

**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**

## 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 (CI<sub>50</sub>: 1 - 8 µg/mL). As concentrações de 4X e 8X CI<sub>50</sub> 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 (IC<sub>50</sub>: 1 – 8 µg/mL). The concentrations at 4X and 8X CI<sub>50</sub> 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.

# 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).

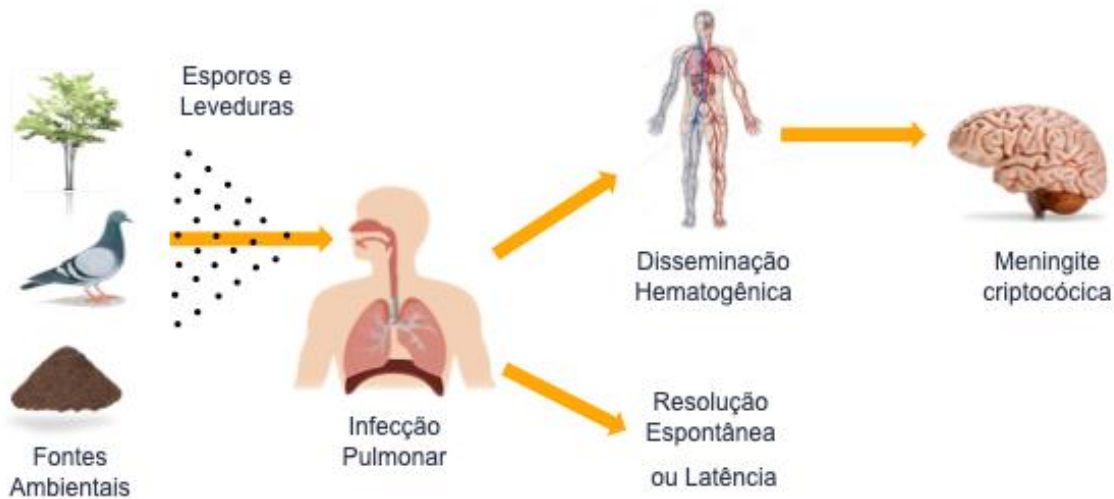
Destes, Brasil e Colômbia são os países com maior incidência, entre 1.001 a 2.500 casos/ano, seguidos pela Argentina e México, com incidência de 501 a 1.000 casos/ano (RAJASINGHAM et al., 2017; VIDAL et al., 2013). Sendo que no Brasil, a taxa de mortalidade varia de 26 – 70% (MEZZARI et al., 2013; MORA 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 nucleicos, 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- $\alpha$ -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 $\alpha$ -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  $\mu\text{M}$  – 2000  $\mu\text{M}$  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, diabete 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* (CI<sub>50</sub>: 2 - 5µM ou 0,55 – 1,37 µg/mL) (CHAN et al., 2007), *Candida* spp. (CI<sub>50</sub>: 128 µg/mL) (BILLACK et al., 2010; WÓJTOWICZ et al., 2004), *C. neoformans* (CI<sub>50</sub>: 4,5 µM ou 1,23 µg/mL) (SOTEROPOULOS et al., 2000), *Aspergillus* spp. (CI<sub>50</sub>: 128 µg/mL) e *Penicillium* spp. (CI<sub>50</sub>: 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<sup>+</sup>- 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<sup>+</sup>- 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. 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.

### 3. 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<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-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](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. **Memorias 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<sup>+</sup>-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.