

ALINE LUIZA DUARTE DE FREITAS

Análise do efeito antifúngico de compostos sintéticos sobre *Cryptococcus* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2019

ALINE LUIZA DUARTE DE FREITAS

Análise do efeito antifúngico de compostos sintéticos sobre *Cryptococcus* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia
Orientadora: Profa. Dra. Kelly Ishida

Versão Original

São Paulo

2019

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)

Duarte de Freitas , Aline Luiza
Análise do efeito antifúngico de compostos
sintéticos sobre *Cryptococcus* spp. / Aline Luiza
Duarte de Freitas ; orientadora Kelly Ishida. --
São Paulo, 2019.
97 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Criptococose. 2. Resistência fúngica. 3.
Compostos sintéticos. 4. Efeito antifúngico. I.
Ishida, Kelly, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Aline Luiza Duarte de Freitas

Titulo da Dissertação: Análise do efeito antifúngico de compostos sintéticos sobre *Cryptococcus* spp.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Ishida

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica 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:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **987/2018** referente ao projeto intitulado: "**Análise do efeito antifúngico de compostos sintéticos sobre *Cryptococcus spp.***" sob a responsabilidade de **Aline Luiza Duarte de Freitas** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Kelly Ishida**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 17 de outubro de 2018.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

AGRADECIMENTOS

*“E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas
E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho por mais que pense estar...”*
(Caminhos do coração – Gonzaguinha.)

Agradeço à Deus por ter me dado muita força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Maria Aparecida Moraes Duarte de Freitas e Manuel Rodrigues de Freitas, que nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos, por me terem ensinado a andar e por me terem dado amor, carinho, educação e valores.

Aos meus irmãos, Douglas Antônio Duarte de Freitas e Thiago Augusto Duarte de Freitas, que também sempre me apoiaram, compartilhando momentos bons e ruins, sempre tirando um sorriso do meu rosto quanto as coisas não iam tão bem assim.

À minha orientadora Prof. Dra. Kelly Ishida que abriu as portas do seu laboratório em 2013 e me aceitou como sua primeira aluna de iniciação científica e que desde então tem me incentivado a ir atrás dos meus sonhos e ensinado tudo que podia. Agradeço a dedicação, carinho e paciência.

Aos colegas e amigos que fiz durante o meu mestrado: Amanda Roberta, Bruna Nakanishi, Cristina Spadari (mais que amiga científica, companheira de viagem e de vida), Gaby Scheunemann, Luiza Capello, Jong Min Lee, Marcelo Valdemir, Samuel Rodrigues, Thayná Barreto, Vinicius Barroso e Zita Gregório, que sempre me ajudaram quando eu precisei e me garantiram boas risadas e conselhos durante meu mestrado.

Aos amebas, que compartilharam comigo momentos incríveis ao longo da minha trajetória como uspiana e sempre estiveram dispostos a ouvir as minhas reclamações, ajudar com dúvidas científicas e almoçar juntos no bandejão: Arthur Zaneti, Davi Mendes, Leandro Mori, Luna Matsunaga, Jung Hun Park, Jong Min Lee, Marco de Lima Noronha, Pedro Matilha (que me aguentou mais que todo mundo), Gustavo Satoru.

Ao meu amigo de longuíssima data e amor, Paulo Henrique Pereira de Melo, pelo apoio

incondicional que me deu nos momentos mais difíceis do meu mestrado.

Aos funcionários do Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia, Fabia Vilanova e Eliane Gouveia, que sempre responderam as minhas dúvidas com toda a paciência do mundo.

À Veridiana Munford, do Laboratório de Reparo de DNA, pelo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo.

Ao Prof. Dr. Márcio Vinícius Bertacine Dias, por abrir as portas do seu laboratório nos momentos em que precisei.

A Universidade de São Paulo e ao Departamento de Microbiologia (ICB-II, USP), pela oportunidade e utilização das instalações.

A todos aqueles que, de alguma forma (direta ou indireta) contribuíram com esse trabalho.

AGRADECIMENTO À INSTITUIÇÃO DE FOMENTO

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo no. 2017/15226-5, período 2018 - 2019) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código de Financiamento 001 - período 01/09/2017 - 30/11/2017) pelo suporte financeiro na forma de bolsa de estudo durante o mestrado. Por conta disso, a realização desse trabalho foi possível, contribuindo com a minha formação.

*“Happiness can be found, even in the darkest of times,
if one only remembers to turn on the light.”*

- Albus Dumbledore (J.K. Rowling)

RESUMO

FREITAS, A. L. D. Análise **do efeito antifúngico de compostos sintéticos sobre *Cryptococcus spp.*** 2019, 97 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A terapia da criptococose é limitada por problemas de toxicidade, tolerância aos antifúngicos e alto custo. Estudos realizados com compostos orgânicos de calcogênio, em especial aqueles contendo selênio, mostram que esses apresentam considerável atividade contra microrganismos, incluindo fungos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antifúngico de compostos sintéticos de calcogênio no controle de *Cryptococcus spp.* usando modelo *in vitro* e *in vivo*. Após triagem de 141 compostos sobre *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* para determinar atividade antifúngica e avaliação de toxicidade sobre hemácias, selecionamos o composto ALDF_078 como molécula líder para avaliar a atividade anticriptocócica. Esse composto apresentou atividade antifúngica sobre *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 e suas linhagens tolerantes ao fluconazol (FCZ) e também sobre isolados clínicos das duas espécies (CI₅₀: 1 - 8 µg/mL). As concentrações de 4X e 8X CI₅₀ de ALDF_078 apresentaram efeito fungicida sobre *C. neoformans* H99 após 8h e 4h de exposição à molécula, respectivamente. O tratamento das leveduras com o composto mostrou que este, em geral, causou a diminuição na espessura da cápsula e volume celular de *Cryptococcus spp.*, além de ter aumentado a permeabilidade de membrana das leveduras da linhagem de *C. neoformans* H99 tolerante ao FCZ. As células em dispersão do biofilme maduro da linhagem não adaptada de *C. neoformans* H99 foram inibidas por concentrações semelhantes as que inibiram as células planctônicas da mesma linhagem; entretanto, esta molécula não foi capaz de interferir nas células sésseis dos biofilmes maduros. Os experimentos em modelo invertebrado de *Galleria mellonella* mostraram que doses abaixo de 46,5 mg/kg de ALDF_078, apesar de não serem tóxicas no modelo testado, não foram efetivas no tratamento da infecção por *C. neoformans*. Nossos dados indicam que o composto ALDF_078 apresenta efeito fungicida, baixa toxicidade e efeitos morfofisiológicos sobre leveduras de *Cryptococcus spp.* e destacam o potencial desse composto sintético como molécula líder no desenvolvimento de uma opção terapêutica sobre os agentes da criptococose.

Palavras-chave: Criptococose. Resistência fúngica. Compostos sintéticos. Efeito antifúngico.

ABSTRACT

FREITAS, A. L. D. **Analysis of the antifungal effect of synthetic compounds on *Cryptococcus* spp.** 2019, 97 p. Dissertation (Master in Biotechnology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

Cryptococcosis therapy is limited by toxicity problems, antifungal tolerance and high cost. Studies with organic chalcogen compounds, especially those containing selenium, have shown their activity against microorganisms, including fungi. Thus, the objective of this work was to evaluate the antifungal potential of synthetic chalcogen compounds in the control of *Cryptococcus* spp. using *in vitro* and *in vivo* models. After the screening of 141 compounds on *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* for antifungal activity and red blood cell toxicity evaluation, the ALDF_078 compound was selected as leader molecule for anticryptococcal activity evaluation. This compound showed antifungal activity on *C. neoformans* H99 and *C. gattii* R265 and their fluconazole (FCZ) tolerant strains, and also on the clinical isolates of the two species (IC₅₀: 1 – 8 µg/mL). The concentrations at 4X and 8X CI₅₀ of ALDF_078 presented fungicidal effect on *C. neoformans* H99 after 8h and 4h of molecule exposure, respectively. Treatment of the yeasts with the compound caused a decrease in capsule thickness and cell volume of *Cryptococcus* spp., besides to increasing membrane permeability of FCZ tolerant *C. neoformans* H99 yeasts. The dispersion cells from non-adapted *C. neoformans* H99 mature biofilm were inhibited at similar concentrations that inhibited planktonic cells of the same strain; however, this molecule was unable to interfere with mature biofilm cells. *Galleria mellonella* invertebrate model experiments have shown that doses below 46.5 mg/kg of ALDF_078, although were not toxic in the tested model, were not effective in treating the infection with *C. neoformans*. Our data show that the compound ALDF_078 has fungicidal effect, low toxicity and morphophysiological effects on *Cryptococcus* spp. and highlighted the potential of this synthetic compound as a leader molecule in the development of a therapeutic option for cryptococcosis agents.

Keywords: Cryptococcosis. Fungal resistance. Synthetic compounds. Antifungal effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de infecção de <i>Cryptococcus</i> spp.	24
Figura 2. Esquema de desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado “Análise do efeito antifúngico de compostos sintéticos sobre <i>Cryptococcus</i> spp.”	37
Figura 3. Triagem de 141 compostos calcogênicos sobre <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 16913, <i>Fusarium solani</i> ATCC 36031, <i>Candida albicans</i> SC5314 e <i>Cryptococcus neoformans</i> H99.	49
Figura 4. Série de compostos derivados de quinolinas	61
Figura 5. Curva do tempo de morte de leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao tebuconazol.	66
Figura 6. Espessura da cápsula (μm) e volume celular (μm^3) de leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 e <i>Cryptococcus gattii</i> R265 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao tebuconazol.	72
Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 não adaptadas (NA) ao tebuconazol.	73
Figura 8. Curva de permeabilidade da membrana quantificada por liberação de proteínas por leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao tebuconazol.	75
Figura 9. Curva de permeabilidade da membrana quantificada por liberação de DNA por leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao tebuconazol.	76
Figura 10. Efeitos do composto líder ALDF_078 sobre a permeabilidade de membrana em leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao tebuconazol.	77
Figura 11. Virulência das leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) testadas em modelo invertebrado de <i>Galleria mellonella</i>	79
Figura 12. Toxicidade do composto líder ALDF_078 sobre as larvas de <i>Galleria mellonella</i>	80

Figura 13. Eficácia do tratamento de larvas infectadas com leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 não adaptadas (NA) com Anfotericina B (AMB) e ALDF_078.81

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Origem das cepas de fungos e condições de crescimento.39
- Tabela 2.** Nota do índice de saúde de larvas de *Galleria mellonella*.46
- Tabela 3.** Suscetibilidade de *Cryptococcus neoformans* H99, *Candida albicans* SC5314, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913 e *Fusarium solani* ATCC 36031 aos compostos orgânicos sintéticos contendo telúrio, selênio e enxofre. Concentração inibitória mínima de 50% e de 90% (CI₅₀ e CI₉₀, respectivamente) e concentração fungicida mínima (CFM) são expressa em µg/mL.51
- Tabela 4.** Compostos calcogenados sintéticos classificados em alta (CI₅₀ ≤ 4 µg/mL) e média (CI₅₀ > 4 e ≤ 16 µg/mL) atividade antifúngica sobre *Cryptococcus neoformans* H99. Concentração inibitória mínima de 50% e de 90% (CI₅₀ e CI₉₀, respectivamente), concentração fungicida mínima (CFM) e concentração dos compostos que causam 50% de atividade hemolítica para eritrócitos (AH₅₀) são expressos em µg/mL.58
- Tabela 5.** Suscetibilidade de leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 e *Cryptococcus gattii* R265 não-adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao composto líder ALDF_078, fluconazol (FCZ) e anfotericina B (AMB). Menores concentrações que inibem 50% e 90% do crescimento fúngico (CI₅₀ e CI₉₀) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) são expressos em µg/mL.63
- Tabela 6.** Suscetibilidade de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* a anfotericina B (AMB), fluconazol (FCZ) e ao composto líder ALDF_078. Menores concentrações que inibem 50% e 90% do crescimento fúngico (CI₅₀ e CI₉₀) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) são expressos em µg/mL.64
- Tabela 7.** Valores da concentração inibitória fracionaria (CIF) para leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 e *Cryptococcus gattii* R265 não-adaptadas (NA) e adaptadas (A) obtidos da interação entre fluconazol (FCZ) e o composto ALDF_078.69

Tabela 8. Atividade antifúngica de Anfotericina B (AMB) e do composto líder ALDF_078 sobre células sésseis e células em dispersão de biofilmes maduros de linhagens de *Cryptococcus neoformans* H99 não-adaptadas (NA) e adaptadas (A). Concentrações mínimas dos compostos capazes de inibir em 50% (CIB₅₀) e 90% (CIB₉₀) a atividade metabólica das células sésseis e as concentrações inibitórias 50% (CID₅₀) e 90% (CID₉₀) do crescimento das células em dispersão são expressas em µg/mL.69

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FC: 5-fluocitosina

A: Linhagens Adaptadas ao Tebuconazol

ABC: *ATP-binding cassette*

ABD: Ágar Batata Dextrose

AH: Atividade Hemolítica

AMB: Anfotericina B

ASD : Ágar Saboraud Dextrose

AT: Absorbância da Amostra Teste

BHE: Barreira Hematoencefálica

BHI: *Brain Heart Infusion*

CEUA-ICB: Comissão de Ética no Uso de Animais – Instituto de Ciências Biomédicas

CFM: Concentração Fungicida Mínima

CI: Concentração Inibitória Mínima

CIB: Concentração Inibitória Mínima sobre as Células Sésseis do Biofilme

CID: Concentração Inibitória Mínima sobre as Células em Dispersão do Biofilme

CIF: Concentração Inibitória Fracional

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CP: Absorbância do Controle Positivo

CN: Absorbância do Controle Negativo

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

FCZ: Fluconazol

GalXM: Galactoxilomanana

GPx: Glutathione Peroxidase

GXM: Glucuronoxilomanano

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IAL: Instituto Adolf Lutz

ICB: Instituto de Ciências Biomédicas

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fiocruz, Brasil)

ITZ: Itraconazol

LEMI: Laboratório Especial de Micologia

MDR: *Multidrug Resistance*

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MFS: *Major Facilitator Superfamily*

MOPS: Ácido propano sulfônico 3-morfolino

NA: Linhagens não-Adaptadas ao Tebuconazol

PBS: Tampão fosfato-salino

PDR: *Pleiotropic Drug Resistance*

PI: Iodeto de Propídeo

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SEM: *Standard Error of the Mean* ou Erro Padrão da Média

SNC: Sistema Nervoso Central

TBZ: Tebuconazol

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

XTT: *2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Infecções Fúngicas	19
1.2. Criptococose	20
1.2.1. Agente etiológico.....	20
1.2.2. Epidemiologia.....	21
1.2.3. Infecção e Patogênese.....	23
1.3. Fatores de virulência	25
1.4. Tratamento.....	28
1.4.1. Resistência aos antifúngicos.....	30
1.4.2. Busca de Alternativas de Tratamento	32
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivo Geral	36
2.2. Objetivos específicos	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1. Antifúngicos padrão	38
3.2. Compostos orgânicos de Telúrio, Selênio e Enxofre	38
3.3. Cepas e condições de crescimento.....	38
3.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CI) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	40
3.5. Avaliação da atividade hemolítica (AH)	40
3.6. Curva do tempo de morte	41
3.7. Combinação de antifúngicos	41
3.8. Concentração inibitória mínima sobre células do biofilme	42
3.9. Microscopia ótica	43
3.10. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	43
3.11. Permeabilidade da membrana plasmática.....	44
3.12. Avaliação do efeito de ALDF_078 sobre a permeabilidade de membrana com uso de marcador fluorescente.....	44
3.13. Ensaio de virulência, toxicidade e atividade antifúngica sobre as larvas de Galleria mellonella	45
3.14. Análise estatística	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5. CONCLUSÕES.....	83
6. REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecções Fúngicas

Os fungos fazem parte do segundo grupo de organismos mais rico em espécies após os insetos e desempenham papéis-chave nos ecossistemas como decompositores, mutualistas e patógenos (PURVIS; HECTOR, 2000). Estima-se que existam entre 2,2 a 3,8 milhões de espécies fúngicas, das quais apenas 120.000 foram descritas. Dentre essas, apenas algumas centenas de espécies são conhecidas por infectar humanos e causar desde infecções superficiais, que atingem pele, pelos, unhas e mucosas, até infecções invasivas que podem afetar sistema nervoso central (SNC), pulmões, coração, ossos, trato urinário, sistema reprodutor, etc (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017); sendo os fungos dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Pneumocystis* causadores de cerca de 90% de todas as mortes relacionadas às infecções fúngicas (BROWN et al., 2012). Os padrões de infecções fúngicas variam pelo globo e dependem não só da espécie do fungo e região geográfica, mas também do sistema imune do hospedeiro e sítio de infecção (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017).

O aumento da incidência de infecções fúngicas invasivas nos últimos anos tornou-se um desafio para profissionais da saúde, uma vez que patógenos fúngicos estão associados a crescentes taxas de morbidade e mortalidade em humanos (BONGOMIN et al., 2017; RAJASINGHAM et al., 2017). Estudos estimam que infecções fúngicas matam mais de 1,5 milhões de indivíduos ao ano, taxa de mortalidade semelhante à da tuberculose (BONGOMIN et al., 2017). Esse aumento da incidência está diretamente relacionado ao aumento da taxa de resistência aos tratamentos disponíveis e, também, ao aumento da população de risco; composta por pacientes que receberam transplantes, pacientes expostos a quimioterapia antineoplásica intensiva e fármacos imunossupressores, pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência

Humana (HIV), diabéticos, prematuros, idosos, entre outros fatores (BIELSKA; MAY, 2016; KWON-CHUNG et al., 2014).

1.2. Criptococose

1.2.1. Agente etiológico

O gênero *Cryptococcus* é composto por fungos basidiomicetos que são normalmente encontrados em diferentes substratos orgânicos ricos em fontes de nitrogênio, tais como solo contaminado com fezes de aves, troncos de árvores e material em decomposição (KWON-CHUNG et al., 2014; LIN; HEITMAN, 2006). Estima-se que este gênero possui mais de 30 espécies distribuídas no ambiente, porém dentre essas, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* destacam-se por sua importância médica e veterinária (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Os fungos pertencentes à esse gênero são encontrados tanto em sua forma saprofítica de hifa ou pseudohifa (estruturas associadas à reprodução sexuada), como na forma de levedura (estrutura associada à reprodução assexuada e forma patogênica do fungo) (LIN; HEITMAN, 2006). Durante a infecção em humanos, esse microrganismo se apresenta na forma de leveduras, esféricas ou globosas, que atingem de 3 a 8 μm de diâmetro e são envoltas por uma cápsula mucopolissacarídica composta por três componentes principais: glucoronoxilomanano (GXM; composto por ácido glucurônico, xilose e manose), galactoxilomanana (GalXM, composto por galactose, xilose e manose) e manoproteínas (manose e, em menor quantidade, xilose e galactose) (FRIES et al., 1999; MAY et al., 2016).

Diferenças estruturais do polissacarídeo capsular GXM, que constitui cerca de 90% da cápsula, permite a classificação de *C. neoformans* e *C. gattii* em cinco sorotipos (A, B, C, D e AD). As cepas com sorotipos A e D e o híbrido AD pertencem a *C. neoformans*, sendo que as cepas do sorotipo A foram nomeadas *C. neoformans* var. *grubii*, e as cepas do sorotipo D, *C.*

neoformans var. *neoformans*. Já as cepas com sorotipos B e C são classificadas como *C. gattii* (HAGEN et al., 2015). Com o uso de técnicas moleculares é possível, também, classificar *C. neoformans* e *C. gattii* em oito genótipos 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 (GONZÁLEZ et al., 2016; KWON-CHUNG et al., 2014). Em 2015, com uso de análise filogenética, Hagen e colaboradores propuseram uma nova classificação 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* a *C. deneoformans*. 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 ainda não tem sido muito bem aceita e tem gerado discussão no meio científico. 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); e neste documento iremos denominá-los simplesmente de *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente.

