



**THAIS FURTADO FERREIRA MAGALHÃES**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA  
DE ALILIMINAS**

**Belo Horizonte– 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA  
DE ALILIMINAS**

**THAIS FURTADO FERREIRA MAGALHÃES**

Tese apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia do  
Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais,  
para obtenção do título de  
Doutor em Microbiologia

**Orientadora:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Aparecida de Resende-Stoianoff**

**Co-orientadores:**

**Prof. Dr. Ângelo de Fátima**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cleide Viviane Buzanello Martins**

**Colaborador:**

**Prof. Dr. Daniel de Assis Santos**

**Belo Horizonte– 2016**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Maristela, meus exemplos de vida e que tanto apoiaram e incentivaram o meu crescimento profissional.

Ao meu marido Rodolfo, meu companheiro em todos os momentos pelo apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e perseverança na realização desse trabalho.

À minha orientadora Professora Cida, pela confiança, pela amizade e por todos os ensinamentos profissionais e pessoais.

Aos meus co-orientadores Prof. Ângelo de Fátima e Prof<sup>ª</sup>. Cleide pelas imensas contribuições no trabalho, pelas orientações, pelo carinho e amizade.

Ao colaborador Prof. Daniel de Assis Santos, por ter me guiado em diversos momentos, pela paciência e por sempre ter um tempinho pra ouvir minhas dúvidas.

Ao Cleiton Moreira da Silva e à Luíza Braga Ferreira do Departamento de Química da UFMG pela síntese dos compostos.

À CAPES pela bolsa de estudo e auxílio financeiro.

À Prof. Luciana Maria Silva e às suas alunas Graziela de Paula Ferreira Dantas, Camila Barbosa e Tayara Pimenta do Laboratório de Biologia Celular da FUNED pela colaboração e auxílio nos ensaios de toxicidade.

À Prof. Simone Gonçalves e à sua aluna Priscila Costa do Laboratório de Microbiologia Oral e de Anaeróbios da UFMG pelas colaborações nos ensaios de atividade antibacteriana.

Aos Professores Eleftherios Mylonakis e Beth Fuchs do Alpert Medical School da Brown University por me receberem em seus laboratórios, pela oportunidade e por todos os ensinamentos.

Aos Professores Ângelo Márcio Leite Denadai e Gabriella Freitas Ferreira da Universidade Federal de Juiz de Fora pelas contribuições com o ensaio do Potencial Zeta.

Ao Prof. Sérgio Antônio Fernandes e à Natália Liberto do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa pelos estudos de encapsulação em  $\beta$ -ciclodextrina.

A todos os colegas de batalha do Laboratório de Micologia, por toda parceria e, principalmente, pela ajuda imensa nos dias de sacrifício e nos fins de semana de tratamentos dos animais.

Em especial à Marliete e Julliana que tanto me ajudaram e ensinaram nos testes *in vivo*, à Noelly e ao Rodrigo pelas ajudas no SHIRPA, à Vanessa pela ajuda na morfometria e à Dani por toda amizade, paciência, conselhos e caronas.

Aos estagiários Rayce, Larrisa, Laís, Franciele, Rafaela, Sabine, Anderson e Lorena por toda a ajuda nesse trabalho e, em especial ao Gustavo pelo incentivo, palpites/sugestões, pela parceria nos experimentos e pela boa vontade em aprender e ajudar.

Aos amigos da “PD” que a Faculdade de Farmácia me proporcionou e aos “Insanos” amigos de sempre de São Gonçalo, obrigada pela torcida e pela compreensão nos momentos de ausência.

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram e torceram por mim e principalmente aos meus pais e meu irmão Diogo que sempre foram exemplo de luta, dedicação e responsabilidade.

Ao meu marido Rodolfo, pelos auxílios técnicos na realização desse trabalho e por todo incentivo, carinho, paciência e compreensão ao longo dessa caminhada.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	7
1.1	Criptococose .....	8
1.1.1	Patogênese .....	8
1.1.2	Manifestações clínicas .....	10
1.2	<i>Cryptococcus</i> spp. ....	11
1.2.1	Epidemiologia.....	12
1.2.2	Fatores de virulência.....	14
1.3	Diagnóstico .....	18
1.4	Tratamento da criptococose .....	21
1.5	Agentes antifúngicos.....	22
1.5.1	Polienos .....	23
1.5.2	Azólicos.....	25
1.5.3	Alilaminas.....	26
1.5.4	Equinocandinas.....	27
1.5.5	Griseofulvina .....	28
1.5.6	5-flucitosina .....	29
1.5.7	Aliliminas .....	30
1.6	Ensaio de toxicidade.....	32
1.7	Modelos <i>in vivo</i> de criptococose.....	34
2	JUSTIFICATIVA.....	36
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo geral .....	37
3.2	Objetivos específicos .....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	39
4.1	Aliliminas.....	40
4.2	Micro-organismos .....	41
4.3	Triagem inicial das aliliminas - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de 22 aliliminas contra amostras de <i>Cryptococcus</i> spp. ....	42
4.3.1	Preparo do inóculo.....	43
4.4	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de 6 aliliminas contra bactérias de importância clínica.....	44
4.5	Toxicidade dos compostos.....	45
4.5.1	Teste de Hemólise .....	45

4.5.2	Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT).....	46
4.5.3	Avaliação da genotoxicidade - Ensaio do cometa.....	46
4.6	Determinação da atividade anti-criptocócica do composto 3H2.....	48
4.6.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) contra 12 amostras de <i>Cryptococcus gattii</i> e de <i>C. neoformans</i> 49	
4.6.2	Avaliação da curva de morte .....	49
4.6.3	Atividade em combinação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B ....	50
4.6.4	Ensaio do sorbitol .....	51
4.6.5	Avaliação da produção de melanina.....	51
4.6.6	Determinação da atividade de lacase.....	52
4.6.7	Potencial zeta das células de <i>C. gattii</i> tratadas com 3H2 .....	52
4.6.8	Avaliação do efeito do tratamento com a alilimina 3H2 na cápsula de amostras de <i>Cryptococcus gattii</i> .....	53
4.6.9	Visualização das células de <i>C. gattii</i> tratadas com 3H2 pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	53
4.7	Avaliação da atividade <i>in vivo</i> de 3H2 em modelo de infecção pulmonar causada por <i>Cryptococcus gattii</i> .....	54
4.7.1	Infecção intratraqueal .....	54
4.7.2	Tratamento dos animais.....	54
4.7.3	Curva de sobrevida e determinação da carga fúngica .....	56
4.7.4	Análise comportamental dos animais infectados com <i>C. gattii</i> e tratados com 3H2, CD-3H e anfotericina B.....	56
4.8	Análise estatística .....	57
5	RESULTADOS.....	58
5.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de 22 aliliminas contra amostras de <i>Cryptococcus spp.</i> .....	58
5.2	Determinação da concentração inibitória mínima contra outros fungos de importância clínica.....	59
5.3	Determinação da concentração inibitória mínima contra bactérias de importância clínica	60
5.4	Toxicidade dos compostos.....	61
5.4.1	Teste de Hemólise .....	61
5.4.2	Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT).....	62

5.4.3	Avaliação da genotoxicidade - Ensaio do cometa.....	63
5.5	Determinação da atividade anti-criptocócica do composto 3H2.....	65
5.5.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) contra 12 amostras de <i>Cryptococcus gattii</i> e de <i>C. neoformans</i> 65	
5.5.2	Avaliação da curva de morte .....	67
5.5.3	Atividade do composto 3H2 em combinação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B .....	68
5.5.4	Ensaio do Sorbitol .....	71
5.5.5	Avaliação da produção de melanina.....	72
5.5.6	Determinação da atividade de lacase.....	73
5.5.7	Potencial zeta de <i>C. gattii</i> tratado com 3H2 .....	74
5.5.8	Avaliação do efeito do tratamento com 3H2 na cápsula da amostra de <i>Cryptococcus gattii</i> L27/01 .....	75
5.5.9	Visualização das células de <i>C. gattii</i> tratadas com 3H2 pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	75
5.5.10	Avaliação da atividade <i>in vivo</i> de 3H2 e seu complexo em $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H) em modelo de infecção pulmonar causada por <i>Cryptococcus gattii</i> .....	77
5.5.11	Análise comportamental dos animais infectados com <i>C. gattii</i> e tratados com 3H2, CD-3H e anfotericina B.....	82
6	DISCUSSÃO.....	85
6.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de 22 alilimas contra amostras de <i>Cryptococcus spp.</i> .....	85
6.2	Determinação da concentração inibitória mínima contra fungos e bactérias de importância clínica.....	86
6.3	Citotoxicidade dos compostos .....	87
6.4	Determinação da atividade anti-criptocócica do composto 3H2.....	90
6.4.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) contra 12 amostras de <i>Cryptococcus gattii</i> e <i>C. neoformans</i> ...	90
6.4.2	Avaliação da curva de morte .....	91
6.4.3	Atividade dos compostos em combinação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B .....	92
6.4.4	Ensaio do Sorbitol .....	93
6.4.5	Avaliação da produção de melanina.....	94
6.4.6	Determinação da atividade de lacase.....	95
6.4.7	Potencial zeta de <i>C. gattii</i> tratado com 3H2 .....	96

6.4.8	Avaliação do efeito do tratamento com 3H2 na cápsula de amostras de <i>Cryptococcus gattii</i> .....	97
6.4.9	Avaliação da atividade <i>in vivo</i> de 3H2 em modelo de infecção pulmonar causada por <i>Cryptococcus gattii</i> .....	97
6.4.10	Análise comportamental dos animais infectados com <i>C. gattii</i> e tratados com 3H2, CD-3H e anfotericina B.....	102
7	CONCLUSÕES.....	105
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
9	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS .....	138

