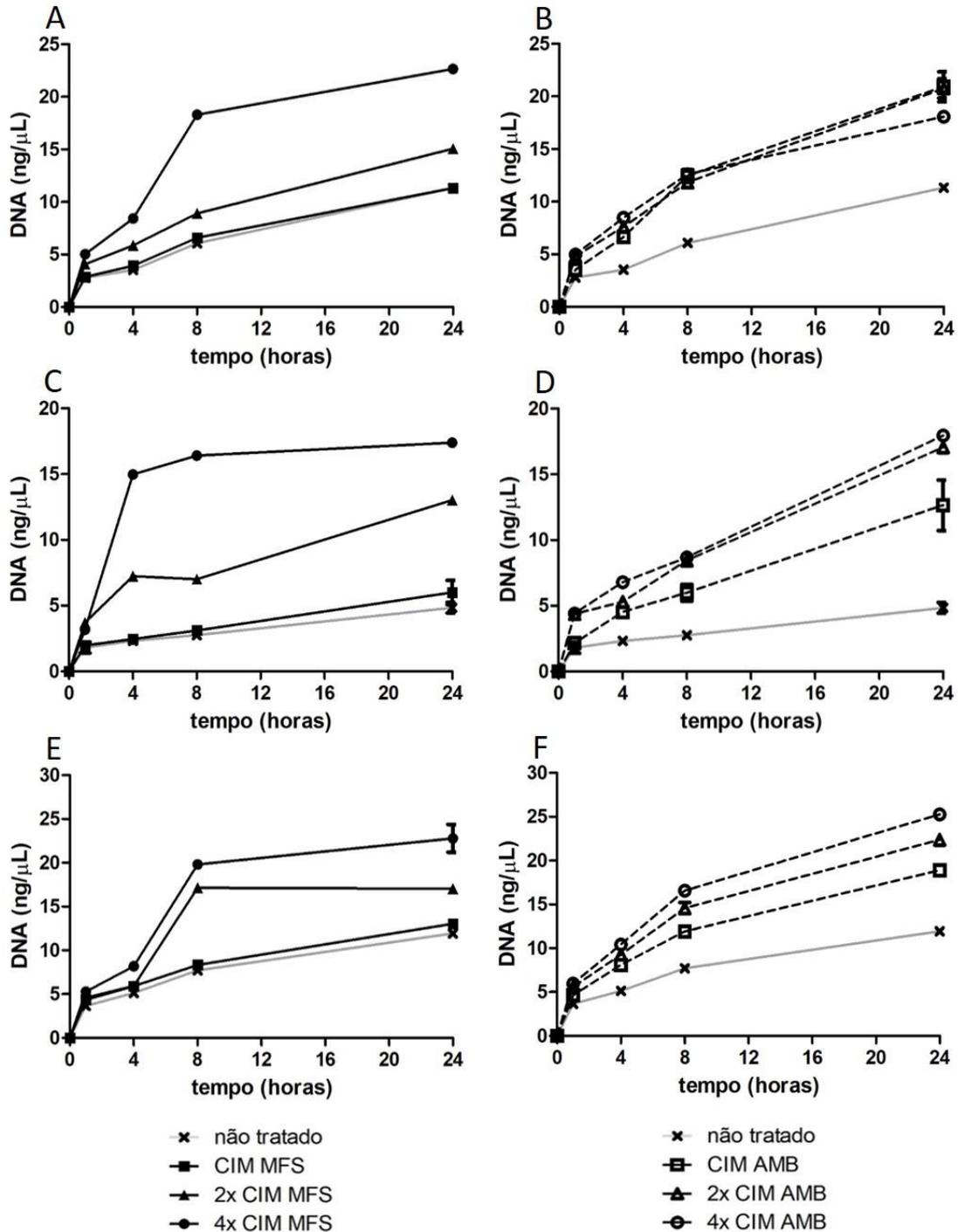
Valores expressos em µg/mL. MFS: Miltefosina; AMB: Anfotericina B.*dados representam resultados de três experimentos distintos.

Figura 8. Curva do tempo de morte de *Cryptococcus neoformans* (CAP59 e H99) e *Cryptococcus gattii* (ATCC 56990)



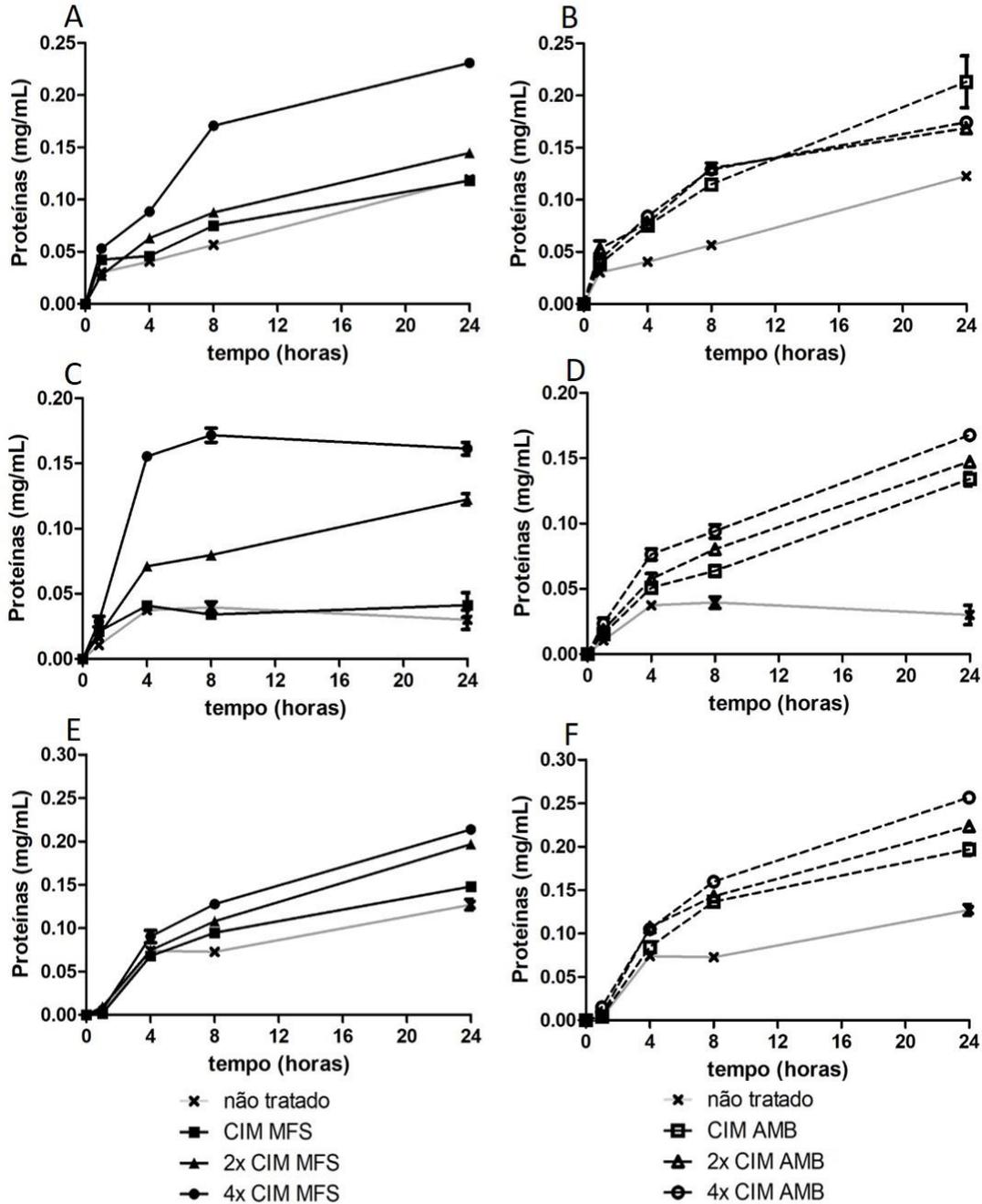
Leveduras tratadas com diferentes concentrações de miltefosina (MFS) e anfotericina B (AMB). **A, B:** *C. neoformans* CAP59; **C, D:** *C. neoformans* H99; e **E, F:** *C. gattii* ATCC 56990. **A, C, E:** miltefosina e **B, D, F:** anfotericina B. O limite de detecção da técnica é de 1,5 log (linha tracejada) e CIM significa o valor de concentração inibitória mínima.

Figura 9. Curva de permeabilidade da membrana quantificada por liberação de DNA de *Cryptococcus neoformans* (CAP59 e H99) e *Cryptococcus gattii* (ATCC 56990).



Leveduras tratadas com diferentes concentrações de miltefosina (MFS) e anfotericina B (AMB). Leveduras de *Cryptococcus neoformans* CAP59 (A, B), *Cryptococcus neoformans* H99 (C, D), *Cryptococcus gattii* (E, F) tratados ou não com miltefosina (A, C, E) ou anfotericina B (B, D, F) em PBS a 35°C por 24 h. DNA livre no sobrenadante foi quantificado, nos tempos 0, 1, 4, 8 e 24 h após incubação, usando comprimento de onda de 260 nm.

Figura 10. Curva de permeabilidade da membrana quantificada por liberação de proteínas de *Cryptococcus neoformans* (CAP59 e H99) e *Cryptococcus gattii* (ATCC 56990).



Leveduras tratadas com diferentes concentrações de miltefosina (MFS) e anfotericina B (AMB). Leveduras de *Cryptococcus neoformans* CAP59 (A, B), *Cryptococcus neoformans* H99 (C, D), *Cryptococcus gattii* (E, F) tratados ou não com miltefosina (A, C, E) ou anfotericina B (B, D, F) em PBS a 35 °C por 24 h. Proteínas livres no sobrenadante foram quantificadas, nos tempos 0, 1, 4, 8 e 24 h após incubação, usando comprimento de onda de 280 nm.

4.2.4.6 Avaliação do efeito da MFS com uso de marcadores fluorescentes

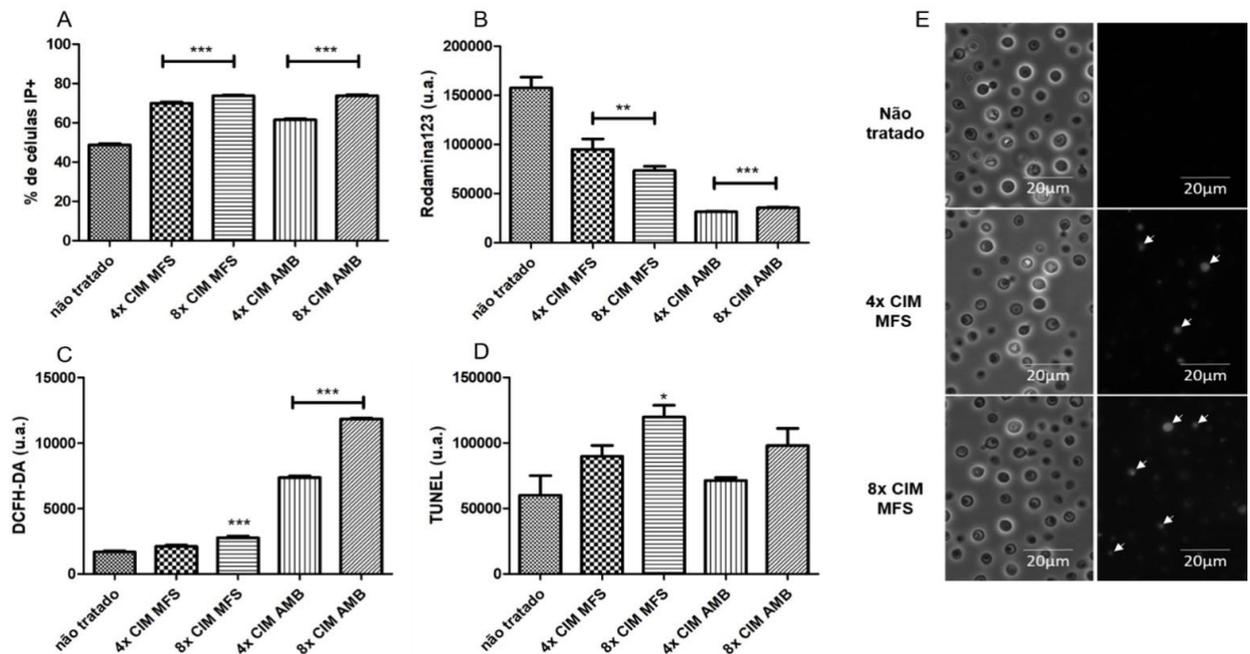
Para avaliar os efeitos celulares da MFS sobre *Cryptococcus*, as leveduras tratadas com concentrações fungicidas foram marcadas com diferentes marcadores fluorescentes para citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Os resultados indicaram alteração da permeabilidade da membrana em leveduras de *C. neoformans* tratadas com MFS ou AMB (4x e 8x CIM), onde foi observado um aumento significativo de leveduras marcadas com PI quando comparado às leveduras não tratadas (Figura 11A). Esses dados corroboram com os obtidos no teste de permeabilidade de membrana descrito acima, no qual o extravasamento de DNA e proteínas foi observado no sobrenadante sugerindo o aumento da permeabilidade da membrana celular (Figuras 9 e 10).

Após a observação da alteração morfológica nas mitocôndrias por MET, a marcação com Rodamina123 indicou que a MFS reduz o potencial da membrana mitocondrial das leveduras, foi observada uma perda significativa da intensidade média de fluorescência nas leveduras tratadas com 4x e 8x CIM (Figura 11B). Da mesma forma, AMB também diminuiu a atividade mitocondrial (Figura 11B). Este fenômeno foi avaliado por Rodamine123, que é um marcador fluorescente que se distribui na matriz mitocondrial em resposta ao potencial da membrana (LUDOVICO; CÔRTE-REAL; SANSONETTY, 2001).

Concomitantemente, um aumento significativo na produção de ROS após os tratamentos com MFS (8x CIM) e AMB foi observado usando DCFH-DA (Figura 11C). Importaneamente, foi observado a fragmentação do DNA (por TUNEL para citometria de fluxo, Figura 11D) e a condensação de cromatina (pela marcação Hoechst 33342 para microscopia de fluorescência, Figura 11E) após o tratamento das leveduras de *C. neoformans* com MFS ou AMB em concentrações de 4x e 8x CIM, enquanto as leveduras não tratadas apresentaram um sinal de fluorescência significativamente menor ou indetectável.

Em resumo, foi detectado um aumento na permeabilidade da membrana plasmática, bem como a perda do potencial de membrana mitocondrial e aumento da produção de ROS, e danos no DNA em leveduras de *C. neoformans* tratadas durante 24 h com concentrações fungicidas de MFS. Estes efeitos foram semelhantes aos observados após o tratamento com o antifúngico de referência AMB.

Figura 11. Efeitos fisiológicos da miltefosina (MFS) em leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99.



As leveduras foram tratadas ou não com concentrações fungicidas (4x CIM e 8x CIM) de miltefosina (MFS) ou anfoterina B (AMB), durante 24 h a 35°C e depois processadas para análise de citometria de fluxo com seguintes parâmetros: permeabilidade da membrana, utilizando iodeto de propídio (PI) (A); potencial de membrana mitocondrial, utilizando Rodamina123 (B); níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), usando diacetato de 2'7'-diclorofluorescina (DCFH-DA) (C); e fragmentação do DNA, utilizando marcação com TUNEL (D). Os dados representam média \pm SEM de três experimentos independentes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ versus leveduras não tratadas (ANOVA unidirecional com pós-teste de Dunnett). (E) Imagens de microscopia de fluorescência das leveduras marcadas com Hoechst 33342 (coluna direita), mostrando condensação de cromatina após tratamento (pontos brancos, indicados por setas). As imagens de contraste de fase correspondentes são mostradas à esquerda.

4.3 Discussão

O repertório de agentes antifúngicos é limitado devido restrições na via de administração, elevada toxicidade, um estreito espectro de atividade, interações medicamentosas prejudiciais, desenvolvimento de resistência aos antifúngicos convencionais e baixa biodisponibilidade em tecidos alvo (BROWN; DENNING; LEVITZ, 2012). Para superar esses problemas, vários estudos visam identificar novos compostos bioativos de origem natural ou sintética. No entanto, é importante enfatizar que o processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos pode exigir um tempo de 10 a 17 anos, em média, e a taxa de sucesso é inferior

a 10 % (PARENTE-ROCHA et al., 2017). Uma estratégia interessante para a descoberta de antifúngicos é o reposicionamento de fármacos. Como a farmacocinética e a segurança em seres humanos já foram previamente estabelecidas, expandir a aplicação de um fármaco para doenças adicionais tem vantagens em termos de custo e eficiência no tempo (TSUBAMOTO et al., 2017). A MFS é um agente quimioterápico eficaz para tratamentos de câncer de mama e de leishmaniose visceral e cutânea; e é licenciado para administração tópica e oral em vários países (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

Nesse trabalho podemos observar que a MFS apresenta atividade antifúngica *in vitro* tanto para as amostras padrão ATCC de *Cryptococcus* spp. como para isolados de origem clínica apresentando valores de CIM-P de 0,5 a 4 µg/mL e atividade fungicida, corroborando com dados previamente descritos para este fungo (RAVU et al., 2013; WIDMER et al., 2006) e para fungos dimórficos (0,12 - 4 µg/mL) tais como *Paracoccidioides* spp. (ROSSI et al., 2017), *Sporothrix* spp. (BORBA-SANTOS et al., 2015; BRILHANTE et al., 2014), *Histoplasma capsulatum* (BRILHANTE et al., 2014); *Coccidioides posadasii* (BRILHANTE et al., 2015); e dermatófitos (0,25 - 2 µg/mL) (TONG et al., 2007). Por outro lado, fungos como *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Fusarium* spp. e *Scedosporium* spp. (2 - 64 µg/mL) (BISWAS et al., 2013a); e outras leveduras como *Candida* spp. (0,25 - 8 µg/mL) (VILA; QUINTANILHA; ROZENTAL, 2015; VILA et al., 2016, 2013) apresentam menor suscetibilidade a MFS.