1.2.2. Epidemiologia

Estudos mostram que cerca de 95% das infecções são causadas por *C. neoformans*, sendo as demais causadas por *C. gattii* (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Enquanto a criptococose causada por *C. neoformans* tem distribuição mundial e causa infecções sintomáticas disseminadas em pacientes imunocomprometidos, a infecção por *C. gattii* ocorre também em pacientes imunocompetentes e é observada principalmente em regiões subtropicais e tropicais principalmente na América do Sul, África e Austrália; porém estudos mostram que essa espécie

se expandiu para regiões de clima temperado como Columbia Britânica - Canadá e no noroeste do Pacífico dos Estados Unidos da América (BIELSKA; MAY, 2016).

No Brasil, infecções por *C. neoformans* estão distribuídas em todo o país, com a maioria dos casos ocorrendo nas regiões Sul e Sudeste; enquanto *C. gattii* está relacionada com infecções endêmicas no Norte e Nordeste, ocorrendo casos esporádicos nas demais regiões (FIRACATIVE et al., 2018; TRILLES et al., 2008). Em 2012, o Ministério da Saúde publicou um levantamento mostrando que a criptococose foi a micose sistêmica que mais causou internações entre os anos de 2000-2007 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Até a década de 80, a infecção criptocócica sistêmica era uma infecção incomum que ocorria em pacientes em terapia com corticoides ou diagnosticados com diabetes mellitus, doença de Hodgkin, lúpus eritematoso sistêmico, dentre outros. Porém, com a ascensão da pandemia por HIV, a criptococose tornou-se mais relevante para a comunidade médica e atualmente é uma das doenças com maior incidência entre pacientes com severa deficiência imunológica celular, sendo a segunda causa mais comum da mortalidade relacionada à AIDS (Síndrome da imunodeficiência adquirida) (BRATTON et al., 2012; MITCHELL; PERFECT, 1995; RAJASINGHAM et al., 2017). Atualmente, a criptococose é a principal causa de meningite fúngica com aproximadamente 223.100 casos/ano e taxa de mortalidade que chega a 81% em países subdesenvolvidos, onde o tratamento antirretroviral é insuficiente ou indisponível e tem início em fase avançada do HIV/AIDS, sendo a maioria dos casos encontrados na África subsaariana, Ásia, Pacífico e América Latina (RAJASINGHAM et al., 2017).

Na América Latina, considerada a terceira região do mundo com a maioria dos casos, a criptococose representa a principal causa de meningite oportunista e possui alta incidência (~5.300 casos/ano) e elevada taxa de mortalidade (~55%) (FIRACATIVE, C. et al., 2018). Destes,

Brasil e Colômbia são os países com maior incidência, entre 1.001 a 2.500 casos/ano, seguidos pela Argentina e México, com incidência de 501 a 1.000 casos/ano (RAJASINGHAM et al., 2017; VIDAL et al., 2013). Sendo que no Brasil, a taxa de mortalidade varia de 26 – 70% (MEZZARI et al., 2013; MORA et al., 2012; MOREIRA et al., 2006; SOUZA et al., 2013).

1.2.3. Infecção e Patogênese

A infecção por *Cryptococcus* spp. é adquirida pela inalação de propágulos aéreos (basidiósporos ou leveduras) provenientes de uma fonte ambiental e deposição em alvéolos pulmonares. Na maioria dos casos, a inalação de *Cryptococcus* spp. produz uma infecção pulmonar assintomática autolimitada, caracterizada pela formação de complexos granulomatosos nos quais as leveduras podem ser eliminadas ou permanecer na forma latente por anos. Quando a imunidade local é suprimida, a levedura pode crescer, disseminar-se para fora desses complexos e causar pneumonia grave. Em um paciente com imunidade celular gravemente comprometida, as leveduras reativadas podem proliferar no local da infecção inicial e obter acesso a outros locais do corpo por meio de disseminação hematogênica. Após alcançar a corrente sanguínea, as leveduras se direcionam preferencialmente para o SNC, causando meningite ou meningoencefalite; entretanto, o fungo também pode causar infecções localizadas na pele, ossos e articulações, pulmões e trato geniturinário (Figura 1) (LIN; HEITMAN, 2006; MAZIARZ; PERFECT, 2016; NEGRONI, 2012; SEVERO; GAZZONI; SEVERO, 2009).

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



Esporos e leveduras encontrados em fezes de aves contaminadas, solo e troncos de árvores são inalados, podendo causar uma infecção pulmonar geralmente assintomática e autolimitada. O fungo pode permanecer localizado nos pulmões em sua forma latente ou disseminar via hematogênica para outros órgãos, apresentando um acentuado tropismo para o sistema nervoso central, onde causa meningite criptocócica (adaptado de LIN; HEITMAN, 2006).

Essa predileção das leveduras pelo SNC não é totalmente elucidada, porém, algumas hipóteses já foram propostas. A elevada concentração, no líquido cefalorraquidiano (líquor), de nutrientes assimiláveis pelo fungo, tais como tiamina, ácido glutâmico, glutamina, carboidratos e minerais, associados à fraca resposta imune no tecido cerebral tornam o líquido um meio favorável ao desenvolvimento de *Cryptococcus* spp. (SEVERO; DE MATTOS OLIVEIRA; LONDERO, 1999). Além disso, o SNC é rico em catecolaminas (dopamina, noradrenalina, epinefrina e adrenalina) que podem ser utilizadas como precursoras da síntese de melanina, um importante fator de virulência, tornando o neurotropismo ainda mais relevante para a sobrevivência do microrganismo (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; GÓMEZ; NOSANCHUK, 2003).

Para chegar ao SNC e causar meningite criptocócica, as leveduras precisam atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). O mecanismo pelo qual elas penetram a BHE não é totalmente entendido embora várias possibilidades tenham sido propostas; incluindo passagem entre células endoteliais vizinhas (entrada paracelular), transporte para o sistema nervoso central dentro de fagócitos infectados (modelo Cavalo de Tróia), ou por absorção e travessia através de células endoteliais (transcitose) (CASADEVALL, 2010; CHANG et al., 2004; CHARLIER et al., 2009).

Os sintomas comumente apresentados pelos pacientes com meningite criptocócica são dor de cabeça, estado mental alterado, febre, náusea e vômito. Muitos pacientes desenvolvem deterioração da visão e paralisia do nervo ótico (devido ao aumento da pressão intracranial). Quando não tratada, 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., 2017).

1.3. Fatores de virulência

A capacidade de sobrevivência de *Cryptococcus* spp. no meio ambiente e dentro do hospedeiro é favorecida por condições intrínsecas ao fungo denominadas 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 presença da cápsula mucopolissacarídica, produção de melanina, capacidade de formar biofilmes e a produção de enzimas como as fosfolipases, proteinases, esterases DNases e ureases (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; LIN; HEITMAN, 2006).

A cápsula mucopolissacarídica, constituída principalmente pelos açúcares GXM e GalXM, é o principal fator de virulência do gênero e contribui com cerca de 25% da virulência do fungo (MCCLELLAND; BERNHARDT; CASADEVALL, 2006). Além de desempenhar papel

estrutural e proteger o fungo da dessecação ambiental e/ou predadores naturais; a cápsula contribui para a virulência através de diversos mecanismos que conferem proteção às leveduras contra a fagocitose e ainda interferem nos mecanismos imunes do hospedeiro (CASADEVALL et al., 2018). Sabe-se que essa estrutura interfere com a resposta imune do hospedeiro pela regulação negativa de citocinas inflamatórias, depleção de componentes do complemento e inibição da capacidade de apresentação de antígenos dos monócitos (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012). A importância desse fator de virulência já foi demonstrada por diversos estudos que mostram que cepas acapsulares são menos virulentas do que aquelas que apresentam essa estrutura; a espessura da cápsula, que depende de fatores associados ao microambiente da célula, também é um importante fator a ser considerado, uma vez que cápsulas com maior espessura contribuem mais para a sobrevivência de *Cryptococcus* spp. no hospedeiro (KUMAR et al., 2011).

A melanina, presente em vários microrganismos incluindo *Cryptococcus* spp., é um pigmento preto ou marrom de alto peso molecular formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos (L-DOPA, monofenol, difenol e/ou esculina) catalisada pela enzima lacase (BORAL et al., 2018). A produção de melanina pelas leveduras desse gênero também é um importante fator de virulência que confere ao patógeno resistência à fagocitose, termotolerância, proteção contra radiação ultravioleta e resistência aos antifúngicos (GÓMEZ; NOSANCHUK, 2003). Estudos mostram que células fúngicas melanizadas apresentam menor susceptibilidade à anfotericina B e à caspofungina, interferindo na efetividade do tratamento para criptococose (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; DE FÁTIMA LISBOA FERNANDES et al., 2012).

Biofilmes são comunidades microbianas que crescem aderidas a alguma superfície sólida e são envolvidas por uma matriz exopolimérica secretada pelos microrganismos em associação; podem ser formados em placas de poliestireno e dispositivos médicos, incluindo fístula de diálise peritoneal, cateteres de derivação ventriculoatrial e outros. A produção de biofilme por *Cryptococcus* spp. tem sido frequentemente descrita como uma estratégia associada à infecção crônica, uma vez que os biofilmes constituem uma barreira física que impede a penetração eficiente dos antifúngicos e conferem aos microrganismos níveis mais altos de resistência à atividade antifúngica (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005, 2015). Martinez e Casadevall (2006), mostraram que as leveduras presentes nos biofilmes de *Cryptococcus* spp. apresentavam maior resistência ao fluconazol e ao voriconazol, quando comparado à forma planctônica (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006).

A formação de biofilmes pelas leveduras de *Cryptococcus* spp. pode ser dividida em três fases: fase de adesão, fase intermediária e fase de maturação. Durante a fase de adesão (2 a 4 h), também chamada de fase inicial, as leveduras tornam-se metabolicamente ativas e se aderem a superfícies bióticas ou abióticas formando uma monocamada; após essa fase, no estágio intermediário (4 a 16 h), ocorre um aumento significativo na população, a produção inicial de matriz extracelular e a formação de microcolônias, nas quais ocorrem o estabelecimento de gradientes de nutrientes, a troca genética e *quorum sensing*. Durante o estágio de maturação (24 a 48 h), a atividade metabólica das células criptocócicas nos biofilmes permanece alta e constante (MARTINEZ; CASADEVALL, 2015). Após a maturação, as células podem se destacar do biofilme como microcolônias ou células isoladas e colonizar outros sítios no hospedeiro, causando a expansão da infecção e podendo dar início a infecções disseminadas. Estudos mostram que as células que se separam de um biofilme, conhecidas como células em dispersão,

são mais virulentas e causam maior mortalidade do que as células planctônicas, o que pode ser explicado por alterações epigenéticas que ocorrem nas células durante a formação e desenvolvimento do biofilme (SARDI et al., 2014; UPPULURI et al., 2010).

A produção e secreção de enzimas como as ureases, proteinases e fosfolipases, por *Cryptococcus* spp. está diretamente ligada à sobrevivência no ambiente e à patogênese (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018; KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009). A urease é capaz de degradar a uréia em amônia e carbamato e assim fornecer fontes de nitrogênio à levedura; além disso, essa enzima contribui para a invasão cerebral por favorecer a passagem fúngica por barreiras epiteliais (OLSZEWSKI et al., 2004; SINGH et al., 2013a). As fosfolipases são enzimas que hidrolisam as ligações ésteres de fosfolipídios da membrana plasmática de células do hospedeiro, promovendo sua desestabilização e causando lise celular; essas enzimas também facilitam a adesão da levedura ao tecido pulmonar pela degradação do líquido surfactante (COX et al., 2001; GHANNOUM, 2000) Já as proteases secretadas pelo fungo ocasionam degradação de proteínas do hospedeiro, tais como o colágeno, fibrinogênio, elastina, imunoglobulinas e componentes do complemento, promovendo danos teciduais e comprometimento do sistema de defesa (CAMPOS; BARONI, 2010; CHEN; BLANK; CASADEVALL, 1996).

1.4. Tratamento

Apesar da distribuição global de *Cryptococcus* spp., o tratamento da criptococose ainda é um desafio devido ao limitado arsenal terapêutico por problemas de seletividade, toxicidade, espectro de atividade e perfis de resistência dos fungos aos antifúngicos disponíveis (PERFECT, 2016).

Atualmente, três classes de agentes antifúngicos são utilizados no tratamento das infecções criptocócica: poliênicos, azóis e análogos de pirimidinas (5-flucitosina – 5-FC). Sendo que a farmacoterapia atual da criptococose compreende na anfotericina B (AMB) e suas formulações lipídicas, fluconazol (FCZ) e na combinação de AMB e 5-FC (COELHO; CASADEVALL, 2016; WHO, 2019). Recomenda-se que o tratamento da meningite criptocócica seja realizado em três fases distintas: indução, consolidação e manutenção. A fase de indução tem por objetivo alcançar uma rápida atividade fungicida, para obter a esterilidade do líquido cefalorraquidiano (LCR), sendo o regime primário indicado a AMB (0,7–1 mg/kg/dia) associado a 5-FC (100 mg/kg/dia) durante 2 semanas. Durante as oito semanas da fase de consolidação, recomenda-se o uso de FCZ (400 mg/dia); enquanto a manutenção do tratamento, com o objetivo de evitar recidivas, é realizada com FCZ (200 mg/dia) por 1 ano ou mais dependendo do paciente. 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 (MAZIARZ; PERFECT, 2016; PERFECT et al., 2010; SLOAN; PARRIS, 2014).

A AMB pertence à classe dos poliênicos e atua ligando-se ao ergosterol presente na membrana celular fúngica e produzindo poros, levando ao aumento da permeabilidade da membrana aos cátions (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}), o que promove um desbalanço eletrolítico e morte celular (BOLARD; JOLY; YENI, 1993; MESA-ARANGO et al., 2014). Além desse clássico mecanismo de ação, estudos mostram que AMB induz o acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS), que levam ao dano celular e à morte (BOLARD; JOLY; YENI, 1993; MESA-ARANGO et al., 2014). Apesar deste fármaco ser considerado como terapia de escolha para o tratamento da meningite criptocócica, o seu uso tem sido limitado devido aos seus efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos (CAMPOY; ADRIO, 2017; NETT; ANDES, 2016).

A 5-FC é uma pirimidina fluorada que, por ser um análogo de pirimidina, é transportada para dentro da célula pela citosina permease e convertida em fluorouracil pela citosina deaminase. O fluorouracil prejudica a síntese de ácidos nucléicos, impedindo a replicação celular e produção de proteínas (NETT; ANDES, 2016). Atualmente a 5-FC é recomendada somente em terapia combinada pois diversos fatores limitam o uso da 5-FC em monoterapia, tais como: efeitos tóxicos no fígado e na medula óssea, rápido desenvolvimento de resistência fúngica, baixo tempo de meia vida, alto custo e indisponibilidade em várias localidades, como na África e no Brasil (AGUIAR et al., 2017; LOYSE et al., 2013; NETT; ANDES, 2016).

O FCZ é um antifúngico fungistático pertencente a classe dos triazóis que atua inibindo a enzima C14- α -lanosterol demetilase (produto do gene *ERG11*), enzima essencial na via biossintética do ergosterol da célula fúngica. A depleção de ergosterol na membrana plasmática dos fungos e o acúmulo de intermediários tóxicos (do tipo 14 α -metil-3,6-diol) alteram a permeabilidade e fluidez da membrana e, conseqüentemente, inibem o crescimento fúngico (NETT; ANDES, 2016; ODDS; BROWN; GOW, 2003). Apesar de seu efeito hepatotóxico e das interações medicamentosas (KHOZA; MOYO; NCUBE, 2017), os agentes azólicos, tais como FCZ, ocasionam menos efeitos colaterais do que AMB e 5-FC (ZAVREL; WHITE, 2015), tem adequada penetração no SNC e excelente biodisponibilidade e tolerabilidade (ALLEN et al., 2015).

1.4.1. Resistência aos antifúngicos

A resistência antifúngica, processo no qual a concentração terapêutica do fármaco utilizado no tratamento não é mais capaz de inibir o crescimento fúngico, está se tornando uma preocupação para os profissionais de saúde nas últimas décadas (WIEDERHOLD, 2017). Os mecanismos de resistência mais comumente relatados estão relacionados com a saída do fármaco

do interior celular (efluxo), alterações fenotípicas nos sítios alvos dos fármacos, recombinações genômicas fúngicas e a formação de biofilmes (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014).

Apesar da resistência de *Cryptococcus* spp. aos agentes antifúngicos ainda não ser considerada um problema característico do gênero, estudos mostram que as taxas de resistência de isolados clínicos ao FCZ tem crescido com o passar dos anos, podendo chegar a 50% dependendo da região do globo (BONGOMIN et al., 2018; SMITH; DIXON; MAY, 2015).

A resistência aos agentes azólicos ocorre por diferentes mecanismos, que incluem mutação e/ou superexpressão do gene *ERG11*, alteração da via biossintética do ergosterol e superexpressão de bombas de efluxo (ZAVREL; WHITE, 2015). Dentre esses mecanismos, a superexpressão de bombas de efluxo na membrana, que reduzem a concentração de FCZ intracelular, é o mecanismo de resistência antifúngica mais comum entre os fungos patogênicos (CANNON et al., 2009; ZAVREL; WHITE, 2015). Em fungos, duas classes de bombas de efluxo já foram encontradas: *ATP-binding cassette* (ABC) e *major facilitator superfamily* (MFS); sendo a primeira uma grande classe de bombas de efluxo de fármacos que usam a hidrólise de ATP para translocar os compostos através das membranas celulares (DEL SORBO; SCHOONBEEK; DE WAARD, 2000).

A superexpressão de bombas de efluxo do tipo ABC foi observada em isolados resistentes ao FCZ obtidos de diferentes surtos de criptococose por *C. neoformans* e *C. gattii*. Dentre estas, as bomba de efluxo Mdr1 (*Multidrug resistance*, MDR) e as proteínas Afr1 e Afr2, pertencentes à subclasse de multirresistência (MDR) e a subclasse da família de resistência a drogas pleiotrópicas (PDR), respectivamente; estão ligadas à resistência de azóis nas duas espécies (BASSO et al., 2015; CHANG et al., 2018). Diferentes fatores, que incluem a exposição aos

antifúngicos clínicos bem como a exposição às substâncias antifúngicas usadas na agricultura, podem selecionar populações fúngicas tolerantes ou menos sensíveis aos antifúngicos utilizados na medicina humana e animal (BASTOS et al., 2017).

A resistência fúngica aos poliênicos, embora menos frequente do que a relatada nos azólicos, já foi relatada na literatura e pode estar relacionada à variação da quantidade de ergosterol e seus precursores presente na membrana de *C. neoformans* bem como à ocorrência de alterações na síntese de proteínas e enzimas capazes de degradar o antifúngico. Enquanto a resistência a 5-FC ocorre em 1 - 7% dos isolados de *C. neoformans* pela mutação nos genes que codificam a citosina permease e/ou citosina deaminase (CUENCA-ESTRELLA et al., 2001; GOVENDER et al., 2011; LOYSE et al., 2013).

1.4.2. Busca de Alternativas de Tratamento

A alta taxa de mortalidade associada à criptococose, os efeitos adversos dos agentes antifúngicos comumente utilizados e os recentes casos de resistência clínica a agentes antifúngicos como o FCZ têm incentivado a busca por alternativas e estratégias para o tratamento eficaz dessa condição clínica (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014).