## RESUMO

A criptococose é uma micose invasiva de ocorrência mundial, causada principalmente por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* e afeta pacientes, tanto imunocomprometidos quanto imunocompetentes. Seu tratamento pode ser complicado pela toxicidade das drogas utilizadas e pelo surgimento de linhagens resistentes. A descoberta de novos antifúngicos que possam contornar essa situação é fundamental para o tratamento eficaz das infecções fúngicas. As aliliminas apresentam estruturas semelhantes ao grupo das alilaminas, contendo uma dupla ligação próxima ao átomo de nitrogênio presente na molécula. Foi realizada uma triagem com 22 aliliminas contra *C. neoformans* e *C. gattii* e seis compostos foram selecionados para a investigação de atividade antimicrobiana e toxicidade. Essas substâncias apresentaram maior atividade contra *Cryptococcus* spp. e *Fonsecaea pedrosoi* e resultados insatisfatórios contra amostras de *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e algumas bactérias. A partir dos ensaios de toxicidade foi selecionada a alilimina 3H2 para mais estudos de atividade anti-criptococócica. Esse apresentou atividade fungistática contra amostras de *C. gattii* e fungicida contra *C. neoformans*. A alilimina 3H2 demonstrou ser indiferente em combinação com o fluconazol, porém apresentou sinergismo quando combinada com anfotericina B. A alilimina testada foi capaz de retardar a síntese de melanina, reduzir atividade de lacase e diminuir a produção de cápsula em uma amostra de *C. gattii*. *In vivo* o composto testado individualmente não foi efetivo no tratamento de camundongos infectados com *C. gattii*, porém apresentou sinergismo com anfotericina B, prolongando a sobrevivência dos animais, tendo reduzido a carga fúngica nos grupos tratados com essa associação. Assim, esse composto demonstra ser um promissor agente antifúngico que poderia vir a ser usado como alternativas no tratamento e controle de micoses graves, como a criptococose.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is an invasive mycosis of worldwide occurrence, mainly caused by *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* and affects patients both immunocompromised as immunocompetent. Its treatment may be complicated by the toxicity of the drugs used and the emergence of resistant strains. The discovery of new antifungals that solve this situation is crucial for effective treatment of fungal infections. The allylimines have similar structures to the group of allylamines, containing a double bond next to the nitrogen atom in the molecule. A screening test was performed with 22 allylimines against *C. neoformans* and *C. gattii*; six compounds were selected to investigate their antimicrobial activity and toxicity. These substances showed greater activity against *Cryptococcus* spp. and *Fonsecaea pedrosoi* and unsatisfactory results against *Candida* spp., *Aspergillus* spp. and some bacteria. From the toxicity tests the allylimine 3H2 was selected for further anti-cryptococcal activity studies. It showed fungistatic activity against *C. gattii* samples and fungicidal against *C. neoformans*. The allylimine 3H2 shown to be indifferent in combination with fluconazole, however showed synergism when combined with amphotericin B. The allylimine tested was able to slow the melanin synthesis, reduce laccase activity and decrease the capsule production in a *C. gattii* strain. *In vivo* the compound tested individually was not effective in the treatment of mice infected with *C. gattii* but showed synergism with amphotericin B, prolonging the survival of animals and reducing the fungal load in the groups treated with this association. Thus, this compound proves to be a promising antifungal agent that it could be used as alternatives in the treatment and control of serious fungal infections such as cryptococcosis.

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de doenças fúngicas causando infecções fatais tem aumentado progressivamente nos últimos anos devido ao crescimento da população de risco (FORTÚN, 2011; ALCAZAR-FUOLI e MELLADO, 2014). Entre os indivíduos mais susceptíveis a maioria se encontra em algum estado de imunossupressão causada, principalmente, pelo uso de quimioterápicos no tratamento de doenças neoplásicas, uso de imunossuppressores em transplantes de órgãos, uso prolongado de corticoides, ou pelo estágio avançado de infecção pelo vírus HIV sem terapia antirretroviral (KLEPSEK, 2011; PEMÁN E SALAVERT, 2012; OLIVEIRA et al., 2014). As Infecções fúngicas invasivas mais frequentemente diagnosticadas são causadas por patógenos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* (RICHARDSON, 2005; PAPPAS et al., 2010).

Com o advento do tratamento antirretroviral houve, nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos, uma redução nas taxas de infecções fúngicas associadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), como a criptococose, entretanto, o peso destas doenças nos países em desenvolvimento ainda é grande e crescente (WARNOCK, 2007).

Na África subsaariana, a criptococose causada por *C. neoformans* é a maior causa de meningite entre os pacientes com AIDS e é associada à alta mortalidade (JARVIS et al., 2010; GOVENDER et al., 2011). No Brasil, esta doença foi identificada, recentemente, como a micose mais fatal entre esses pacientes (PRADO et al., 2009; ALBUQUERQUE e RODRIGUES, 2012).

Apesar do uso da terapia antirretroviral e da disponibilidade de drogas antifúngicas nos serviços públicos de saúde brasileiros, a meningite criptococócica ainda representa a terceira ou quarta doença mais relacionada à AIDS e é a segunda infecção mais prevalente no sistema nervoso central (SNC) desses pacientes (MORA et al., 2012). Considerando-se as altas taxas de mortalidade causadas pela criptococose em pacientes com AIDS e as dificuldades no tratamento da doença, é evidente que novas ferramentas terapêuticas e de diagnóstico são necessárias (ALBUQUERQUE e RODRIGUES, 2012).

## 1.1 Criptococose

A criptococose é uma micose invasiva de ocorrência mundial causada, principalmente, por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, e é associada com morbidade e mortalidade. No mundo todo, infecções por esses patógenos correspondem a uma estimativa de um milhão de casos de meningite criptocócica por ano entre pessoas com HIV / AIDS, resultando em cerca de 625 mil mortes por ano (PARK et al., 2009; COGLIATI, 2013; SLOAN e PARRIS, 2014). Embora mais rara, a criptococose pode também ser causada por *Cryptococcus laurentii* ou por *Cryptococcus albidus* (KHAWCHAROENPORN et al., 2007; BANERJEE et al., 2013; MOLINA-LEYVA et al., 2013; RAGUPATHI e REYNA, 2015).

Registros de criptococose no homem eram relativamente raros, porém desde 1970 relatos dessa doença têm aumentado, principalmente devido ao número crescente de pacientes com comprometimento imunológico, incluindo transplantados, em uso de quimioterapia citotóxica e em terapia imunossupressora a longo prazo. A doença criptocócica é atualmente reconhecida como uma das infecções fúngicas oportunistas mais comuns em pacientes imunocomprometidos, particularmente entre aqueles com AIDS sendo *C. neoformans* o patógeno fúngico mais comum no acometimento do sistema nervoso central desses pacientes (THOMAS et al., 1998; PERFECT et al., 2010).

Embora em relação à *C. neoformans*, *C. gattii* infecte primariamente indivíduos hígidos, em vários países e, inclusive no Brasil, amostras desse patógeno já foram relatadas em infecções associadas ao HIV (BOVERS et al., 2008; FAVALESSA et al., 2009; SILVA et al., 2012; RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2014).

A criptococose também é relatada em animais domésticos, como cães e gatos (CARDOSO et al., 2013) (PEREZ et al., 2015); além de outras espécies como coalas (KROCKENBERGER et al., 2010), golfinhos e lhamas (STEPHEN et al., 2002).

### 1.1.1 Patogênese

A infecção pulmonar causada por *C. neoformans* ou *C. gattii* tem início, provavelmente, com a inalação de esporos ou leveduras desidratadas presentes no ambiente. Normalmente, as células fúngicas são eliminadas por macrófagos alveolares ou ficam restritas ao pulmão, dentro de granulomas, onde podem persistir em um estado latente indefinidamente

sem produzir a doença (CHAYAKULKEEREE e PERFECT, 2006; LIN, 2009). Em indivíduos imunodeficientes, macrófagos alveolares parasitados com criptococos intracelulares agem como cavalos de Tróia dentro dos pulmões, provocando a disseminação sistêmica (SABIITI e MAY, 2012).

Para sobreviver no ambiente intracelular hostil, células de *Cryptococcus neoformans* expressam alguns fatores de virulência, como o aumento da sua cápsula, e a formação de melanina, como antioxidante contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (SABIITI e MAY, 2012). Alternativamente, essas leveduras também podem resistir à fagocitose aumentando seu tamanho, formando as células Titãs (ZARAGOZA e NIELSEN, 2013).

Leveduras extracelulares podem permanecer localizadas nos pulmões ou disseminar transcelularmente para a circulação sanguínea. Na circulação sistêmica, as leveduras se associam com monócitos ou são transportadas livremente para dentro do leito capilar do cérebro. No capilar cerebral, as leveduras do gênero *Cryptococcus* podem penetrar a barreira hematoencefálica (BHE) por diferentes mecanismos (A) modelo paracelular entre as células endoteliais - travessia através dos espaços intercelulares da BHE; (B) transcitose – ligando ou sendo internalizadas pelas células endoteliais microvasculares cerebrais; ou (C) pelo mecanismo de cavalo de Tróia, através do parasitismo intracelular em monócitos e macrófagos (FIGURA 1) (CHARLIER et al., 2009; SABIITI e MAY, 2012; TSENG et al., 2015; SORRELL et al., 2016).