No entanto, mesmo que estudos já tenham demonstrado que a MFS possui um amplo espectro de atividade antifúngica *in vitro* e uma boa eficácia *in vivo* em modelo murino de criptococose (WIDMER et al., 2006), poucos estudos foram realizados para entender melhor as características antimicrobianas da MFS em células fúngicas e o mecanismo de ação da MFS em fungos patogênicos ainda é pouco compreendido. Dessa forma, nosso trabalho pretende esclarecer alguns aspectos dos efeitos fisiológicos e entender melhor o possível mecanismo de ação da MFS em leveduras de *Cryptococcus* spp.

A formação de biofilme constitui um problema considerável na prática clínica. Essa estrutura consiste em uma rede complexa de leveduras embebidas em uma quantidade substancial de matriz de polissacarídeos, caracterizando em alterações celulares fenotípicas que traduz em maior resistência aos mecanismos imunes do hospedeiro e à terapia antifúngica (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005). A atividade inibitória da MFS em células sésseis do biofilme maduro de *Cryptococcus* spp. foi observada apenas em concentrações mais elevadas; 8 ou mais vezes a quantidade de MFS utilizada para a inibição das células planctônicas. Esses

resultados correlacionam-se com os apresentados em outros trabalhos sugerindo que o fenótipo do biofilme confere menor susceptibilidade à terapia antifúngica convencional (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006b, 2015; VILA; ROZENTAL, 2016), e também aqueles que mostram o efeito da MFS em biofilmes maduros de *Candida* spp. (VILA; QUINTANILHA; ROZENTAL, 2015; VILA et al., 2016). Por outro lado, as células em dispersão dos biofilmes maduros de *Cryptococcus* spp. foram tão suscetíveis a MFS quanto as células planctônicas. Vila et al., (2016) relataram dados semelhantes, onde as células em dispersão de *Candida* spp. foram suscetíveis a MFS em concentrações similares às obtidas para células planctônicas (1-4 µg/mL). A inibição das células em dispersão de biofilmes é de extrema importância durante o tratamento de infecções relacionadas ao biofilme porque pode reduzir a disseminação da infecção (VILA et al., 2016).

O efeito pós-antifúngico é uma característica farmacodinâmica muito importante relacionado a eficácia de compostos antifúngicos; refere-se à supressão do crescimento fúngico persistente após uma breve exposição do fungo ao fármaco (PEREIRA DE SÁ et al., 2015; UCHIDA; ABE; YAMAGUCHI, 2006). Os valores de PAFE da MFS em fungos ainda não foram descritos e nosso trabalho demonstra um PAFE relevante para MFS em *Cryptococcus* spp., chegando até 8,15 h após o tratamento com CIM, sugerindo atividade inibitória prolongada mesmo quando a MFS não está mais presente. Valores de PAFE mais longos sugerem uma atividade inibitória do crescimento fúngico prolongada, isso pode ser associado ao regime de dosagem do antifúngico durante uso clínico (PEREIRA DE SÁ et al., 2015; UCHIDA; ABE; YAMAGUCHI, 2006). Ernst e colaboradores (2000) observaram que as equinocandinas e AMB, ambas descritas como fungicidas, possuem PAFEs prolongados e dose-dependentes, enquanto o FLC, que é fungistático, não produz PAFE mensurável contra *C. albicans* ou *C. neoformans*. Nossos dados com a MFS corroboraram com essas descobertas em que os fármacos fungicidas apresentam um PAFEs significativos e seus efeitos são dose-dependente.

O mecanismo de ação da MFS em fungos patogênicos é pouco esclarecido e neste trabalho alguns experimentos foram realizados para entender melhor o efeito antifúngico da MFS em leveduras de *Cryptococcus* spp. Segundo Dorlo et al. (2012), a MFS possui mecanismos de ação muito semelhantes contra os parasitas *Leishmania* e as células de câncer humano. No entanto, a multiplicidade de potenciais mecanismos de ação propostos e estudos contraditórios podem indicar que a MFS possui mais de um local de ação (DORLO et al., 2012a). Primeiramente, observamos por microscopia eletrônica de transmissão e por

microscopia ótica que a concentração subinibitória de MFS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) causou danos na ultraestrutura celular de *C. neoformans* H99 como: redução da espessura da cápsula mucopolissacarídica, presença de inchaço nas mitocôndrias e a aparente diminuição da espessura da parede celular.

Como se sabe, a cápsula de *C. neoformans* e *C. gattii*, possui diferentes funções e, na virulência, ajuda na proteção da célula fúngica frente mecanismos antimicrobianos do hospedeiro, interferindo com as respostas imunológicas (ARAUJO et al., 2012; O'MEARA; ANDREW ALSPAUGH, 2012). Um estudo avaliou a interação de macrófagos no controle de infecção causada por *C. neoformans* e mostrou que os macrófagos preferencialmente fagocitam células fúngicas com cápsulas menores, sendo a espessura da cápsula criptocócica um fator determinante nesse processo (BOJARCZUK et al., 2016). Santos et al., (2014) observaram que isolados de *C. gattii* resistentes ao FLC tem perda da virulência em experimentos *in vitro* e *in vivo*, a baixa virulência é associada a perda do diâmetro ou pouca produção de cápsula. Outros antifúngicos como AMB e itraconazol (GUERRA et al., 2012); e produtos naturais (ISHIDA et al., 2009), também levam a diminuição da espessura da cápsula. A redução da cápsula em leveduras de *Cryptococcus* spp. observada após tratamento com concentração subinibitória de MFS pode indicar virulência reduzida. Além disso, os polissacarídeos da cápsula são o principal constituinte da matriz extracelular dos biofilmes de *Cryptococcus*; assim, a redução da cápsula em *Cryptococcus* spp. observada neste trabalho indica que o tratamento com MFS pode reduzir a virulência de leveduras tanto na forma planctônica quanto em biofilmes. Importaneamente, o mutante acapsular CAP59 e cepas com cápsula reduzida estão relacionados com uma menor tolerância aos antifúngicos (ISHIDA et al., 2009). De acordo com esta interpretação, observamos que os biofilmes formados por CAP59 são mais suscetíveis a MFS (CIM-B_S = 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do que os formados por *C. neoformans* H99 (CIM-B_S > 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

A MFS interfere na permeabilidade da membrana citoplasmática das células fúngicas. É possível notar que o fármaco provavelmente tem ação direta sobre a membrana plasmática, uma vez que no período de incubação de 4 h, principalmente nas concentrações mais altas (2x e 4x CIM), ocorre extravasamento de DNA e proteínas para o sobrenadante, assim como com a AMB. Esse comportamento foi confirmado por citometria de fluxo usando Iodeto de Propídio (PI) (Figura 11A). Este marcador é um corante fluorescente utilizado para coloração de ácido nucleico e é impermeável à membrana; o PI entra nas células apenas quando há perda da integridade da membrana plasmática e então se liga ao DNA (KUMAR; MOHANDAS, 2017). Desta forma, o aumento significativo da porcentagem de células PI-positivas observada quando

tratado com MFS e AMB confirma esta alteração na permeabilidade de membrana. No entanto, quando se usa uma menor concentração da MFS (valores de CIM), a quantidade de DNA e proteínas liberadas permanece próxima ao controle não tratado; Brilhante et al. (2015) também observaram que valores de CIM de MFS não causam diferença na permeabilidade da membrana de *H. capsulatum* quando comparados com o grupo controle. Adicionalmente, irregularidades da morfologia da membrana plasmática em leveduras de *Sporothrix brasiliensis* e *Paracoccidioides* spp. tratadas com MFS foram previamente observadas por MET (BORBA-SANTOS et al., 2015; ROSSI et al., 2017).

Quanto a viabilidade das leveduras de *Cryptococcus* spp., quando tratadas com MFS, os dados corroboram com dados de permeabilidade, onde se observa que concentrações maiores do fármaco causam morte celular a partir de 4 h de incubação e que na CIM as células ainda se encontram viáveis durante o período de 24 h. A MFS mostrou efeito fungicida mesmo na CIM quando avaliada após 72 h de incubação (Tabela 3) e é possível que a ação da MFS na CIM precise de maior tempo de interação com o fungo para causar a perda de viabilidade enquanto concentrações acima de CIM possuem efeito mais rápido e acentuado.

Segundo Barratt e colaboradores (2009), o mecanismo de ação da MFS em células tumorais e em parasitas de *Leishmania* envolve a interação com lipídeos, em particular fosfolipídios e esteróis de membrana. Assim, o teste de competição com ergosterol exógeno foi realizado para comprovar a hipótese de que a MFS poderia estar interagindo com ergosterol em células de *Cryptococcus* spp. Os resultados indicaram que a MFS pode estar se ligando à molécula de ergosterol exógeno e, conseqüentemente, diminuindo a MFS disponível para agir na célula fúngica. Este efeito *in vitro* foi semelhante ao obtido para AMB, cujo mecanismo de ação envolve a formação de um complexo com ergosterol localizado na membrana plasmática, resultando em maior permeabilidade na membrana e, posteriormente, morte fúngica (KATHIRAVAN et al., 2012; MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012). Devido a competição pelo ergosterol, a concentração crescente de ergosterol no meio é inversamente proporcional a atividade antifúngica da AMB e MFS, o que significa que a concentração do ergosterol na membrana é essencial para a manutenção da eficácia de ambos os antifúngicos. Brilhante et al. (2015), mostraram que a MFS em concentração subinibitória em *C. posadassi* e *H. Capsulatum* causa redução significativa na quantidade de ergosterol total extraída das células fúngicas quando comparado com o controle. Esses dados sugerem que a MFS pode interagir diretamente com o ergosterol, levando a um aumento da permeabilidade na membrana plasmática de leveduras de *Cryptococcus* spp.

Os efeitos causados sobre a mitocôndria de *C. neoformans* foi outra resposta celular importante ao tratamento com concentrações fungicidas da MFS. As mitocôndrias, como principal fonte de produção de ROS na maioria das células eucarióticas, são necessárias para a produção de energia celular por fosforilação oxidativa e outros processos conservados, como o metabolismo do ferro, morte celular programada e metabolismo intermediário (LI et al., 2015b). Em nosso estudo, observamos que as leveduras tratadas com 4x e 8x CIM de MFS mostraram uma perda significativa no potencial da membrana mitocondrial e esse distúrbio pode refletir na perda das cristas mitocondriais observado nas imagens de MET. Além disso, os danos causados às mitocôndrias podem estar relacionados à redução da espessura da cápsula observada nesse trabalho, uma vez que o crescimento da cápsula é dependente da atividade mitocondrial (TREVIANO-CONTADOR et al., 2017).

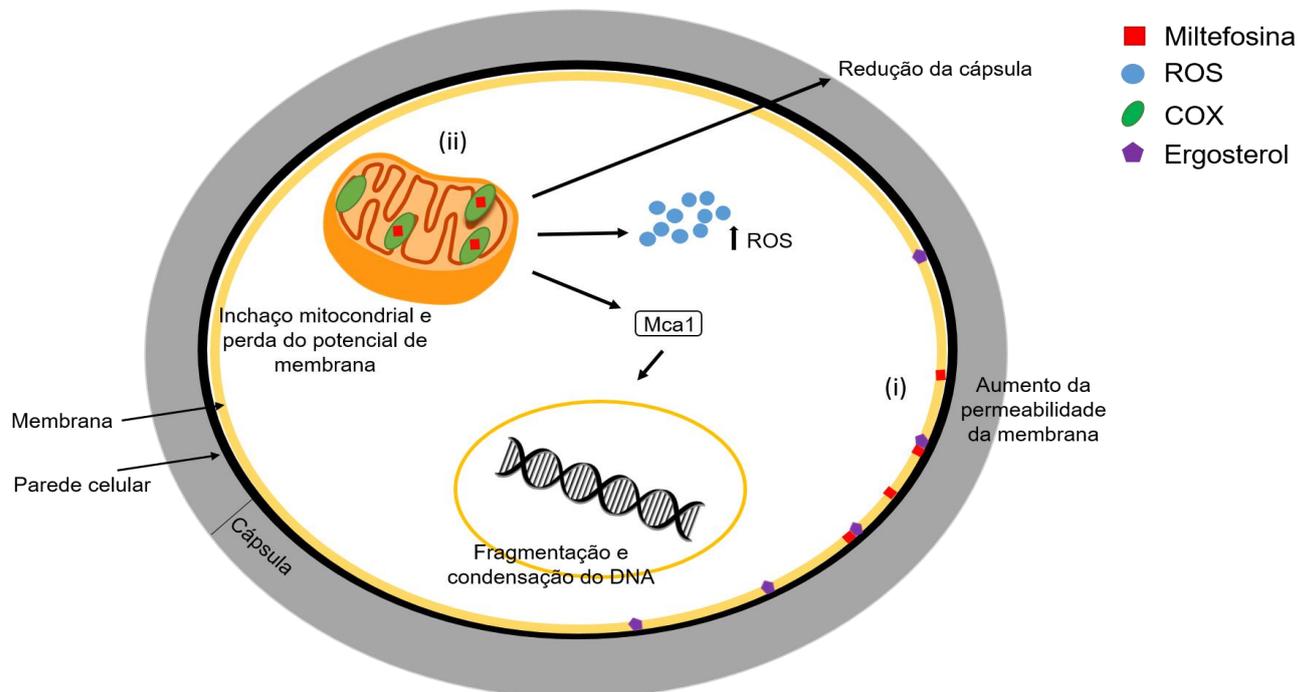
O efeito da MFS na função mitocondrial também levou a aumento da produção de ROS em leveduras expostas a maior concentração de MFS (8x CIM). Por outro lado, a AMB provocou um aumento significativo da produção de ROS (maior que a MFS), e seu acúmulo tem múltiplos efeitos deletérios sobre as estruturas essenciais dos fungos como membrana, proteínas, DNA e mitocôndrias, resultando em morte celular (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012). Por fim, também foram observados danos ao material genético das leveduras (fragmentação do DNA) e a condensação da cromatina em leveduras tratadas com concentrações fungicidas de MFS e AMB (4x e 8x MIC).

O processo apoptótico possui características bem definidas, entre elas o encolhimento celular e o inchaço das organelas nos estágios iniciais, a dissipação do potencial da membrana mitocondrial, a acumulação de ROS e a condensação e fragmentação do DNA (MUNOZ et al., 2012). Zuo et al. (2011), descreveram morte celular por apoptose em levedura de *S. cerevisiae* após a incorporação da molécula de MFS na membrana mitocondrial interna; essa inserção da MFS na membrana mitocondrial causou a ruptura do potencial da membrana pela interação com uma subunidade do complexo COX da cadeia transportadora de elétrons (Cox9p), levando a degradação do DNA nuclear. Importammentemente, Biswas et al., (2014) descreveu que a morte celular por apoptose é mediada pela metacaspase-1 e representa o principal mecanismo responsável pelo efeito fungicida da MFS em *S. cerevisiae*. Desta forma, nossos resultados indicam que a MFS desencadeia morte celular por apoptose em leveduras de *Cryptococcus* spp.

Para representar os efeitos celulares observados aqui, sugerimos um modelo esquemático para o mecanismo de ação da MFS em leveduras de *Cryptococcus* spp. (Figura 12). A MFS interage com as membranas que conduzem a morte fúngica por dois mecanismos

importantes: (i) permeabilidade da membrana plasmática aumentada por interação direta com fosfolípidos e/ou ergosterol; e (ii) ligação na membrana mitocondrial, levando ao aumento da produção de ROS e culminando em danos ao material genético (condensação e fragmentação de DNA), levando a morte do fungo por apoptose. Além disso, como consequência da alteração mitocondrial, também observamos a redução na espessura da cápsula nas leveduras de *Cryptococcus* spp.

Figura 12. Modelo do mecanismo de ação da miltefosina (MFS) em leveduras de *Cryptococcus*.



A MFS interage com as membranas celulares levando a morte fúngica pelos importantes mecanismos: (i) MFS atua como detergente, interagindo com fosfolípidos e/ou o ergosterol, o que altera a permeabilidade da membrana plasmática; (ii) dentro da célula, a MFS atua nas mitocôndrias, levando ao inchaço mitocondrial e perda de potencial de membrana (possivelmente ao interromper a atividade de COX (ZUO et al., 2011) e promover a geração de ROS e a ativação da metacaspase-1 (Mca1) (BISWAS et al., 2014). Então, ocorre a condensação e a fragmentação do DNA causando morte das células leveduriformes por apoptose. Outro efeito observado em *Cryptococcus* spp. foi uma redução na cápsula de mucopolissacarídeos.

4.4 Conclusão

- A MFS possui alto potencial como agente antifúngico contra a criptococose, devido aos baixos valores de concentração inibitória mínima em células planctônicas (CIM-P) tanto para isolados ATCC quanto clínicos de *Cryptococcus* spp. Além de atividade inibitória sobre as células em dispersão do biofilme;

- Os valores de PAFE demonstram que a MFS possui atividade inibitória sobre *Cryptococcus* spp. mesmo depois da retirada do fármaco após uma breve exposição;

- A MFS causa várias mudanças nas leveduras de *Cryptococcus* spp. como a redução da espessura da cápsula; aumento da permeabilidade da membrana; danos nas mitocôndrias e consequente aumento de ROS e fragmentação e condensação de DNA, levando a morte do fungo por apoptose.

5 CAPÍTULO II

Objetivo geral:

Padronizar e caracterizar nanopartículas de alginato como carreador da miltefosina; avaliar o efeito tóxico e a atividade antifúngica frente a *Cryptococcus* spp.

Objetivos específicos:

- Padronizar a produção de nanopartículas de alginato com miltefosina;
- Caracterizar as nanopartículas de alginato com miltefosina por métodos microscópicos e físico-químicos;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* das nanopartículas de alginato com miltefosina sobre células planctônicas de *Cryptococcus* spp.;
- Analisar o efeito antifúngico *in vivo* das nanopartículas de alginato com miltefosina em modelo murino de criptococose.

Parte dos dados deste capítulo gerou o depósito do pedido de patente no INPI sob n°: BR102017018011-5, data: 23/08/2017; título “Formulação farmacêutica, processo para preparação da formulação farmacêutica, e uso da mesma”.

Inventores: Kelly Ishida, Cristina de Castro Spadari, Luciana Biagini Lopes, Fernanda Walt Mendes da Silva de Bastiani

5.1. Materiais e métodos

5.1.1 Reagentes

Para o desenvolvimento das nanopartículas foram utilizados alginato de sódio (MP Biomedicals), óleo de girassol, SPAN 80 (Sigma aldrich), isopropanol (Merck), cloreto de cálcio (Synth), poloxamer F-127 (Sigma aldrich) e a miltefosina (MFS, Cayman Chemical).