Entre as alternativas para o tratamento da criptococose existentes, pode-se listar os compostos antifúngicos: APX001 que inibe a proteína fúngica Gwt1, enzima altamente conservada que catalisa uma etapa inicial da biossíntese da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI); AR-12, um derivado do celecoxib, reaproveitado para terapia antifúngica, que inibe a acetil-CoA sintase e T-2307, uma alilamina que inibe o potencial da membrana mitocondrial fúngica. Os novos compostos azóis (tretrazóis), VT1129 e VT1598, mostraram excelente atividade fungicida em modelos murinos de criptococose (MOURAD; PERFECT, 2018a). Além desses, a sertralina e o tamoxifeno, ambos fármacos de reposicionamento, já estão em fase clínica

III (NCT 01802385 e NCT 03002012) e II (NCT 03112031), respectivamente, para o tratamento de meningite criptocócica isoladamente e/ou em combinação com a terapia padrão.

Estudos realizados com compostos orgânicos de calcogênio (contendo telúrio - Te, selênio - Se ou enxofre - S) mostraram que além de propriedades imunomodulatórias, anti-inflamatórias, antioxidantes e antiproliferativas em diversos tecidos, esses compostos possuem atividades biológicas contra parasitas e microrganismos, incluindo *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Saccaromyces cerevisiae*, sendo essa atividade dose dependente com concentrações inibitórias entre 750 µM – 2000 µM para os três microrganismos (GRIFFIN et al., 2018; KALECHMAN et al., 2004; REN et al., 2002; SREDNI-KENIGSBUCH et al., 2008). Dentre os possíveis mecanismos de ação desses compostos, a capacidade de oxidar seletivamente grupos tiol de resíduos de cisteína nas proteínas e enzimas de sinalização celular dos microrganismos, desencadeando processos que culminam em uma resposta antioxidante, ou no início da apoptose e outras formas de morte celular; é um dos modos predominantes de ação da maioria dos compostos calcogenados (GRIFFIN et al., 2018; KARVEKAR; DAS; NARAJJI, 2007).

O interesse em compostos selenorgânicos iniciou-se na década de 1920 e continuou nas décadas seguintes, quando muitos compostos organosselênios foram sintetizados e tiveram sua atividade antimicrobiana foi estudada. O ebselen (2-fenilbenzo[d][1,2]selenazol-3(2H)-ona), sintetizado em 1924 por Lesser e Weiss, tem merecido destaque na literatura por sua baixa toxicidade e propriedades farmacológicas e, que incluem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiateroscleróticas, sendo a atividade antioxidante a mais estudada (LESSER; WEISS, 1924; MUGESH; DU MONT; SIES, 2001; NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004). Muitas das ações citoprotetoras de ebselen decorrem de sua capacidade de imitar o mecanismo ação de enzimas relacionadas à glutatona, como a glutatona peroxidase (GPx), que convertem as

ROS em metabólitos inócuos (AZAD; TOMAR, 2014). O ebselen já esteve em ensaios clínicos em pacientes que sofreram acidentes vasculares cerebrais e agora está sendo analisado para distúrbios bipolares, perda de audição, doença de Meniere, diabetes mellitus, osteoporose e câncer (BAEK et al., 2016; KAUR; PRAKASH; MEDHI, 2013; KIL et al., 2017; NOGUCHI, 2016; SINGH et al., 2013b; YAMAGUCHI et al., 1998).

Além das atividades mencionadas, o ebselen exibe atividade antimicrobiana contra bactérias *Gram* positivas e fungos como *Saccharomyces cerevisiae* (CI₅₀: 2 - 5 μM ou 0,55 – 1,37 μg/mL) (CHAN et al., 2007), *Candida* spp. (CI₅₀ : 128 μg/mL) (BILLACK et al., 2010; WÓJTOWICZ et al., 2004), *C. neoformans* (CI₅₀ : 4,5 μM ou 1,23 μg/mL) (SOTEROPOULOS et al., 2000), *Aspergillus* spp. (CI₅₀ : 128 μg/mL) e *Penicillium* spp. (CI₅₀ : 128 – 256 μg/mL) (WÓJTOWICZ et al., 2004).

Apesar da atividade molecular do ebselen nos fungos ser menos clara, o mecanismo proposto para sua atividade antifúngica está relacionada a inibição da enzima H⁺- ATPase da bomba de prótons Pma1p presente na membrana celular fúngica. A bomba de prótons Pmap1 possui baixa homologia em humanos e é fundamental para o crescimento fúngico e manutenção da estabilidade celular; assim, a inibição farmacológica da função da ATPase provavelmente resultará em atividade fungicida (AZAD; TOMAR, 2014; SOTEROPOULOS, 2000). Assim como já relatado para compostos orgânicos de calcogênio, estudos demonstraram que a inibição da H⁺- ATPase pelo ebselen resulta da interação covalente com os grupos tiol dos resíduos de cisteína, que são críticos para a atividade normal desse transportador (PARNHAM; SIES, 2013; SOTEROPOULOS et al., 2000).

Na tentativa de propor novas estratégias para o controle da criptococose, visando contornar as desvantagens dos agentes antifúngicos comumente utilizados na clínica e considerando as

atividades antimicrobianas dos compostos orgânicos de calcogênio; nesse projeto, avaliamos o efeito antifúngico de compostos sintéticos contendo Te, Se ou S sobre modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* de *Cryptococcus* spp.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

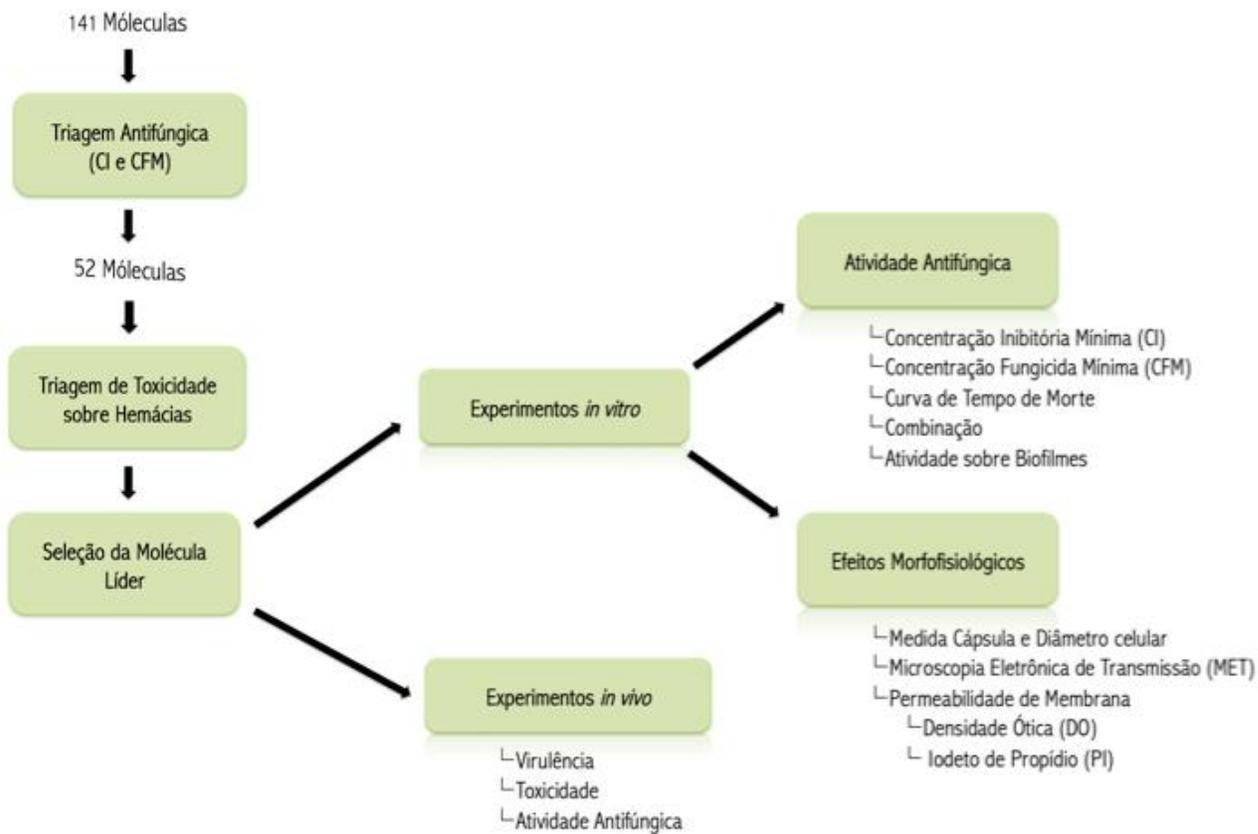
Avaliar o potencial antifúngico de compostos sintéticos contendo telúrio, selênio ou enxofre no controle de *Cryptococcus* spp. usando modelos *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

1. Realizar triagem antifúngica de 141 compostos sintéticos sobre *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913, *Candida albicans* SC5314, *Cryptococcus neoformans* H99 e *Fusarium solani* ATCC 36031, triagem de toxicidade em hemácias e selecionar um composto líder;
2. Avaliar as atividades inibitória e fungicida do composto ALDF_078 sobre células planctônicas de *C. neoformans* e *C. gattii*;
3. Avaliar a combinação de fluconazol com o composto ALDF_078 sobre *Cryptococcus* spp.;
4. Avaliar a atividade antibiofilme do composto ALDF_078 sobre *C. neoformans*;
5. Avaliar os efeitos morfofisiológicos do composto ALDF_078 sobre células planctônicas de *Cryptococcus* spp.;
6. Verificar a toxicidade e avaliar a atividade antifúngica do composto ALDF_078 em modelo de invertebrado *Galleria mellonella*.

O fluxograma de trabalho para o desenvolvimento deste projeto está ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema de desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado “Análise do efeito antifúngico de compostos sintéticos sobre *Cryptococcus* spp.”



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Antifúngicos padrão

Fluconazol (FCZ, Sigma Aldrich) e tebuconazol (TBZ, Alterne) foram previamente diluídos em água destilada estéril para obtenção de solução estoque de 2.560 e 1.000 µg/mL respectivamente. Anfotericina B (AMB, Sigma Aldrich) foi mantida como solução estoque de 1.600 µg/mL em Dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec). Todos os fármacos foram mantidos a -20°C.

3.2. Compostos orgânicos de Telúrio, Selênio e Enxofre

Os 141 compostos orgânicos de telúrio, selênio e enxofre utilizados nesse projeto foram sintetizados pelos grupos de pesquisa do Prof. Dr. Alcindo Aparecido dos Santos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Compostos ALDF_001 a ALDF_052) e do Prof. Dr. Hélio Alexandre Stefani da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Compostos ALDF_053 a ALDF_141). Soluções estoque desses compostos foram preparadas na concentração de 6.400 µg/mL utilizando DMSO, alíquotadas e armazenadas a -80°C.

3.3. Cepas e condições de crescimento

Para triagem antifúngica dos compostos foram usados: *Candida albicans* SC 5314, *Cryptococcus neoformans* ATCC 208821 (ou H99), *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913 e *Fusarium solani* ATCC 36031 (Tabela 1). Após a seleção do composto líder, *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 e outros isolados clínicos foram utilizados para os testes antifúngicos. As linhagens de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao TBZ, obtidas e descritas por Bastos et al., (2017), foram cedidas pelo Prof. Dr. Daniel de Assis dos Santos (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais/MG, Brasil). Para a obtenção das linhagens A, as cepas H99 e R265 passaram por um

processo de adaptação ao TBZ, gerando linhagens com tolerância cruzada aos triazóis de uso clínico (FCZ e ao itraconazol (ITZ)). Isolados clínicos, provenientes do líquido cefalorraquidiano, de *C. neoformans* (n = 5) e *C. gattii* (n = 5), foram cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Arnaldo L. Colombo do Laboratório Especial de Micologia (LEMI, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil) (Tabela 1). Todas as cepas fúngicas foram estocadas em caldo BHI com 20% glicerol em *freezer* a - 80°C.

Tabela 1. Origem das cepas de fungos e condições de crescimento.

Cepas	Origem	Estocagem durante Ensaios	Condições de Crescimento
<i>C. albicans</i> SC5314	IAL	ASD a 4°C	ASD, 48 h a 35°C
<i>A. fumigatus</i> ATCC 16913	INCQS	ABD a 28°C	ABD, 7 dias a 35°C
<i>F. solani</i> ATCC 36031	INCQS	ABD a 28°C e	ABD, 48 h a 35°C seguido por 5 dias de a 25 °C
<i>C. neoformans</i> H99 NA	ICB – UFMG	ASD a 4°C	ASD, 72 h a 35°C
<i>C.gattii</i> R265 NA	ICB – UFMG	ASD a 4°C	ASD, 72 h a 35°C
<i>C. neoformans</i> H99 A	ICB - UFMG	ASD + 2 µg/mL TBZ a 4°C	ASD + 2 µg/mL TBZ, 72 h a 30°C
<i>C. gattii</i> R265 A	ICB - UFMG	ASD + 7 µg/mL TBZ a 4°C	ASD + 7 µg/mL TBZ, 72 h a 30°C
Isolados clínicos <i>C. neoformans</i> (n=5) ^a	LEMI - UNIFESP	ASD a 4°C	ASD, 72 h a 35°C
Isolados clínicos <i>C. gattii</i> (n=5) ^b	LEMI - UNIFESP	ASD a 4°C	ASD, 72 h a 35°C

^a isolados clínicos de *C. neoformans*: 541, 542, 543, 544A e 545A; ^b Isolados clínicos *C. gattii*: 525, 527, 551A, 616A e 652A; A: adaptada ao tebuconazol; NA: não adaptada ao tebuconazol (selvagem); IAL: Instituto Adolf Lutz; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fiocruz, Brasil); ICB: Instituto de Ciências Biomédicas; UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais; LEMI: Laboratório Especial de Micologia; UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo; TBZ: tebuconazol; ASD : ágar Saboraud dextrose; ABD: ágar batata dextrose.

3.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CI) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A concentração inibitória mínima de cada uma das moléculas e dos antifúngicos padrão foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, descrita nos documentos M27-A3 para leveduras e M38-A2 para filamentosos (CLSI, 2008a, 2008b). Os antifúngicos foram diluídos seriadamente (1:2) em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16M em microplacas de 96 poços e fundo chato; em seguida, 100 µL da suspensão fúngica foi adicionada aos poços obtendo uma concentração final de 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL e concentrações finais dos fármacos e compostos testados foram: AMB (0,031 a 16 µg/mL), FLC (0,125 a 64 µg/mL) e ALDF_001 a ALDF_142 (0,25 a 128 µg/mL). As microplacas foram incubadas a 35°C por 72 h. A leitura foi realizada visualmente e/ou espectrofotometricamente a 492 nm (Epoch 2, Biotek) para determinar a menor concentração que inibe o crescimento fúngico em 50% e 90% (CI₅₀ e CI₉₀, respectivamente). Posteriormente, alíquotas de 10 µL de cada poço em que houve inibição de crescimento fúngico foram transferidas para ASD livre do composto, e incubadas à 35°C por 24-72 h para determinar a CFM, definida como a menor concentração do composto capaz de causar a morte das leveduras (redução da viabilidade celular em >99,9%). Os compostos são considerados fungicidas se o valor de CFM for igual ou até 4X a CI₅₀; caso o CFM do composto for maior que 4X a CI₅₀, estabelecemos que o composto apresenta atividade fungistática (PFALLER et al., 2004; PFALLER; LIANG YU, 2001).

3.5. Avaliação da atividade hemolítica (AH)

Uma suspensão de hemácias de carneiro a 4% (v/v, em solução de glicose a 5% estéril) foi submetida a diferentes concentrações (16 a 128 µg/mL) dos compostos que apresentaram CI₅₀ ≤

16 µg/mL 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, Sigma Aldrich). Após este período, as amostras foram centrifugadas a 500 g por 10 min e o sobrenadante analisado em um espectrofotômetro a 540 nm (Epoch 2, Biotek). A atividade hemolítica (AH) foi calculada como segue: $AH (\%) = 100 - [(CP - AT)/(CP - CN)] \times 100$; sendo CP : absorbância do controle positivo, AT : absorbância da amostra teste e CN : absorbância do controle negativo (LI et al., 2002).

3.6. Curva do tempo de morte

Células planctônicas de *C. neoformans* H99 NA e A padronizadas a 5×10^4 UFC/mL foram expostas a diferentes concentrações de ALDF_078 (0,5X CI₅₀ a 8X CI₅₀) em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16 M e incubadas a 35°C. Após os períodos de 1, 4, 8, 24 e 48 h de incubação as amostras foram diluídas seriadamente de 1:10 e plaqueadas em ASD incubadas por 72 h a 35°C e as UFCs contadas para definir a curva do tempo de morte (KLEPSEK et al., 1998).

3.7. Combinação de antifúngicos

A combinação do composto ALDF_078 com FCZ sobre células planctônicas de *Cryptococcus* spp. foi realizada utilizando a técnica de *Checkerboard*. Células planctônicas de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* NA e A nas concentrações finais de 1×10^3 UFC/mL foram expostas a diferentes concentrações de ALDF_078 (0,125X CI₅₀ a 8X CI₅₀) combinadas com FCZ (0,125X CI₅₀ a 8X CI₅₀) em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16 M. As microplacas foram então incubadas por 72 h a 35°C. O perfil de interação entre ALDF_078 e FCZ foi avaliado após o cálculo da índice de Concentração Inibitória Fracional (CIF), definido como a soma das CIFs de cada composto, as quais são obtidas pela divisão da CI₅₀ do composto em combinação pela CI₅₀ do composto sozinho. Se o valor de CIF obtido foi $\leq 0,5$ concluiu-se que os agentes possuem sinergismo de ação. Se o valor de CIF obtido foi $> 0,5$ e ≤ 4 a combinação é indiferente. Por

último, se o valor de CIF foi > 4 , os compostos possuem ação antagônica (MUKHERJEE et al., 2005).

3.8. Concentração inibitória mínima sobre células do biofilme

As atividades antibiofilme do composto ALDF_078 e AMB foram avaliadas em células sésseis e em dispersão do biofilme maduro de *C. neoformans* H99 NA e A. As duas linhagens foram previamente cultivadas como descrito anteriormente (Tabela 1) e após a incubação, 100 μ L de uma suspensão padronizada a 1×10^7 UFC/mL em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16 M foi adicionada nos poços das microplacas de 96 poços de fundo chato de poliestireno e incubadas a 35°C sem agitação por 48 h para a formação do biofilme (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006)

Depois das formação do biofilme, o sobrenadante foi coletado para a avaliação da susceptibilidade das células em dispersão do biofilme ao ALDF_078 e AMB pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2008a) como descrito previamente. Os valores de CID (concentração inibitória mínima sobre as células em dispersão do biofilme) foi definido como a menor concentração que inibe 50% (CID₅₀) e 90% (CID₉₀) do crescimento do fungo. Para avaliar as células sésseis do biofilme, estas foram lavadas 2 vezes com PBS e tratadas com 100 μ L de ALDF_078 (0,25 a 128 μ g/mL) e AMB (0,015 a 8 μ g/mL) por 48 h a 35 °C, sem agitação. 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 0.1 mg/mL de XTT com 10 μ M de menadiona em PBS foi adicionada aos poços da microplaca, e esta foi incubada por 3 h a 37°C e protegida da luz. Após este período, a microplaca foi centrifugada a 4000 rpm por 10

min e 80 µL do sobrenadante foi transferido para outra microplaca para a leitura da absorbância a 490 nm (LUIZ et al., 2015). Os valores de CIBs (concentração inibitória mínima sobre as células sésseis do biofilme) foram definidos como a menor concentração do composto que inibe 50% (CIB₅₀) e 90% (CIB₉₀) da atividade metabólica das células sésseis do biofilme quando comparado com as células sem tratamento.