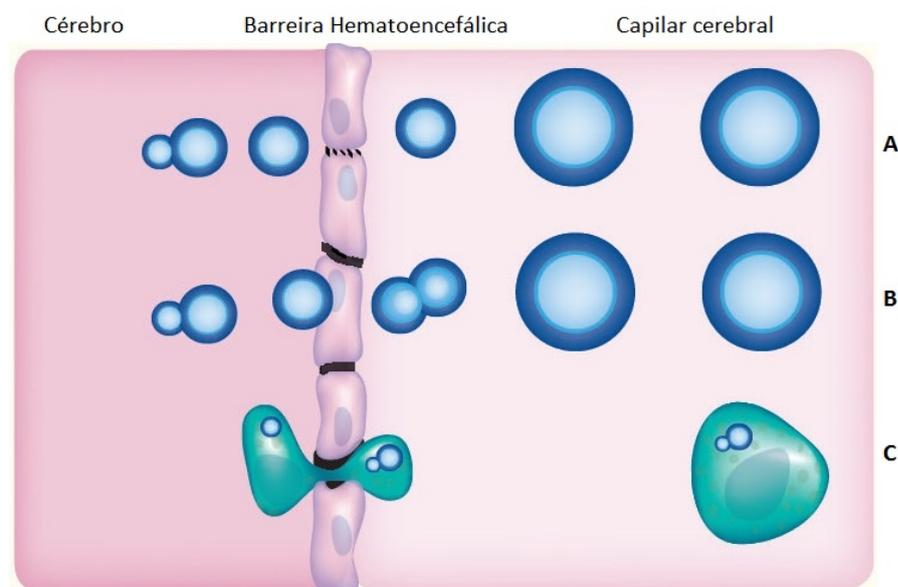


Figura 1: Mecanismos propostos da passagem de *Cryptococcus* spp. pela Barreira Hematoencefálica. Modelo paracelular (A), Transcitose (B) e Cavalo de Tróia (C). (Adaptado de SABIITI e MAY.,2012).

### 1.1.2 Manifestações clínicas

*C. neoformans* e *C. gattii* têm uma grande predileção para o estabelecimento de doença clínica nos pulmões e sistema nervoso central. Outros locais do corpo menos frequentes de infecção incluem a pele, próstata, olhos e articulações ósseas (MAZIARZ e PERFECT, 2016).

As manifestações clínicas da criptococose pulmonar variam de colonização assintomática das vias aéreas até doença disseminada com falência respiratória (MORETTI et al., 2008). A infecção do sistema nervoso central pode resultar em meningoencefalite, uma condição que pode ser fatal se não tratada, ou levar a seqüelas e déficits neurológicos como diminuição do nível de consciência, alteração do comportamento, alterações visuais e de nervos cranianos (DARZÉ et al., 1999; CHEN et al., 2012; 2014).

Em comparação com *C. neoformans*, a infecção por *C. gattii* nos pacientes HIV negativos, apresenta mais frequentemente envolvimento pulmonar que em outros órgãos. A ocorrência de grandes lesões de massa fúngica (criptococomas) nos pulmões e/ou cérebro também é observada com maior frequência nas infecções causadas por *C. gattii* (HOANG et al., 2011; COSTA et al., 2013).

Recentemente, tornou-se evidente que, em alguns casos, o nível de resposta inflamatória não reflete a carga de patógenos no paciente. Esta discrepância é especialmente observada na síndrome inflamatória da reconstituição imunológica (SIRI). A SIRI ocorre após o início da terapia antirretroviral e também quando as doses de drogas imunossupressoras são reduzidas em pacientes que receberam transplante de órgãos. Na infecção por *Cryptococcus* spp., estes indivíduos apresentam uma resposta inflamatória que é desproporcional à carga de organismos viáveis. Em um estudo, inclusive, a introdução precoce da terapia antirretroviral em pacientes com meningite criptocócica foi associada ao aumento da taxa de mortalidade (MAKADZANGE et al., 2010). Os sinais e sintomas clínicos evidentes dificultam distinguir SIRI do agravamento da infecção e o tratamento adequado pode ser extremamente desafiador (HUSTON e MODY, 2009).

## 1.2 *Cryptococcus* spp.

As espécies de *Cryptococcus* têm se tornado um grupo de patógenos cada vez mais importantes. Foram isolados, inicialmente, na Itália no suco de pêssego pelo italiano Francesco Sanfelice, em 1894 e, posteriormente, na Alemanha, da tibia de uma paciente, por Otto Busse e Abraham Buschke. Atualmente, *Cryptococcus* spp. são uma grande ameaça para um número crescente de pacientes imunocomprometidos e também indivíduos imunocompetentes (BARNETT, 2010; POETA e CASADEVALL, 2011).

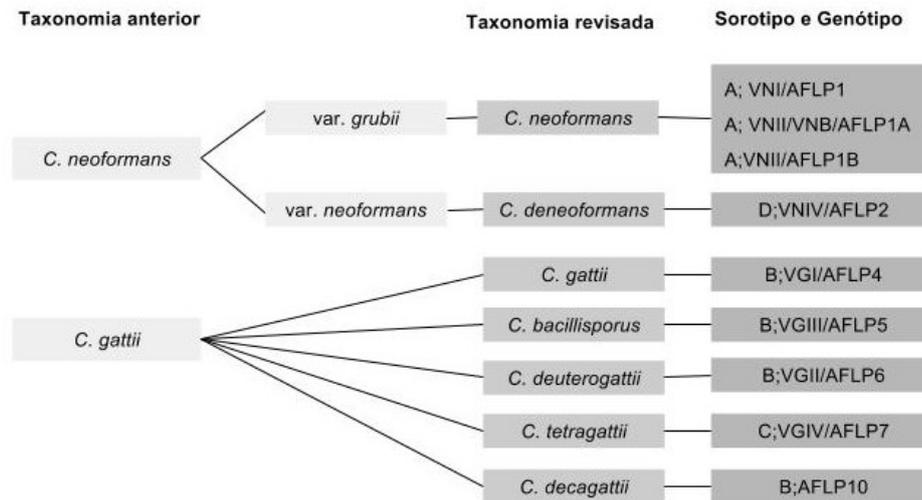
Os basidiomicetos do gênero *Cryptococcus* caracterizam-se por apresentarem células leveduriformes redondas ou ovais cercadas por uma cápsula. Embora mais de 80 espécies pertençam a esse gênero, os membros do complexo de espécies *C. neoformans/C.gattii* são os principais representantes causadores da criptococose no homem (CHEN et al., 2014).

Anteriormente, consideravam-se o complexo de espécies *C. neoformans/C.gattii* como duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A e D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). Atualmente, *C. neoformans* var. *gattii* é classificada como uma espécie distinta, e os sorotipos A e D são separados em duas variedades, *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D); além do híbrido *C. neoformans* (sorotipo AD). Essas espécies apresentam também a fase sexuada, sendo o teleomorfo de *C. neoformans* denominado *Filobasidiella neoformans* e de *C. gattii*, *Filobasidiella bacillispora* (KWON-CHUNG, 1976; LIN, 2009; SHARP, 2009; SPRINGER E CHATURVEDI, 2010; ANTINORI, 2013).

Dentro do complexo de espécies *C. neoformans /C. gattii*, através da tipagem molecular, identificaram-se oito tipos moleculares: VNI/AFLP1, VNII/AFLP1A, VNII/AFLP1B (*C. neoformans* var. *grubii*), VNIV / AFLP2 (*C. neoformans* var. *neoformans*) e VGI/AFLP4, VGII/AFLP6, VGIII/AFLP5, VGIV/AFLP7 (*C. gattii*) (BOEKHOUT et al., 2001; GALANIS et al., 2009; ANTINORI, 2013).

Recentemente, tem sido proposta uma nova taxonomia diferenciando as espécies do complexo *C.gattii/C. neoformans* (FIGURA 2). *C. neoformans* var. *grubii*, com os genótipos VNI/AFLP1, VNII/AFLP1A e AFLP1B/VNII, seriam reduzidos a *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* genótipo VNIV / AFLP2 seria renomeado para *Cryptococcus deneoformans*; *Cryptococcus gattii* seria dividido em 5 espécies, seguindo os genótipos conhecidos: *Cryptococcus gattii* (VGI/AFLP4); *Cryptococcus bacillisporus*

(VGIII/AFLP5); *Cryptococcus deuterogattii* (VGII/AFLP6); *Cryptococcus tetragattii* (VGIV/AFLP7) e *Cryptococcus decagattii* (AFLP10) (MEYER et al., 2009; HAGEN et al., 2015).



**Figura 2:** Identificação das espécies de *Cryptococcus* considerando as diferentes nomenclaturas (adaptado de (HAGEN et al., 2016).

### 1.2.1 Epidemiologia

As linhagens de *C. neoformans* sorotipos A e D estão distribuídas mundialmente e causam a grande maioria das infecções criptocócicas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. De todos os sorotipos, o A (variedade *grubii*) é o predominante entre amostras clínicas e é responsável por mais de 95% dos casos de criptococose em todo o mundo (LIN, 2009). No Brasil, Nishikawa e colaboradores (2003), avaliaram a distribuição regional dos isolados clínicos e ambientais de *C. neoformans* e concluíram que o sorotipo A prevaleceu no país, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (NISHIKAWA et al., 2003).

Como saprófitas, os isolados de *C. neoformans* estão presentes no ambiente. Sabe-se que este fungo está associado com fezes de aves, principalmente, pombos. Acredita-se que a alta concentração de creatinina nas fezes de pombos favorece o crescimento criptocócico, mas também as fezes dessa ave proporcionam outras características como ambiente alcalino, hiperosmolaridade e disponibilidade de compostos ricos em nitrogênio (ROSARIO et al.,

2008). Este fungo, no Brasil, já foi isolado de ocos de árvores tropicais, como da espécie *Theobroma cacao* e até em detritos de árvores de eucalipto (NISHIKAWA et al., 2003).