5.1.2 Padronização da produção das nanopartículas de alginato

As nanopartículas de alginato foram preparadas pelo método de emulsificação/gelificação externa e as principais etapas do processo estão mostradas na figura 1. É sabido que alterações nas concentrações e proporções dos reagentes utilizados nas formulações podem modificar consideravelmente suas características morfológicas e físico-químicas. Dessa forma, em cada etapa do processo de padronização das nanopartículas de alginato vazias, designadas neste trabalho de Nano.Alg, as nanopartículas foram analisadas quanto ao tamanho médio, potencial zeta e polidispersão (ver os critérios e métodos na seção 5.1.3).

Inicialmente, foi avaliada a influência da homogeneização antes de sonicar, de diferentes concentrações de tensoativo SPAN 80 (m/m 1 %, 3 % e 9 %), diferentes tempos de sonicação (2, 4, e 6 min) e diferentes concentrações de alginato (m/v; 0,5 %, 1 % e 2 %) (Tabela 6; protocolos de **A** a **I**).

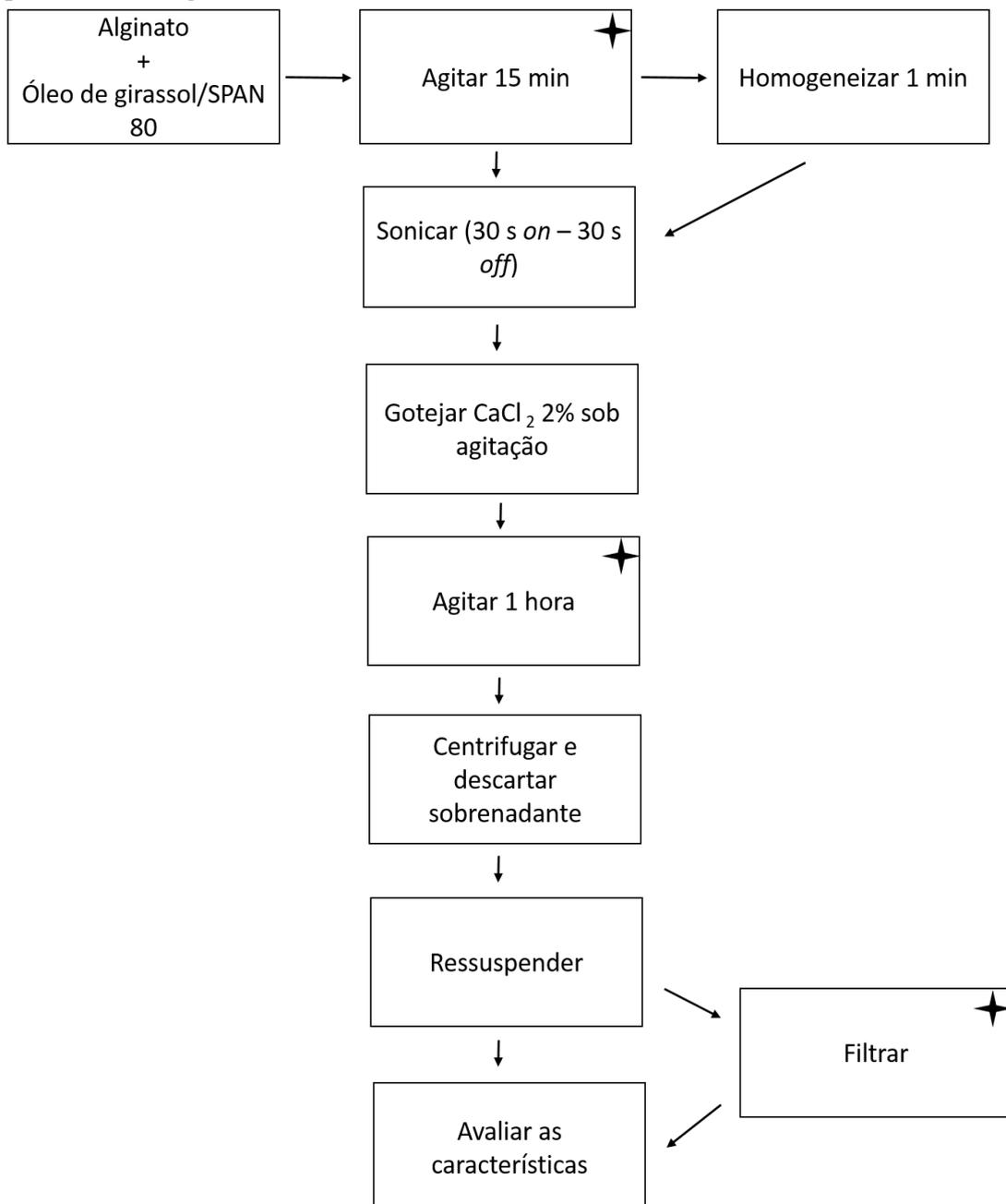
Em um segundo momento, para melhorar as características da formulação, foram testadas outras alterações no protocolo como sonicar por 10 minutos e filtrar a formulação em membrana de 0,45 μm ao final do processo (Tabela 6; protocolo **J**).

Em um terceiro momento, foram realizadas três modificações no protocolo de produção das nanopartículas de alginato (protocolo **K**): retirar o período de 15 min iniciais de agitação, deixar em agitador magnético por 30 min ao invés de 1 h e, principalmente, não filtrar a formulação ao final do procedimento (Figura 13 e tabela 6). Além dessas modificações principais foram testadas outras variáveis para melhorar o processo e as características das nanopartículas de alginato como: adicionar poloxamer 2 % e 0,5 % na solução de cloreto de cálcio (**K1** e **K9**, respectivamente), modificar o intervalo de sonicação para 50 s *on* – 10 s *off* (**K3**), o tempo no sonicador de 20 min ao invés de 10 min (**K5**), adicionar o cloreto de cálcio com agitação no agitador tipo vórtex (**K2**) e no sonicador de banho (**K4**) ao invés do agitador magnético, sonicar após adicionar o cloreto de cálcio por 5 min (**K7**) e 10 min (**K8**) e

ressuspender em água ou isopropanol após o término do processo de produção (**K6**). O protocolo **K** foi sendo padronizado conforme eram obtidos os resultados das diferentes modificações testadas.

Após definido o protocolo, foi adicionado 3.000 µg de MFS na solução de alginato para incorporar o fármaco nas nanopartículas de alginato, denominadas neste trabalho de MFS.Alg.

Figura 13. Fluxograma indicando as etapas realizadas para a produção e padronização das nanopartículas de alginato.



As variações na concentração do tensoativo SPAN 80 e do alginato, na homogeneização, no tempo no sonicador e no processo de filtração geraram os protocolos de **A** a **J**. Modificações indicadas em estrela originam o protocolo **K** (detalhes em Tabela 1).

Tabela 6. Denominação e respectiva breve descrição das modificações realizadas nas formulações para os diferentes protocolos testados na padronização da produção das nanopartículas de alginato.

Protocolos	Descrições
A	Apenas sonicar (4 minutos), alginato 1%
B	Homogeneizar e sonicar (4 minutos), alginato 1%
C	Homogeneizar e sonicar (4 minutos), SPAN 80 a 1% e alginato 1%
D	Homogeneizar e sonicar (4 minutos), SPAN 80 a 3% e alginato 1%
E	Homogeneizar e sonicar (4 minutos), SPAN 80 a 9% e alginato 1%
F	Homogeneizar e sonicar (2 minutos), SPAN 80 a 3% e alginato 1%
G	Homogeneizar e sonicar (6 minutos), SPAN 80 a 3% e alginato 1%
H	Homogeneizar e sonicar (4 minutos), SPAN 80 3% alginato a 2%
I	Homogeneizar e sonicar (4 minutos), SPAN 80 3% alginato a 0,5%
J	Sonicar 10 minutos e filtrar com membrana 0,45 μm
K	Não agitar por 15 min no início, agitar por 30 min ao invés de 1 h e não filtrar

5.1.3 Determinação dos tamanhos dos complexos, polidispersão e potencial zeta

O tamanho médio (Dz) e a distribuição de tamanhos (polidispersidade, Pdi) das nanopartículas (Nano.Alg e MFS.Alg) foram monitoradas pelo método de Espalhamento Dinâmico da Luz (*Dynamic Light Scattering - DLS*); e o potencial zeta foi medido com eletroforese. Todos os parâmetros foram obtidos usando o equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) durante o desenvolvimento e padronização das formulações. Antes de cada leitura no equipamento as amostras foram diluídas 100 vezes em água destilada.

Foram consideradas como características adequadas para este trabalho: Dz < 1000 nm (de preferência valores inferiores a 500 nm) (CEGNAR; MIKLAVŽIN; KERČ, 2011), valor de Pdi menor possível (<0,5), pois valores altos demonstram que a população da amostra de partículas não é homogênea, e potencial zeta com valor absoluto maior possível, pois quanto maior a carga das nanopartículas, maior é a estabilidade elétrica e menor a chance de agregação (SUNDAR; KUNDU; KUNDU, 2010).

5.1.4 Liofilização e reconstituição das nanopartículas de alginato

Foi avaliado o uso de diferentes crioprotetores para a liofilização e veículos para reconstituição das nanopartículas de alginato. Após o término do protocolo de produção das nanopartículas, antes de liofilizar, foi adicionado na formulação 500 µL de água, dextrose 10% ou trealose 10%. Em seguida, as amostras foram congeladas em freezer -80 °C e liofilizadas por 24 h em liofilizador (FreeZone 2.5, Labconco). Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de isopropanol, diluídas 100 vezes em água destilada para caracterização de Dz, Pdi e potencial zeta e analisadas para escolha do crioprotetor. Depois de realizada a escolha do melhor crioprotetor, foi avaliado o veículo (água ou PBS) para reconstituir a formulação. As características Dz, Pdi e potencial zeta foram analisadas e comparadas com os dados obtidos antes da liofilização.

Definido o uso de crioprotetor (dextrose ou trealose) e o veículo (água ou PBS) foram avaliadas as características de Dz, Pdi e potencial zeta das nanopartículas de alginato com MFS (MFS.Alg) após a liofilização e comparada com os dados obtidos antes da liofilização.

5.1.5 Microscopia eletrônica

Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizadas para visualizar a morfologia das nanopartículas de alginato com e sem a incorporação da MFS (MFS.Alg e Nano.Alg, respectivamente). Para a MET, uma gota da amostra foi deixada sedimentar por 5 min sobre a grade de cobre 300 *mesh*, recoberta com película FormVar, e retirada o excesso com papel filtro; em seguida, foi adicionado ácido fosfotúngstico 2% por 1 min e retirado o excesso com papel filtro. As amostras foram visualizadas no microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G20, FEI, Thermo Scientific).

Para a MEV as lamínulas de vidro foram preparadas com poli-L-lisina por 30 min, lavadas e, subsequentemente as amostras de MFS.Alg e Nano.Alg adicionadas na superfície. As amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 24 h para a secagem e foram recobertas com 10 nm de platina para posterior visualização no microscópio eletrônico de varredura (Quanta 650 FEG, FEI, Thermo Scientific).

5.1.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Análises espectroscópicas na região do infravermelho foram conduzidas a fim de verificar interações entre o fármaco e as partículas. Foram obtidos espectros com resolução de 2 cm⁻¹ da MFS livre, Nano.Alg e MFS.Alg, utilizando pastilhas de KBr.

5.1.7 Determinação da eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento da MFS nas nanopartículas de alginato foi avaliada pela forma indireta, na qual o sobrenadante é coletado após a produção das nanopartículas para quantificação da MFS. A quantificação da MFS foi realizada pelo método colorimétrico baseado na complexação da MFS com ferrotiocianato de amônio, e a detecção do complexo no comprimento de onda de 460 nm (DORLO et al., 2012b). Curvas de calibração para a MFS (15,62 a 2.000 µg/mL) foram preparadas para determinar a concentração da MFS na amostra. Por fim, a porcentagem de encapsulamento foi calculada pela fórmula: $100 - (\text{MFS no sobrenadante} \times 100 / \text{quantidade de MFS inicial})$ (PANDEY et al., 2005).

5.1.8 Ensaio de liberação da MFS *in vitro*

As nanopartículas MFS.Alg foram preparadas e restituídas em 1 mL de água estéril; em seguida foram incubadas a 37°C em agitação a 200 r.p.m. Nos tempos de 6, 12 e 24 h as amostras foram centrifugadas por 5 min a 5.000 r.p.m. e o sobrenadante coletado. A quantificação da MFS foi realizada pelo método colorimétrico baseado na complexação da MFS com ferrotiocianato de amônio, com absorção em 460 nm (DORLO et al., 2012b). Curvas de calibração para a miltefosina (15,62 a 2.000 µg/ mL) foram preparadas em PBS. A formulação sem o fármaco (Nano.Alg) foi usada como controle negativo.

5.1.9 Estabilidade das nanopartículas MFS.Alg

Nanopartículas de alginato com miltefosina (MFS.Alg) foram preparadas, liofilizadas e estocadas a -20° C por diferentes períodos de tempo (7, 15, 30 e 90 dias). Ao fim de cada período foram determinadas as características de tamanho médio (Dz), distribuição de tamanhos (polidispersão, Pdi) e potencial zeta das nanopartículas e os resultados comparados com os dados do dia do preparo das formulações. A atividade antifúngica *in vitro* de MFS.Alg, também, foi avaliada conforme descrição na seção 5.1.11.

5.1.10 Avaliação da citotoxicidade

Uma suspensão de hemácias a 4 % (v/v, em solução de glicose a 5 % estéril) foi submetida à presença de diferentes concentrações de MFS livre, MFS.Alg e Nano.Alg por 2 h em banho Maria a 37°C. Também foram utilizados, neste teste, controles negativo (sem tratamento) e positivo (0,1 % de triton X-100). Após este período, as amostras foram

centrifugadas a 3.000 r.p.m. por 10 min e o sobrenadante analisado em um espectrofotômetro a 540 nm. A atividade hemolítica (AH) foi calculada como segue: $AH (\%) = 100 - [(CP - AT)/(CP - CN)] \times 100$; sendo CP – absorvância do controle positivo, AT – absorvância da amostra teste e CN – absorvância do controle negativo (LI et al., 2002). Os resultados foram comparados com a atividade hemolítica da MFS livre.

5.1.11 Atividade antifúngica in vitro

A concentração inibitória mínima (CIM) da MFS livre e MFS.Alg foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2008) sobre *Cryptococcus neoformans* (H99 e CAP59) e *Cryptococcus gattii* (ATCC 56990). As leveduras foram cultivadas em meio Sabouraud dextrose por 48-72 h a 35°C. Em seguida, as leveduras foram contadas em câmara de Neubauer e a suspensão fúngica ajustada para $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. MFS livre e MFS.Alg foram diluídas seriadamente (1:2) em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,165M em microplacas de 96 poços e fundo chato e 100 µL da suspensão fúngica adicionado aos poços obtendo uma concentração fúngica final de $0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL e concentrações de MFS livre e em nanopartículas (MFS.Alg) de 0,03-16 µg/mL e 0,78-400 µg/mL, respectivamente. Paralelamente, Nano.Alg foi diluído nas mesmas condições que a MFS.Alg para avaliar a possível interferência dos constituintes da formulação na atividade antifúngica. As microplacas foram incubadas por 48-72 h a 35°C e a CIM foi determinada, por leitura visual, como a concentração que inibiu 90 % do crescimento fúngico.

5.1.12 Eficácia antifúngica das nanopartículas em modelo murino de criptococose sistêmica

5.1.12.1 Animais

Camundongos machos da linhagem BALB/c com idade entre 6 e 8 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP, Rede USP de Biotérios) foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Microbiologia (ICB/USP) e utilizados de acordo com o protocolo aprovado pela CEUA-ICB (número 68) e normas estabelecidas pelo CONCEA.

5.1.12.2 Modelo de criptococose sistêmica

Leveduras de *C. neoformans* H99 foram cultivadas duas vezes seguidas em caldo Sabouraud dextrose por 72 h a 35°C. Em seguida, foram contadas em câmara de Neubauer e a

suspensão fúngica ajustada para 1×10^7 UFC/mL de PBS. Para a infecção, 100 μ L do inóculo foi injetado na veia da cauda (1×10^6 UFC) dos camundongos.

5.1.12.3 Terapia

Com o modelo de criptococose sistêmica estabelecido, os animais (4 - 5 por grupo) foram infectados conforme descrito anteriormente e tratados, após 1h da infecção, por via oral de 3 formas: 5 doses de MFS livre (10 mg/Kg), dose única de MFS.Alg (20 mg/Kg) (MFS.Alg 1x) e 3 doses de MFS.Alg (20 mg/Kg) (MFS.Alg 3x). No grupo MFS livre os animais receberam, após 1 h da infecção, 100 μ L de MFS (10 mg/Kg) por gavagem seguido de mais 4 doses a cada 24 h. Os grupos tratados com MFS.Alg receberam, após 1h da infecção, uma dose de 100 μ L de MFS livre (10 mg/Kg) como dose inicial de ataque. Após 6 h foi administrado 100 μ L de MFS.Alg (20 mg/kg) para ambos os grupos. O grupo MFS.Alg 3x recebeu mais 2 doses em intervalos de 48 h. O grupo infectado e não tratado foi utilizado como controle.

5.1.12.4 Avaliação do tratamento

Os animais foram observados diariamente para anotação dos sobreviventes; em seguida foram construídas curvas de sobrevida dos camundongos por período total de 21 dias após a infecção para comparação dos diferentes tratamentos. Além disso, no sétimo dia após a infecção, os animais foram sacrificados, os órgãos (pulmão e cérebro) extirpados, pesados, macerados com PBS e uma alíquota de 100 μ L foi plaqueada em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, incubada a 35°C por 72 h. O número de colônias foi contado e os resultados expressos em unidade formadora de colônia (UFC) por grama de tecido. Durante a retirada dos órgãos, uma fração de cada tecido foi separada, fixada em formalina 10 %, seccionada e corada com eosina-hematoxilina (HE) e Gomori-Grocott para a análise histopatológica.

5.1.13 Análise estatística

As análises estatísticas para os dados obtidos foram avaliados pela análise de variância unidirecional (ANOVA) com teste Dunnett como pós-teste e teste t de student, e os dados da curva de sobrevida pelo teste Log-rank (Mantel-Cox) usando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). O nível de confiança de 95 % foi considerado significativo para todas as análises.