3.9. Microscopia ótica

Leveduras planctônicas de *Cryptococcus* spp. (1×10^3 UFC/mL) foram tratadas ou não com concentrações sub-inibitórias (CI_{50/2}) do composto ALDF_078 ou FCZ 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, 50 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) e o volume celular foi calculado utilizando a fórmula $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ (ISHIDA et al., 2009).

3.10. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Uma suspensão de células planctônicas de *C. neoformans* H99 NA foi ajustada para 1×10^4 UFC/mL em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16 M. As leveduras foram tratadas ou não com a CI₅₀ de ALDF_078 por 72 h a 35°C. Após a 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 ferrocianeto de potássio 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 de propileno e embebidas em resina Spurr. Secções ultrafinas foram coradas com acetato de uranila 5 % e citrato de chumbo a 0,5 %, e observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai FEI G20, FEI company).

3.11. Permeabilidade da membrana plasmática

Suspensões fúngicas de *C. neoformans* H99 NA e A padronizadas a 1×10^7 UFC/mL foram expostas às concentrações de CI₅₀, 2X CI₅₀ e 4X CI₅₀ de ALDF_078 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).

3.12. Avaliação do efeito de ALDF_078 sobre a permeabilidade de membrana com uso de marcador fluorescente

Leveduras de *C. neoformans* H99 NA e A padronizadas a 1×10^7 CFU/mL em PBS foram expostas ou não às concentrações de 4X CI₅₀ e 8X CI₅₀ de ALDF_078 ou AMB. Após 24 h de incubação a 35°C as leveduras foram coletadas por centrifugação e lavadas com PBS e a suspensão fúngica ajustada para 1×10^6 UFC/mL. As leveduras foram então fixadas com 2 % de formaldeído em PBS durante 30 min, lavadas com PBS e, em seguida, marcadas com 100 µL de iodeto de propídio (PI, Invitrogen) a 5 µg/mL durante 30 min no escuro e temperatura ambiente para análise no citômetro de fluxo. Para tal, 100.000 eventos foram analisados pelo citômetro de fluxo (BD Accuri C6) e os dados processados usando o software BD Accuri C6.

3.13. Ensaio de virulência, toxicidade e atividade antifúngica sobre as larvas de *Galleria mellonella*

As mariposas foram mantidas em uma câmara incubadora a 30°C e alimentadas com pólen e cera de abelha. Todos os dias, durante a fase do acasalamento foi realizada a troca do papel filtro, com o objetivo de recolher os ovos depositados e efetuar a limpeza do ambiente retirando as mariposas mortas. Os papéis filtro com os ovos depositados foram transferidos para outro recipiente contendo pólen e cera de abelha. Diariamente, foi realizado o acompanhamento para inspecionar o crescimento das larvas até atingirem o peso e o tamanho ideal para os experimentos (1,5 a 2,0 cm de comprimento e peso corporal de 110 mg a 116 mg).

Em todos os experimentos realizados, as larvas (n = 18) foram incubadas a 37°C e observações diárias por até 7 dias foram realizadas para a contagem dos sobreviventes e avaliação do estado de saúde das larvas. Curvas de sobrevivência e morbidade foram plotadas após o ensaio, sendo que a curva de morbidade foi realizada seguindo o modelo de notas do índice de saúde das larvas como mostrado abaixo (Tabela 2) (LOH et al., 2013).

Para a avaliação da virulência das linhagens, as leveduras de *C. neoformans* H99 NA e A foram cultivadas em caldo Sabouraud dextrose por 72 h a 37°C, lavadas em PBS e o inóculo ajustado para 1×10^8 UFC/mL em PBS. Posteriormente, 10µL do inóculo foi injetado na hemocele esquerda das larvas com o auxílio de seringas Hamilton (FRENKEL et al., 2016). Larvas que receberam PBS foram incluídas nos ensaios como grupos controle.

A toxicidade do composto ALDF_078 foi avaliada em diferentes doses 46,5 mg/kg, 69,8 mg/kg e 93 mg/kg, ou seja, 10µL das respectivas concentrações do composto 512 µg/mL, 768 µg/mL ou 1024 µg/mL foram administradas na hemocele esquerda das larvas. As larvas que receberam PBS foram incluídas no ensaio como grupo controle.

Tabela 2. Nota do índice de saúde de larvas de *Galleria mellonella*.

Índice de Saúde		
Categoria	Descrição	Nota
atividade	sem movimento	0
	movimento mínimo ao estímulo	1
	movimento quando estimulada	2
	movimento sem estímulo	3
formação de casulo	sem casulo	0
	casulo parcial	0.5
	casulo total	1
melanização	larva preta	0
	larva preta com pontos marrons	1
	≥3 pontos em larva bege	2
	<3 pontos em larva bege	3
	sem melanização	4
sobrevivência	morta	0
	viva	2
Interpretação: larva saudável (sem infecção), nota somatória: 9 -10		

A avaliação da eficácia do tratamento com ALDF_078 foi realizada após 30 min da infecção com 10 µL de 1×10^8 UFC/mL de *C. neoformans* H99 NA. As larvas foram tratadas com 10 mg/kg de AMB, 20mg/kg ou 40 mg/kg de ALDF_078 (10 µL das soluções a 110µg/mL, 220 µg/mL e 440 µg/mL, respectivamente) na hemocele direita para a avaliação da atividade antifúngica. Foram utilizados também um grupo inoculado somente com PBS e um grupo infectado e não tratado para a avaliação antifúngica.

3.14. Análise estatística

As análises estatísticas para a medida da espessura da cápsula foram realizadas pelo teste t de *student* e a análise dos resultados obtidos para os experimentos de permeabilidade de membrana foi feita pela análise de variância bidirecional (ANOVA). Os dados obtidos pela

citometria de fluxo foram avaliados pela análise de variância unidirecional (ANOVA) com teste Dunnett como pós-teste. As curvas de sobrevivência e de morbidade de *G. mellonella* foram analisadas pelos testes Log-rank (Mantel-Cox) e ANOVA bidirecional, respectivamente. Todos os testes foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) e o nível de confiança de 95% foi considerado significativo para todas as análises.

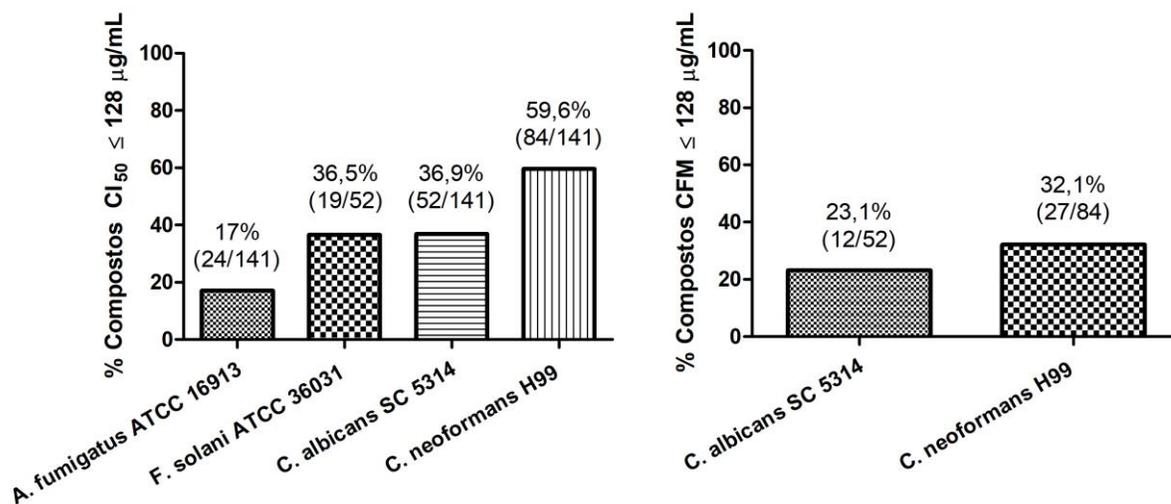
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora várias classes de antifúngicos estejam clinicamente disponíveis, pode-se afirmar que diversos fatores, tais como restrições na via de administração, alta toxicidade, estreito espectro de atividade, desenvolvimento de resistência, baixa biodisponibilidade em tecidos alvo e limitações geográficas, tornam o repertório de agentes antifúngicos limitado (PFALLER, 2012). Por esse motivo, estudos que visam identificar novos compostos de origem natural ou sintética que possuam atividade antifúngica, sejam atóxicos, seletivos, possuam alta biodisponibilidade e amplo espectro de ação são de extrema importância (FUENTEFRIA et al., 2018; PIANALTO; ALSPAUGH, 2016).

A triagem dos compostos sintéticos contendo Te, Se e S foi realizada pelo ensaio de microdiluição em caldo utilizando diferentes espécies fúngicas (*A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans* e *F. solani*). Os valores de CI_{50} obtidos sugerem que os fungos leveduriformes são mais susceptíveis aos compostos testados do que os filamentosos (Tabela 3). Para as leveduras, dos 141 compostos testados, 52 foram capazes de inibir em 50 % o crescimento de *C. albicans* SC5314 (36,9%, CI_{50} : 0,25 – 128 $\mu\text{g/mL}$), enquanto 84 compostos foram capazes de inibir *C. neoformans* H99 (59,6%, CI_{50} : 0,25 – 128 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 3). Para os fungos filamentosos, apenas 24 dos 141 compostos testados foram capazes de inibir em 50 % o crescimento de *A. fumigatus* ATCC 16913 (17%, CI_{50} : 8 – 128 $\mu\text{g/mL}$); enquanto dos 52 compostos testados para *F. solani* ATCC 36031, 19 foram capazes de inibir o crescimento fúngico da espécie (36,5%, CI_{50} : 4 – 128 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 3). Quando avaliamos as CFM dos compostos que apresentaram $CI_{50} \leq 128$ $\mu\text{g/mL}$ sobre *C. albicans* SC5314 e *C. neoformans* H99, observamos que somente 12 dos 52 compostos apresentaram atividade fungicida sobre *C. albicans* SC5314 (23,1%) enquanto 27 dos 84 compostos testados apresentaram atividade fungicida sobre *C. neoformans* H99 (32,1%)

(CFM: 8 – 128 $\mu\text{g/mL}$). Após a análise dos resultados obtidos na triagem, decidimos seguir o estudo desses compostos utilizando o gênero *Cryptococcus* como modelo experimental, pois foi o mais susceptível ao maior número de compostos (Tabela 3 e Figura 3).

Figura 3. Triagem de 141 compostos calcogênicos sobre *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913, *Fusarium solani* ATCC 36031, *Candida albicans* SC5314 e *Cryptococcus neoformans* H99.



Concentração inibitória mínima de 50% (CI_{50}) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de 141 compostos sobre *A. fumigatus* ATCC 16913, *F. solani* ATCC 36031, *C. albicans* SC5314 e *C. neoformans* H99. % de compostos com $\text{CI}_{50} \leq 128 \mu\text{g/mL}$ (A) e % de compostos com $\text{CFM} \leq 128 \mu\text{g/mL}$ (B).

Apesar de não existirem valores de pontos de cortes determinados pelos guias de sensibilidade/resistência aos antifúngicos padrão usados contra *Cryptococcus* spp., alguns trabalhos têm utilizado os valores de pontos de cortes sugeridos para *Candida* spp. (ESPINEL-INGROFF et al., 2012; PFALLER et al., 2004, 1999); assim, isolados inibidos em $\text{CIM} \leq 8 \mu\text{g/mL}$ são considerados susceptíveis, CIM entre 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$ susceptíveis dose-dependente e com $\text{CIM} \geq 64 \mu\text{g/mL}$ são considerados resistentes ao FCZ (CLSI, 2008a). Entretanto, ainda não

está claro se esses parâmetros podem ser utilizados para *Cryptococcus* spp. (SMITH et al., 2015). Para melhor análise dos resultados obtidos, dividimos os compostos em 3 grupos de acordo com as faixas de CI_{50} obtidas para *C. neoformans* H99; assim, classificamos as moléculas em alta atividade inibitória ($CI_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$), média atividade ($CI_{50} > 4$ e $\leq 16 \mu\text{g/mL}$) e baixa atividade ($CI_{50} > 16 \mu\text{g/mL}$). O grupo de compostos classificados como de baixa atividade possui 111 moléculas, seguido pelo grupo de média atividade com 19 moléculas e alta atividade com 21 moléculas (Tabela 3). Dessa forma, 40 moléculas (média⁺ e alta⁺⁺ atividade) foram selecionadas para serem avaliadas quanto a citotoxicidade em hemácias.

Tabela 3. Suscetibilidade de *Cryptococcus neoformans* H99, *Candida albicans* SC5314, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913 e *Fusarium solani* ATCC 36031 aos compostos orgânicos sintéticos contendo telúrio, selênio e enxofre. Concentração inibitória mínima de 50% e de 90% (CI₅₀ e CI₉₀, respectivamente) e concentração fungicida mínima (CFM) são expressa em µg/mL.

Código Moléculas	<i>Cryptococcus neoformans</i> H99			<i>Candida albicans</i> SC5314			<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 16913	<i>Fusarium solani</i> ATCC 36031
	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₅₀
ALDF_001	128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128
ALDF_002 ⁺	16	32	64	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_003	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_004	128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128
ALDF_005	32	64	>128	>128	>128	>128	128	64
ALDF_006	32 - 64	>128	>128	>128	>128	>128	128	128
ALDF_007	32	64	64	32 - 128	128	>128	128	128
ALDF_008	32 - 64	128	>128	>128	>128	>128	128	128
ALDF_009	32	64	128	>128	>128	>128	>128	128
ALDF_010	64	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_011	64	>128	>128	32	64	64	128	>128
ALDF_012 ⁺	8	16	16	128	>128	>128	128	128
ALDF_013	32 - 64	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_014	64	128	>128	128	128	>128	>128	>128
ALDF_015 ⁺	8 - 16	16 - 32	>128	>128	>128	>128	128	128
ALDF_016	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_017 ⁺	16 - 32	64	64	16	32	64	64	16

Código Moléculas	<i>Cryptococcus neoformans</i> H99			<i>Candida albicans</i> SC5314			<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 16913	<i>Fusarium solani</i> INCQS 40099
	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₅₀
ALDF_018	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_019	128	>128	>128	128	>128	>128	>128	128
ALDF_020 ⁺	16	32	64	64	>128	64	32	32
ALDF_021 ⁺	8	16	>128	>128	>128	>128	64	64
ALDF_022	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_023 ⁺⁺	0,5 - 1	1 - 2	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_024 ⁺	8	16	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_025 ⁺	8	16	128	>128	>128	>128	>128	128
ALDF_026 ⁺⁺	2 - 4	4	128	32 - 64	>128	>128	64	64
ALDF_027 ⁺⁺	0,25	0,5 - 1	8	4 - 16	16 - 32	32	8 - 16	32
ALDF_028 ⁺⁺	0,25 - 0,5	0,5 - 1	64	32 - 64	64	64	128	>128
ALDF_029 ⁺⁺	4	64	128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_030	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_031 ⁺⁺	1 - 2	2 - 8	64	>128	>128	>128	64	>128
ALDF_032 ⁺⁺	0,25 - 1	0,5 - 2	64	32	32 - 64	128	32	128
ALDF_033 ⁺⁺	0,5 - 2	1 - 4	16	128	>128	>128	>128	4
ALDF_034 ⁺⁺	0,25	0,25	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_035	32	32	>128	16	32	>128	64 - 128	>128
ALDF_036 ⁺	16	>128	128	16	32 - 128	>128	32	32
ALDF_037 ⁺⁺	2	8	8	16	32	>128	>128	8
ALDF_038	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_039	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_040	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_041	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_042	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128

Código Moléculas	<i>Cryptococcus neoformans</i> H99			<i>Candida albicans</i> SC5314			<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 16913	<i>Fusarium solani</i> INCQS 40099
	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₅₀
ALDF_043	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_044	64 - 128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_045	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_046	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_047	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_048	32	64	128	>128	>128	>128	64	128
ALDF_049	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_050	32	64	128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_051	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_052	128	>128	>128	>128	>128	>128	128	>128
ALDF_053	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
ALDF_054	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_055	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_056	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_057	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_058	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_059	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_060	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_061	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_062	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_063	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_064	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_065	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_066	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_067	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND

Código Moléculas	<i>Cryptococcus neoformans</i> H99			<i>Candida albicans</i> SC5314			<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 16913	<i>Fusarium solani</i> INCQS 40099
	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₅₀
ALDF_068	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_069	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_070	128	128	>128	>128	128	>128	128	ND
ALDF_071	128	128	>128	>128	128	>128	128	ND
ALDF_072	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_073	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_074	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_075	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_076	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_077	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_078 ⁺⁺	4	4 - 16	16	8 - 16	16	32	>128	ND
ALDF_079	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_080	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_081 ⁺⁺	4	4 - 8	16	64	>128	128	>128	ND
ALDF_082	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_083	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_084	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_085 ⁺	16 - 32	64	128	64	>128	>128	>128	ND
ALDF_086	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_087	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_088	32 - 64	64	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_089	128	64	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_090 ⁺	4 - 64	128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_091	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_092 ⁺	16	32	>128	>128	>128	>128	>128	ND

Código Moléculas	<i>Cryptococcus neoformans</i> H99			<i>Candida albicans</i> SC5314			<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 16913	<i>Fusarium solani</i> INCQS 40099
	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₅₀
ALDF_093	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_094	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_095	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_096	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_097	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_098 ⁺⁺	2 - 4	8	>128	16	ND	>128	128	ND
ALDF_099	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_100 ⁺	8	32	32	128	>128	>128	>128	ND
ALDF_101 ⁺	8	16	32	128	>128	>128	>128	ND
ALDF_102	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_103	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_104	64	>128	>128	128	>128	>128	>128	ND
ALDF_105	>128	>128	>128	128	>128	>128	>128	ND
ALDF_106 ⁺⁺	0,5 - 2	0,5 - 4	>128	32	>128	>128	>128	ND
ALDF_107 ⁺⁺	8 - 32	8 - 32	>128	64	>128	>128	>128	ND
ALDF_108	128	>128	>128	128	>128	>128	>128	ND
ALDF_109 ⁺⁺	4 - 16	8 - 16	>128	4	>128	>128	>128	ND
ALDF_110	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_111	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_112	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_113	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_114	64 - 128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_115	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_116 ⁺⁺	0,25 - 1	0,25 - 1	64	1	ND	>128	>128	ND
ALDF_117 ⁺	8 - 64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND

Código Moléculas	<i>Cryptococcus neoformans</i> H99			<i>Candida albicans</i> SC5314			<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 16913	<i>Fusarium solani</i> INCQS 40099
	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₅₀
ALDF_118 ⁺⁺	2 - 4	2 - 4	>128	8	ND	>128	>128	ND
ALDF_119	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_120	64	>128	64	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_121	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_122	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_123 ⁺	16 - 32	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_124 ⁺	16 - 32	16 - 32	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_125	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_126	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_127	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_129	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_130	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_131	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_132 ⁺	16 - 32	64	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_133 ⁺	16 - 64	128	64	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_134	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_135	64	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_136	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_137 ⁺⁺	0,5 - 2	4	>128	8	ND	>128	>128	ND
ALDF_138	64	>128	128	>128	>128	>128	>128	ND
ALDF_139 ⁺⁺	1	2	>128	4 - 8	16	>128	>128	ND
ALDF_140 ⁺⁺	2 - 4	4 - 8	>128	1 - 4	2 - 32	>128	>128	ND
ALDF_141	128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	ND

⁺⁺ alta atividade antifúngica (CI₅₀ ≤ 4 µg/mL), ⁺ média atividade antifúngica (CI₅₀ > 4 e ≤ 16 µg/mL).