*C. gattii* foi, inicialmente, reconhecido por ter uma associação ecológica específica com árvores de eucalipto, no Norte da Austrália. A árvore de eucalipto parecia corresponder à distribuição epidemiológica da criptococose causada por *C. gattii* e, até então, nenhuma outra fonte ambiental para o fungo havia sido detectada (ELLIS e PFEIFFER, 1990). Ademais, este organismo era considerado confinado geograficamente a climas tropicais e subtropicais e apresentava uma baixa incidência como agente da criptococose, em todo o mundo em pacientes com AIDS. No entanto, em 1999 ocorreu um surto de infecções por *C. gattii* na Ilha de Vancouver, Columbia Britânica, Canadá, e o fungo não foi isolado de árvores de eucalipto, mas de espécies arbóreas nativas (STEPHEN et al., 2002; KIDD et al., 2007). A partir de 2004, *C. gattii* expandiu para a região sudoeste continental da Columbia Britânica atingindo também Washington e Oregon, nos Estados Unidos (DATTA et al., 2009). O Nordeste do Pacífico, na América do Norte, no momento, apresentando *C. gattii* endêmico, é o único clima temperado conhecido a abrigar o organismo (HOANG et al., 2011). O aparecimento deste patógeno, geralmente de ocorrência em região de clima tropical nessa região destaca a mudança na distribuição desse micro-organismo. Estudos filogenéticos sugerem que as amostras causadoras dos recentes surtos, provocando infecções graves em seres humanos e animais, tenham sido derivadas de linhagens da floresta Amazônica (HAGEN et al., 2013).

No Brasil este fungo é endêmico nas regiões Norte e Nordeste (MARTINS et al., 2011). Recentemente Brito-Santos e colaboradores (2015) isolaram *C. gattii* da poeira do interior das típicas casas de madeira da Bacia do Rio Negro no Amazonas. Fortes e colaboradores (2001) isolaram *C. gattii* de *Guettarda acreana*, uma espécie de árvore nativa da floresta amazônica. No estado do Mato Grosso esse fungo foi isolado de uma espécie de árvore do cerrado *Plathymenia reticulata* (ANZAI et al., 2014). Atualmente tem sido sugerido que o solo pode ser de fato, o reservatório principal de *C. gattii* (KIDD et al., 2007; SHARP, 2009; HOANG et al., 2011).

## 1.2.2 Fatores de virulência

Vários fatores de virulência contribuem para o estabelecimento das infecções por *C. neoformans* e *C. gattii* nos hospedeiros, sendo os mais importantes:

### a) Crescimento a 37°C

A capacidade de crescer a 37°C é essencial para fungos patogênicos. Dentro do gênero *Cryptococcus*, somente *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam bom crescimento a temperaturas acima de 30°C e mutantes sensíveis à temperatura são avirulentos (PERFECT, 2005; BOVERS et al., 2008). As espécies de *C. gattii* e *C. neoformans* var. *neoformans* parecem ser geralmente mais sensíveis à temperaturas entre 37°C e 39°C do que *C. neoformans* var. *grubii* (MARTINEZ et al., 2001).

### b) Presença de cápsula polissacarídica

Membros do gênero *Cryptococcus* são conhecidos por produzirem cápsulas, que são os principais determinantes de virulência nas espécies altamente patogênicas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (ARAUJO et al., 2012).

A cápsula, que é composta por cerca de 90% de glucuronoxilomanana (GXM) e 10% de galactoxilomanana confere ao micro-organismo proteção contra a dessecação no ambiente (CHAYAKULKEEREE e PERFECT, 2006). *C. neoformans* modula a espessura da cápsula em resposta a condições ambientais. A síntese da cápsula é induzida pelo soro, limitação de ferro e níveis fisiológicos de gás carbônico. Em condições padronizadas *in vitro*, a espessura da cápsula é frequentemente de 1-2 microns (FIGURA 3). *In vivo*, o tamanho da cápsula pode atingir 30 microns (IDNURM et al., 2005; McFADDEN et al., 2006).

As alterações na estrutura da cápsula, no tamanho, e na sua densidade são potencialmente um mecanismo de fuga do sistema imune, o que demonstra que a cápsula é uma estrutura dinâmica altamente regulada pela célula em resposta a sinais específicos do ambiente (O'MEARA e ALSPAUGH, 2012).

Embora o aumento da cápsula seja uma resposta precoce do patógeno durante a infecção, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que regulam este processo.

Recentemente, García-Rodas e colaboradores (2014) estabeleceram uma ligação entre o crescimento da cápsula, a progressão do ciclo celular e a virulência em *C. neoformans*.

A cápsula tem muitas propriedades e funções importantes. Devido à sua carga negativa esta estrutura protege o patógeno da fagocitose e morte por neutrófilos, monócitos e macrófagos. É também responsável pela depleção do complemento, falta de resposta do anticorpo e desregulação na secreção de citocinas por monócitos e macrófagos, incluindo o fator alfa de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6) (McFADDEN et al., 2006; KARKOWSKA-KULETA et al., 2009).

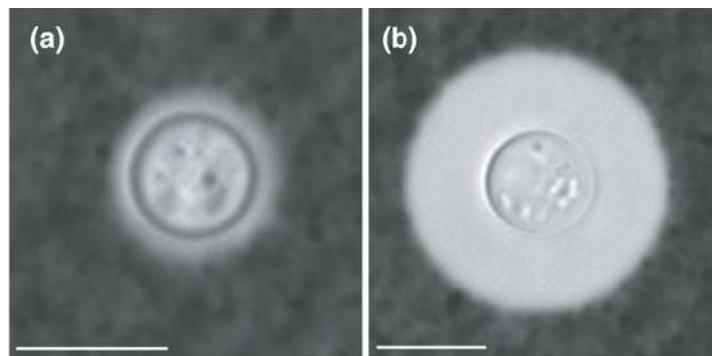


Figura 3: Micrografias de células de *Cryptococcus neoformans* com tamanhos diferentes da cápsula. Coloração de tinta Nanquim. (a) células com uma pequena cápsula e (b) células com uma cápsula espessa. A cápsula é visível como um halo ao redor da célula (McFADDEN et al. 2006).

A cápsula também pode inibir a migração de leucócitos da corrente sanguínea para os sítios de inflamação. Além disso, sua presença é essencial para a formação de biofilmes criptococócicos (McFADDEN et al., 2006; KARKOWSKA-KULETA et al., 2009).

### c) Formação de biofilme

A formação de biofilme é um mecanismo comum utilizado por micro-organismos para sobreviver em ambientes hostis, colonizar novos nichos ecológicos e conferir proteção contra a predação. Biofilmes são comunidades de micro-organismos aderidos a uma superfície sólida envolvidos numa matriz exopolimérica. O biofilme criptococócico é constituído por uma complexa rede de leveduras organizadas em uma quantidade substancial de matriz polissacarídica. A formação de biofilme por *C. neoformans* segue uma sequência de eventos, incluindo a adesão a uma superfície, a formação de microcolônias e a produção da matriz extracelular. *C. neoformans* pode formar biofilmes em placas de poliestireno e dispositivos médicos após a liberação de GXM, o principal componente do polissacarídeo capsular.

Biofilmes criptocócicos estão se tornando comuns devido à crescente utilização de válvulas cerebrais e outros dispositivos médicos (SANTI et al., 2014).

A formação de biofilmes tem graves consequências no estabelecimento da infecção fúngica e está associada com a infecção persistente, já que estas formações levam ao aumento da resistência à resposta imune do hospedeiro e à terapia antifúngica (MARTINEZ et al., 2006; RAVI et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010).

#### d) Produção de melanina

A produção de melanina é outro importante fator de virulência. A síntese de melanina é catalisada por uma enzima lacase e pode ocorrer quando os compostos fenólicos, por exemplo, catecolaminas, estão presentes no meio (DALISAY et al., 2011).

Em *C. neoformans* e *C. gattii*, a melanina é sintetizada durante a infecção e os mutantes que não produzem melanina são menos virulentos (FIGURA 4). A melanina protege o fungo dos danos oxidativos produzidos pelo hospedeiro. Células melanizadas de *Cryptococcus* spp. são resistentes à radiação, a detergentes e metais pesados e à fagocitose por macrófagos. Além disso, essas células são menos susceptíveis ao tratamento com antifúngicos, como a anfotericina B (DALISAY et al., 2011; EISENMAN e CASADEVALL, 2012).

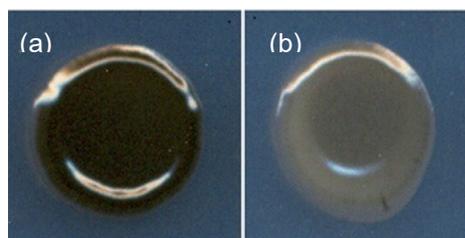


Figura 4: Colônias de *C. neoformans* produtora de melanina (a) e não produtora (b) (KRONSTAD et al., 2008).

#### d) Produção de manitol

A infecção do sistema nervoso central causada por *C. neoformans* é frequentemente associada à produção de uma grande quantidade do hexitol D-manitol por este micro-

organismo (LIAPPIS et al., 2008). Este processo pode facilitar o desenvolvimento de meningoencefalite, porque o manitol aumenta a pressão osmótica do fluido circundante, o que pode contribuir para o edema cerebral. Além disso, o manitol também protege o fungo de danos oxidativos e confere resistência a estresses ambientais (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009).

#### **e) Produção de enzimas**

Fosfolipases são um grupo heterogêneo de enzimas que são capazes de hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídeos (COX et al., 2001). A produção de fosfolipases é considerada um fator de virulência, pois essas enzimas são capazes de danificar a membrana celular do hospedeiro degradando seus lipídios constituintes (ECHEVARRÍA et al., 2002). Acredita-se que essas enzimas tenham papel na infecção pulmonar por *Cryptococcus* spp. e na sua disseminação do pulmão para outros órgãos via sistemas linfático e venoso (CHEN et al., 1997; GANENDREN et al., 2006; PARK et al., 2009).