5.2 Resultados

5.2.1 Padronização da produção das nanopartículas de alginato

Na primeira etapa da produção e padronização da formulação das partículas de alginato por emulsificação/gelificação externa observou-se diferentes resultados dentre os protocolos de **A** a **I** (Tabela 7). Quando avaliadas os protocolos **A** e **B** (variável homogeneização) foi observada grande diferença no tamanho médio das partículas formadas (790,3 nm e 335,2 nm, respectivamente), e foi definido que homogeneizar a emulsão alginato-óleo/SPAN 80 por 1 min antes da sonicação é um passo importante na obtenção de partículas de tamanhos menores. Em seguida, foi avaliada as diferentes concentrações de alginato, e foi definido o uso de alginato 1% como melhor protocolo (**D**) quando comparado com os protocolos **H** (2 %) e **I** (0,5 %) (Tabela 7). O protocolo **D** (alginato a 1 %, SPAN 80 a 3%, homogeneizando por 1 minuto antes de sonicar por 4 minutos) resultou em partículas com características de tamanho, polidispersão e potencial zeta melhores (definido na secção 5.1.3 dos materiais e métodos) quando comparado com os demais. O protocolo **E** também mostrou características comparáveis ao protocolo **D**, porém utiliza concentração maior de tensoativo SPAN 80 (9 %) e, dessa forma, foi escolhido usar o protocolo **D** a fim de minimizar o potencial citotóxico do tensoativo (NOUDEH et al., 2009).

A segunda etapa da padronização da formulação foi necessária devido a mudança de equipamento utilizado para determinação de tamanho, polidispersão e potencial zeta das nanopartículas, pois a leitura da polidispersão no novo equipamento era de 1 (Nano ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). O protocolo **J**, no qual o tempo no sonicador passou para 10 minutos (30 seg *on* - 30 seg *off*) e a formulação final era filtrada em membrana 0,45 µm resultou em partículas de tamanho de $180 \pm 11,8$ nm e polidispersão de $0,14 \pm 0,02$; valores menores quando comparados ao protocolo **D**. Entretanto, a etapa de filtração pode resultar em seleção do tamanho das nanopartículas de forma inadequada e perda de parte das nanopartículas, sendo este procedimento abandonado subsequentemente.

A fim de melhorar as características das partículas (baseando-se no protocolo **J**), outras variáveis foram alteradas, sendo desenvolvido o protocolo **K**. Para obter este protocolo várias modificações foram avaliadas como citado anteriormente, e em algumas ocorreu a formação de gel ou grandes aglomerados (K1, K2, K3, K4, K5). Quando utilizado isopropanol para remover os resíduos de óleo de girassol foi possível realizar as leituras das características físicas, porém com o Pdi em torno de 0,56 (K6), característica indesejada para obter uma formulação de partículas de tamanhos homogêneos. Então seguiu-se testando até obter partículas com

tamanho, polidispersão e potencial zeta nas características consideradas adequadas para o uso (K7 a K9) (Tabela 8).

Tabela 7. Tamanho médio (nm), polidispersão e potencial zeta das nanopartículas de alginato obtidas com os diferentes protocolos de produção.

Protocolos	Características físicas (média \pm desvio padrão)		
	Tamanho (nm)	Polidispersão	Potencial zeta (mV)
A	790,3 \pm 31,7	0,08 \pm 0,03	-22,40 \pm 0,80
B	335,2 \pm 12,7	0,26 \pm 0,02	-17,2 \pm 1,4
C	Formação de gel	Formação de gel	Formação de gel
D	362,4 \pm 28,7	0,05 \pm 0,03	-36,9 \pm 3,6
E	244,3 \pm 16,4	0,06 \pm 0,00	-36,6 \pm 1,0
F	Formação de gel	Formação de gel	Formação de gel
G	Formação de gel	Formação de gel	Formação de gel
H	583,0 \pm 50,6	0,32 \pm 0,10	-1,6 \pm 0,4
I	820,7 \pm 167,1	1,60 \pm 0,00	-7,6 \pm 0,7
J	180 \pm 11,8	0,14 \pm 0,02	-25,1 \pm 2,0

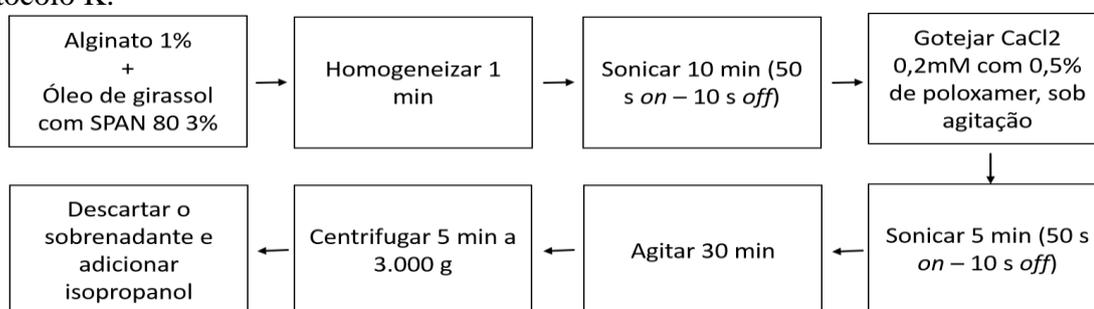
Tabela 8. Resultados obtidos nas modificações avaliadas para obter o protocolo K com características das nanopartículas de alginato consideradas adequadas.

Modificação	Resultado
K1	Formação de gel
K2	Formação de aglomerados
K3	Formação de aglomerados
K4	Formação de gel
K5	Formação de aglomerados
K6	Em água: formação de aglomerados Em isopropanol: tamanho = 425,5 \pm 130,2/ Pdi = 0,56 \pm 0,22
K7	Tamanho = 361,1 \pm 1,6/ Pdi = 0,32 \pm 0,02
K8	Tamanho = 419,8 \pm 12,6/ Pdi = 0,40 \pm 0,04
K9	Tamanho = 304,7 \pm 6,5 / Pdi = 0,29 \pm 0,02

Pdi: polidispersão

Após todo o processo de padronização o protocolo **K** foi definido em: misturar 1,35 g de alginato 1 % (m/v em água destilada) com 2,04 g de óleo de girassol contendo 3 % de SPAN 80 e homogeneizar por 1 min. Em seguida, sonicar a emulsão por 10 min (50 s *on* – 10 s *off*) e, sob agitação, adicionar por gotejamento o cloreto de cálcio 0,2 mM com 0,5 % de poloxamer. Após a adição do cloreto de cálcio, sonicar por mais 5 min (50 s *on* – 10 s *off*) e, em seguida, deixar em agitação por 30 min. Após estas etapas, centrifugar a emulsão por 5 min a 3.000 g., retirar o sobrenadante e adicionar isopropanol (P.A.) para retirar resíduos do óleo de girassol (Figura 14). Para incorporar a MFS, 3.000 µg do fármaco foi adicionado na solução de alginato 1 % antes de iniciar as etapas de produção das nanopartículas pelo protocolo K.

Figura 14. Etapas do processo de produção das nanopartículas de alginato utilizando o protocolo K.



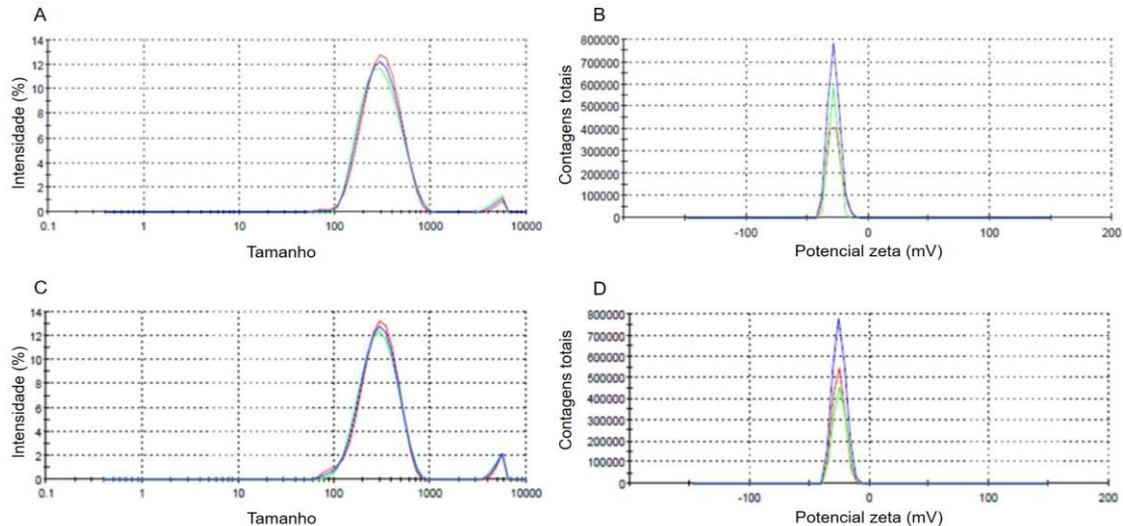
A incorporação da miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) foi realizada com o protocolo K e as características físicas comparadas com as nanopartículas de alginato vazias (Nano.Alg) (Tabela 9 e Figura 15). Os dados de tamanho, Pdi e potencial zeta foram semelhantes entre as duas formulações, mostrando que a incorporação da MFS não altera as características do sistema (Tabela 9 e Figura 15). É possível observar que, em ambas as formulações, 95 % da população de nanopartículas possuem diâmetro médio de 300 nm e 5 % com tamanhos maiores (~5.000 nm) (Figura 15), sendo a média de tamanho obtido em torno de 300 nm, Pdi de ~0,30 e potencial zeta negativo com valores em ~25 mV.

Tabela 9. Dados das características físicas (tamanho, polidispersão e potencial zeta) das nanopartículas de alginato vazias (Nano.Alg) e com miltefosina incorporada (MFS.Alg) produzidas seguindo o protocolo K.

	Tamanho (nm)	Pdi	Potencial zeta (mV)
Nano.Alg	330,3 ± 20,6	0,35 ± 0,05	-25,3 ± 4,07
MFS.Alg	314,0 ± 32,6	0,31 ± 0,05	-27,2 ± 3,01

Os dados representam média ± DP.

Figura 15. Distribuição de tamanho médio e potencial zeta das nanopartículas utilizando o protocolo K.



Nanopartículas de alginato vazias (A, B) e com miltefosina incorporada (C, D); tamanho médio (A, C) e potencial zeta (B, D).

5.2.2 Liofilização e reconstituição das nanopartículas de alginato

O processo de liofilização consiste em retirar a água presente na amostra. Como esse procedimento pode alterar as características físicas das nanopartículas foram testados crioprotetores como dextrose 10 % e trealose 10 % e apenas água para liofilizar as amostras. Utilizando isopropanol para ressuspender as amostras após a liofilização, foi observado que este processo melhora as características de potencial zeta das nanopartículas em relação a amostra antes de liofilizar ($p < 0,001$), sendo a trealose 10 % o crioprotetor de escolha devido a diminuição dos valores de Pdi ($p < 0,05$) e do tamanho médio das partículas (Tabela 10).

Tabela 10. Dados das características físicas das nanopartículas de alginato liofilizadas com e sem crioprotetor, resuspendidas em isopropanol e diluídas em água (1:100, v/v).

	Tamanho (nm)	Pdi	Potencial zeta (mV)
Antes da liofilização	$335,7 \pm 10,9$	$0,35 \pm 0,06$	$-22,8 \pm 0,6$
Água	$400,6 \pm 46,6$	$0,27 \pm 0,05$	$-43,5 \pm 0,7$ ***
Dextrose	$372,8 \pm 27,4$	$0,24 \pm 0,02$	$-39,5 \pm 0,4$ ***
Trealose	$314,2 \pm 11,1$	$0,17 \pm 0,01$ *	$-34,7 \pm 0,5$ ***

Os dados representam média \pm DP. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ versus nanopartículas antes de liofilizar (ANOVA unidirecional com pós-teste de Dunnet).

Em seguida, foi avaliado o uso de PBS e água estéril como veículos para reconstituir as amostras liofilizadas, pois o uso de isopropanol em ensaios *in vitro* e *in vivo* de atividade antifúngica é inapropriado. O PBS foi o veículo que menos alterou as características físicas após reconstituir as nanopartículas de alginato liofilizadas (Tabela 11), mantendo os valores de tamanho e Pdi similares antes da formulação ser liofilizada, e aumentando o valor de potencial zeta ($p < 0,05$). Enquanto que o uso de água aumentou o Pdi significativamente ($p < 0,01$) e não alterou os demais parâmetros.

As nanopartículas contendo miltefosina (MFS.Alg) quando liofilizadas com trealose 10% e ressuspensas em PBS, mostraram que o processo de liofilização mantém as características de tamanho e polidispersão e aumenta o potencial zeta ($p < 0,05$) (Tabela 12).

Tabela 11. Características físicas das nanopartículas de alginato liofilizadas com trealose 10%, reconstituídas diretamente em água estéril ou PBS e, posteriormente, diluídas em água (1:100) para avaliação.

	Tamanho (nm)	Pdi	Potencial zeta (mV)
Antes da liofilização	321,9 ± 6,6	0,34 ± 0,04	-21,1 ± 1,3
PBS	346,5 ± 30,6	0,40 ± 0,07	-36,2 ± 6,8 *
Água estéril	394,3 ± 34,7	0,62 ± 0,05 **	-22,8 ± 3,9

Os dados representam média ± DP. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ versus nanopartículas antes de liofilizar (ANOVA unidirecional com pós-teste de Dunnet).

Tabela 12. Características físicas das nanopartículas de alginato com miltefosina (MFS.Alg) antes da liofilização com trealose 10 % e o pó liofilizado reconstituído com PBS e diluídas em água (1:100) para avaliação.

	Tamanho (nm)	Pdi	Potencial zeta (mV)
MFS.Alg antes da liofilização	320,2 ± 37,9	0,43 ± 0,14	-19,0 ± 3,1
MFS.Alg após a liofilização	279,1 ± 56,7	0,42 ± 0,15	-39,7 ± 5,2 *

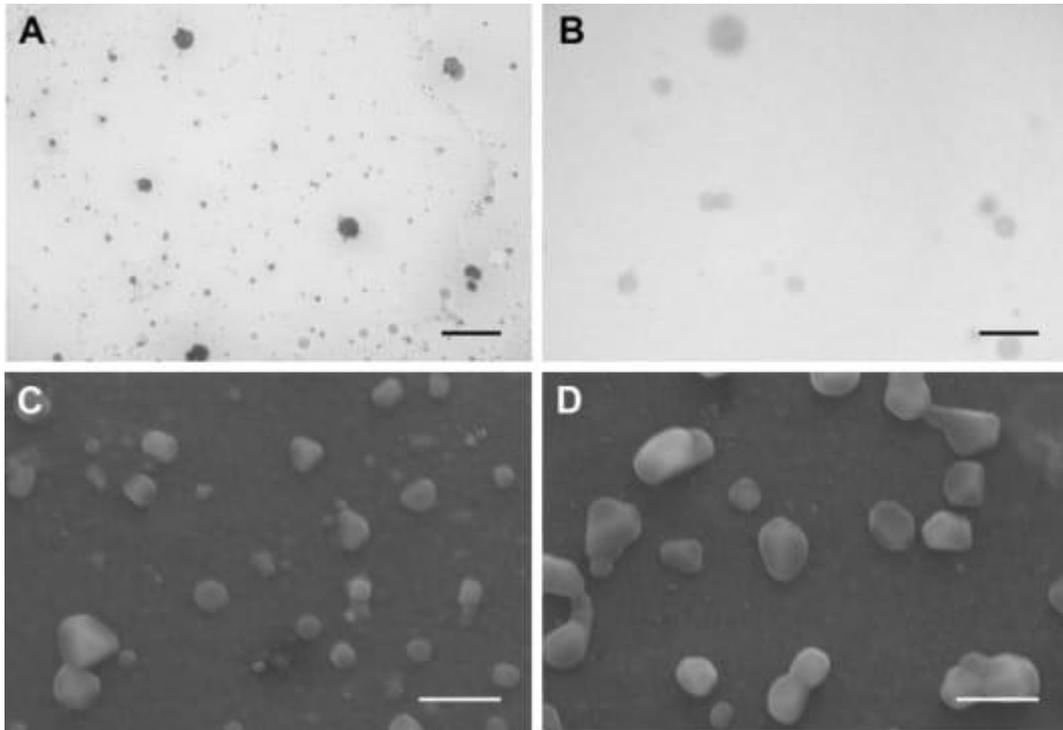
Os dados representam média ± DP. * $P < 0,05$ versus nanopartículas antes de liofilizar (teste t de student).

5.2.3 Microscopia eletrônica

As nanopartículas Nano.Alg e MFS.Alg nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram observadas com forma esférica. No entanto, com a microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que as nanopartículas possuem superfície regular e formatos

poliédricos irregulares (Figura 16). Importantemente, as imagens confirmam a média de tamanho dessas nanopartículas obtidas pelo *DLS*.

Figura 16. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura das nanopartículas de alginato.



Microscopia eletrônica de transmissão (A, B) e de varredura (C, D). Nanopartículas alginato vazias - Nano.Alg (A, C) e nanopartículas de alginato contendo miltefosina - MFS.Alg (B, D). Barras em A e B: 2 μm . Barras em C e D: 0,5 μm .