Em estudos que visam o desenvolvimento de alternativas aos tratamentos convencionais é de extrema importância que os compostos ou extratos de interesse sejam considerados seguros e não causem manifestações tóxicas que possam por em risco a saúde do usuário. Assim, a avaliação do potencial citotóxico do composto teste, ou seja, a capacidade do mesmo em provocar qualquer dano ou alteração fisiológica em células selecionadas para o estudo, é essencial. (MORENO et al., 2018; NUNES ALVES; OSWALDO CRUZ ORIENTADOR; PINTO CORRADO, 2003). Dentre as metodologias mais empregadas, destaca-se a avaliação da citotoxicidade hemolítica, que avalia o grau de hemólise provocado por uma molécula quando incubada com uma suspensão padronizada de hemácias (PAPE; HOPPE, 1990).

Os resultados de CI_{50} , CI_{90} , CFM e atividade hemolítica (AH_{50}) para as moléculas classificadas como média e alta atividade antifúngica estão representados na Tabela 4. A partir da avaliação dos resultados da atividade hemolítica, observamos que o composto ALDF_036, quando utilizado em sua maior concentração (128 $\mu\text{g/mL}$), causou 50% de hemólise, sendo esse o único composto sintético que apresentou atividade hemolítica nas concentrações testadas (Tabela 4). Enquanto a AMB, fármaco de primeira escolha no tratamento da neurocriptococose, mostrou forte atividade hemolítica com 50% de lise a 17 $\mu\text{g/mL}$ (ISHIDA et al., 2015; MOURAD; PERFECT, 2018a); corroborando com um dos maiores inconvenientes da AMB: a toxicidade relacionada à infusão, resultado da atividade hemolítica e produção de citocinas pró-inflamatórias (GALLIS; DREW; PICKARD, 1990; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009). Os resultados obtidos nos testes de hemólise com os compostos indicam baixo potencial de citotoxicidade *in vitro*, o que torna a investigação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* ainda mais relevante. Vale ressaltar a importância de se testar a citotoxicidade em outras linhagens celulares, como fibroblastos, macrófagos, células epiteliais, renais e hepáticos.

Tabela 4. Compostos calcogenados sintéticos classificados em alta ($CI_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$) e média ($CI_{50} > 4$ e $\leq 16 \mu\text{g/mL}$) atividade antifúngica sobre *Cryptococcus neoformans* H99. Concentração inibitória mínima de 50% e de 90% (CI_{50} e CI_{90} , respectivamente), concentração fungicida mínima (CFM) e concentração dos compostos que causam 50% de atividade hemolítica para eritrócitos (AH_{50}) são expressos em $\mu\text{g/mL}$.

Código Moléculas	CI₅₀	CI₉₀	CFM	AH₅₀
ALDF_002	16	32	64	>128
ALDF_012	8	16	16	>128
ALDF_015	8 - 16	16 - 32	>128	>128
ALDF_017	16 - 32	64	64	>128
ALDF_020	16	32	64	>128
ALDF_021	8	16	>128	>128
ALDF_023 ⁺⁺	0,5 - 1	1 - 2	>128	>128
ALDF_024	8	16	>128	>128
ALDF_025	8	16	128	>128
ALDF_026 ⁺⁺	2 - 4	4	128	>128
ALDF_027 ⁺⁺	0,25	0,5 - 1	8	>128
ALDF_028 ⁺⁺	0,25 - 0,5	0,5 - 1	64	>128
ALDF_029 ⁺⁺	4	64	128	>128
ALDF_031 ⁺⁺	1 - 2	2 - 8	64	>128
ALDF_032 ⁺⁺	0,25 - 1	0,5 - 2	64	>128
ALDF_033 ⁺⁺	0,5 - 2	1 - 4	16	>128
ALDF_034 ⁺⁺	0,25	0,25	>128	>128
ALDF_036	16	>128	128	128
ALDF_037 ⁺⁺	2	8	8	>128
ALDF_078 ⁺⁺	4	4 - 16	16	>128
ALDF_081 ⁺⁺	4	4 - 8	16	>128
ALDF_085	16 - 32	64	128	>128
ALDF_090	4 - 64	128	>128	>128
ALDF_092	16	32	>128	>128

ALDF_098 ⁺⁺	2 - 4	8	>128	>128
ALDF_100	8	32	32	>128
ALDF_101	8	16	32	>128
ALDF_106 ⁺⁺	0,5 - 2	0,5 - 4	>128	>128
ALDF_107	8 - 32	8 - 32	>128	>128
ALDF_109	4 - 16	8 - 16	>128	>128
ALDF_116 ⁺⁺	0,25 - 1	0,25 - 1	64	>128
ALDF_117	8 - 64	>128	>128	>128
ALDF_118 ⁺⁺	2 - 4	2 - 4	>128	>128
ALDF_123	16 - 32	> 128	>128	>128
ALDF_124	16 - 32	16 - 32	>128	>128
ALDF_132	16 - 32	64	>128	>128
ALDF_133	16 - 64	128	64	>128
ALDF_137 ⁺⁺	0,5 - 2	4	>128	>128
ALDF_139 ⁺⁺	1	2	>128	>128
ALDF_140 ⁺⁺	2 - 4	4 - 8	>128	>128
FCZ	1	2	8	>128
AMB	0,03	0,03	0,03	17*

⁺⁺ alta atividade antifúngica ($CI_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$); * Dado obtido por Ishida e colaboradores (2015) (ISHIDA et al., 2015). Dados representam resultados realizados em dois momentos distintos.

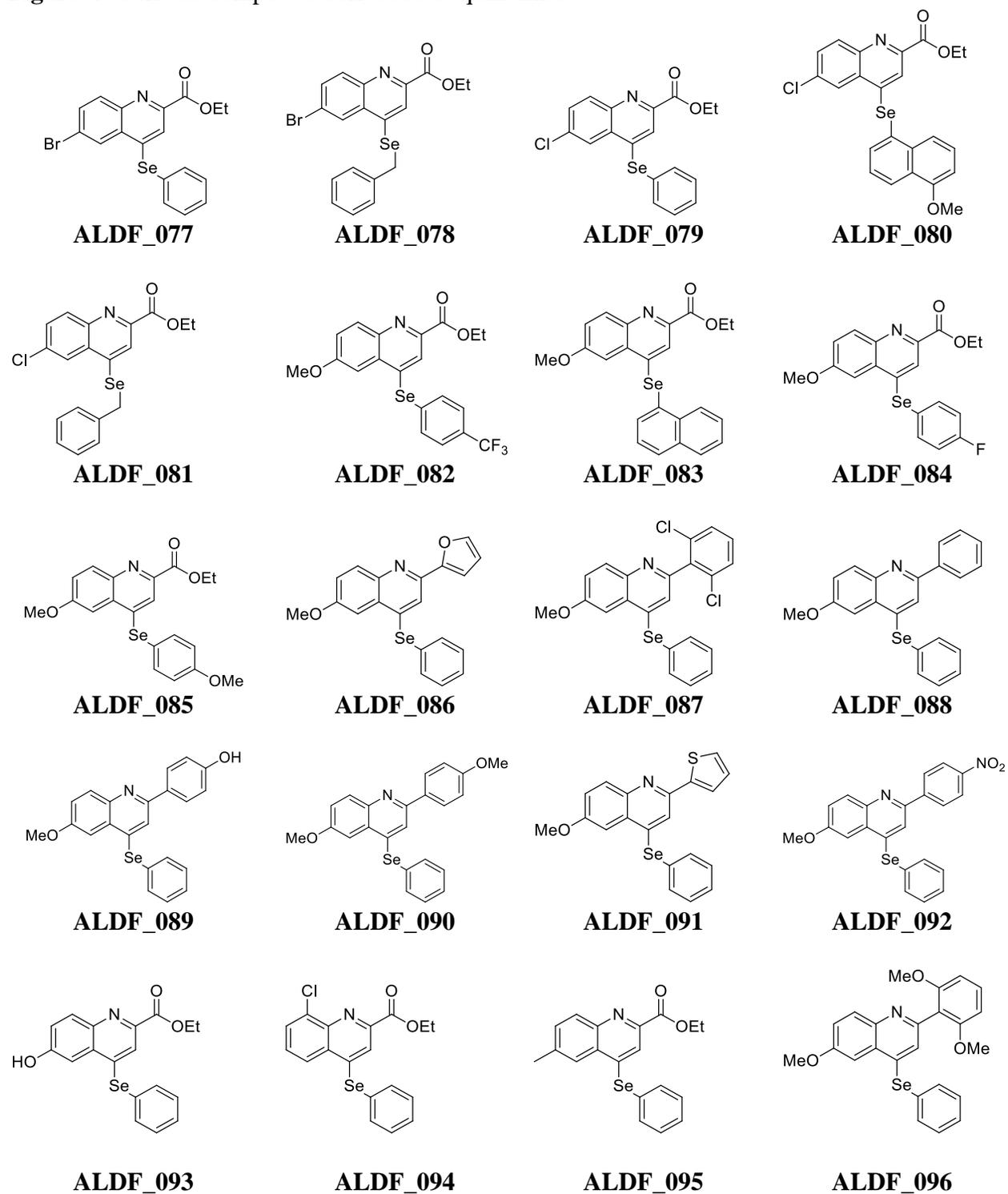
A partir dos dados da triagem antifúngica (CI e CFM) decidimos trabalhar com uma série de compostos contendo o núcleo de quinolina (Figura 4). Compostos que possuem esse núcleo em sua estrutura química apresentam atividades biológicas diversificadas, como atividade antiparasitária, antibacteriana, antitumoral (CHEN et al., 2014; SANGANI et al., 2014), anti-inflamatória (CHEN et al., 2006), antiviral (MUSIOL, 2013) e atividade antifúngica (KATHIRAVAN et al., 2012; MUSIOL et al., 2010). A atividade antifúngica de derivados de quinolinas contra *C. albicans* (CIM : 0,1 a 50 μM), *Rhodotorulla bogoriensis* (CIM : 0,12 a 0,5

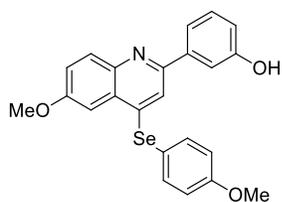
$\mu\text{g/mL}$), *Aspergillus flavus* (CIM : 0,5 a 8 $\mu\text{g/mL}$), e *C. neoformans* (CIM : 0,05 a 6,25 μM), já foi descrita e tem sido estudada para outras espécies fúngicas (SHIRI et al., 2016; VANDEKERCKHOVE et al., 2013; ZUO et al., 2016).

Para escolher o composto líder dentre dos derivados de quinolina (Figura 4), buscamos o composto que apresentava menores valores de CI_{50} e CFM sobre *C. neoformans* H99 e assim, selecionamos o composto ALDF_078. A comparação desse composto, com o seu análogo estrutural ALDF_102 demonstra que, apesar da atividade anti-*Cryptococcus* já descrita para derivados de quinolinas (ZUO et al., 2016), a atividade do composto ALDF_078 provavelmente se dá pela presença do átomo de Se encontrado entre o anel quinolina e o anel benzeno (Figura 4).

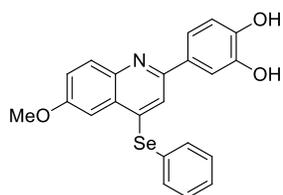
Além da presença do Se parecer ser importante para a atividade antifúngica, a cadeia lateral também parece ter importância, uma vez que a comparação entre os análogos estruturais mostrou que aqueles que apresentaram menores valores de CI_{50} e atividade fungicida foram aqueles que possuem um grupo halogênio (**F**luor, **C**loro, **B**romo ou **I**odo) em sua cadeia lateral (compostos ALDF_100, ALDF_081, ALDF_078, ALDF_102, Figura 4). Dentre esses, o composto contendo o Br (ALDF_078) foi o mais efetivo na inibição dos crescimento de *C. neoformans* H99.

Figura 4. Série de compostos derivados de quinolinas

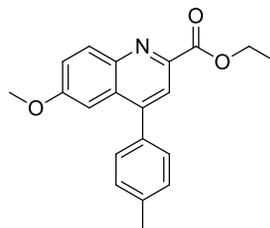




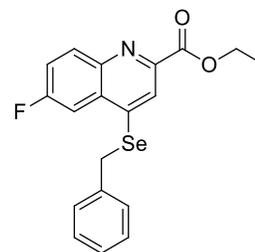
ALDF_097



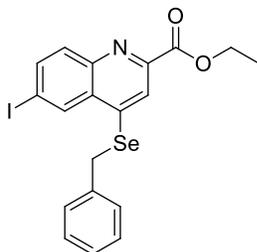
ALDF_098



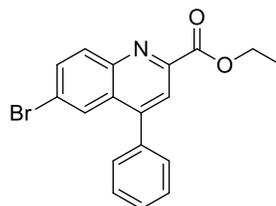
ALDF_099



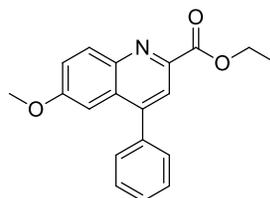
ALDF_100



ALDF_101



ALDF_102



ALDF_103

O composto escolhido ALDF_078 foi testado em linhagens de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 não adaptadas e adaptadas ao tebuconazol (TBZ) com tolerância cruzada aos triazóis de uso clínico. Bastos e colaboradores (2017) demonstraram que a adaptação das leveduras ao TBZ diminui a sensibilidade destas a outros agentes azólicos, tais como FCZ e ITZ; sendo que essa redução da sensibilidade a esses agentes foi associada ao aumento da expressão do gene *ERG11* em ambas as espécies e dos genes de bomba de efluxo ABC (*AFR1* e *MDR1*) em *C. neoformans* H99 (BASTOS et al., 2017).

Os resultados do teste de susceptibilidade de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 (linhagens NA e A) (Tabela 5) confirmam os resultados descritos por Bastos et al. (2017), que mostram que as linhagens adaptadas são mais tolerantes ao FCZ, com aumento de pelo menos duas diluições da CI_{50} em relação às colônias não adaptadas (BASTOS et al., 2017). Além da

diferença na concentração inibitória, a adaptação de H99 também alterou a CFM de FCZ: a CFM de FCZ sobre H99 NA foi 8 µg/mL, enquanto para a linhagem A, a CFM foi de 64 µg/mL.

Ambas linhagens NA e A de H99 e R265 são susceptíveis a AMB, que foi capaz de inibir 90% do crescimento com concentrações entre 0,015 e 0,06 µg/mL; a CFM de AMB para *C. neoformans* H99 NA e A é 0,06 µg/mL e para *C. gattii* R265 NA e A são 0,5 µg/mL e 0,25 µg/mL, respectivamente. O composto líder ALDF_078 inibiu as linhagens H99 NA e A a 4 µg/mL enquanto para linhagens R265 NA e A inibiu a 2 µg/mL; e a CFM para as duas espécies foi 16 µg/mL (Tabela 4). Tanto para os testes com AMB quanto para os testes com o composto líder, não houve diferença de valores de CI entre as linhagens adaptadas e não adaptadas.

Tabela 5. Suscetibilidade de leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 e *Cryptococcus gattii* R265 não-adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao composto líder ALDF_078, fluconazol (FCZ) e anfotericina B (AMB). Menores concentrações que inibem 50% e 90% do crescimento fúngico (CI₅₀ e CI₉₀) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) são expressos em µg/mL.

	AMB			FCZ			ALDF_078		
	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM
H99 NA	0,015	0,015	0,06	1	2	8	4	8	16
H99 A	0,015	0,03	0,06	4	8	64	4	8	16
R265 NA	0,03	0,06	0,5	4	16	32	2	8	16
R265 A	0,03	0,06	0,25	16	64	64	2	8	16

Dados representam resultados realizados em três momentos distintos.

Além da avaliação da susceptibilidade de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 (linhagens NA e A) ao composto ALDF_078, fizemos a avaliação da susceptibilidade de isolados clínicos de ambas as espécies, e comparamos aos antifúngicos padrão AMB e FCZ. Observamos que AMB foi capaz de inibir 90% do crescimento dos isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii* em concentrações de 0,03 a 0,25 µg/mL e 0,06 a 0,5 µg/mL, respectivamente (Tabela 6).

Corroborando com sua atividade fungicida descrita na literatura, os valores de CFM de AMB para ambas as espécies variou entre 0,03 e 1 µg/mL (DE CASTRO SPADARI et al., 2018; TEODORO et al., 2013). O azólico FCZ foi capaz de inibir 50% do crescimento fúngico dos isolados de *C. neoformans* com concentrações entre 0,25 e 4 µg/mL, enquanto inibiu os isolados de *C. gattii* com concentrações entre 1 e 4 µg/mL e apresentou atividade fungistática para maioria dos isolados de *Cryptococcus* spp. (Tabela 6). ALDF_078 apresentou atividade antifúngica sobre isolados clínicos de ambas as espécies: variando de 1 a 4 µg/mL e de 2 a 8 µg/mL sobre *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente. A atividade fungicida foi observada após o tratamento das leveduras com 4 a 16 µg/mL de ALDF_078, comprovando a capacidade fungicida desta molécula.

Tabela 6. Suscetibilidade de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* a anfotericina B (AMB), fluconazol (FCZ) e ao composto líder ALDF_078. Menores concentrações que inibem 50% e 90% do crescimento fúngico (CI₅₀ e CI₉₀) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) são expressos em µg/mL.

Espécie	Isolados	AMB			FCZ			ALDF_078		
		CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM
<i>C. neoformans</i>	H99	0,015	0,015	0,06	1	2	8	4	8	16
	541	0,03	0,03	0,03	0,25	0,25	0,25	1	2	8
	542	0,03	0,03	0,125	4	8	64	1	2	4
	543	0,125	0,25	1	0,25	0,25	2	1	4	4
	544	0,25	0,25	0,25	1	2	4	4	4	8
	545	0,125	0,25	0,5	1	2	8	4	8	8
<i>C. gattii</i>	R265	0,03	0,06	0,5	4	16	32	2	8	16
	525	0,25	0,25	0,25	4	8	128	4	4	16
	527	0,25	0,25	0,5	2	8	128	2	4	16
	551A	0,25	0,5	1	1	2	16	2	2	8
	616A	0,125	0,25	1	2	4	8	2	4	8
	652	0,25	0,25	1	2	4	64	8	8	16

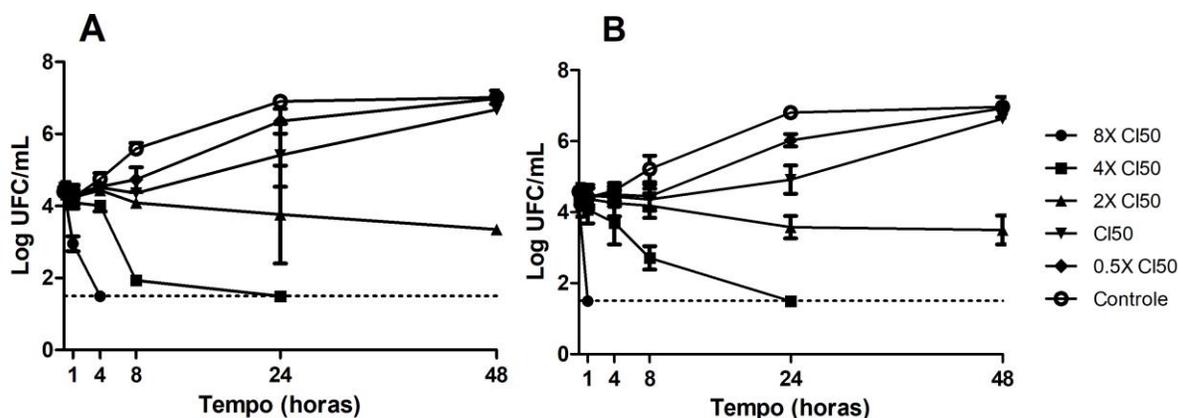
Dados representam resultados realizados em três momentos distintos.