As proteinases podem contribuir com a virulência microbiana pela destruição dos tecidos do hospedeiro e digestão de proteínas imunologicamente importantes como anticorpos e parte do sistema do complemento no local da infecção (CHEN et al., 1996; CAMPOS e BARONI, 2010). Apesar das últimas descobertas, poucos trabalhos têm sido feitos atualmente para elucidar o mecanismo pelo qual as proteinases aumentam a virulência de *C. neoformans* no hospedeiro (SABIITI e MAY, 2012).

A urease, que catalisa a hidrólise de ureia em amônia e carbamato, desempenha um papel importante em *Cryptococcus neoformans* na disseminação do fungo para o cérebro causando a meningoencefalite (COX et al., 2000; SINGH et al., 2013). Shi e colaboradores (2010) demonstraram que a transmigração de *C. neoformans* para o cérebro é urease-dependente (SHI et al., 2010).

#### **f) Vesículas extracelulares**

Muitos fatores associados com a patogênese de *C. neoformans* devem ser transportados a partir de sítios intracelulares de síntese para locais na superfície da célula ou no exterior da membrana plasmática (RODRIGUES et al., 2008).

As vesículas extracelulares funcionam como "sacos de virulência" contendo proteínas ribossomais, bem como proteínas relacionadas a virulência e defesa antioxidante, incluindo

lacase (síntese de melanina), urease, superóxido dismutase e proteínas de choque térmico (RODRIGUES et al., 2014).

Entre os demais fatores de virulência, recentemente, foi descrita nas amostras de *C. gattii* isoladas no surto da Ilha de Vancouver, a capacidade extremamente rápida dessas células se replicarem em fagócitos (MA et al., 2009). Dados recentes revelaram que esta rápida proliferação é, por sua vez, acionada por um mecanismo conhecido como divisão de trabalho. Em resposta a espécies reativas de oxigênio geradas pelos fagócitos, células criptocócicas intracelulares adotam diferentes destinos. Algumas param de crescer e adquirem uma morfologia atípica que é caracterizada por uma ampla tubularização de suas mitocôndrias, enquanto que as células vizinhas não passam por essa transição. Assim, através de mecanismo ainda não estabelecido, as células que se submetem à alteração morfológica protegem aquelas vizinhas da atividade antimicrobiana dos fagócitos permitindo o aumento da capacidade proliferativa das células como um todo (VOELZ et al., 2014).

### 1.3 Diagnóstico

Devido a manifestações clínicas complexas e atípicas, a meningite criptocócica pode ser facilmente confundida com outras doenças do sistema nervoso central durante seus estágios iniciais, podendo resultar em diagnósticos e tratamentos equivocados (ZHANG et al., 2014). Estratégias de diagnóstico da criptococose são de extrema importância, uma vez que o tratamento adequado de pacientes com AIDS é dependente do diagnóstico precoce (VIVIANI, 1996).

A identificação de leveduras encapsuladas por exame microscópico de amostras clínicas fornece um diagnóstico preliminar de *Cryptococcus* spp. A tinta nanquim, que não penetra na cápsula e cora todo o resto da preparação, pode demonstrar cápsulas negativamente coradas em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR). Este método rápido e simples é muito utilizado em vários hospitais. Entretanto, apresenta sensibilidade e especificidade limitadas, podendo gerar falsos negativos pela baixa quantidade de leveduras no LCR ou a presença de isolados com cápsula muito pequena, além de falsos positivos devido a possibilidade de ser confundido com outras leveduras, e até mesmo bactérias, como *Klebsiella* sp., artefatos ou linfócitos (MAZUELOS e GARCÍA, 2010; ZHANG et al., 2014). Em cortes de tecidos fixados, a presença de *Cryptococcus* sp. também pode ser identificada por meio das

colorações de mucicarmim de Mayer, Grocott-metenammina-prata e Fontana-Masson. Estas colorações, por método direto e histológico, contudo, não fazem qualquer distinção entre as espécies e variedades (GALANIS et al., 2009; SEVERO et al., 2009).

Métodos semi-automatizados e automatizados para a identificação de leveduras, tais como API 20C AUX e VITEK, fornecem resultados dentro de aproximadamente 72h. No entanto, estes testes têm suas próprias limitações, uma vez que eles dependem de exames complementares para identificação completa do isolado (SIDRIM et al., 2010).

Uma das melhores opções para o diagnóstico da criptococose, em termos de alta sensibilidade e resultados rápidos, é a detecção, por aglutinação em látex, do antígeno capsular polissacarídico nos fluidos corporais tais como, LCR, soro e urina. A desvantagem deste método é devido ao uso de um produto importado que tem alto custo (PAPPALARDO e MELHEM, 2003).

Um ensaio de fluxo lateral do antígeno criptocócico (CrAg LFA) foi recentemente introduzido no repertório do diagnóstico da criptococose. O teste semi-quantitativo oferece muitas vantagens, incluindo tempo de resposta rápido e baixo custo (PERFECT e BICANIC, 2015; VIDAL e BOULWARE, 2015).

Jitmuang e colaboradores (2016) avaliando o CrAg LFA para o diagnóstico de criptococose em pacientes HIV-negativos comprovaram uma sensibilidade excelente, sugerindo que este ensaio possa substituir os ensaios convencionais baseados em aglutinação em látex.

Uma vez que nenhum método de diagnóstico tem sensibilidade e especificidade total, uma combinação de vários métodos é recomendada. A cultura, embora mais demorada, é o padrão ouro para o diagnóstico da criptococose (PAPPALARDO E MELHEM, 2003; ZHANG et al., 2014). Apesar do fato de que *Cryptococcus* spp. pode ser recuperado em placas de ágar sangue usadas rotineiramente para cultura bacteriana, meios seletivos e enriquecidos podem melhorar a recuperação dessas leveduras. O ágar semente de niger é utilizado em amostras que podem estar contaminadas com *Candida* e que mascaram o crescimento de *Cryptococcus*. Este meio diferencia as colônias marrons de *Cryptococcus* das brancas de *Candida* pela capacidade do primeiro degradar o ácido caféico até melanina. As espécies de *C. gattii* e *C. neoformans* podem ser distinguidas pela assimilação do ácido málico, fumárico, D-prolina e D-triptofano, que são utilizados somente pela primeira espécie

(MAZUELOS e GARCÍA, 2010). O ágar canavanina-glicina-bromotimol (CGB) permite a diferenciação dessas espécies com base na utilização da glicina e da susceptibilidade à canavanina. As amostras que produzem coloração azul no meio CGB podem ser presuntivamente identificadas como *C. gattii* (FIGURA 5). Entretanto, a confirmação de *C. gattii* exige subtipagem por sorotipo ou genótipo (GALANIS et al., 2009).



Figura 5: Meio de cultivo CGB diferenciando *Cryptococcus neoformans* (amarelo claro) de *Cryptococcus gattii* (em azul) (MAGALHÃES, 2012).

Entre as principais técnicas moleculares de identificação tem-se a hibridização, PCR (“Polymerase Chain Reaction”) e outros métodos baseados em PCR, além de seqüenciamento de regiões específicas do genoma que são amplificadas por meio de PCR, o que é especialmente útil para o diagnóstico de criptococose causada por espécies menos comuns de *Cryptococcus*. Quanto à tipagem do micro-organismo, as seguintes técnicas têm mostrado a melhor capacidade de diferenciar entre sorotipos fúngicos e tipos moleculares: PCR fingerprinting, PCR-RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) e MLST (“Multilocus Sequence Typing”) (SIDRIM et al., 2010).

Atualmente não existem testes de subtipagem comercialmente disponíveis. No entanto, a genotipagem é essencial para a confirmação de *C. gattii*, para a caracterização de isolados de *Cryptococcus* e para a manutenção da vigilância epidemiológica molecular. Os tipos moleculares de *Cryptococcus* spp., são identificados pela técnica de RFLP (GALANIS et al., 2009).

## 1.4 Tratamento da criptococose

Para uma terapia antifúngica eficaz há vários desafios que incluem o diagnóstico, tempo e custo do tratamento, a eficácia dos fármacos e a disponibilidade de drogas (IDNURM e LIN, 2015). Porém, se o diagnóstico for feito precocemente, se os clínicos aderirem aos princípios básicos de algumas diretrizes e se a doença subjacente for controlada, a criptococose pode ser tratada com sucesso na grande maioria dos pacientes. De acordo com as diretrizes de práticas clínicas para o tratamento da doença criptococócica da “Infectious Diseases Society of America” (IDSA) o controle da imunidade do hospedeiro, o local da infecção, a toxicidade do antifúngico e a doença de base são fatores de risco críticos que devem ser considerados durante o tratamento da criptococose (PERFECT et al., 2010).

O tratamento antifúngico de meningite criptococócica baseia-se em três fases distintas: indução, consolidação e terapia de manutenção (CHEN et al., 2010). A fase de indução tem como objetivo alcançar uma atividade fungicida rápida para se obter a esterilização do líquido cefalorraquidiano (LCR) utilizando a combinação de anfotericina B desoxicolato (AMB) (0,7mg/kg/dia) e 5-fluorocitosina (5-FC) (100mg/kg/dia) por duas semanas. A combinação de AMB e 5-FC é mais eficaz do que a AMB sozinha e está associada a uma tendência para uma maior proporção de pacientes que conseguem um LCR estéril em duas semanas e uma reduzida taxa de recaída (PERFECT et al., 2010; WHO, 2011; ANTINORI, 2013; DAY et al., 2013).