5.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

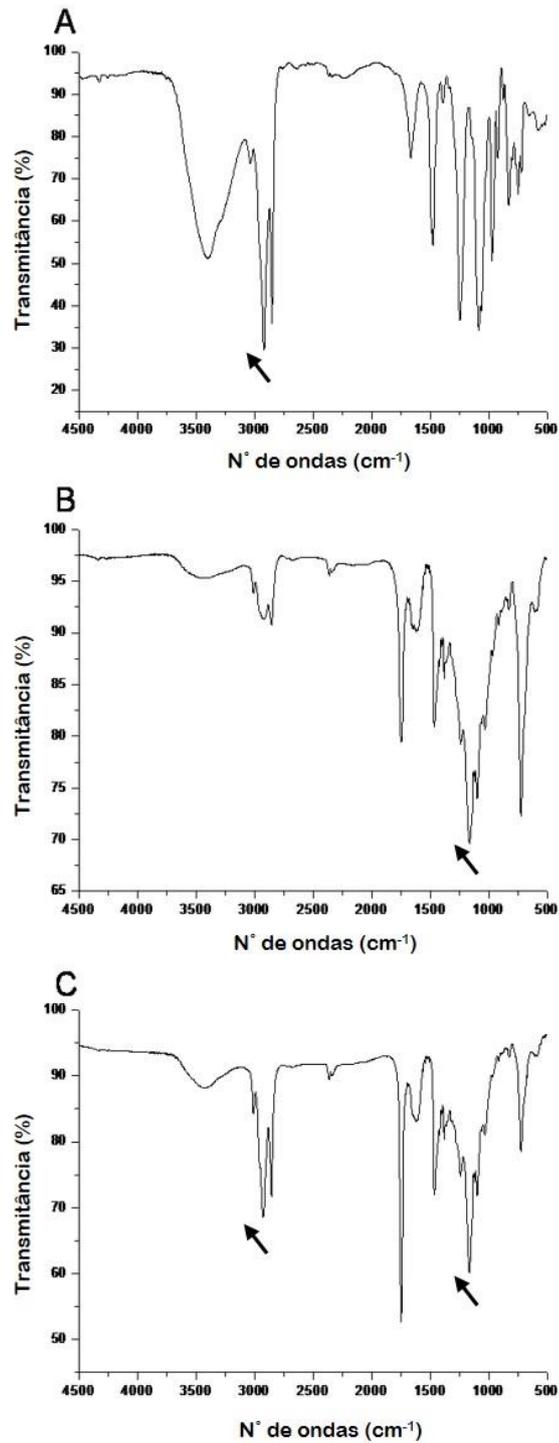
A Figura 17 demonstra os espectros de infravermelho no infravermelho da miltefosina, das nanopartículas vazias e das nanopartículas com fármaco. Os espectros das nanopartículas vazias e com miltefosina mostraram-se muito semelhantes, não sendo observado deslocamento das principais bandas, como em $\sim 1750\text{ cm}^{-1}$. Esses resultados indicam que não há interações perceptíveis ou novas ligações entre a MFS e os componentes da formulação.

5.2.4 Determinação da eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada seguindo a fórmula $EE = 100 - (\text{MFS no sobrenadante} \times 100 / \text{quantidade de MFS inicial})$. Para quantificar a MFS livre no sobrenadante foi utilizado o teste colorimétrico sempre utilizando uma curva padrão de calibração e o sobrenadante controle sem droga. Os dados de EE da MFS em nanopartículas de

alginate obtidos pelo protocolo K foram de $81,7\% \pm 6,64$ (quantificado em 6 amostras distintas e em momentos diferentes).

Figura 17. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

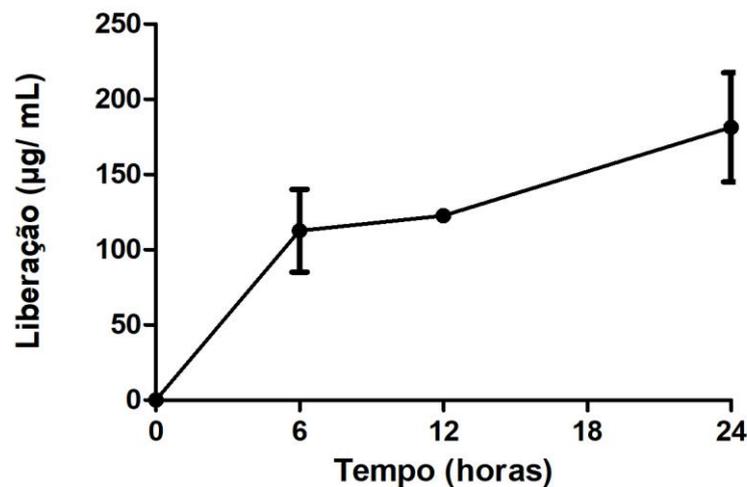


Miltefosina livre (A), nanopartículas de alginato (B) e nanopartículas de alginato com miltefosina (C). A presença de miltefosina e de alginato podem ser vistos em $2750-3000\text{ cm}^{-1}$ e $1000-1750\text{ cm}^{-1}$, respectivamente.

5.2.5 Ensaio de liberação da MFS *in vitro*

A liberação sustentada dos sistemas carreadores é um dos aspectos atrativos para seu uso, pois mantém a substância de interesse sendo constantemente e lentamente liberada no organismo. Com as nanopartículas MFS.Alg foi observado que a liberação da MFS ocorre de modo controlado e sustentado quando avaliado *in vitro* (figura 6), sendo observado um aumento da concentração ao longo das primeiras horas, obtendo um pico de liberação de aproximadamente 112,5 $\mu\text{g/mL}$ em 6 h. E, após esse período, a liberação se mantém lenta e prolongada até 24 h (181,25 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 18).

Figura 18. Liberação da miltefosina das nanopartículas de alginato.



Liberação *in vitro* a 37°C, com agitação constante e tempos de 6, 12 e 24 h. A quantificação da miltefosina foi realizada pelo método colorimétrico com ferrotiocianato de amônio.

5.2.6 Estabilidade das nanopartículas MFS.Alg

Outro fator importante é saber a estabilidade físico-química das formulações quando armazenadas por um determinado período de tempo. Podemos observar que as MFS.Alg liofilizadas com trealose 10 % mantém suas características até 30 dias de armazenamento a -20°C (Tabela 13), com pequenas alterações nos valores (sem diferenças estatísticas, $p > 0,05$). Porém, após 90 dias armazenadas as nanopartículas sofrem aumento significativo de tamanho e Pdi ($p < 0,001$ para ambos) (Tabela 13).

Tabela 13. Estabilidade das características de tamanho, polidispersão (Pdi) e potencial zeta das nanopartículas de alginato com miltefosina incorporada estocadas a -22°C ao longo de 90 dias.

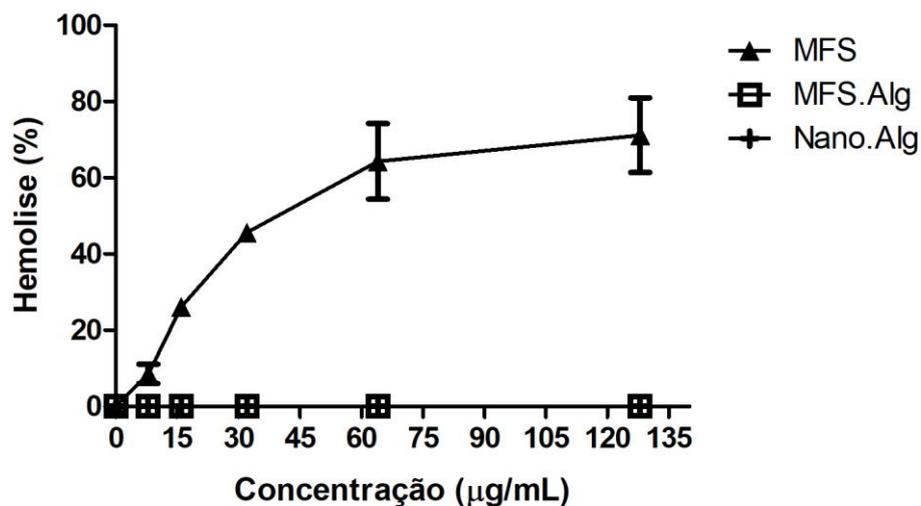
Tempo	Tamanho (nm)	Pdi	Potencial zeta (mV)
Antes da liofilização	$291,6 \pm 19,2$	$0,39 \pm 0,09$	$-19,0 \pm 3,1$
Após a liofilização			
1 dia	$311,2 \pm 20,1$	$0,38 \pm 0,06$	$-24,9 \pm 10,5$
7 dias	$346,2 \pm 58,6$	$0,38 \pm 0,01$	$-25,1 \pm 9,0$
15 dias	$345,9 \pm 78,8$	$0,43 \pm 0,23$	$-24,0 \pm 5,7$
30 dias	$313,4 \pm 9,9$	$0,26 \pm 0,01$	$-22,7 \pm 0,07$
90 dias	$741,8 \pm 9,9$ ***	$0,89 \pm 0,01$ ***	$-38,1 \pm 2,2$

Os dados representam média \pm DP. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ versus nanopartículas antes de liofilizar (ANOVA unidirecional com pós-teste de Dunnett).

5.2.7 Avaliação da citotoxicidade da formulação

A MFS livre apresentou atividade hemolítica de 50 % em concentrações próximas de $35 \mu\text{g/mL}$; entretanto, a MFS incorporada nas nanopartículas de alginato (MFS.Alg) não causa nenhum efeito hemolítico até nas maiores concentrações testadas de MFS ($128 \mu\text{g/mL}$). As nanopartículas de alginato (Nano.Alg), também, não apresentaram nenhum efeito sobre as hemácias (Figura 19).

Figura 19. Atividade hemolítica da miltefosina livre (MFS) e incorporada nas nanopartículas de alginato (MFS.Alg).



Nanopartículas de alginato sem o fármaco (Nano.Alg) também foram avaliadas.

5.2.8 Atividade antifúngica *in vitro*

Avaliando a atividade antifúngica das nanopartículas *in vitro*, os valores de CIM obtidos para o isolado *C. neoformans* CAP59 foi semelhante ao da MFS livre. Já nos isolados *C. neoformans* H99 e *C. gattii* ATCC 56990 os valores de CIM da MFS.Alg foram mais altos quando comparados com a MFS livre (Tabela 14). Nano.Alg foi avaliado e nenhuma atividade inibitória sobre as leveduras foi observada.

Tabela 14. Susceptibilidade de *Cryptococcus neoformans* (H99 e CAP59) e *Cryptococcus gattii* (ATCC 56990) à miltefosina livre (MFS), nanopartículas de alginato com (MFS.Alg) e sem MFS (Nano.Alg).

	MFS	MFS.Alg	Nano.Alg
<i>C. neoformans</i> CAP59	1	1,56	>400
<i>C. neoformans</i> H99	2	25	>400
<i>C. gattii</i> ATCC 56990	0,5	12,5	>400

Resultados de Concentração inibitória mínima (CIM) expressos em µg/mL.

Analisando a atividade antifúngica das nanopartículas MFS.Alg estocadas por até 90 dias a -20°C foi possível observar pequenas variações (1 ou 2 diluições) nos valores de CIM para as 3 cepas de *Cryptococcus* spp. (Tabela 15), demonstrando que a MFS presente na formulação mantém sua atividade antifúngica durante o período avaliado.

Tabela 15. Estabilidade da atividade antifúngica da nanopartículas de alginato com miltefosina sobre *Cryptococcus neoformans* (H99 e CAP59) e *Cryptococcus gattii* (ATCC 56990).

Tempo	<i>C. neoformans</i> CAP59	<i>C. neoformans</i> H99	<i>C. gattii</i> ATCC 56990
0	3,12	25	12,5
15 dias	12,5	100	25
30 dias	12,5	100	12,5
90 dias	6,25	100	50

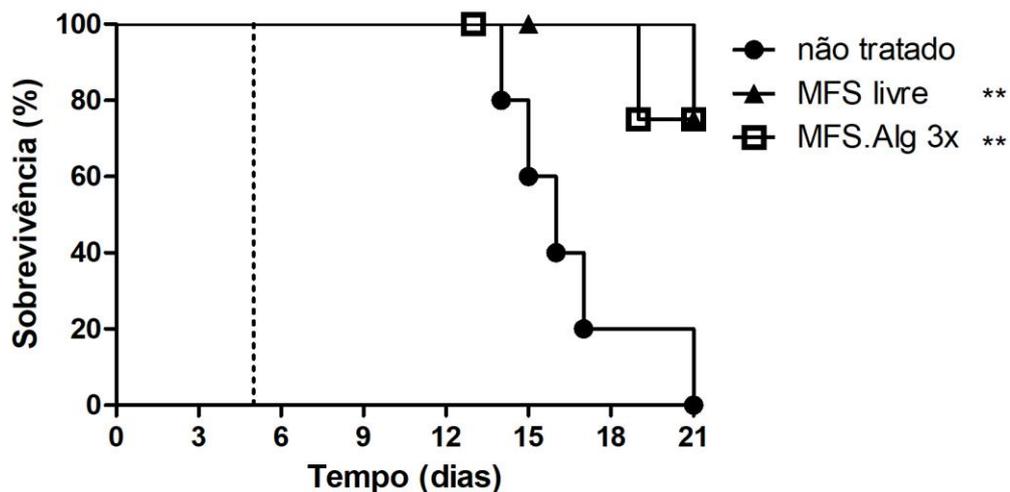
Avaliado pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM, µg/mL).

5.2.9 Eficácia antifúngica das nanopartículas em modelo murino de criptocose sistêmica

A curva de sobrevivência dos camundongos com infecção sistêmica causada por *C. neoformans* H99 foi obtida e observado que os animais infectados e não tratados começam a sucumbir após 15 dias da infecção, levando a 100 % de mortalidade no 21º dia. Após o tratamento com os esquemas terapêuticos propostos de MFS livre, MFS.Alg 1x e MFS.Alg 3x, a MFS livre e MFS.Alg 3x foram eficazes em aumentar a sobrevivência dos animais em cerca de 75 % de sobrevivência no 21º dia de observação ($p < 0,0055$).

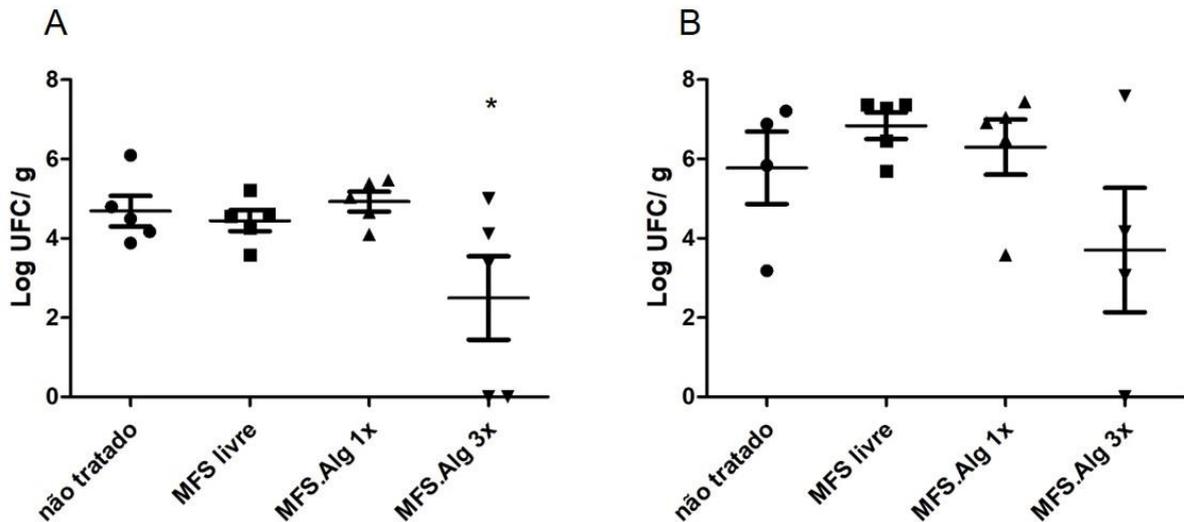
Apesar do aumento de sobrevivência dos animais tratados com MFS livre e MFS.Alg, apenas o tratamento com MFS.Alg 3x (20 mg/Kg) foi capaz de reduzir a carga fúngica pulmonar (53,3 %, $p < 0,05$) e cerebral (64 %, sem significância estatística) quando comparado com o grupo não tratado (Figura 21).

Figura 20. Curva de sobrevivência de camundongos infectados com *Cryptococcus neoformans* H99 tratados e não tratados com miltefosina.



Camundongos machos BALB/c infectados 1×10^6 UFC pela veia caudal. Os animais foram tratados após 1 hora da infecção, por via oral (gavagem) com os seguintes esquemas terapêuticos: 5 doses de miltefosina livre 10 mg/Kg a cada 24 h (MFS livre); 3 doses de nanopartículas de alginato com miltefosina 20 mg/Kg a cada 48 h (MFS.Alg 3x). O grupo não tratado foi incluído para comparação com os grupos tratados. A linha pontilhada indica o tempo de duração dos tratamentos. N = 5 animais/grupo; ** $p < 0,0055$ (teste Log-rank (Mantel-Cox)) comparado com o grupo não tratado.

Figura 21. Carga fúngica pulmonar e cerebral de camundongos infectados com *Cryptococcus neoformans* H99 tratados e não tratados com miltefosina.



Camundongos machos BALB/c infectados com 1×10^6 UFC pela veia caudal. Os animais foram tratados após 1 hora da infecção, por via oral (gavagem) com os seguintes esquemas terapêuticos: miltefosina livre 10 mg/Kg a cada 24 h (MFS livre); dose única de nanopartículas de alginato com miltefosina 20 mg/Kg (MFS.Alg 1x); e 3 doses de nanopartículas de alginato com miltefosina 20 mg/Kg a cada 48 h (MFS.Alg 3x). O grupo não tratado foi incluído para comparação com os grupos tratados. (A) pulmão e (B) cérebro. N = 4 - 5 animais/grupo; * $p < 0,05$ (ANOVA unidirecional com pós-teste de Dunnet) comparado com o grupo não tratado.

5.3 Discussão

Os sistemas de liberação controlada de substâncias vêm sendo amplamente utilizado na área da saúde como carreadores de fármacos e entre eles estão presentes as nanopartículas. Neste trabalho foi definido produzir nanopartículas de alginato pelo método de emulsificação com gelificação externa; o qual consiste de duas etapas principais: primeira, a solução de alginato, contendo o composto de interesse, é emulsionada em uma fase oleosa formando uma emulsão; segunda, um agente de reticulação, muitas vezes o íon cálcio de uma solução de cloreto de cálcio, é adicionado à emulsão resultando na gelificação das gotículas de emulsão de alginato, seguido pela separação dos componentes da emulsão. Além disso, as emulsões são relativamente fáceis de serem produzidas e, podem ser, por conseguinte, mais facilmente dimensionadas para escala industrial (PAQUES et al., 2014).