Como o interesse em terapias antifúngicas continua a crescer, há uma necessidade de aprimorar o entendimento das propriedades fungicidas e das características farmacodinâmicas desses agentes. Os ensaios de curva de tempo de morte permitem o estudo da farmacodinâmica dos antifúngicos, examinando as diferentes concentrações de um determinado antifúngico que matam as células fúngicas. O interesse da determinação do tempo de morte está relacionado a implicações no tratamento, uma vez que, poderia aumentar a eficácia com o ajuste da dose terapêutica (KLEPSEK et al., 1998).

A análise da viabilidade fúngica de *C. neoformans* H99 NA realizada pelos dados de contagem de UFC/mL obtidos do ensaio de curva de tempo de morte (Figura 5A) mostrou que os tratamentos com ALDF_078 na concentração de 4X e 8X CI_{50} (valores de CI_{50} provenientes da Tabela 5) induziram a morte celular a níveis não detectáveis de *C. neoformans* H99 NA após 24, e 4 h de tratamento, respectivamente. A concentração de 2X CI_{50} reduziu em ~16% a viabilidade celular de H99 NA após 24 h de exposição, enquanto concentrações mais baixas do composto (CI_{50} e 0,5X CI_{50}) inibiram parcialmente o crescimento das leveduras mesmo após 48 h de tratamento (Figura 5A). As concentrações de 4X e 8X CI_{50} de ALDF_078 causaram a morte na linhagem A de *C. neoformans* H99 a níveis não detectáveis de UFC/mL após os períodos de 24 e 1 h de incubação, respectivamente (Figura 5B). A concentração de 2X CI_{50} diminuiu em ~21% a viabilidade dessas levedura após 24 h de tratamento e concentrações mais baixas do composto (0,5X CI_{50} e CI_{50}) não diminuíram a viabilidade das leveduras mesmo após 48 h de tratamento (Figura 5B). Os resultados obtidos corroboram com os dados encontrados nos testes de susceptibilidade para as linhagens NA e A (Tabela 5), que mostram que o composto apresenta atividade fungicida em concentrações acima de 16 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, 4X CI_{50} . Compostos que possuem atividade fungicida agem com efeito letal e irreversível sobre os fungos sensíveis, sendo

esse o modo de ação desejável para os agentes antimicrobianos, principalmente no tratamento de indivíduos imunocomprometidos (FERNANDES et al., 2012). A rápida atividade fungicida (1 a 24 h) observada no tratamento de *C. neoformans* H99 NA e A com as doses de 4X e 8X CI₅₀ de ALDF_078 (Figura 5A – B) demonstra o potencial uso desse composto durante a fase de indução do tratamento da meningite criptocócica, que atualmente é realizada com a combinação entre AMB (0,7–1 mg/kg/dia) e 5-FC (100 mg/kg/dia) (MAZIARZ; PERFECT, 2016; MOURAD; PERFECT, 2018b; SLOAN; PARRIS, 2014).

Figura 5. Curva do tempo de morte de leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao tebuconazol.



Leveduras de *C. neoformans* H99 NA (A) e *C. neoformans* H99 A (B) tratadas com diferentes concentrações de ALDF_078. O limite de detecção da técnica é de 1,5 log (linha tracejada). A concentração inibitória mínima de 50% (CI₅₀) utilizada para as duas linhagens é de 4 µg/mL. Experimento realizado em duplicata e em dois momentos distintos.

O uso de combinações de agentes antimicrobianos é uma prática comum durante a terapia clínica. Os benefícios potenciais da quimioterapia antimicrobiana combinada em relação à monoterapia incluem a diminuição do desenvolvimento de resistência, atividade antimicrobiana

sinérgica e um ampliado espectro de ação (MOUTON, 2007; PILLAI; MOELLERING; ELIOPOULOS, 2005). Os valores de CI_{50} encontrados para o composto líder e FCZ sozinhos, e em combinação, mostraram que a interação entre ALDF_078 e FCZ é indiferente, ou seja, não há uma diferença entre os valores de CI_{50} de ALDF_078 e FCZ sozinhos e quando estão em combinação (Tabela 7). O método *Checkerboard*, embora comumente usado para determinar interações de antimicrobianos *in vitro*, possui várias limitações, como confiança em um único ponto no tempo, suposição de uma dose-resposta linear para todos os antimicrobianos, leitura do tipo tudo ou nada e dependência de diluições seriadas (HSIEH et al., 1993; ROY-LEON et al., 2005).

A formação de biofilme constitui um problema considerável na prática clínica pois essa complexa comunidade de microrganismos protegidos por uma matriz exopolimérica é caracterizada por alterações celulares fenotípicas que são traduzidas em alto nível de resistência aos mecanismos imunes do hospedeiro e à terapia antifúngica (MARTINEZ; CASADEVALL, 2015). Assim, um composto que consiga interferir na formação do biofilme ou mesmo romper o biofilme maduro e/ou inibir as células em dispersão passa ser um candidato interessante para o desenvolvimento de antifúngicos. Assim, neste trabalho avaliamos se o composto líder ALDF_078 apresenta potencial antibiofilme. ALDF_078 não causou redução da atividade metabólica das células sésseis de biofilmes maduros de *C. neoformans* H99, linhagens NA e A, nem na maior concentração utilizada (128 $\mu\text{g/mL}$). No entanto, a inibição de 90% da atividade metabólica de leveduras de *C. neoformans* H99 NA e A foram obtidas com 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de AMB, respectivamente (Tabela 8). Esses resultados correlacionam-se com os apresentados em outros trabalhos que demonstram apesar das leveduras de biofilmes maduros

serem susceptíveis a AMB, o fenótipo do biofilme confere menor susceptibilidade à terapia antifúngica convencional (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006).

As células de dispersão dos biofilmes maduros são células que se desprendem do biofilme maduro e são responsáveis por colonizar outros sítios no hospedeiro, causando a expansão da infecção e podendo dar início às infecções disseminadas. Essas células são mais virulentas do que células planctônicas, apresentam maior capacidade de aderência e geralmente possuem maior resistência a agentes antifúngicos (SARDI et al., 2014; UPPULURI et al., 2010). Sendo assim, a inibição das células em dispersão é de extrema importância durante o tratamento de infecções relacionadas ao biofilme pois pode controlar a disseminação da infecção (VILA; ROZENTAL, 2016).

As células em dispersão dos biofilmes maduros de *C. neoformans* H99 NA e A foram tão suscetíveis a AMB quanto as células planctônicas (Tabelas 5 e 8). Vila e colaboradores (2016) relataram dados semelhantes, onde as células em dispersão de *Candida* spp. foram suscetíveis a AMB em concentrações similares às obtidas para células planctônicas (VILA et al., 2016). Assim como foi visto para AMB, a CID_{50} do composto líder sobre *C. neoformans* H99 NA foi semelhante ao CI_{50} (8 e 4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente); no entanto, a concentração de ALDF_078 que inibiu 50% das células em dispersão da linhagem adaptada foi ligeiramente menor do que a concentração necessária para a mesma inibição das células planctônicas (1 e 4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). A diferente expressão de fatores de virulência das células em dispersão de biofilmes quando comparadas com células planctônicas tornam os resultados obtidos aqui ainda mais importante, pois estes mostram que o composto ALDF_078 pode ser capaz de prevenir a disseminação de células em dispersão e assim conter a infecção.

Tabela 7. Valores da concentração inibitória fracionaria (CIF) para leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 e *Cryptococcus gattii* R265 não-adaptadas (NA) e adaptadas (A) obtidos da interação entre fluconazol (FCZ) e o composto ALDF_078.

Cepas	Faixa de CIM (mediana) ($\mu\text{g/mL}$)				Interação	
	Individual		Em combinação		CIF	Tipo
	ALDF_078	FCZ	ALDF_078	FCZ		
H99 NA	4	1	0,5 - 2	0,12 - 0,5	1,25 - 2	Indiferente
H99 A	4	4	0,12 - 4	0,25 - 4	0,62 - 2,12	Indiferente
R265 NA	2	4	0,12 - 2	0,12 - 4	1,03 - 2	Indiferente
R265 A	2	16	0,12 - 1	4 - 16	1,12 - 2	Indiferente

Dados representam resultados realizados em três momentos distintos.

Tabela 8. Atividade antifúngica de Anfotericina B (AMB) e do composto líder ALDF_078 sobre células sésseis e células em dispersão de biofilmes maduros de linhagens de *Cryptococcus neoformans* H99 não-adaptadas (NA) e adaptadas (A). Concentrações mínimas dos compostos capazes de inibir em 50% (CIB_{50}) e 90% (CIB_{90}) a atividade metabólica das células sésseis e as concentrações inibitórias 50% (CID_{50}) e 90% (CID_{90}) do crescimento das células em dispersão são expressas em $\mu\text{g/mL}$.

	AMB		ALDF_078	
	CIB_{50}	CIB_{90}	CIB_{50}	CIB_{90}
<i>Células sésseis</i>				
<i>C. neoformans</i> H99 NA	0,06	0,25	>128	>128
<i>C. neoformans</i> H99 A	0,25	0,5	>128	>128
<i>Células em dispersão</i>	CID_{50}	CID_{90}	CID_{50}	CID_{90}
<i>C. neoformans</i> H99 NA	0,015	0,015	8	>128
<i>C. neoformans</i> H99 A	0,015	0,015	1	>128

Dados representam resultados realizados em três momentos distintos.

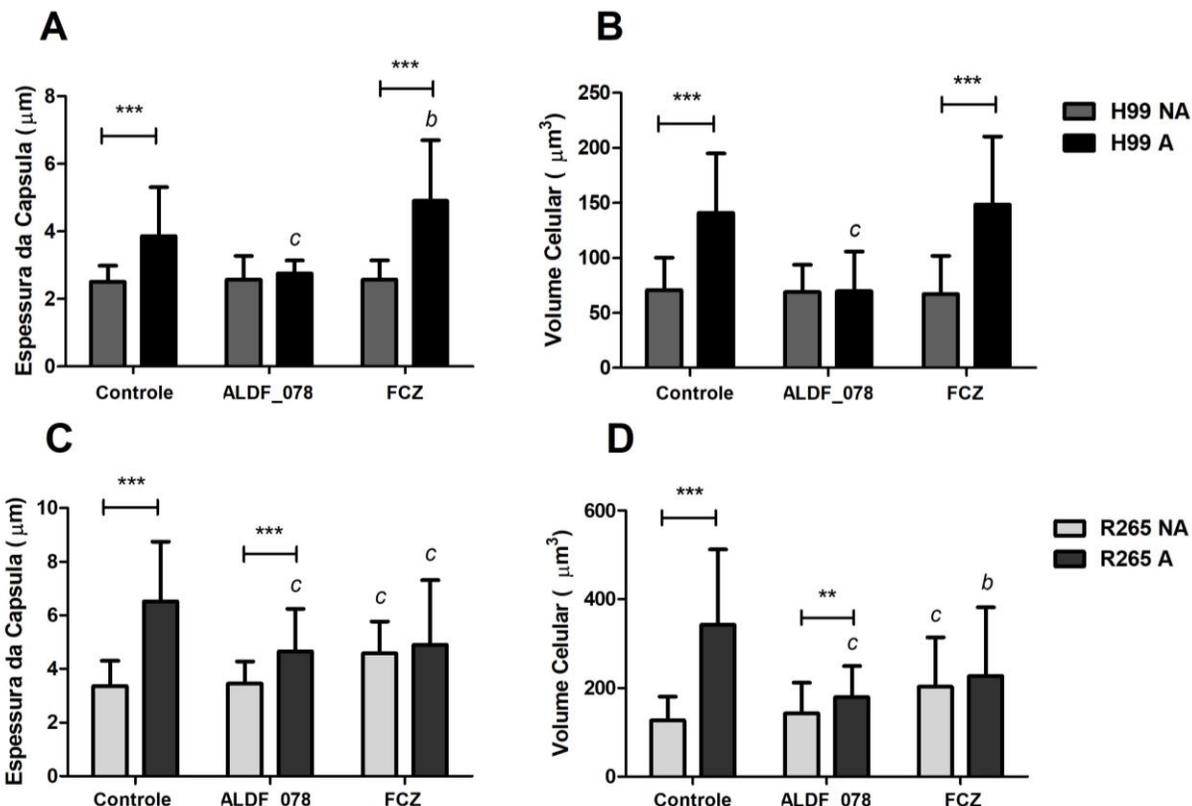
Dentre os fatores de virulência de *Cryptococcus* spp. a cápsula mucopolissacarídica é considerada o de maior importância, uma vez que além de proteger o fungo da dessecação ambiental e/ou predadores naturais, tais como nematoides ou amebas, é importante durante a infecção (ZARAGOZA et al., 2009). A cápsula confere à levedura resistência a fagocitose, inibição da proliferação de linfócitos T, inibição na produção de citocinas e opsonização, além de ser importante na proteção da célula contra ROS dentro do lisossomo e auxiliar na proliferação celular dentro do macrófago (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012; ZARAGOZA et al., 2009). A espessura da cápsula depende de fatores associados ao microambiente da célula, sendo que cápsulas com maior espessura contribuem mais para a sobrevivência de *Cryptococcus* spp. no hospedeiro; e por mais que não seja claro como indução da cápsula ocorre exatamente, sabe-se que a ativação da via cAMP/PKA, dependente da ativação de enzimas como a adenilato ciclase por íons bivalentes como o Mg^{2+} , é importante para aumentar a biossíntese capsular (KUMAR et al., 2011). Sendo um fator de virulência tão importante, presume-se que a diminuição da espessura da cápsula seria responsável por redução da virulência das leveduras desse gênero. Santos et al., (2014) observaram que a perda do diâmetro ou pouca produção de cápsula ocorrem em isolados de *C. gattii* resistentes ao FCZ, isolados esses que apresentaram baixa virulência em experimentos *in vitro* e *in vivo* (SANTOS et al., 2014). Além disso, outros antifúngicos como AMB e ITZ (GUERRA et al., 2012a); e produtos naturais (ISHIDA et al., 2009), também levam a diminuição da espessura da cápsula.

A análise morfométrica da espessura capsular (μm) e volume celular (μm^3) de células das culturas de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 (linhagens NA e A) está demonstrada na Figura 6. Quando comparamos as linhagens NA e A das duas espécies, podemos notar que em geral, as adaptadas apresentam maior espessura capsular e volume celular para todos os tratamentos,

corroborando com o que foi visto por Bastos e colaboradores (2017) (BASTOS et al., 2017). O tratamento de H99 NA com ALDF_078 ou FCZ não causou diminuição significativa na espessura da cápsula e no volume celular quando comparados com o controle não tratado; enquanto o tratamento de H99 A com ALDF_078 causou diminuição significativa na espessura da cápsula mucopolissacarídica e do volume celular das leveduras de *C. neoformans* H99 A ($p < 0,001$), o que pode indicar que o tratamento com esse composto possa reduzir a virulência das leveduras (SANTOS et al., 2014); a diminuição significativa do volume celular de leveduras da linhagem H99A ocorreu após o tratamento com ALDF_078 ($p < 0,001$).

Assim como observado para H99 NA, o tratamento de *C. gattii* R265 NA com o composto líder não causou redução significativa na espessura da cápsula e volume celular, enquanto que o tratamento com FCZ causou aumento de ambos os parâmetros. O tamanho da cápsula e o volume das células da linhagem adaptada de *C. gattii* R265 diminuíram com o tratamento com ALDF_078 ou FCZ. Os resultados da análise morfométrica indicam que a exposição de leveduras de *Cryptococcus* spp. ao ALDF_078 reduz a espessura da cápsula de ambas as espécies, podendo impactar na virulência para esse gênero fúngico (GUERRA et al., 2012b; SANTOS et al., 2014).

Figura 6. Espessura da cápsula (μm) e volume celular (μm^3) de leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 e *Cryptococcus gattii* R265 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao tebuconazol.



Leveduras de *C. neoformans* H99 NA e A (A e B) e *C. gattii* NA e A (C e D) foram tratadas com concentrações sub-inibitórias ($CI_{50}/2$) do composto líder ALDF_078 ou do fluconazol (FCZ). Espessura da cápsula (μm) (A e C) e volume celular (μm^3) (B e D) após o tratamento foram comparados com grupo não tratado (Controle) (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$). Além disso, a comparação entre as linhagens não adaptadas (NA) e adaptadas (A) também foi feita (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (teste t de Student). $n = 50$ células.

Tanto as leveduras de *C. neoformans* H99 NA não tratadas, quanto aquelas tratadas com o CI_{50} de ALDF_078 apresentaram ultraestrutura celular preservada com forma arredondada, parede celular eletrondensa e compactada, núcleo, nucléolo e mitocôndrias (Figura 7). Por outro lado, é possível que a cápsula mucopolissacarídica tenha sido extraída durante o processamento do material para a MET (Figura 7). O fato de não termos observado diferenças entre as leveduras

não tratadas e tratadas da linhagem A, corrobora com os resultados de comparação de volume celular e espessura capsular apresentados na Figura 6 e poderia ser explicado pela baixa dosagem utilizada (CI_{50}).

Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 não adaptadas (NA) ao tebuconazol.



Leveduras de *C. neoformans* H99 (1×10^4 UFC/mL) não tratadas (A) ou tratadas com a CI_{50} de ALDF_078 (B) por 72 h a 35°C . Aumento de 6500X. m: mitocôndrias, n: nucléolo, N: núcleo, pc: parede celular.

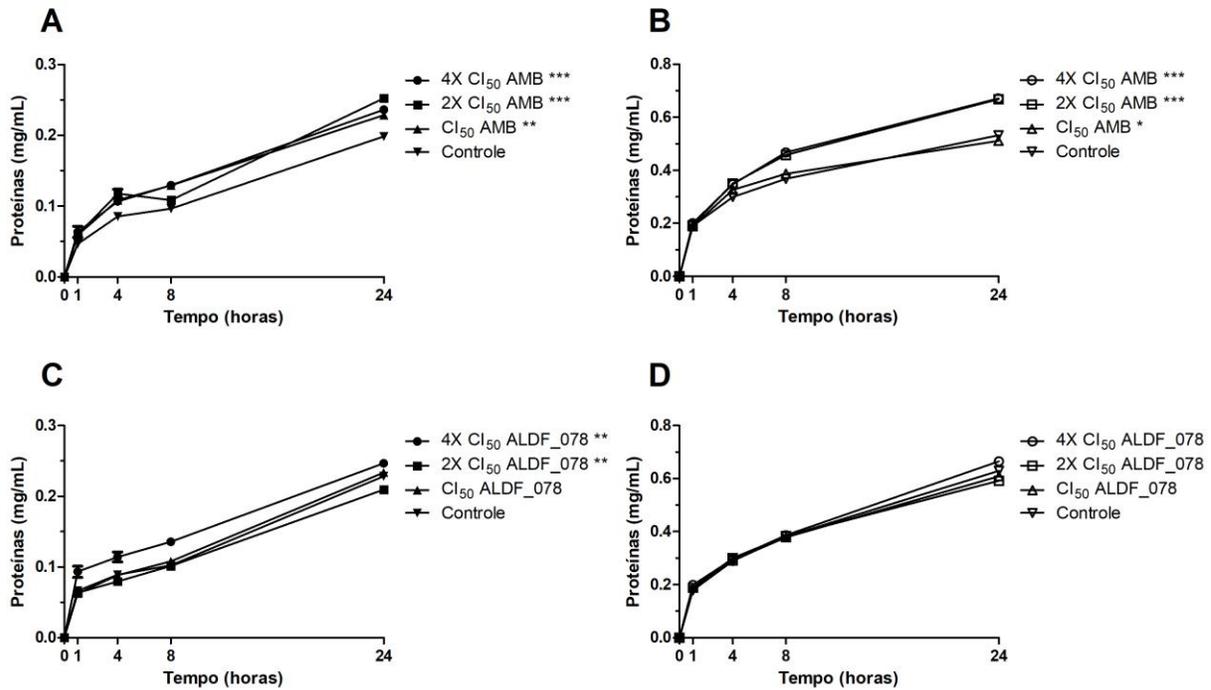
As curvas de permeabilidade de membrana às proteínas citoplasmáticas (Figura 8) e ao DNA (Figura 9) mostraram que ALDF_078 aumenta a permeabilidade da membrana citoplasmática das células fúngicas NA de *C. neoformans* H99 (Figuras 8C e 9C); porém não interferiu na permeabilidade de membrana nas células A de *C. neoformans* H99 (Figuras 8D e 9D). É possível sugerir que a molécula tem ação direta ou indiretamente sobre a membrana plasmática dessas leveduras, uma vez que no período de incubação de 24 h, nas concentração de 4X e 2X CI_{50} ocorre extravasamento de proteínas para o sobrenadante (Figura 8C); e na concentração de 4X CI_{50} também ocorre extravasamento de DNA (Figura 9C). Comportamento

similar ocorre quando as células de ambas as linhagens são tratadas com 4X e 2X CI_{50} de AMB (Figuras 8A - B e 9A - B).