Para situações em que 5-FC não estiver disponível, como na maioria dos países em desenvolvimento, a segunda linha de tratamento na indução consiste em AMB associada a dose elevada de fluconazol (FCZ) (0,8-1,2mg/kg/dia). Se AMB não estiver disponível ou não puder ser administrada com segurança (demanda monitorização de função renal e efeitos tóxicos), FCZ em alta dose associado a 5-FC é recomendado (WHO, 2011; GOVENDER et al., 2013; LOYSE et al., 2013).

O tratamento inicial de duas semanas de indução é seguido pela fase de consolidação com o tratamento de 8 semanas com fluconazol (400mg/dia). Itraconazol (400mg/dia) pode ser usado como alternativa para pacientes com intolerância ao fluconazol. A fase de manutenção ou profilaxia secundária no tratamento da meningite criptococócica em indivíduos infectados pelo HIV é imperativa a fim de evitar a elevada taxa de recidivas dessa

doença (PERFECT et al., 2010; WHO, 2011; ANTINORI, 2013; DAY et al., 2013; VIDAL et al., 2013).

Um determinante do resultado da terapia na meningite criptocócica é o controle da pressão do líquido cefalorraquidiano e o tratamento precoce do aumento da pressão intracraniana. A hipertensão intracraniana (HIC) é definida como a pressão liquórica inicial medida por raquimaniometria  $\geq 20$  mm Hg com o paciente em decúbito lateral, e ocorre em aproximadamente 50% dos pacientes com neurocriptococose, contribuindo para significativo aumento da morbi-mortalidade da doença. A principal intervenção recomendada para a redução da HIC é a punção lombar intermitente (MORETTI et al., 2008; ANTINORI, 2013; VIDAL et al., 2013; SLOAN e PARRIS, 2014). A ressecção de grandes criptocomas cerebrais deve ser considerada quando a resposta às drogas antifúngicas for pobre. Lesões múltiplas geralmente não são passíveis de remoção cirúrgica e exigem a terapia prolongada de indução/erradicação. A duração do tratamento antifúngico depende, principalmente, da resposta clínica (CHEN et al., 2010).

Em comparação com *C. neoformans*, a infecção intracraniana por *C. gattii* está associada com maior taxa de sequelas neurológicas e intervenções neurocirúrgicas e atraso na resposta à terapia. Essas diferenças são, principalmente, devido a uma maior proporção de lesões de massa cerebral (criptocomas) na infecção por *C. gattii* (MITCHELL et al., 1995; CHEN et al., 2010; CHAN et al., 2014).

## 1.5 Agentes antifúngicos

O arsenal terapêutico antifúngico, de certa forma, tem aumentado nos últimos anos, buscando atender a uma demanda crescente na micologia médica. A partir da década de 1980, alguns fatos, como o desenvolvimento nos métodos de diagnóstico, aumento nas septicemias por leveduras, uso de procedimentos invasivos ou, até mesmo, o surgimento de novas doenças imunossupressoras, como a AIDS, por exemplo, têm pressionado a indústria químico-farmacêutica no sentido de buscar novas alternativas de fármacos para o tratamento das infecções fúngicas (ROCHA e SIDRIM, 2010).

Os fungos são eucariotos, como seu hospedeiro humano e, dessa maneira, tornam-se um desafio para identificar novas terapêuticas antifúngicas específicas. Há um repertório limitado

de antifúngicos em uso clínico e a resistência às drogas e a toxicidade para o hospedeiro podem comprometer sua utilidade clínica (XIE et al., 2014).

A maioria dos agentes antifúngicos interfere na biossíntese ou na integridade do ergosterol, principal esteroide da membrana citoplasmática fúngica. Uma exceção são as equinocandinas, que causam ruptura de parede celular (FIGURA 6). Os principais fármacos antifúngicos podem ser agrupados em cinco classes: polienos, azólicos, alilaminas, equinocandinas e outros agentes (griseofulvina e 5-flucitosina) (CHEN e SORRELL, 2007).

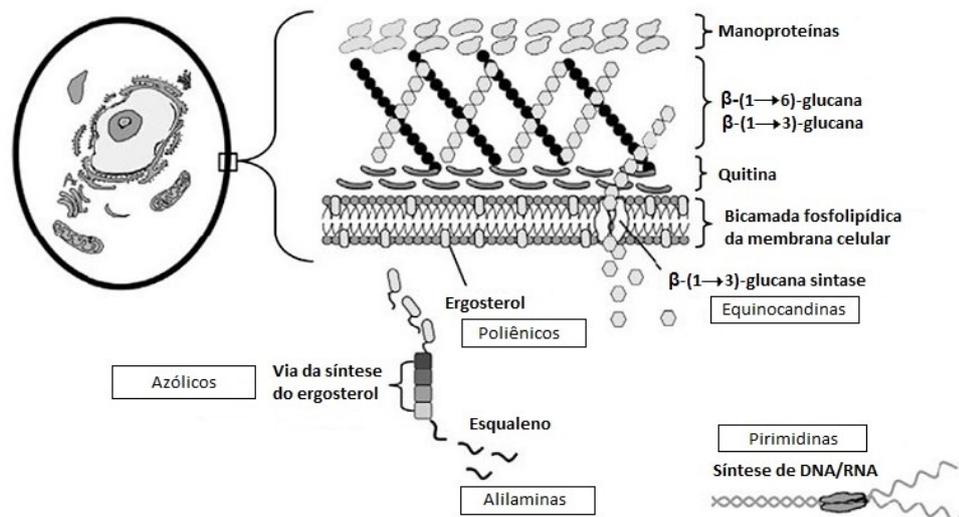


Figura 6: Alvos dos atuais antifúngicos sistêmicos disponíveis (THOMPSON et al., 2009).

### 1.5.1 Polienos

De 1950 até a descoberta dos azólicos, os polienos, como a Anfotericina B (AMB) representavam o padrão ouro de terapia sistêmica para infecções fúngicas. Os polienos, representados pela AMB e pela nistatina, são moléculas produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces* que se ligam ao ergosterol presente na membrana celular fúngica (ODDS et al., 2003). Este processo perturba a permeabilidade da membrana celular, formando poros e causando o efluxo de potássio e moléculas intracelulares, levando à morte fúngica. Recentemente, foi descrito que AMB pode também provocar morte celular por um forte estresse oxidativo (SANGALLI-LEITE et al., 2011). A resistência à AMB já foi descrita em algumas espécies de *Candida* e *Aspergillus* (KRCMERY E BARNES, 2002; CHAMILOS e KONTOYIANNIS, 2005). Essa resistência tem sido relacionada com a diminuição dos níveis de ergosterol na membrana plasmática (LEON et al., 2011). Recentemente, Mandal e

colaboradores (2014) comprovaram uma diminuição na sensibilidade de amostras de *Candida* à AMB em meios com altos níveis de glicose. Foi verificado que há a formação de um complexo antifúngico-glicose diminuindo a quantidade da droga disponível (MANDAL et al., 2014).

A toxicidade aguda de AMB desoxicolato inclui náuseas, vômitos, calafrios, febre, hipertensão ou hipotensão e hipóxia. Seu efeito adverso crônico principal é a nefrotoxicidade. A AMB produz lesão renal provavelmente por uma variedade de mecanismos, causando manifestações clínicas como insuficiência renal, hipomagnesemia, hipocalemia, e poliúria, devido ao diabetes *insipidus* nefrogênico (LANIADO-LABORÍN e CABRALES-VARGAS, 2009). A necessidade de administração intravenosa, monitorização de hemograma e função renal, e a presença de efeitos tóxicos podem, frequentemente, dificultar o uso de AMB em ambientes hospitalares com poucos recursos e escassez de pessoal (LOYSE et al., 2013).

Na tentativa de evitar a nefrotoxicidade presente na AMB desoxicolato, outras formulações têm sido desenvolvidas. As preparações lipídicas incluem: anfotericina B lipossomal, complexo lipídico de anfotericina B, e a dispersão coloidal de anfotericina B. Embora menos tóxicas, essas formulações apresentam um alto custo, o que impede a mudança do convencional para as preparações lipídicas em países de baixa renda (LOYSE et al., 2013).

O amplo espectro antifúngico e a experiência com o uso da AMB levam à continuidade de seu uso, apesar das preocupações com a toxicidade. A penetração no LCR é pobre, e ainda assim esta droga é eficaz no tratamento de algumas causas de meningite fúngica como a criptococose (GHANNOUM e RICE, 1999; CHEN E SORRELL, 2007; THOMPSON et al., 2009).

A nistatina apresenta características farmacodinâmicas e estrutura química semelhantes à AMB (FIGURA 5), e é utilizada principalmente na formas de creme para o tratamento da candidíase vaginal (MARTINS et al., 2012).

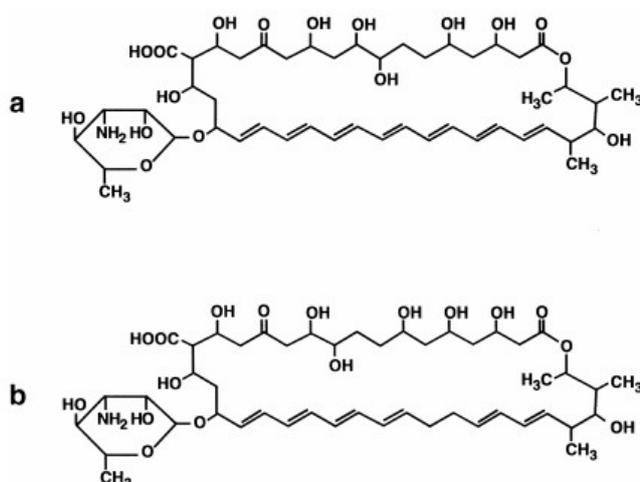


Figura 7: Estruturas químicas dos polienos anfotericina B (a) e nistatina (b) (GROLL et al., 1999).