Ao longo da padronização da produção das nanopartículas de alginato foram avaliados diferentes protocolos e escolhidas etapas e concentrações conforme se observava os resultados para chegar ao protocolo final no qual a MFS seria incorporada. Esse protocolo foi o 'protocolo K' e durante a padronização foi possível observar que as nanopartículas de alginato com

tamanho e polidispersão menores foram obtidas com 5 min de sonicação após o gotejamento do cloreto de cálcio (protocolo **K7**) e com adição 0,5 % de poloxamer (protocolo **K9**). O uso de sonicador nos protocolos baseados em emulsificação com polissacarídeos é um passo importante para obter um tamanho menor e populações monodispersas; a sonicação é eficaz em quebrar os agregados de partículas, reduzindo assim seu tamanho e polidispersão (LOPES et al., 2015). Porém a sonicação é um processo crítico envolvendo uma variedade de interações físico-químicas complexas que podem resultar na quebra de aglomerados ou agregação adicional, e outros efeitos como reações químicas sendo considerada uma etapa relevante na padronização correta do processo de produção (MAHBUBUL et al., 2015; TAUROZZI; HACKLEY; WIESNER, 2012).

A utilização do poloxamer e de SPAN 80 na formulação está relacionada com suas características tensoativas; são compostos anfifílicos que tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo) formando um filme molecular ordenado nas interfaces que reduz a tensão interfacial e superficial formando as emulsões (SILVA et al., 2015). Yao et al., (2012) observaram que o uso de poloxamer com alginato na formação de esferas porosas flutuantes para uso gástrico aumentou a estabilidade da preparação.

É de extrema importância nos sistemas de liberação de fármacos as características de tamanho, polidispersão e potencial zeta; as nanopartículas obtidas com o protocolo **K** possuem tamanho médio de $330,3 \pm 20,6$ nm e índice de polidispersão em torno de 0,30. É possível observar um pico principal (95 % da população) e outro menor contendo partículas de tamanho em torno de 5.000 nm (5 % da população) (Figura 15), o que pode explicar o valor do índice de polidispersão ao redor de 0,30.

Quanto a média de tamanho encontrada é demonstrado que emulsões de alginato com gelificação externa podem variar de 200 a 1000 nm (PAQUES et al., 2013); trabalhos mostram valores de tamanho de 259 ± 27 nm e $419,6 \pm 0,28$ nm (SANGEETHA et al., 2007; TACHAPRUTINUN; PAN-IN; WANICHWECHARUNGRUANG, 2013), muito próximos aos obtidos neste trabalho com o protocolo **K**. Nossas nanopartículas possuem um tamanho favorável, no que diz respeito à entrega de fármaco por via oral, pois partículas menores que 500 nm são absorvidas intactas por meio de vias transcelulares/ paracelulares no intestino (JIAO, 2002)

O potencial zeta obtido foi negativo com valores de $-25,3 \pm 4,07$ mV; é sabido que o alginato é um polímero aniônico e essa característica sugere que o polímero de alginato se

encontra presente na superfície externa das nanopartículas (GUPTA et al., 2015). A carga das nanopartículas interfere na estabilidade, no comportamento delas dentro do organismo e, também, na liberação do fármaco (HONARY; ZAHIR, 2013). Estudos sugerem que nanopartículas com carga superficial positiva se ligam fortemente às membranas celulares devido as interações eletrostáticas entre a membrana aniônica e as partículas catiônicas, facilitando a captação celular (HONARY; ZAHIR, 2013; PANYAM; LABHASETWAR, 2003). Porém, sistemas carreadores com potencial zeta negativo têm se mostrado eficientes mesmo com carga igual a das células. Patil et al., (2007) avaliaram o efeito do potencial zeta de nanopartículas de óxido de cério sobre a absorção celular em células de adenocarcinoma do pulmão (A549) e observaram que as células A549 possuem uma absorção preferencial pelas nanopartículas carregadas negativamente. O trabalho com microesferas de alginato como carreadoras de nistatina, com potencial zeta de -35 mV, demonstrou liberação adequada do fármaco para tratamento de candidíase oral (SANGEETHA et al., 2007). Da mesma forma, outros trabalhos com carreadores de alginato e carga negativa mostram ser eficazes na liberação e consequente tratamento de candidíases (MARTÍN et al., 2015; MARTÍN-VILLENA et al., 2013; REIS et al., 2015). Wilhelm et al., (2003) sugerem que as partículas carregadas negativamente se ligam aos sítios catiônicos na forma de aglomerados, devido às suas interações repulsivas com a carga negativa da superfície da célula. Além disso, as nanopartículas, já ligadas na superfície celular apresentam uma densidade de carga reduzida, o que pode favorecer a adsorção de outras partículas livres. Assim, a elevada absorção celular de nanopartículas carregadas negativamente está relacionada primeiro com o processo não específico de adsorção das nanopartículas na membrana celular e, segundo com a formação de aglomerados de nanopartículas.

A liofilização é uma técnica frequentemente usada para promover a estabilidade física e química de nanopartículas e consiste em remover água da amostra congelada por sublimação e dessorção a vácuo, porém durante as etapas de congelamento e secagem as nanopartículas podem sofrer alterações nas suas características (ABDELWAHED et al., 2006). Quando avaliada a estabilidade das nanopartículas submetidas a liofilização, foi observado que a trealose foi o melhor crioprotetor para ser utilizado na formulação; esse resultado concorda com estudos realizados por Chitkara et al., (2014) onde o uso de trealose mostrou melhores resultados na reconstituição e constância do tamanho das nanopartículas. Outro fato observado foi a diferença das características físicas das nanopartículas quando ressuspensas em água ou em PBS. Pasparakis e Bouropoulos (2006) mostram que formulações de alginato em diferentes

meios aquosos (água pura, PBS pH 7.4 e solução representando fluido gástrico pH 1.2) apresentam diferentes taxas de inchaço; no período de 1 h em água pura ocorreu um grau de intumescimento de 115 % enquanto em PBS foi de aproximadamente 70 %. O comportamento de intumescimento pode ser bem justificado pelo fato de que as amostras ressuspensas tendem a absorver água a fim de encher as regiões vazias da rede de polímero das nanopartículas que permanecem desidratadas até que atinjam um estado de equilíbrio osmótico, aumentando, assim, seu tamanho (PASPARAKIS; BOUROPOULOS, 2006). Nossos dados demonstram que a reconstituição das nanopartículas em água aumenta o tamanho e o PDI enquanto que em PBS essas mudanças são menores em relação aos valores obtidos antes da liofilização, isso se deve pelo efeito de inchaço causado pela água pura. As nanopartículas MFS.Alg liofilizadas com trealose 10 % e ressuspensas em PBS, também, mantêm suas características de tamanho e polidispersão, e um potencial zeta negativo com valor em módulo maior, tornando viável a utilização desse procedimento. Além disso, as nanopartículas MFS.Alg podem ser armazenadas a -20°C durante 1 mês sem perder suas características de tamanho, PDI e potencial zeta; e principalmente a atividade antifúngica, facilitando o uso da formulação, não sendo necessário utilizar logo após o seu preparo.

As nanopartículas sem e com MFS (Nano.Alg e MFS.Alg, respectivamente) possuem superfície e formas semelhantes quando observadas em microscopia eletrônica, o que indica que a incorporação do fármaco não altera a morfologia. Além disso, as imagens de microscopia corroboram com os dados de tamanho médio das nanopartículas obtidos por *DLS*. É interessante salientar que as formas das nanopartículas observadas por MET são esféricas e por MEV são poliedros irregulares; essa característica em partículas de alginato é observada em diferentes trabalhos (GUPTA et al., 2015; MARTÍN et al., 2015), podendo ser resultado da técnica utilizada na preparação das amostras (MARTÍN-VILLENA et al., 2013).

Outra característica importante do protocolo utilizado foi a eficiência de encapsulamento da MFS nas nanopartículas de alginato (81,7 % \pm 6,64). Isso demonstra que o protocolo K é eficiente em incorporar a MFS. Outros estudos utilizando o alginato mostram valores de eficiência de encapsulamento nesta faixa, como micropartículas com ~80 % de nistatina (MARTÍN-VILLENA et al., 2013), nanopartículas com 80 – 90 % de antibacterianos antituberculose e 92 – 97 % de econazol (AHMAD; SHARMA; KHULLER, 2007). Alta porcentagem de incorporação dos fármacos nas nanopartículas torna esses sistemas mais promissores para a utilização, pois a perda de MFS durante o processo de produção é baixa.

Devido à natureza hidrofílica do polímero de alginato, a liberação de fármacos encapsulados pode seguir mecanismos diferentes; fármacos solúveis em água são liberados principalmente por difusão, enquanto que fármacos pouco solúveis em água são liberados por erosão matricial (SOSNIK, 2014). Martín-Villena et al., (2013) observaram em suas micropartículas de alginato contendo nistatina que a liberação ocorria em um passo inicial com liberação de explosão, seguida de uma fase de liberação prolongada mais lenta. Esse comportamento é visto na liberação da MFS das nanopartículas de alginato, onde em 6 h ocorre maior liberação da MFS seguida de forma constante e lenta, o que pode proporcionar redução na frequência de dosagem, minimizar as flutuações no nível do fármaco no plasma, e diminuir os efeitos adversos (JAIN, 2014). É importante salientar que não foram observadas interações químicas entre o fármaco e a formulação quando analisado por FTIR, fator importante para que a MFS seja liberada nas das nanopartículas de alginato.

A MFS possui elevada toxicidade com efeitos gastrointestinais (náuseas, vômito, diarreia) e toxicidade associada principalmente com os rins e o fígado. Adicionalmente, observa-se efeito teratogênico e elevada atividade hemolítica (similar a anfotericina B deoxicolato) (revisado por DORLO et al., 2012). Observamos que a MFS livre possui atividade hemolítica de 50 % em concentrações próximas de 35 µg/mL e a MFS em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) não causa nenhum efeito hemolítico até as maiores concentrações testadas de MFS (128 µg/mL). Esses dados corroboram com o perfil de liberação controlada do fármaco das nanopartículas. Além disso, foi observado que as nanopartículas Nano.Alg não apresentam nenhum efeito tóxico. Dados da literatura afirmam que uso do polímero de alginato traz como uma vantagem não apresentar toxicidade (CARDOSO; COSTA; MANO, 2016; PAQUES et al., 2014) e, também, que o uso de sistemas carreadores diminui o efeito tóxico de fármacos (KUMAR et al., 2013; SANGEETHA et al., 2007; SPADARI; LOPES; ISHIDA, 2017).

A atividade antifúngica das nanopartículas de alginato com MFS (MFS.Alg) quando avaliada *in vitro* apresentou valores de CIM similar à MFS livre para *C. neoformans* CAP59; entretanto para *C. neoformans* H99 e *C. gatti* ATCC 56990 os valores de CIM das nanopartículas MFS.Alg foram maiores que MFS livre. Dados da literatura têm demonstrado que alguns antifúngicos (Ex. Anfotericina B) carreados em partículas (nano- ou micro-) podem apresentar menor atividade antifúngica *in vitro* quando comparado com a formulação convencional do fármaco; por outro lado, em modelo animal a atividade antifúngica apresentava-se similar ou melhor, e também, diminui os efeitos toxicológicos associados ao antifúngico na formulação convencional e/ou diminui os intervalos da administração do fármaco (KHAN et

al., 2016; SALDANHA et al., 2016; TAN et al., 2016). Um aspecto importante é que as nanopartículas MFS.Alg estocadas a -20°C por até 90 dias mantêm a atividade antifúngica com uma variação no valor de CIM de mais ou menos uma diluição. Essas variações nos resultados de CIM são amplamente aceitas pelos protocolos padrão de testes de susceptibilidade aos antifúngicos descritos em documentos do “Clinical & Laboratory Standards Institute” (CLSI, www.clsi.org) e do “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST, www.eucast.org). Adicionalmente, as características de tamanho médio, Pdi e de potencial zeta de MFS.Alg foram consideradas similares por até 30 dias de armazenamento a -20°C , conferindo estabilidade da formulação.

O uso de MFS em nanocarreadores, também, tem sido avaliado para tratamentos antiparasitários. Nanopartículas de PLGA-PEG com MFS promoveram uma redução significativa de amastigotas de *Leishmania donovani* no tecido infectado em relação a MFS livre e AMB *in vivo* (KUMAR et al., 2016). Outro estudo com nanopartículas lipídicas contendo MFS diminuíram o efeito hemolítico e a citotoxicidade em macrófagos e mantiveram a atividade anti-leishmaniose semelhante ao fármaco livre (BITTERCOURT et al., 2016). Também, foram avaliadas nanopartículas lipídicas contendo MFS para tratamento oral alternativo para a esquistossomose mansônica; os autores demonstraram que uma dose única (20 mg/ kg) por tratamento oral contra o estágio adulto de *S. mansoni* em camundongos foi eficaz usando a formulação, além de observarem efeitos potentes contra os estágios invasivo e imaturo de *S. mansoni* em camundongos infectados (EISSA et al., 2015; EL-MOSLEMANY et al., 2016).

Neste trabalho incorporamos a MFS em nanopartículas poliméricas de alginato, os carreadores poliméricos oferecem vantagens em relação aos demais sistemas, como os formados por lipídios, principalmente na facilidade de produção; são mais facilmente escalonáveis, cujas propriedades físico-químicas são passíveis de reprodução após otimização do processo de produção; e são mais estáveis (VOLTAN et al., 2016). Além disso, o uso de polímeros naturais, como o alginato, é vantajoso em comparação com polímeros sintéticos devido à sua abundância na natureza, baixo custo de processamento, biocompatibilidade, biodegradabilidade, solubilidade em água, bioatividade e segurança ambiental (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016; SUNDAR; KUNDU; KUNDU, 2010)

O modelo de infecção sistêmica por *C. neoformans* H99 e o tratamento com MFS livre corroboram com resultados obtidos na literatura em que a administração oral diária de MFS por 5 dias após a infecção dos camundongos aumentou a sobrevivência (WIDMER et al., 2006). É

importante salientar que os animais tratados por via oral com 3 doses (20 mg/Kg) de MFS.Alg e com 5 doses de MFS livre (10 mg/Kg) tiveram perfil de sobrevivência semelhantes (75 %). De forma interessante, quando avaliada as UFC desses animais, o tratamento com MFS livre não diminuiu a carga fúngica nos pulmões e cérebros, assim como o uso de MFS.Alg 1x. Por outro lado, o tratamento com MFS.Alg 3x diminuiu a carga fúngica em ambos os órgãos. Esses dados demonstram que o uso das nanopartículas de alginato como carreador da miltefosina é promissor, sendo o tratamento menos incomodo pelo fato de ser administrado em intervalos maiores de tempo (48 h) e mais eficiente em diminuir a carga fúngica nos órgãos que o fármaco livre. É importante ressaltar que mesmo a concentração total do fármaco sendo maior quando utilizada a formulação MFS.Alg 3x, as nanopartículas trazem a vantagem importante de diminuir os efeitos tóxicos no organismo.

5.4 Conclusão

- O protocolo de produção das nanopartículas de alginato foi padronizado utilizando o método de emulsificação com gelificação externa, e obtidas nanopartículas com tamanho médio de $314,0 \pm 32,6$ nm, índice de polidispersão em torno de 0,30 e potencial zeta de $-27,2 \pm 3,01$ mV, com superfície regular e formas esféricas e/ou poliédricas irregulares;

- A porcentagem de incorporação da miltefosina nas nanopartículas de alginato é de $81,7\% \pm 6,64$ e ocorre uma liberação lenta e prolongada do fármaco quando avaliado *in vitro*;

- Nanopartículas MFS.Alg avaliadas *in vitro* sobre células planctônicas de *Cryptococcus* spp. mostraram atividade antifúngica com valores de CIM semelhantes e até ~10 x mais altos que a MFS livre;

- O uso de nanopartículas de alginato como carreador da MFS não causou hemólise, diminuindo a toxicidade quando comparado com o fármaco livre;

- As nanopartículas de alginato com miltefosina (MFS.Alg) mostraram atividade contra criptococose sistêmica, aumentando a sobrevivência dos camundongos infectados e diminuindo a carga fúngica no pulmão e cérebro.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W. et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688–1713, 30 dez. 2006.
- AGUIAR, P. A. D. F. DE et al. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. February 2016, 2017.
- AHMAD, Z.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Chemotherapeutic evaluation of alginate nanoparticle-encapsulated azole antifungal and antitubercular drugs against murine tuberculosis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 3, p. 239–243, 2007.
- ALBERTINI, B. et al. Polymer-lipid based mucoadhesive microspheres prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate. **European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 4-5, p. 591–601, 2 mar. 2009.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. **Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*** *Eukaryotic Cell*, 2015.
- ARAUJO, G. DE S. et al. Capsules from Pathogenic and Non-Pathogenic *Cryptococcus* spp. Manifest Significant Differences in Structure and Ability to Protect against Phagocytic Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e29561, 12 jan. 2012.
- BANERJEE, U.; GUPTA, K.; VENUGOPAL, P. A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 35, n. 2, p. 139–41, 1997.
- BARRATT, G.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P. Cellular Transport and Lipid Interactions of Miltefosine. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 3, p. 247–255, 1 mar. 2009.
- BIELSKA, E. et al. Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1556, 19 dez. 2018.
- BISWAS, C. et al. In vitro activity of miltefosine as a single agent and in combination with voriconazole or posaconazole against uncommon filamentous fungal pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2842–2846, 2013a.
- BISWAS, C. et al. Functional characterization of the hexose transporter Hxt13p: An efflux pump that mediates resistance to miltefosine in yeast. **Fungal Genetics and Biology**, v. 61, p. 23–32, 2013b.
- BISWAS, C. et al. Functional disruption of yeast metacaspase, Mca1, leads to miltefosine

resistance and inability to mediate miltefosine-induced apoptotic effects. **Fungal Genetics and Biology**, v. 67, p. 71–81, 2014.

BITTERCOURT, J. J. G. et al. Miltefosine-loaded lipid nanoparticles: improving stability and reducing hemolytic potential to erythrocytes and cytotoxic effect to macrophages. **Biophysical chemistry**, v. submetido, p. 20–31, 2016.

BLAHA, C. et al. In vitro activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against metronidazole-resistant and -susceptible strains of *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. December 2005, p. 273–278, 2006.

BOJARCZUK, A. et al. *Cryptococcus neoformans* Intracellular Proliferation and Capsule Size Determines Early Macrophage Control of Infection. **Scientific Reports**, v. 6, n. October 2015, p. 21489, 2016.