Esse comportamento foi confirmado por citometria de fluxo usando o fluorocromo PI (Figura 10). Este marcador é um corante fluorescente utilizado para coloração de ácido nucleico e é impermeável à membrana plasmática; o PI entra nas células apenas quando há perda da integridade da membrana plasmática e então se liga ao DNA (SANGALLI-LEITE et al., 2011). Assim como visto por Spadari e colaboradores (2018) (DE CASTRO SPADARI et al., 2018) e corroborando com o mecanismo de ação da AMB, o tratamento de *C. neoformans* H99 NA com 8X e 4X CI_{50} desse fármaco causou um aumento significativo na porcentagem de células PI-positivas ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 10A). Resultado similar foi observado no tratamento da linhagem NA com 8X e 4X CI_{50} do composto líder ALDF_078 ($p < 0,001$) (Figura 10A). O tratamento da linhagem A com AMB não resultou em diferença significativa da permeabilidade, enquanto o tratamento com 8X e 4X CI_{50} de ALDF_078 levou a aumento significativo da porcentagem de células PI-positivas ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 10B).

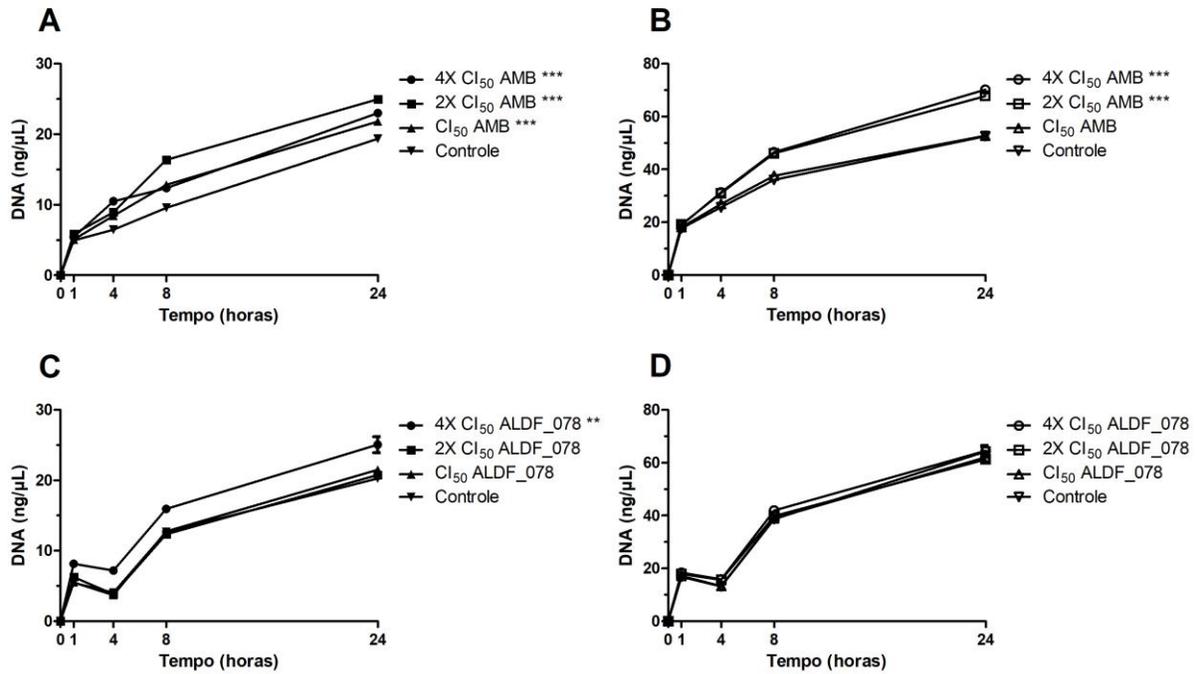
Os dados de permeabilidade da membrana citoplasmática (Figuras 8, 9 e 10) corroboram com os resultados de viabilidade das leveduras de *C. neoformans* H99 (linhagens NA e A) após o tratamento com ALDF_078 (Figura 5). Concentrações maiores de ALDF_078, 8X e 4X CI_{50} , causam morte celular a partir de 1h e 4h de incubação e foi visto que essas concentrações causam perda da integridade da membrana plasmática. Essa correlação entre os resultados sugere que um possível mecanismo de morte do composto líder ALDF_078 seria a alteração na permeabilidade de membrana.

Figura 8. Curva de permeabilidade da membrana quantificada por liberação de proteínas por leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao tebuconazol.



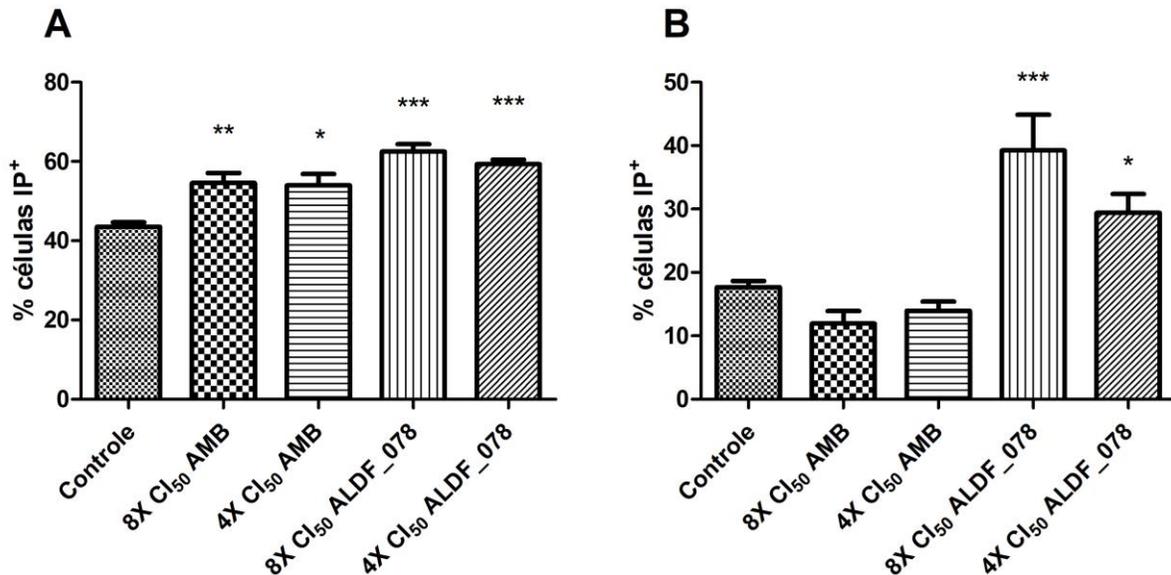
Leveduras de *C. neoformans* H99 NA (A e C) e *C. neoformans* H99 A (B e D) foram tratadas ou não com diferentes concentrações (4X CI₅₀, 2X CI₅₀ e CI₅₀) de AMB (A e B) ou ALDF_078 em PBS a 35°C por 24 h. Proteínas livres no sobrenadante foram quantificadas, nos tempos 0, 1, 4, 8 e 24 h após incubação, usando comprimento de onda de 260 nm. Asteriscos representam valor de p significativo em comparação com o grupo controle (* p<0,05; ** p <0,01; *** p<0,001) pela análise de variância bidirecional (ANOVA).

Figura 9. Curva de permeabilidade da membrana quantificada por liberação de DNA por leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao tebuconazol.



Leveduras de *C. neoformans* H99 NA (A e C) e *C. neoformans* H99 A (B e D) foram tratadas ou não com diferentes concentrações (4X CI₅₀, 2X CI₅₀ e CI₅₀) de AMB (A e B) ou ALDF_078 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 280 nm. Asteriscos representam valor de p significativo em comparação com o grupo controle (* p<0,05; ** p <0,01; *** p<0,001) pela análise de variância bidirecional (ANOVA).

Figura 10. Efeitos do composto líder ALDF_078 sobre a permeabilidade de membrana em leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) ao tebuconazol.



As leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 NA e A (A e B, respectivamente) foram tratadas ou não com concentrações fungicidas (4X CI₅₀ e 8X CI₅₀) de anfoterina B (AMB) ou de ALDF_078, durante 24 h a 35°C e depois processadas para análise de citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio (PI). Os dados representam média ± SEM de três experimentos independentes. Asteriscos representam valor de p significativo em comparação com o grupo controle (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001) pela análise de variância unidirecional (ANOVA) com teste Dunnett como pós-teste.

Existem diversos modelos de roedores para reproduzir diferentes formas clínicas de infecções fúngicas e modelos murino ainda são considerados padrão ouro para estudar patogênese e analisar a eficácia do tratamento de um antifúngico (AMORIM-VAZ et al., 2015). No entanto, considerações econômicas, logísticas, e éticas limitam o seu uso em experimentos de infecção. Sendo assim, modelos animais não convencionais de infecção podem ser usados para investigar a virulência de um patógeno ou a toxicidade e eficácia terapêutica de um composto

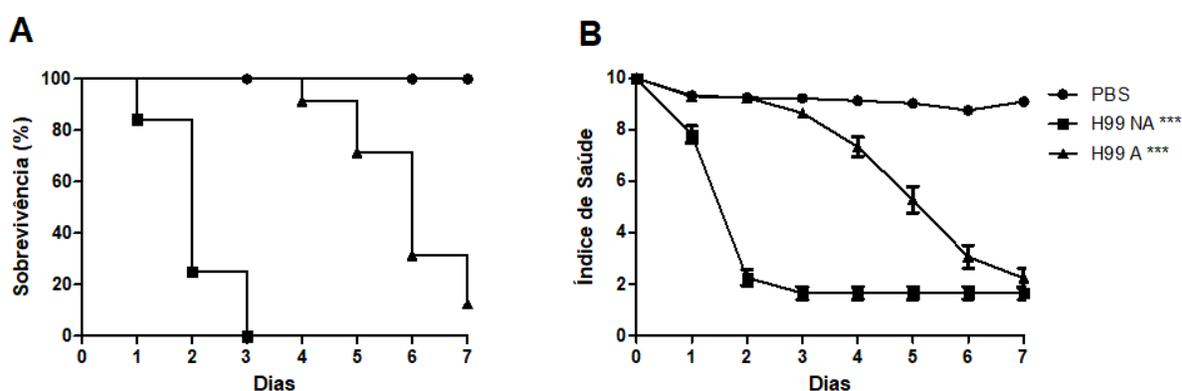
em potencial, bem como o estudo das interações hospedeiro-patógeno (AMORIM-VAZ et al., 2015; TSAI; LOH; PROFT, 2016).

Galleria mellonella é um invertebrado e pertence a ordem Lepidoptera, família Pyralidae e quando comparado ao modelo experimental tradicional de mamíferos, como aos de roedores, *G. mellonella* é de fácil manuseio, baixo custo e não necessita de equipamentos especiais no laboratório para a manutenção (TSAI; LOH; PROFT, 2016). É um modelo considerado ético e econômico que pode ser utilizado como ferramenta em triagem de estudos de antifúngicos, tendo o intuito de reduzir custos, minimizar a utilização de modelo de mamíferos e, sobretudo, transferir os resultados obtidos neste modelo de invertebrado para o modelo mamíferos, resultados tais como virulência, patogenicidade, toxicidade do fármaco e dosagem efetiva (AMORIM-VAZ et al., 2015). Esse modelo tem sido empregado com sucesso no estudo da virulência de fungos patogênicos, como *C. neoformans* e *C. gattii* (FIRACATIVE; DUAN; MEYER, 2014; MYLONAKIS et al., 2005).

A avaliação da virulência de *C. neoformans* H99 NA e A em larvas de *G. mellonella* mostrou que a linhagem não-adaptada à TBZ é mais virulenta do que a linhagem adaptada, uma vez que a primeira causa a morte de 100% das larvas infectadas no terceiro dia após a inoculação (5×10^8 UFC/larva), enquanto a linhagem adaptada causou a morte de 88% das larvas somente no sétimo dia após a infecção. A comparação entre ambas as linhagens em relação ao controle não infectado (grupo PBS) apresentou diferença estatística ($p < 0,001$), assim como a comparação entre as linhagens NA e A ($p < 0,001$) (Figura 11). Concomitantemente com a avaliação da curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* foi realizada a avaliação da curva de morbidade de *C. neoformans* H99 NA e A em que o índice de saúde de cada grupo foi determinado diariamente conforme as características listadas na Tabela 2. Como resultado pode-se notar que os gráficos da

curva de sobrevivência e morbidade corroboram entre si (Figura 11A - B). A diferença na virulência entre linhagem não adaptada e a linhagem adaptada corrobora com estudos que relatam que cepas com resistência secundária ao fluconazol são menos virulentas que cepas suscetíveis (BASTOS et al., 2017; ROSSI et al., 2016; SANTOS et al., 2014). Além disso, também é possível correlacionar a diferença na virulência entre *C. neoformans* H99 NA e A com o resultado da análise morfométrica do volume celular (μm^3), uma vez que, assim como observamos, estudos demonstram que células de menor diâmetro são menos virulentas (BASTOS et al., 2017; FERREIRA et al., 2015; OKAGAKI et al., 2010).

Figura 11. Virulência das leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 não adaptadas (NA) e adaptadas (A) testadas em modelo invertebrado de *Galleria mellonella*.

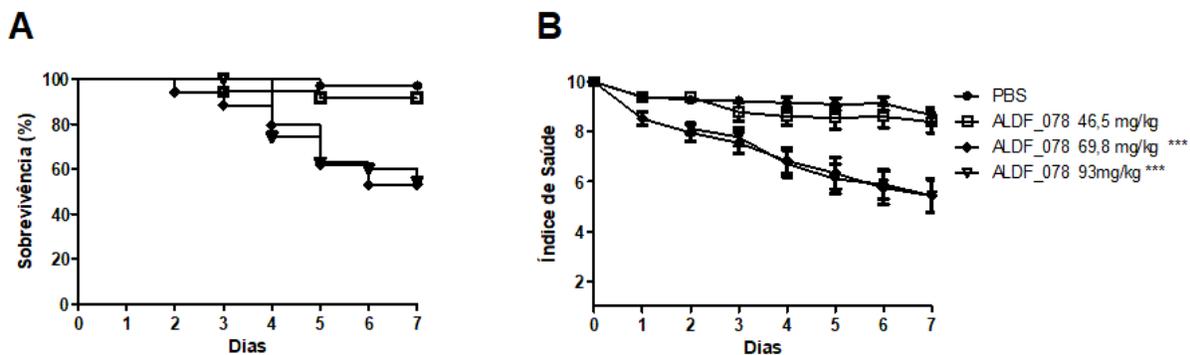


Curva de sobrevivência (A) e de Morbidade (B) de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. neoformans* H99 NA e A. As larvas ($n = 18$) foram infectadas (5×10^8 UFC/mL) e acompanhadas por 7 dias. Asteriscos representam valor de p significativo em comparação com o grupo PBS (***) $p < 0,001$ pelos testes Log-rank (Mantel-Cox) (A) e ANOVA bidirecional (B).

A toxicidade do composto líder ALDF_078 sobre as larvas foi avaliada pelo tratamento das larvas com as doses de 46,5 mg/kg (512 $\mu\text{g/mL}$), 69,8 mg/kg (768 $\mu\text{g/mL}$) e 93 mg/kg (1024

µg/mL). Ao final do sétimo dia de tratamento foi possível observar que a porcentagem de larvas sobreviventes ao tratamento com a menor dose (91,6%) foi praticamente a mesma das larvas do grupo controle sem tratamento – PBS (97,2%), não havendo diferença estatística entre os dois grupos. Nos tratamentos com as doses de 68,9 mg/kg e 93 mg/kg apenas cerca de 54% das larvas permaneceram vivas após 7 dias de observação, sendo estatisticamente diferentes do grupo controle sem tratamento (grupo PBS) ($p < 0,001$) (Figura 12A). Apenas a menor dose de 46,5 mg/kg não apresentou toxicidade sobre o modelo de invertebrado, assim sendo, decidimos utilizar doses menores (20mg/kg e 40mg/kg) para a avaliação da eficácia do tratamento com ALDF_078 no modelo de infecção por *C. neoformans* H99 NA. Um dos fatores que poderia explicar a toxicidade observada para as maiores doses (69,8 mg/kg e 93 mg/kg) de ALDF_078 seria a formação de precipitado que ocorre por um problema de solubilidade do composto em meio aquoso.

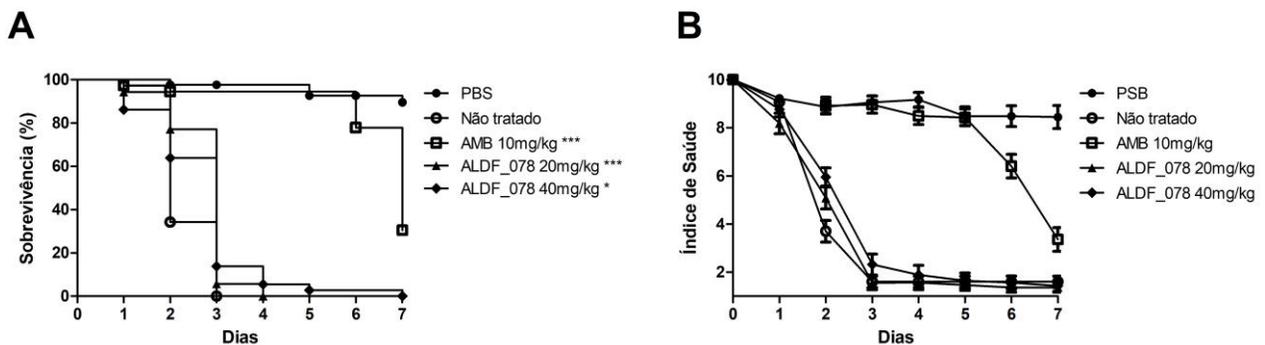
Figura 12. Toxicidade do composto líder ALDF_078 sobre as larvas de *Galleria mellonella*.



Curva de sobrevivência (A) e de Morbidade (B) de larvas de *G. mellonella* ($n = 18$) tratadas com diferentes doses do composto ALDF_078 (46,5 mg/kg, 69,8 mg/kg e 93 mg/kg) e incubadas a 37°C por 7 dias. Asteriscos representam valor de p significativo em comparação com o grupo não tratado (PBS) (***) $p < 0,001$ pelos testes Log-rank (Mantel-Cox) para dados de sobrevivência e ANOVA bidirecional para dados de morbidade.