### 1.5.2 Azólicos

O grupo dos azólicos inibe o crescimento dos fungos por interferir na biossíntese do ergosterol. A droga se liga e inibe a enzima  $14\alpha$ -demetilase envolvida na conversão de lanosterol em ergosterol. Como resultado, o conteúdo do ergosterol na membrana se esgota e a estrutura e funções da membrana são alteradas, inibindo o crescimento fúngico (THOMPSON et al., 2009; PFALLER, 2012). Existem dois grupos utilizados na prática clínica: os imidazólicos (cetoconazol, miconazol, clotrimazol e econazol) e os triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol). Como os triazólicos têm maior afinidade pelas enzimas fúngicas do citocromo P450, comparando-se com a dos mamíferos, seu perfil de segurança é significativamente melhor que dos imidazólicos. O uso dos imidazólicos é limitado ao tratamento de micoses superficiais, enquanto os triazólicos têm grande aplicação na terapia das infecções invasivas e superficiais (CHEN e SORREL, 2007). Fluconazol, voriconazol e posaconazol são os mais utilizados no tratamento das infecções fúngicas invasivas (ROEMER e KRYSAN, 2014). O mais novo azólico, lançado em 2015, é chamado isavuconazol. Este triazólico de segunda geração apresenta boa disponibilidade, menos interações medicamentosas, amplo espectro de ação e é indicado no tratamento de aspergilose invasiva e mucormicose (MICELI e KAUFFMAN, 2015; RYBAK et al., 2015).

O fluconazol (FCZ) (FIGURA 8) continua a ser um dos triazólicos mais frequentemente prescritos no tratamento das infecções fúngicas por sua boa penetração no sistema nervoso central e seu perfil de tolerabilidade aos efeitos colaterais (SIONOV et al., 2009). Seus efeitos colaterais são distúrbios gastrointestinais, tonturas e prurido. Apesar de

rara, a hepatotoxicidade já foi relatada em pacientes no tratamento com FCZ. Esse antifúngico tem boa atividade contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus*. No entanto, a resistência à droga já é relatada em algumas amostras desses gêneros (SOARES et al., 2008; CHONG et al., 2012). Os mecanismos de resistência mais comuns nesses patógenos incluem uma produção aumentada da enzima alvo, bombas de efluxo e mutações no gene alvo (GHANNOUM e RICE, 1999; CHEN e SORRELL, 2007; SIONOV et al., 2009; THOMPSON et al., 2009).



Figura 8: Estrutura química do fluconazol (KATHIRAVAN et al., 2012)

### 1.5.3 Alilaminas

A classe das alilaminas foi descoberta por acaso durante um programa de pesquisa química para síntese de novas drogas que atuassem no sistema nervoso central. Uma reação química inesperada rendeu um produto com uma estrutura química inédita que, quando avaliado em ensaios rotineiros de triagem biológica, demonstrou ser um composto com excelente atividade antifúngica que mais tarde foi nomeado naftifina (BIRNBAUM, 1990). O sucesso dessa alilamina como antifúngico de uso tópico levou à pesquisa de novas drogas que possuíssem biodisponibilidade sistêmica, que resultou apenas na terbinafina, que tinha a combinação necessária de eficácia e segurança para a formação de um novo medicamento. Muitos laboratórios têm tentado desenvolver novas alilaminas, mas sem sucesso nos últimos anos (ODDS, 2003).

As alilaminas (FIGURA 9) agem inibindo passos iniciais da biossíntese do ergosterol, causando o acúmulo do precursor de esterol, esqualeno, além da falta de outros intermediários da cadeia. Este fato sugere que a inibição da síntese de esterol pelas alilaminas ocorra na fase de epoxidação do esqualeno, uma reação catalisada pela enzima esqualeno epoxidase. A morte fúngica ocorre mais devido ao acúmulo de esqualeno do que pela deficiência no

ergosterol. Altos níveis de esqualeno provocam a permeabilidade da membrana levando à perturbação da organização celular (GHANNOUM e RICE, 1999). A terbinafina é muito utilizada no tratamento de infecções por dermatófitos e é o antifúngico de escolha no caso de onicomicoses (ODDS, 2003, CHEN e SORREL, 2007). Guerra e colaboradores (2012) comprovaram, *in vitro*, a atividade antifúngica desta droga contra amostras de *Cryptococcus neoformans*.

O uso da terbinafina via oral é geralmente bem tolerado, mas pode causar distúrbios gastrintestinais, alteração do paladar e elevações transitórias das enzimas hepáticas. Embora sejam relativamente raros, existem relatos de lesão hepática aguda com o uso desse antifúngico (YAN et al., 2014). A redução da dose pode ser necessária no caso de doença hepática crônica (CHEN e SORREL, 2007) A naftifina é uma alilamina de uso tópico, utilizada para tratar dermatomicoses superficiais (GUPTA et al., 2008).

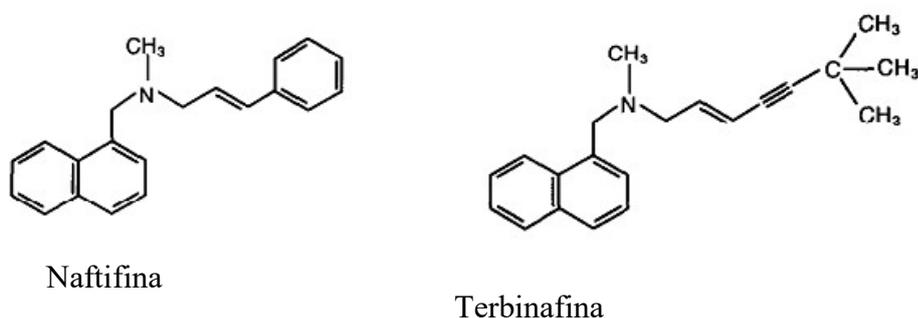


Figura 9: Estruturas dos antifúngicos pertencentes ao grupo das alilaminas: Naftifina e Terbinafina (SHEAR et al., 1992).

#### 1.5.4 Equinocandinas

As equinocandinas (FIGURA 10) são grandes moléculas de lipopeptídeos que inibem a síntese de um constituinte da parede celular fúngica. Esse grupo de antifúngicos inibe a síntese da  $\beta(1-3)$  glucana inativando a  $\beta(1-3)$  glucana sintetase, uma enzima com duas subunidades Fksp e Rho1p. Essa ação danifica a parede celular fúngica sem causar danos aos mamíferos, pois não apresentam alvo semelhante para a droga. *In vitro* e *in vivo* as equinocandinas são fungicidas contra *Candida* spp. e fungistáticas contra *Aspergillus* spp.

Este grupo não é ativo em concentrações relevantes contra zigomicetos, *Cryptococcus* spp. e *Fusarium* spp, por mecanismos ainda desconhecidos. Neste grupo de compostos estão os antifúngicos caspofungina, micafungina e anidulafungina (SHOR et al.,2016).

Os efeitos colaterais das equinocandinas são geralmente moderados como, febre, náusea, alterações nos exames de função hepática e leve hemólise (DENNING et al., 2003). A baixa absorção oral dessas drogas limita seu uso à via intravenosa apresentam boa distribuição nos tecidos, exceto no SNC e olhos. Terapias combinadas utilizando uma equinocandina têm sido consideradas promissoras para o tratamento da aspergilose (CHEN et al., 2011). Recentemente, tem sido relatados casos de resistência de espécies de *Candida* ao tratamento com equinocandinas (ALEXANDER et al., 2013; CASTANHEIRA et al., 2014). Essa resistência está relacionada a mutações do gene FKS que codifica a subunidade Fksp da  $\beta(1-3)$  glucana sintetase (BAL, 2010; ALEXANDER et al., 2013).

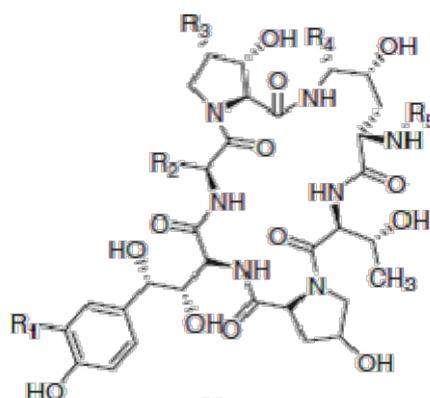


Figura 10: Estrutura geral das equinocandinas (KATHIRAVAN et al.,2012)

### 1.5.5 Griseofulvina

A griseofulvina (FIGURA 11) é um metabólito secundário do fungo *Penicillium griseofulvum* que bloqueia a organização dos microtúbulos dentro das células fúngicas sensíveis, sem exercer efeitos semelhantes em células de mamíferos. Seu espectro de ação é limitado aos dermatófitos e é utilizada principalmente nas infecções do couro cabeludo e, além disso, alguns casos de resistência têm sido relatados (ODDS, 2003, GROVER et al., 2012). Vários efeitos adversos foram observados com o uso da griseofulvina (cutâneos,

gastrointestinais, sanguíneos, hepáticos e neurológicos) (KNASMÜLLER et al., 1998; MARTINEZ et al., 2014).

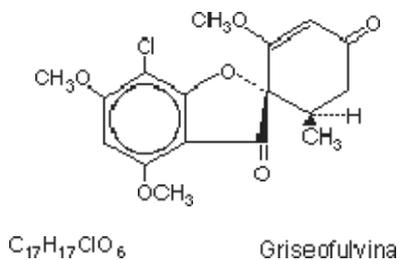


Figura 11: Estrutura química da Griseofulvina (FINKELSTEIN et al., 1996).