BORAL, H. et al. Overview of selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Exophiala dermatitidis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 111, p. 92–107, 2018.

BORBA-SANTOS, L. P. et al. Miltefosine is active against *Sporothrix brasiliensis* isolates with in vitro low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 415–422, 2015.

BRAUN, D. K. et al. Cryptococcal Infection of a Prosthetic Dialysis Fistula. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 24, n. 5, p. 864–867, 1 nov. 1994.

BRILHANTE, R. S. N. et al. In vitro inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 320–325, 2014.

BRILHANTE, R. S. N. et al. In vitro antifungal activity of miltefosine and levamisole: their impact on ergosterol biosynthesis and cell permeability of dimorphic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 4, p. 962–969, out. 2015.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; LEVITZ, S. M. Tackling Human Fungal Infections. **Science**, v. 336, n. 6082, p. 647–647, 11 maio 2012.

BUTTS, A.; KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 9, p. 9–11, 2012.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 2017.

CARDOSO, M.; COSTA, R.; MANO, J. Marine Origin Polysaccharides in Drug Delivery Systems. **Marine Drugs**, v. 14, n. 2, p. 34, 5 fev. 2016.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. **Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*** *Current Opinion in Microbiology*, 2000.

CEGNAR, M.; MIKLAVŽIN, A.; KERČ, J. Freeze-drying and release characteristics of polyelectrolyte nanocarriers for the mucosal delivery of ovalbumin. **Acta Chimica Slovenica**,

v. 58, n. 2, p. 241–250, 2011.

CHEN, S. C. A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. Cryptococcus gattii infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.

CHENG, P. Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. Cryptococcus gattii isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than Cryptococcus neoformans. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4284–4294, out. 2009.

CHENG, Y. et al. Alginic acid nanoparticles prepared through counterion complexation method as a drug delivery system. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 4, n. 10, p. 5325–5332, 2012.

CHEONG, J. W. S.; MCCORMACK, J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 261–269, 1 abr. 2013.

CHITKARA, D. et al. Core-shell nanoparticulate formulation of gemcitabine: lyophilization, stability studies, and in vivo evaluation. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 4, n. 5-6, p. 439–451, 2014.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, n. April, p. 1–25, 2008.

COLEMAN, J. J. et al. Cryptococcus neoformans: Nonvertebrate Hosts and the Emergence of Virulence. In: **Cryptococcus**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2011. p. 261–267.

COMPAIN, F. et al. In vitro activity of miltefosine in combination with voriconazole or amphotericin B against clinical isolates of Scedosporium spp. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. Pt_3, p. 309–311, 2015.

COSSU, A. et al. Antifungal activity against Candida albicans of starch Pickering emulsion with thymol or amphotericin B in suspension and calcium alginate films. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, n. 1-2, p. 233–242, 2015.

CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508–512, 2005.

CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100 Suppl , p. S4–8, 2006.

DE AGUIAR CORDEIRO, R. et al. Synthesis and antifungal activity in vitro of isoniazid derivatives against histoplasma capsulatum var. capsulatum. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2504–11, 2014.

DEBELE, T. A.; MEKURIA, S. L.; TSAI, H.-C. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. **Materials Science and Engineering: C**, 2016.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in

the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. July, p. 2576–2597, 2012a.

DORLO, T. P. C. et al. Characterization and identification of suspected counterfeit miltefosine capsules. **The Analyst**, v. 137, p. 1265, 2012b.

EISSA, M. M. et al. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 2, p. 235–42, 2011.

EISSA, M. M. et al. Miltefosine Lipid Nanocapsules for Single Dose Oral Treatment of Schistosomiasis Mansoni: A Preclinical Study. **Plos One**, v. 10, n. 11, p. e0141788, 2015.

EL-MOSLEMANY, R. M. et al. Miltefosine lipid nanocapsules: Intersection of drug repurposing and nanotechnology for single dose oral treatment of pre-patent schistosomiasis mansoni. **Acta Tropica**, v. 159, p. 142–148, jul. 2016.

ELSAYED, M.; HUANG, J.; EDIRISINGHE, M. Bioinspired preparation of alginate nanoparticles using microbubble bursting. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 132–139, 2015.

ERNST, E. J.; KLEPSER, M. E.; PFALLER, M. A. Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 1108–11, abr. 2000.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: An international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5898–5906, nov. 2012.

GALLOVIC, M. D. et al. Acetalated Dextran Microparticulate Vaccine Formulated via Coaxial Electrospray Preserves Toxin Neutralization and Enhances Murine Survival Following Inhalational *Bacillus Anthracis* Exposure. **Advanced Healthcare Materials**, p. 1–11, 2016.

GUERRA, C. R. et al. Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 582–590, 2012.

GUPTA, P. K. et al. Self Assembled Ionically Sodium Alginate Cross-Linked Amphotericin B Encapsulated Glycol Chitosan Stearate Nanoparticles: Applicability in Better Chemotherapy and Non-Toxic Delivery in Visceral Leishmaniasis. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 5, p. 1727–1740, 2015.

HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16–48, 2015.

HAGEN, F. et al. Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus. **mSphere**, v. 2, n. 4, p. e00238–17, 30 ago. 2017.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced**

Drug Delivery Reviews, v. 60, n. 15, p. 1638–1649, 2008.

HAQUE, S. et al. Development and evaluation of brain targeted intranasal alginate nanoparticles for treatment of depression. **Journal of Psychiatric Research**, v. 48, n. 1, p. 1–12, 2014.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265 – 273, 9 maio 2013.

HOSSEINI, S. M. et al. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 582–588, 2013.

HUANG, S. H. et al. Cryptococcus neoformans-Derived Microvesicles Enhance the Pathogenesis of Fungal Brain Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

IMBERT, S. et al. In vitro combination of voriconazole and miltefosine against clinically relevant molds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6996–6998, 2014.

ISHIDA, K. et al. Influence of tannins from Stryphnodendron adstringens on growth and virulence factors of Candida albicans. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 942–949, 6 set. 2006.

ISHIDA, K. et al. Activity of tannins from Stryphnodendron adstringens on Cryptococcus neoformans: effects on growth, capsule size and pigmentation. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 8, p. 29, 2009.

ISLAM, N.; FERRO, V. Recent Advances in Chitosan-Based Nanoparticulate Pulmonary Drug Delivery. **Nanoscale**, 2016.

JAIN, K. K. **Drug Delivery System**. New York, NY: Springer New York, 2014. v. 1141

JEEVANANDAM, J.; CHAN, Y. S.; DANQUAH, M. K. Nano-formulations of drugs: Recent developments, impact and challenges. **Biochimie**, v. 128-129, p. 99–112, 2016.

JIAO, Y. In Vitro and In Vivo Evaluation of Oral Heparin-Loaded Polymeric Nanoparticles in Rabbits. **Circulation**, v. 105, n. 2, p. 230–235, 15 jan. 2002.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 2012.

KHAN, A. A. et al. Antifungal efficacy of amphotericin B encapsulated fibrin microsphere for treating Cryptococcus neoformans infection in Swiss albino mice. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 342–348, 2016.

KUMAR, A. et al. Innovative pharmaceutical development based on unique properties of nanoscale delivery formulation. **Nanoscale**, v. 5, n. 18, p. 8307, 2013.

KUMAR, R. et al. Development of PLGA–PEG encapsulated miltefosine based drug delivery

system against visceral leishmaniasis. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 748–753, fev. 2016.

KUMAR, S. N.; MOHANDAS, C. An antifungal mechanism of protolicheterinic acid from the lichen *Usnea albopunctata* lies in the accumulation of intracellular ROS and mitochondria-mediated cell death due to apoptosis in *Candida tropicalis*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. MAY, p. 1–18, 2017.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, p. 1–28, 2014.

KWON-CHUNG, K. J. et al. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. e00357–16, 22 fev. 2017.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LI, L. et al. Applications of natural polymeric materials in solid oral modified-release dosage forms. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 40, p. 5854–5867, 2015a.

LI, S. P. et al. The fruiting body and its caterpillar host of *Cordyceps sinensis* show close resemblance in main constituents and anti-oxidation activity. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 319–324, jan. 2002.

LI, Y. et al. Diorcinol D Exerts Fungicidal Action against *Candida albicans* through Cytoplasm Membrane Destruction and ROS Accumulation. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0128693, 2015b.

LIMPER, A. H. et al. Fungal infections 1 Fungal infections in HIV/AIDS. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 17, p. 1–10, 2017.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 401–416, 2009.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual review of microbiology**, v. 60, p. 69–105, 2006.

LIU, O. W. et al. Systematic Genetic Analysis of Virulence in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Cell**, v. 135, n. 1, p. 174–188, 3 out. 2008.

LOPES, M. et al. Probing insulin bioactivity in oral nanoparticles produced by ultrasonication-assisted emulsification/internal gelation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5865, set. 2015.

LORETO, E. S. et al. In vitro activities of miltefosine and antibacterial agents from the macrolide, oxazolidinone, and pleuromutilin classes against *pythium insidiosum* and *pythium aphanidermatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 1–13, 2018.

LOYSE, A. et al. Cryptococcal meningitis: improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 629–637, jul. 2013.

LUDOVICO, P.; CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. **Microbiology**, v. 147, n. 12, p. 3335–3343, 2001.

LUIZ, R. L. F. et al. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 68, 19 dez. 2015.

MAHBUBUL, I. M. et al. Effective ultrasonication process for better colloidal dispersion of nanofluid. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 26, p. 361–369, set. 2015.

MAHOR, A. et al. Moxifloxacin loaded gelatin nanoparticles for ocular delivery: Formulation and in-vitro, in-vivo evaluation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 483, p. 132–138, 2016.

MAITI, S. et al. Investigation on processing variables for the preparation of fluconazole-loaded ethyl cellulose microspheres by modified multiple emulsion technique. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 703–15, 2009.

MARTÍN, M. J. et al. Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 140–149, 2015.

MARTINEZ, L. R. et al. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 669–679, 2010.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific Antibody Can Prevent Fungal Biofilm Formation and This Effect Correlates with Protective Efficacy. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6350–6362, 2005.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6118–6123, 2006a.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Biofilms to Antifungal Agents In Vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021–1033, 2006b.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4592–4601, 2007.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 3, p. 1–11, 2015.

MARTÍN-VILLENA, M. J. et al. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: Development and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 1–11, 2013.

- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, mar. 2016.
- MENDES DE TOLEDO, C. E. et al. Antifungal Properties of Crude Extracts, Fractions, and Purified Compounds from Bark of *Curatella americana* L. (Dilleniaceae) against *Candida* Species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–9, 2015.
- MESA-ARANGO, A. C. et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 2014.
- MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. AUG, p. 286, 2012.
- MEYER, W. et al. Molecular Typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* Species Complex. In: **Cryptococcus**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2011. p. 327–357.
- MEZZARI, A.; WLIBBELLING, A. Criptococose Em Um Hospital Público De Porto Alegre. **Journal of Infection ...**, v. 2, n. 3, p. 135–139, 2013.
- MISHRA, R.; JOSHI, P.; MEHTA, T. Formulation, development and characterization of mucoadhesive film for treatment of vaginal candidiasis. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 6, n. 1, p. 47, 2016.
- MOHAMMED, F. A.; KHEDR, H. Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation of the Buccal Bioadhesive Properties of Slow-Release Tablets Containing Miconazole Nitrate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, n. 3, p. 321–337, 2003.
- MORA, D. J. et al. Clinical, Epidemiological and Outcome Features of Patients with Cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 321–327, 1 jun. 2012.
- MUKAREMERA, L. et al. Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. **The Cell Surface**, v. 1, n. August 2017, p. 15–24, 2018.
- MUNOZ, A. J. et al. Systems biology of yeast cell death. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 2, p. 249–265, 2012.
- NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51–83, mar. 2016.
- NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. The Primary Target Organ of *Cryptococcus gattii* Is Different from That of *Cryptococcus neoformans* in a Murine Model. **mBio**, v. 3, n. 3, p. e00103–12–e00103–12, 2012.
- NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans*

- in the presence or absence of L-dopa. **Microbiology**, v. 149, n. 7, p. 1945–1951, 1 jul. 2003.
- NOUDEH, G. D. et al. Determination of the toxicity effect of sorbitan esters surfactants group on biological membrane. **Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 5, p. 423–430, 2009.
- O'MEARA, T. R.; ANDREW ALSPAUGH, J. The *Cryptococcus neoformans* capsule: A sword and a shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, 2012.
- ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: Mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.
- OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 2004.
- ORGANIZATION WORLD HEALTH. Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children: December 2011. **Geneva: World Health Organization**, n. December, 2011.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 9, p. 719–727, 20 set. 2010.
- PACHIONI, J. D. A. et al. Alkylphospholipids - A promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 5, p. 742–759, 2013.
- PAHUJA, P.; ARORA, S.; PAWAR, P. Ocular drug delivery system: a reference to natural polymers. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 7, p. 837–861, 2012.
- PANDEY, R. et al. Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 268–276, 2005.
- PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Subcutaneous nanoparticle-based antitubercular chemotherapy in an experimental model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 266–268, 2004a.
- PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Polymer based drug delivery systems for mycobacterial infections. **Current drug delivery**, v. 1, n. 3, p. 195–201, jul. 2004b.
- PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 3, p. 329–347, 24 fev. 2003.
- PAQUES, J. P. et al. Alginate submicron beads prepared through w/o emulsification and gelation with CaCl₂ nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 428–434, 2013.
- PAQUES, J. P. et al. Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 163–171, 2014.
- PARENTE-ROCHA, J. A. et al. Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. **Mediators of**

Inflammation, v. 2017, p. 1–16, 2017.

PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, n. 1-2, p. 34–42, 2006.

PATEL, S. K.; SHAH, D. R.; TIWARI, S. Bioadhesive films containing fluconazole for mucocutaneous candidiasis. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 77, n. 1, p. 55–61, 2015.

PATIL, S. et al. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4600–4607, 2007.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p. 3279–3305, abr. 2012.

PEREIRA DE SÁ, N. et al. Thiazole compounds with activity against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 233–242, 2015.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 2010.

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

PINTO-MARTINEZ, A. K. et al. Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisome function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca²⁺-channel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. 1–10, 2018.

QIN, Y. Alginate fibers: an overview of the production processes and applications in wound management. **Polymer international**, v. 57, n. April, p. 171–180, 2008.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, ago. 2017.

RAVU, R. R. et al. Synthesis and antifungal activities of miltefosine analogs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 17, p. 4828–4831, 2013.

REIS, C. P. et al. Innovative formulation of nystatin particulate systems in toothpaste for candidiasis treatment. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 7450, n. April, p. 1–6, 2015.

REMMINGHORST, U.; REHM, B. H. A. Bacterial alginates: From biosynthesis to

- applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 21, p. 1701–1712, 2006.
- ROSSI, D. C. P. et al. Miltefosine is fungicidal to *Paracoccidioides* spp. yeast cells but subinhibitory concentrations induce melanisation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 4, p. 465–471, abr. 2017.
- SABIITI, W. et al. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 5, p. 2000–8, maio 2014.
- SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 24, p. 1112–1120, 15 dez. 2003.
- SALDANHA, C. A. et al. Antifungal Activity of Amphotericin B Conjugated to Nanosized Magnetite in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. e0004754, 15 jun. 2016.
- SANGEETHA, S. et al. Formulation of Sodium Alginate Nanospheres Containing Amphotericin B for the Treatment of Systemic Candidiasis. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. March, p. 653–659, 2007.
- SANTI, L. et al. Proteomic profile of *Cryptococcus neoformans* biofilm reveals changes in metabolic processes. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 3, p. 1545–1559, 2014.
- SANTOS, J. R. A. et al. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine cryptococcosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–14, 2014.
- SCHWARTZ, S. et al. Advances in the diagnosis and treatment of fungal infections of the CNS. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 4, p. 362–372, 2018.
- SEYEDMOUSAVI, S. et al. Fungal infections in animals: A patchwork of different situations. **Medical Mycology**, v. 56, n. May, p. S165–S187, 2018.
- SILVA, J. D. F. DA et al. MICROEMULSIONS: COMPONENTS, CHARACTERISTICS, POTENTIALITIES IN FOOD CHEMISTRY AND OTHER APPLICATIONS. **Química Nova**, v. 38, n. 8, p. 1196–1206, 2015.
- SINGODIA, D. et al. Development and performance evaluation of alginate-capped amphotericin B lipid nanoconstructs against visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 123–124, 2011.
- SLOAN, D. J.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: Epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 169–182, 2014.
- SMITH, K. D. et al. Increased antifungal drug resistance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7197–7204, dez. 2015.
- SOSNIK, A. Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2014, p. 1–17, 2014.

- SOUZA, L. K. H. E et al. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 343–347, jun. 2013.
- SPADARI, C. DE C.; LOPES, L. B.; ISHIDA, K. Potential Use of Alginate-Based Carriers As Antifungal Delivery System. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. January, p. 1–11, 30 jan. 2017.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237–252, 22 jan. 2015.
- SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S. C. Biopolymeric nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 11, n. 1, p. 014104, 12 fev. 2010.
- TACHAPRUTINUN, A.; PAN-IN, P.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Mucosa-plate for direct evaluation of mucoadhesion of drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 801–808, 2013.
- TAN, T. R. M. et al. Characterization of a polyethylene glycol-amphotericin B conjugate loaded with free AMB for improved antifungal efficacy. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152112, 23 mar. 2016.
- TAUROZZI, J. S.; HACKLEY, V. A.; WIESNER, M. R. **Preparation of Nanoparticle Dispersions from Powdered Material Using Ultrasonic Disruption - Version 1.1**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/SpecialPublications/NIST.SP.1200-2.pdf>>.
- TAYLOR-SMITH, L. M.; MAY, R. C. New weapons in the Cryptococcus infection toolkit. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, n. Figure 1, p. 67–74, 2016.
- THOMAS, N. et al. Efficacy of Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid Micro- and Nanoparticles of Ciprofloxacin Against Bacterial Biofilms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 10, p. 3115–3122, ago. 2016.
- TONG, Z. et al. In vitro activities of miltefosine and two novel antifungal biscationic salts against a panel of 77 dermatophytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2219–2222, 2007.
- TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Alginate in Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 621–630, 17 jan. 2002.
- TREVIJANO-CONTADOR, N. et al. Capsule Enlargement in *Cryptococcus neoformans* Is Dependent on Mitochondrial Activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. July, p. 1–11, 2017.
- TREVIJANO-CONTADOR, N.; RUEDA, C.; ZARAGOZA, O. Fungal morphogenetic changes inside the mammalian host. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 57, p. 100–109, 2016.
- TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455–462, 2008.
- TRUONG, M. et al. Repurposing drugs to fast-track therapeutic agents for the treatment of

cryptococcosis. **PeerJ**, v. 6, p. e4761, 4 maio 2018.