A avaliação da eficácia do tratamento das larvas infectadas por *C. neoformans* H99 NA usando o antifúngico padrão AMB (10 mg/kg) mostrou que esse agente poliênico protegeu somente 30,6% das larvas após 7 dias da infecção ($p < 0,001$ quando comparado com o grupo não tratado). Quando as larvas foram tratadas com 20 mg/kg ou 40mg/kg de ALDF_078 houve morte de 100% das larvas infectadas após 4 e 7 dias, respectivamente (Figura 13A), porém é possível notar que esses tratamentos prolongaram a vida das larvas, quando os comparamos com o controle não tratado ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). Para todos os grupos, os resultados da curva de morbidade corroboram com os resultados da curva de sobrevivência (Figura 13A - B). É preciso relatar que o problema de solubilidade do composto ALDF_078 em DMSO e depois em PBS (de modo que a concentração de DMSO fosse menor que 5%) pode dificultar a ação antifúngica e explicar a baixa eficácia do tratamento.

Figura 13. Eficácia do tratamento de larvas infectadas com leveduras de *Cryptococcus neoformans* H99 não adaptadas (NA) com Anfotericina B (AMB) e o composto ALDF_078.



Curva de sobrevivência (A) e de Morbidade (B) de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. neoformans* H99 NA e tratadas com AMB e ALDF_078. As larvas ($n = 18$) foram infectadas com *C. neoformans* H99 NA (5×10^8 UFC/mL), tratadas com AMB (10 mg/kg) ou ALDF_078 (20 mg/kg e 40mg/kg) após 30 minutos da infecção e incubadas a 37°C por 7 dias. Asteriscos representam valor de P significativo em comparação com o grupo Não tratado (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) pelos testes Log-rank (Mantel-Cox) (A) e ANOVA bidirecional (B).

Em resumo, a triagem dos 141 compostos orgânicos de calcogênio sobre *A. fumigatus*, *F. solani*, *C. albicans* e *C. neoformans* mostrou que alguns desses compostos apresentam considerável atividade antifúngica sobre as diferentes espécies testadas. Dentre os compostos testados, destacou-se o composto ALDF_078, pertencente a uma série de compostos análogos que possuem o núcleo de quinolina. A avaliação da atividade antifúngica *in vitro* mostrou que ALDF_078 é capaz de inibir o crescimento de células planctônicas de isolados clínicos e cepas padrão de *C. neoformans* e *C. gattii*, incluindo linhagens tolerantes aos triazóis, e apresenta atividade sobre as células em dispersão de biofilme, comparável àquela observada sobre células planctônicas (1 – 8 µg/mL). ALDF_078, em concentrações sub-inibitórias, causa alterações morfológicas significativas nas leveduras, como diminuição da espessura capsular e volume celular. Além disso, este composto apresenta efeito fungicida, em concentrações > ou iguais a 4 µg/mL, sendo essa atividade fungicida relacionada a capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática de *C. neoformans* e *C. gattii*. ALDF_078 não apresentou efeito hemolítico nem mesmo na maior concentração testada (128 µg/ml) e não demonstrou toxicidade em doses inferiores a 46,5 mg/kg no modelo larvário de *G. mellonella*. A avaliação da atividade antifúngica *in vivo* em *G. mellonella* mostrou que apesar prolongar a vida das larvas infectadas com *C. neoformans* H99 NA, o composto não é efetivo no tratamento da infecção, sendo essa baixa efetividade possivelmente explicada por um problema de solubilidade do composto em meio aquoso.

5. CONCLUSÕES

Compostos orgânicos de calcogênio possuem atividade antifúngica sobre diferentes espécies de fungos. A avaliação da atividade do composto ALDF_078 comprovou a sua capacidade antifúngica, baixa toxicidade e efeitos morfofisiológicos sobre leveduras de *Cryptococcus* spp. Esses resultados destacam o potencial desse composto sintético como agente antifúngico no tratamento da criptococose; porém, mais experimentos, que incluem mudanças na estrutura do composto para melhorar a sua solubilidade, bem como testes adicionais de atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para comprovar a sua eficácia anti-criptocócica.

6. REFERÊNCIAS

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. 0, 2017.

ALLEN, D. et al. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 6, p. 787–798, 3 jun. 2015.

AMORIM-VAZ, S. et al. Examining the virulence of *Candida albicans* transcription factor mutants using *Galleria mellonella* and mouse infection models. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 367, 5 maio 2015.

AZAD, G. K.; TOMAR, R. S. Ebselen, a promising antioxidant drug: Mechanisms of action and targets of biological pathways. **Molecular Biology Reports**. Kluwer Academic Publishers, , 2014.

BAEK, J. M. et al. Ebselen Is a Potential Anti-Osteoporosis Agent by Suppressing Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand-Induced Osteoclast Differentiation *In vitro* and Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Bone Destruction *In vivo*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 5, p. 478–488, 2016.

BASSO, L. R. et al. Identification and properties of plasma membrane azole efflux pumps from the pathogenic fungi *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 70, n. 5, p. 1396–407, maio 2015.

BASTOS, R. W. et al. Environmental Triazole Induces Cross-Resistance to Clinical Drugs and Affects Morphophysiology and Virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. e01179-17, 6 nov. 2017.

BIELSKA, E.; MAY, R. C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, p. fov106, 1 fev. 2016.

BILLACK, B. et al. Evaluation of the antifungal and plasma membrane H⁺-ATPase inhibitory action of ebselen and two ebselen analogs in *S. cerevisiae* cultures. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 25, n. 3, p. 312–7, jun. 2010.

BOLARD, J.; JOLY, V.; YENI, P. Mechanism of Action of Amphotericin B at the Cellular Level. Its Modulation by Delivery Systems. **Journal of Liposome Research**, v. 3, n. 3, p. 409–427, 28 jan. 1993.

BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 4, 18 out. 2017.

BONGOMIN, F. et al. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, v. 61, n. 5, p. 290–297, 1 maio 2018.

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, fev. 2018.

BRATTON, E. W. et al. Comparison and Temporal Trends of Three Groups with Cryptococcosis: HIV-Infected, Solid Organ Transplant, and HIV-Negative/Non-Transplant. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43582, 24 ago. 2012.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science translational medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 19 dez. 2012.

CAMPOS, F. L.; BARONI, F. D. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 2, 4 ago. 2010.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 1 jun. 2017.

CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 2, p. 291–321, Table of Contents, abr. 2009.

CASADEVALL, A. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 5, p. 1389–92, maio 2010.

CASADEVALL, A. et al. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, p. 1–10, ago. 2018.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, 1 ago. 2000.

CHAN, G. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of ebselen: Role of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 21, n. 5, p. 252–

264, out. 2007.

CHANG, M. et al. Roles of Three *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Efflux Pump-Coding Genes in Response to Drug Treatment. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. e01751-17, 1 abr. 2018.

CHANG, Y. C. et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 4985–95, set. 2004.

CHARLIER, C. et al. Evidence of a Role for Monocytes in Dissemination and Brain Invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 1, p. 120–127, 1 jan. 2009.

CHEN, L. C.; BLANK, E. S.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 3, n. 5, p. 570–4, set. 1996.

CHEN, M. et al. Synthesis and anticancer activity of novel quinoline-docetaxel analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 13, p. 2867–2870, 1 jul. 2014.

CHEN, Y. L. et al. Synthesis, cytotoxicity, and anti-inflammatory evaluation of 2-(furan-2-yl)-4-(phenoxy)quinoline derivatives. Part 4. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 13, p. 4373–4378, 1 jul. 2006.

CLSI. M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition. 2008a.

CLSI. M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition. 2008b.

COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. **Cellular microbiology**, v. 18, n. 6, p. 792–9, 2016.

COX, G. M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 166–175, 2001.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Flucytosine primary resistance in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 276–9,

abr. 2001.

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. 2504–2511, 2014.

DE CASTRO SPADARI, C. et al. Miltefosine has a postantifungal effect and induces apoptosis in cryptococcus yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 8, 1 ago. 2018.

DE FÁTIMA LISBOA FERNANDES, O. et al. Effects of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, on Melanized and Non-melanized *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 174, n. 5–6, p. 421–428, 30 dez. 2012.

DEL SORBO, G.; SCHOONBEEK, H.; DE WAARD, M. A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 30, n. 1, p. 1–15, jun. 2000.

ESHER, S. K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J. A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 113, n. 7, p. 1–15, 2018.

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.

FERNANDES, S. et al. Fungicidal Activity of Microbicides. In: **Russell, Hugo & Ayliffe's**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012. p. 142–154.

FERREIRA, G. F. et al. Heteroresistance to itraconazole alters the morphology and increases the virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4600–4609, 1 ago. 2015.

FIRACATIVE, C. et al. The status of cryptococcosis in Latin America. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. e170554, 2018.

FIRACATIVE, C.; DUAN, S.; MEYER, W. *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e105076,

2014.

FRIES, B. C. et al. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. **Infection and immunity**, v. 67, n. 11, p. 6076–83, nov. 1999.

FUENTEFRIA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2–13, jan. 2018.

GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 308–329, 1990.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 122–43, table of contents, jan. 2000.

GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and fungi. **Current opinion in infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 91–6, abr. 2003.

GONZÁLEZ, G. M. et al. Molecular typing of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex from Northeast Mexico. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 1, p. 51–56, 25 jan. 2016.

GOVENDER, N. P. et al. Trends in Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolates Obtained through Population-Based Surveillance in South Africa in 2002-2003 and 2007-2008. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 2606–2611, jun. 2011.

GRIFFIN, S. et al. Resuspendable Powders of Lyophilized Chalcogen Particles with Activity against Microorganisms. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 2, 27 jan. 2018.

GUERRA, C. R. et al. Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 582–90, ago. 2012a.

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, 1 maio 2015.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. In: **The Fungal Kingdom**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2017. v. 5p. 79–95.

HSIEH, M. H. et al. Synergy assessed by checkerboard a critical analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 16, n. 4, p. 343–349, 1993.

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, n. 1, p. 29, 2009.

ISHIDA, K. et al. Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 34–41, 1 jan. 2015.

KALECHMAN, Y. et al. Inhibition of interleukin-10 by the immunomodulator AS101 reduces mesangial cell proliferation in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis: association with dephosphorylation of STAT3. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 23, p. 24724–32, 4 jun. 2004.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211–24, 2009.

KARVEKAR, M.; DAS, A.; NARAJI, C. Biological importance of organoselenium compounds. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 3, p. 344, 2007.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 1 out. 2012.

KAUR, H.; PRAKASH, A.; MEDHI, B. Drug Therapy in Stroke: From Preclinical to Clinical Studies. **Pharmacology**, v. 92, n. 5–6, p. 324–334, 2013.

KHOZA, S.; MOYO, I.; NCUBE, D. Comparative Hepatotoxicity of Fluconazole, Ketoconazole, Itraconazole, Terbinafine, and Griseofulvin in Rats. **Journal of Toxicology**, v. 2017, p. 1–9, 5 fev. 2017.

KIL, J. et al. Safety and efficacy of ebselen for the prevention of noise-induced hearing loss: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. **The Lancet**, v. 390, n. 10098, p. 969–979, 2 set. 2017.

KLEPSEK, M. E. et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207–12, maio 1998.

KUMAR, P. et al. Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. **Current opinion in structural biology**, v. 21, n. 5, p. 597–602, out. 2011.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 1 jul. 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, 2017.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**Asociacion Espanola de Micologia, , 2009.

LESSER, R.; WEISS, R. Aromatic compounds containing selenium. **VI. Ber. dtsh. chemistry Ges**, v. 57, n. 7, p. 1077–1082, 9 jul. 1924.

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**, v. 9, n. 4, p. 319–324, jan. 2002.

LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 69–105, 11 out. 2006.

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, 1 jul. 2013.

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, out. 2005.

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, mar. 2006.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, 25 jun. 2015.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106–117, 21 fev. 2016.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179, 2016.

MCCLELLAND, E. E.; BERNHARDT, P.; CASADEVALL, A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. **Infection and immunity**, v. 74, n. 3, p. 1500–4, mar. 2006.

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. 6627–38, nov. 2014.

MEZZARI, A. et al. CRIPTOCOCOSE EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE PORTO ALEGRE. **Journal of Infection Control**, v. 2, n. 3, 1 set. 2013.

MINISTÉRIO DA, S. **Vigilância e Epidemiológica Da Criptococose**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/proposta_ve-criptococose1.pdf>. Acesso em: 14 set. 2018.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 515–48, out. 1995.

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.

MOREIRA, T. DE A. et al. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 255–258, jun. 2006.

MORENO, A. D. H. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotoxicidade hemolítica em diferentes extratos vegetais. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 11, 20 abr. 2018.

MOURAD, A.; PERFECT, J. R. The war on cryptococcosis: A Review of the antifungal arsenal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. e170391, 2018a.

MOURAD, A.; PERFECT, J. R. Present and future therapy of Cryptococcus infections. **Journal of Fungi**. MDPI AG, , 1 set. 2018.

MOUTON, J. G. DEN H. AND J. W. The Predictive Value of Laboratory Tests for Efficacy of Antibiotic Combination Therapy. p. 115–140, 15 jun. 2007.

MUGESH, G.; DU MONT, W. W.; SIES, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chemical Reviews**, jul. 2001.

MUKHERJEE, P. K. et al. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 1, p. 163–94, jan. 2005.

MUSIOL, R. et al. Quinoline-based antifungals. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 18, p. 1960–73, 2010.

MUSIOL, R. Quinoline-based HIV integrase inhibitors. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 10, p. 1835–49, 2013.

MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842–50, jul. 2005.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599–609, nov. 2012.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51–83, 1 mar. 2016.

NOGUCHI, N. Ebselen, a useful tool for understanding cellular redox biology and a promising drug candidate for use in human diseases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, p. 109–112, 1 abr. 2016.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and Organotellurium Compounds: Toxicology and Pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6255–6286, dez. 2004.

ALVES, E. N. Red blood cell (RBC) - Teste de hemólise: uma alternativa ao teste de Draize-irritação ocular na avaliação do poder tóxico de produtos cosméticos no controle de qualidade. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2003.

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, jul. 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, 1 jun. 2003.

OKAGAKI, L. H. et al. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 6, jun. 2010.

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.

PAPE, W. J.; HOPPE, U. Standardization of an in vitro red blood cell test for evaluating the acute cytotoxic potential of tensides. **Arzneimittel-Forschung**, v. 40, n. 4, p. 498–502, abr. 1990.

PARNHAM, M. J.; SIES, H. The early research and development of ebselen. **Biochemical pharmacology**, v. 86, n. 9, p. 1248–53, 1 nov. 2013.

PERFECT, J. R. et al. the management of cryptococcal disease. **IDSA endorsed**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 2010.

PERFECT, J. R. “Is there an emerging need for new antifungals?” **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 21, n. 2, p. 129–131, 2 abr. 2016.

PFALLER, M. . et al. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 48, n. 3, p. 201–205, mar. 2004.

PFALLER, M. A. et al. In vitro activities of voriconazole, fluconazole, and itraconazole against 566 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from the United States and Africa. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 169–71, jan. 1999.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. S3–S13, jan. 2012.

PFALLER, M. A.; LIANG YU, W. ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING: New Technology and Clinical Applications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 15, n. 4, p. 1227–1261, 1 dez. 2001.

PIANALTO, K. M.; ALSPAUGH, J. A. New Horizons in Antifungal Therapy. **Journal of fungi**

(Basel, Switzerland), v. 2, n. 4, 2 out. 2016.

PILLAI, S. K.; MOELLERING, R. C.; ELIOPOULOS, G. M. Antimicrobial combinations. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, v. 5, p. 365–440, 2005.

PURVIS, A.; HECTOR, A. Getting the measure of biodiversity. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 212–219, maio 2000.

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, 1 ago. 2017.

REN, X. et al. A novel cyclodextrin-derived tellurium compound with glutathione peroxidase activity. **Chembiochem : a European journal of chemical biology**, v. 3, n. 4, p. 356–63, 2 abr. 2002.

ROSSI, S. A. et al. Impact of resistance to fluconazole on virulence and morphological aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 16 fev. 2016.

ROY-LEON, J. E. et al. In vitro and in vivo activity of combination antimicrobial agents on *Haemophilus ducreyi*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 552–558, 2005.

SANGALLI-LEITE, F. et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 5, p. 457–467, 2011.

SANGANI, C. B. et al. Design, synthesis and molecular modeling of pyrazole-quinoline-pyridine hybrids as a new class of antimicrobial and anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 76, p. 549–557, 9 abr. 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, 13 nov. 2014.

SARDI, J. D. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micologia**, jan. 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, abr. 2018.

SEVERO, C. B.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Capítulo 3: criptococose pulmonar. **Jornal**

Brasileiro de Pneumologia, v. 35, n. 11, p. 1136–1144, nov. 2009.

SEVERO, L. C.; DE MATTOS OLIVEIRA, F.; LONDERO, A. T. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases.

Revista iberoamericana de micologia, v. 16, n. 3, p. 152–4, set. 1999.

SHIRI, M. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Quinoline Derivatives as Antibacterial and Antifungal Agents. **Organic Chemistry Research**, v. 2, n. 2, p. 113–119, 1 set. 2016.

SINGH, A. et al. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 4, n. 3, maio 2013a.

SINGH, N. et al. A safe lithium mimetic for bipolar disorder. **Nature communications**, v. 4, p. 1332, 2013b.

SLOAN, D. J.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: Epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology** Dove Medical Press Ltd, , 13 maio 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. 7197–204, dez. 2015.

SMITH, L. M.; DIXON, E. F.; MAY, R. C. The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 5, p. 702–713, 1 maio 2015.

SOTEROPOULOS, P. et al. Molecular Characterization of the Plasma Membrane H⁺-ATPase, an Antifungal Target in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2349–2355, 2000.

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.

SREDNI-KENIGSBUCH, D. et al. The novel tellurium immunomodulator AS101 inhibits interleukin-10 production and p38 MAPK expression in atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v. 50, n. 3, p. 232–235, jun. 2008.

SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; RAMASUBRAMANIAN, A. K. Overcoming

antifungal resistance. **Drug discovery today. Technologies**, v. 11, p. 65–71, mar. 2014.

TEODORO, V. L. I. et al. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 759–764, nov. 2013.

TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455–462, ago. 2008.

TSAI, C. J.-Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214–29, 2 abr. 2016.

UPPULURI, P. et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 3, mar. 2010.

VANDEKERCKHOVE, S. et al. Evaluation of (4-aminobutyloxy)quinolines as a novel class of antifungal agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 16, p. 4641–4643, 15 ago. 2013.

VIDAL, J. E. et al. The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, 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, nov. 2016.

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

WHO, W. H. O. WHO | Guidelines for the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. **WHO**, 2019.

WIEDERHOLD, N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, p. 249–259, 29 ago. 2017.

WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 1, p. 13–24, 25 jan. 2017.

WÓJTOWICZ, H. et al. Azaanalogues of ebselen as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. **Farmaco (Societa chimica italiana : 1989)**, v. 59, n. 11, p. 863–8, nov. 2004.

YAMAGUCHI, T. et al. Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Ebselen Study Group. **Stroke**, v. 29, n. 1, p. 12–7, jan. 1998.

ZARAGOZA, O. et al. Chapter 4 The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in applied microbiology**. 68p. 133–216.

ZAVREL, M.; WHITE, T. C. Medically important fungi respond to azole drugs: an update. **Future Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1355–1373, ago. 2015.

ZUO, R. et al. In vitro antifungal and antibiofilm activities of halogenated quinoline analogues against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 2, p. 208–11, ago. 2016.