TSUBAMOTO, H. et al. Repurposing itraconazole as an anticancer agent. **Oncology Letters**, v. 14, n. 2, p. 1240–1246, ago. 2017.

TYLER, B. et al. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 163–175, 15 dez. 2016.

UCHIDA, K.; ABE, S.; YAMAGUCHI, H. The postantifungal effect (PAFE) of itraconazole, in comparison with those of miconazole and fluconazole, on *Candida* Species. **Microbiology and immunology**, v. 50, n. 9, p. 679–85, 2006.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394–3400, nov. 2002.

VIDAL, J. E. et al. Review article Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 353–362, 2013.

VILA, T. et al. Miltefosine inhibits *Candida albicans* and non-*albicans Candida* spp. biofilms and impairs the dispersion of infectious cells. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 5, p. 512–520, 2016.

VILA, T. V. M. et al. Effect of alkylphospholipids on *Candida albicans* biofilm formation and maturation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 113–125, 2013.

VILA, T. V. M. et al. In Vitro Activity of Miltefosine against *Candida albicans* under Planktonic and Biofilm Growth Conditions and In Vivo Efficacy in a Murine Model of Oral Candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7611–7620, dez. 2015.

VILA, T. V. M.; QUINTANILHA, N. S.; ROZENTAL, S. Miltefosine is effective against *Candida albicans* and *Fusarium oxysporum* nail biofilms in vitro. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1436–1449, 2015.

VILA, T. V. M.; ROZENTAL, S. Biofilm Formation as a Pathogenicity Factor of Medically Important Fungi. In: **Fungal Pathogenicity**. [s.l.] InTech, 2016. p. 1–24.

VOLTAN, A. R. et al. Fungal diseases : could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy ? **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3715–3730, 2016.

WALOCHNIK, J. et al. Cytotoxic Activities of Alkylphosphocholines against Clinical Isolates of *Acanthamoeba* spp . **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 695–701, 2002.

WALSH, T. J. et al. Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: An ultrastructural and quantitative microbiological study. **Neurosurgery**, v. 18, n. 3, p. 373–375, mar. 1986.

WERNSDORFER, W. H. et al. Effects of Miltefosine and Other Alkylphosphocholines on Human Intestinal Parasite *Entamoeba histolytica*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 5, p. 1505–1510, 2001.

WIDMER, F. et al. Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 414–421, 2006.

WIEDERHOLD, N. P. et al. Limited activity of miltefosine in murine models of cryptococcal meningoencephalitis and disseminated cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 745–750, 2013.

WILHELM, C. et al. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. **Biomaterials**, v. 24, n. 6, p. 1001–1011, 2003.

WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Publishing Group**, 2016.

YAO, H. et al. Preparation and evaluation of a novel gastric floating alginate/poloxamer inner-porous beads using foam solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, n. 1-2, p. 211–219, 2012.

YEHIA, S. A; EL-GAZAYERLY, O. N.; BASALIOUS, E. B. Design and in vitro/in vivo evaluation of novel mucoadhesive buccal discs of an antifungal drug: relationship between swelling, erosion, and drug release. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 4, p. 1207–1217, 2008.

YEHIA, S. A; EL-GAZAYERLY, O. N.; BASALIOUS, E. B. Fluconazole mucoadhesive buccal films: in vitro/in vivo performance. **Current drug delivery**, v. 6, n. 1, p. 17–27, 2009.

ZAMITH-MIRANDA, D. et al. Fungal extracellular vesicles: modulating host–pathogen interactions by both the fungus and the host. **Microbes and Infection**, 2018.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biological Procedures Online**, v. 6, n. 1, p. 10–15, jan. 2004.

ZUO, X. et al. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Cell Death in Yeast via Cox9p in Cytochrome c Oxidase. **Molecular pharmacology**, v. 80, p. 476–485, 2011.

APÊNDICE

A: Artigos publicados durante o doutorado



REVIEW
published: 30 January 2017
doi: 10.3389/fmicb.2017.00097



Potential Use of Alginate-Based Carriers As Antifungal Delivery System

Cristina de Castro Spadari¹, Luciana B. Lopes² and Kelly Ishida^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

² Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Joshua D. Nosanchuk,
Albert Einstein College of Medicine,
USA

Reviewed by:

Erin E. McClelland,
Middle Tennessee State University,
USA

Rohitashw Kumar,
University at Buffalo, USA

*Correspondence:

Kelly Ishida
ishidakelly@usp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Fungal and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 09 November 2016

Accepted: 13 January 2017

Published: 30 January 2017

Citation:

Spadari CC, Lopes LB and
Ishida K (2017) Potential Use
of Alginate-Based Carriers As
Antifungal Delivery System.
Front. Microbiol. 8:97.
doi: 10.3389/fmicb.2017.00097

Fungal infections have become a major public health problem, growing in number and severity in recent decades due to an increase of immunocompromised patients. The use of therapeutic agents available to treat these fungal infections is limited by their toxicity, low bioavailability, antifungal resistance, and high cost of treatment. Thus, it becomes extremely important to search for new therapeutic options. The use of polymeric systems as drug carriers has emerged as a promising alternative to conventional formulations for antifungals. Alginate is a natural polymer that has been explored in the last decade for development of drug delivery systems due to its non-toxicity, biodegradability, biocompatibility, low cost, mucoadhesive, and non-immunogenic properties. Several antifungal agents have been incorporated in alginate-based delivery systems, including micro and nanoparticles, with great success, displaying promising *in vitro* and *in vivo* results for antifungal activities, reduction in the toxicity and the total drug dose used in the treatment, and improved bioavailability. This review aims at discussing the potential use and benefits of alginate-based nanocarriers and other delivery systems containing antifungal agents in the therapy of fungal infections.

Keywords: antifungal, alginate, drug delivery systems, nanoparticles, amphotericin B

INTRODUCTION

Fungal infections have become a major public health problem and are growing in number and severity over the past three decades. The development of new medical treatments, including therapy with immunosuppressive agents and chemotherapy of cancer, led to a dramatic increase in the number of immunocompromised individuals who are vulnerable to infections which otherwise would have been easily resolved (Karkowska-Kuleta et al., 2009). More than 1.7 billion people worldwide are estimated to suffer from fungal diseases, ranging from superficial to invasive infections (Brown et al., 2012), and some of these infections cause more deaths per year than tuberculosis or malaria (Gaffi - Global Action Fund for Fungal Infections, 2016). However, deaths resulting from invasive or chronic fungal infections are often overlooked, and most public health agencies present little or no mycological surveillance programs (Brown et al., 2012). Preventive measures, premature diagnosis, and the availability of appropriate antifungal treatment could reduce death rates by fungal infections.

The current antifungal therapy is based on three major chemical classes: echinocandins, polyenes, and azoles. Echinocandins are $\beta(1,3)$ -glucan synthase inhibitors, disrupting the synthesis of the cell wall $\beta(1,3)$ -D-glucan polymer. Polyenes and azoles alter cytoplasm membrane



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

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

Miltefosine is fungicidal to *Paracoccidioides* spp. yeast cells but subinhibitory concentrations induce melanisation



Diego Conrado Pereira Rossi ^{a,1}, Cristina de Castro Spadari ^{b,1}, Joshua Daniel Nosanchuk ^c, Carlos Pelleschi Taborda ^a, Kelly Ishida ^{b,*}

^a Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^b Laboratório de Quimioterapia Antifúngica, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900, ICB II, Lab 150, São Paulo, SP, Brazil

^c Departments of Medicine and Microbiology & Immunology, Albert Einstein College of Medicine, New York, NY, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2016

Accepted 20 December 2016

Keywords:

Paracoccidioides

Miltefosine

Melanin

Antifungal

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungi *Paracoccidioides* spp. The duration of antifungal treatment ranges from months to years and relapses may nevertheless occur despite protracted therapy. Thus, there remains an urgent need for new therapeutic options. Miltefosine (MLT), an analogue of alkylphospholipids, has antifungal activity against species of yeast and filamentous fungi. The aim of this study was to evaluate the antifungal effects of MLT on the yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. MLT demonstrated inhibitory activity from 0.12 to 1 µg/mL, which was similar to amphotericin B or the combination trimethoprim/sulfamethoxazole but was not more effective than itraconazole. The fungicidal activity of MLT occurred at concentrations ≥1 µg/mL. Ultrastructural alterations were observed following exposure of the fungus to a subinhibitory concentration of MLT, such as cytoplasmic membrane alteration, mitochondrial swelling, electron-lucent vacuole accumulation and increasing melanosome-like structures. Melanin production by yeasts following MLT exposure was confirmed by labelling with antibodies to melanin. In addition, the combination of a subinhibitory concentration of MLT and tricyclazole, an inhibitor of DHN-melanin biosynthesis, drastically reduced yeast viability. In conclusion, MLT had a fungicidal effect against both *Paracoccidioides* spp., and a subinhibitory concentration impacted melanogenesis. These findings suggest that additional investigations should be pursued to establish a role for MLT in the treatment of PCM.

© 2017 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Paracoccidioides brasiliensis and *Paracoccidioides lutzii* are dimorphic fungi that are the causative agents of paracoccidioidomycosis (PCM), which is primarily distributed in Latin America with high prevalences in Brazil, Colombia, Venezuela and Argentina [1]. This systemic mycosis is initiated by the inhalation of airborne propagules from the mycelium phase of *Paracoccidioides* spp., which rapidly undergo phase transition into the pathogenic yeast form [1]. PCM is considered a serious public health problem in endemic regions, where it is the leading cause of death due to systemic mycoses in immunocompetent patients [2]. Furthermore, PCM is the eighth most common cause of mortality from chronic infectious diseases

in Latin America, with reaching rates of 1.65 deaths per million inhabitants [3].

Treatment of PCM is usually long-term, typically ranging from 6 to 24 months; moreover, there are few drugs available with proven efficacy against *Paracoccidioides* spp. The most commonly used therapeutics are itraconazole (ITC), amphotericin B (AmB) and trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX) [1]. However, clinical failures or relapses are well documented during and after treatment with these drugs [3]. Thus, there is an urgent need to identify alternative antifungals for treatment of PCM.

Miltefosine (MLT) is an alkylphospholipid analogue [4–6]. Originally developed as an antitumour drug, MLT has also shown inhibitory activities against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* [4–6]. In many countries of Latin America, India, Germany and others, MLT is frequently used for the treatment of leishmaniasis and breast cancer. Recently, MLT was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for cutaneous and visceral leishmaniasis [7].

In addition to its antiparasitic activity, investigators have demonstrated in vitro antifungal activities of MLT against dimorphic fungi such as *Coccidioides posadasii* [8], *Histoplasma capsulatum* and *Sporothrix* spp., [8–10] clinically relevant moulds such as

* Corresponding author. Laboratório de Quimioterapia Antifúngica, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900, ICB II, Lab 150, São Paulo, SP, Brazil.
E-mail address: ishidakelly@usp.br (K. Ishida).

¹ These two authors contributed equally to this work.



Antifungal Activity of the Biphosphinic Cyclopalladate C7a against *Candida albicans* Yeast Forms *In Vitro* and *In Vivo*

Julian E. Muñoz^{1,2*}, Diego C. P. Rossi^{1†}, Kelly Ishida¹, Cristina C. Spadari¹, Marcia S. C. Melhem³, Daniel M. Garcia⁴, Antonio C. F. Caires^{5†}, Carlos P. Taborda^{1,6} and Elaine G. Rodrigues^{7*}

¹ Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Faculty of Health Sciences, Colegio Mayor de Cundinamarca University, Bogotá, Colombia, ³ Parasitology Section, Technical Division of Medical Biology, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil, ⁴ Department of Pharmacology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁵ Interdisciplinary Center for Biochemical Investigation, University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, Brazil, ⁶ Laboratory of Medical Mycology-LIM53/IMTSP, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁷ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Paulista School of Medicine, Federal University of São Paulo (EPM-UNIFESP), São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Luis R. Martínez,
New York Institute of Technology, USA

Reviewed by:

Derek Thomas,
Grand Valley State University, USA
Ian A. Cleary,
Grand Valley State University, USA

*Correspondence:

Elaine G. Rodrigues
rodrigues.elsa@unifesp.br

[†]These authors have contributed
equally to this work.

[‡]In memoriam

Specialty section:

This article was submitted to
Fungal and Their Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 20 January 2017

Accepted: 13 April 2017

Published: 03 May 2017

Citation:

Muñoz JE, Rossi DCP, Ishida K,
Spadari CC, Melhem MSC,
Garcia DM, Caires ACF, Taborda CP
and Rodrigues EG (2017) Antifungal
Activity of the Biphosphinic
Cyclopalladate C7a against *Candida
albicans* Yeast Forms *In Vitro* and *In
Vivo*. *Front. Microbiol.* 8:771.
doi: 10.3389/fmicb.2017.00771

Vulvovaginal and invasive candidiasis are frequent conditions in immunosuppressed individuals caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* spp. Fluconazole and Amphotericin B are the main drugs used to fight the infection. However, resistance to fluconazole and other azole antifungal drugs is an important clinical problem that encourages the search for new therapeutic alternatives. In this work, we evaluate the antifungal activity of the biphosphinic cyclopalladate C7a in the *in vitro* and *in vivo* model. Our results showed fungicidal activity, with low values of minimal inhibitory concentrations and minimum fungicidal concentrations, even for fluconazole and/or miconazole resistant *Candida* isolates. Fluorescence microscopy and transmission electron microscopy revealed that the compound was able to inhibit the formation of hyphae/pseudohyphae and, moreover, promoted morphological alterations in cellular organelles and structures, such as disruption of cell wall, apparent mitochondrial swelling, chromatin marginalization into the nuclei and increased numbers of electron-lucent vacuoles. C7a significantly decreased the biofilm formation and reduced the viability of yeast cells in mature biofilms when tested against a virulent *C. albicans* strain. *In vivo* assays demonstrated a significant decrease of fungal burden in local (vaginal canal) and disseminated (kidneys) infection. In addition, we observed a significant increase in the survival of the systemically infected animals treated with C7a. Our results suggest C7a as a novel therapeutic agent for vaginal and disseminated candidiasis, and an alternative for conventional drug-resistant *Candida*.

Keywords: *Candida* spp., clinical isolates, antifungal chemotherapy, cyclopalladated C7a, vaginal candidiasis, disseminated candidiasis, drug-resistant yeast

B: Artigo aceito para publicação

E-mail de Universidade de São Paulo - AAC00312-18R1 Decision Letter

29/05/18 11:38



Kelly Ishida <ishidakelly@usp.br>

AAC00312-18R1 Decision Letter

asm@msubmit.net <asm@msubmit.net>

18 de maio de 2018 08:01

Responder a: dra@medicine.wisc.edu, aacasmusa@gmail.com

Para: ishidakelly@usp.br

Dr. Kelly Ishida
University of São Paulo
São Paulo, São Paulo
Brazil

Re: AAC00312-18R1 (Miltefosine has post-antifungal effect and induces apoptosis in *Cryptococcus* yeasts)

Dear Dr. Kelly Ishida:

Your manuscript has been accepted, and I am forwarding it to the ASM Journals Department for publication. If your submission included supplemental material to be considered for posting, my decision regarding each supplemental file may be found at the bottom of this letter. For your reference, ASM Journals' address is given below. Before it can be scheduled for publication, your manuscript must be checked by the ASM production editor to make sure that all elements meet the technical requirements for publication. Noel Lin, the production editor for Antimicrobial Agents and Chemotherapy, will contact you if anything needs to be revised before copyediting and production can begin. Otherwise, you will be notified when your proofs are ready to be viewed.

The ASM Journals program strives for constant improvement in our submission and publication process. Please tell us how we can improve your experience by taking this quick [Author Survey](#).

Open Access: Please contact the AAC production editor, Noel Lin, at nlin@asmusa.org immediately if you wish to select open access. Authors who choose open access will be assessed an article processing charge (APC). For a corresponding author who is an active member of ASM at any level except the Supporting member level, the APC is \$2,300 (subject to change without notice). For a nonmember or Supporting member corresponding author, the APC is \$3,150 (subject to change without notice). (Note: Payment of this fee is not necessary to meet the NIH requirement for authors to make their accepted manuscripts publicly available within 12 months. Primary research published in ASM journals is automatically deposited in PubMed Central 6 months after publication.)

Page Charges: Authors who do not choose open access and whose research was supported by grants, special funds (including departmental and institutional), or contracts (including governmental) or whose research was done as part of their official duties (government or corporate, etc.) are required to pay page charges (based on the number of typeset pages, including illustrations, in the article). For a corresponding author who is an active member of ASM at any level except the Supporting member level, page charges are \$80 per page (subject to change without notice). For a nonmember or Supporting member corresponding author, page charges are \$160 per page (subject to change without notice). If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to Noel Lin at nlin@asmusa.org as soon as possible. For more details, including types of articles not charged, see the Instructions to Authors.

Supplemental Material: To offset the costs associated with publishing journal article supplemental material, ASM charges a flat fee for authors who wish to publish supplemental material as an adjunct to their published article. The fee (subject to change without notice) is \$210 for a corresponding author who is an active member of ASM at any level except the Supporting member level, or \$320 for a nonmember or Supporting member corresponding author, with a limit of 10 supplemental files per article. (Exceptions: Minireviews and Commentaries are exempt from this fee.)

ASM Member Discount: Nonmember corresponding authors may [join ASM](#) at any level except the Supporting

C: Pedido de patente

23/08/2017 870170061470
10:34
00.000.2.2.17.0557509.3

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**Número do Processo:** BR 10 2017 018011 5**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 63025530000104**Nacionalidade:** Brasileira**Endereço:** Rua da Reitoria, 374 - Butantã**Cidade:** São Paulo**Estado:** SP**CEP:** 05508220**País:** Brasil**Telefone:** (11) 3091.4474**Fax:****Email:** pidireto@usp.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 23/08/2017 às 10:34. Petição 870170061470