### 1.5.6 5-flucitosina

A 5-flucitosina (5-F) é um membro único do grupo das pirimidinas (FIGURA 12). O composto foi obtido inicialmente como uma potencial droga anticâncer. Sua atividade antifúngica foi descoberta em pesquisas de triagem e, atualmente, ainda é utilizada no tratamento adjuvante com anfotericina B em infecções como a criptococose. Sua especificidade antifúngica vem do fato de que, os fungos, mas não as células humanas, possuem as enzimas necessárias para absorver a 5-F e convertê-la internamente para o 5-fluorouracil que se incorpora no RNA, causando uma terminação de cadeia prematura e inibindo a síntese de DNA através dos efeitos sobre a timidilato-sintase. A maioria dos fungos filamentosos não têm esta enzima e, portanto, o espectro de ação da 5-flucitosina é restrito às leveduras patogênicas (KATHIRAVAN et al., 2012).

A 5-F não deve ser administrada em monoterapia devido ao rápido desenvolvimento de resistência e seu uso deve ser monitorado devido a sua hepatotoxicidade e mielotoxicidade. A resistência a 5-F pode ocorrer por mutações, que resultam em uma deficiência das enzimas necessárias ao transporte celular e absorção da droga ou seu metabolismo, ou pode ser também devido a um aumento na síntese de pirimidinas, que competem com os antimetabólitos fluorados da 5-F e, assim, diminuem sua atividade antifúngica (STEIER et al., 2013). O uso da 5-F não é disponível em muitos países em desenvolvimento, inclusive no Brasil (VERMES et al. 2000; ODDS, 2003; CHEN e SORRELL, 2007; PAPPAS, 2010). As principais barreiras para o acesso à 5-flucitosina são a ausência de registro do medicamento e da fabricação de genéricos em países de baixa renda (LOYSE et al., 2013).



Figura 12: Estrutura química da 5-flucitosina (KATHIRAVAN et al.,2012)

Na atual terapêutica das infecções fúngicas o repertório de antifúngicos em uso clínico é limitado e a resistência às drogas e a toxicidade para o hospedeiro comprometem sua utilidade clínica (XIE et al., 2014). Adicionalmente, tem-se a necessidade de uso em longo prazo de antifúngicos em indivíduos imunocomprometidos e o alto custo associado ao tratamento dessas infecções (LIN, 2009; LOYSE et al.,2013). Portanto, a descoberta de novos compostos com baixa toxicidade, alta seletividade e amplo espectro de ação é fundamental para o tratamento eficaz das infecções fúngicas (MARTINS et al., 2008; GULLO et al., 2013).

## 1.6 Aliliminas

As aliliminas têm suas estruturas semelhantes ao grupo das alilaminas, uma vez que apresentam uma dupla ligação próxima ao átomo de nitrogênio presente na molécula. Manrao e colaboradores (2007) avaliaram diversas aliliminas variando seus grupos substituintes (metila, cloro, nitro e hidroxil) nas posições *orto*, *meta* e *para* no anel proveniente da amina, contra fungos fitopatogênicos. A alilimina cinamal-4-toluidina foi a mais ativa contra os fungos *Fusarium oxysporum*, *Myrothecium roridum* e *Ustilago tritici*, enquanto o composto cinamal-2-hidroxianilina foi ativo contra a espécie *Alternaria alternata*.

Por apresentarem uma ligação C=N, as aliliminas também são consideradas bases de Schiff ou aldiminas. Em nosso grupo de pesquisa nove aldiminas foram testadas demonstrando boa atividade anti-criptocócica (MAGALHÃES et al.,2013). Além disso, foi verificado que a adição de um grupamento CH=CH entre o anel aromático proveniente do aldeído e o grupamento C=N, gerando as aliliminas, levou a um aumento considerável no potencial antifúngico dessas moléculas. As aliliminas 3D5 e 3D7 (FIGURA 13) foram ativas

contra amostras clínicas e de referência de *C. gattii* e *C. neoformans*, sendo ativas, inclusive, contra o biofilme do último. A alilimina 3D5 foi capaz de inibir o crescimento de amostras de *C. neoformans* com valores de concentração inibitória mínima (CIM) que variaram de 1,4 a 4,0  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto para amostras de *C. gattii* os valores de CIM foram de 1,0 a 5,7  $\mu\text{g/mL}$ . Para a alilimina 3D7 os valores de CIM variaram de 1,0 a 2,8  $\mu\text{g/mL}$  contra as linhagens de *C. neoformans* e 1,4 a 11,3  $\mu\text{g/mL}$  para *C. gattii*. Ambas as substâncias foram capazes de, no valor da CIM, inibir a progressão do biofilme de *C. neoformans* com porcentagens de inibição acima de cinquenta por cento (MAGALHÃES, 2012). Dessa forma, esse grupo de moléculas pode ser promissor no tratamento da criptococose e seu mecanismo de ação e seu comportamento em modelo de infecção *in vivo* devem ser investigados.



Figura 13: Estruturas das aliliminas 3D5 e 3D7 com potencial anticriptocócico já comprovado em nosso grupo de pesquisa.

## 1.7 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacarídeos macrocíclicos que contêm unidades de D-glucopiranosose ligadas em conjunto formando estruturas cíclicas cônicas consistindo em um exterior hidrofílico e uma cavidade interior hidrofóbica (WILLIAMS et al., 2013; MENDES et al., 2016). Tal cavidade permite às ciclodextrinas complexarem moléculas que apresentem dimensões compatíveis e alterarem suas propriedades físico-químicas, como solubilidade em água, estabilidade e biodisponibilidade (FRACETO et al., 2007). Ciclodextrinas com seis, sete e oito unidades de glicose são conhecidas como  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha\text{CD}$ ),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta\text{CD}$ ) e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma\text{CD}$ ), respectivamente (MENDES et al., 2016). Dentre as várias formulações farmacêuticas utilizando-se ciclodextrinas, a  $\beta$ -ciclodextrina é a mais comumente utilizada devido ao seu preço baixo e sua facilidade de produção (KURKOV e LOFTSSON, 2013). O antifúngico itraconazol, por ter baixa solubilidade em meio aquoso, é

comercializado na forma complexada em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (JAMBHEKAR e BREEN.,2016).

## 1.8 Ensaios de toxicidade

Dentre os diversos estudos necessários para o desenvolvimento de novos fármacos, os testes de toxicidade são de importância primordial. A citotoxicidade é um fator importante na compreensão dos mecanismos de ação das substâncias nas células e tecidos. Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de drogas, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Existem vários benefícios na utilização de testes *in vitro*, como a redução do uso de animais em estudos e a capacidade de se determinar os alvos específicos da toxicidade da droga (PUTNAM et al., 2002).

Os testes de citotoxicidade consistem em colocar a substância direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes metodologias, contagem celular, ensaios clonogênicos, medida de incorporação de nucleotídeos radioativos ou métodos colorimétricos (FRESHNEY, 2001; HENRIKSSON et al., 2006.). Os ensaios colorimétricos são vantajosos, pois podem ser otimizados permitindo que muitas amostras sejam analisadas rápida e simultaneamente (VEGA-AVILA e PUGSLEY, 2011).

Existem diferentes ensaios colorimétricos, dentre os quais podem ser citados (HENRIKSSON et al., 2006):

- MTT: (sais de tetrazólio), Brometo de 3-(4,5- dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Este método consiste no ensaio de proliferação celular que quantifica a habilidade das células viáveis de reduzirem o sal amarelo de tetrazólio a cristais púrpuros de formazana insolúveis em água, usando uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. O ensaio detecta células metabolicamente ativas e a leitura é feita em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

- XTT: (hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[fenilamina]carbonil]-2H-tetrazólio). Este ensaio também avalia a atividade das células vivas pelas desidrogenases mitocondriais. Difere-se do ensaio do MTT por formar um produto de formazana que é

solúvel em água. Este fato exclui o uso do solvente dimetilsulfóxido para solubilizar os cristais de formazana, como necessário no caso do MTT (PUTNAM et al., 2002).

- Resazurina: Este composto é um corante solúvel em água que é utilizado para quantificar a viabilidade celular; é extremamente estável e não tóxico para as células. A forma oxidada da resazurina entra no citosol e é convertida por enzimas mitocondriais. A coloração do meio muda de azul índigo para rosa fluorescente (VEGA-AVILA e PUGSLEY, 2011).

- Sulforrodamina B (SRB): O princípio do ensaio da sulforrodamina B baseia-se na habilidade que este composto tem de se ligar a componentes protéicos das células fixadas pelo ácido tricloroacético, sendo uma quantificação colorimétrica da proteína celular. Assim, esse método independe da atividade metabólica das células, ao contrário do MTT (PUTNAM et al., 2002).

Outro modelo experimental utilizado para avaliação da toxicidade *in vitro* é o ensaio de hemólise. Esse teste tem sido utilizado em testes de triagem de novas drogas correlacionando sua atividade hemolítica com a citotoxicidade (NOLAN.,1981; CHOI et al., 2011; EVANS et al., 2013).

A toxicidade de uma droga pode também ser avaliada quanto ao seu dano no material genético da célula, caracterizando assim a genotoxicidade. O ensaio do cometa (eletroforese em gel de única célula) é um método simples e sensível para o estudo de danos no DNA. Nesta técnica, um pequeno número de células em suspensão em um gel de agarose fino sobre uma lâmina de microscópio é lisado, separado por eletroforese, e corado com um corante fluorescente com afinidade ao DNA (SPEIT e HARTMAN, 2012). O nome cometa vem da semelhança da imagem obtida neste método (FIGURA 14) com a do corpo astronômico, a cabeça consistindo no DNA intacto e a cauda contendo as partes danificadas do mesmo. Essa forma é gerada na eletroforese, quando o DNA migra para fora da célula. A distribuição do DNA ao longo do cometa correlaciona-se com a extensão do seu dano (FIKROVA et al., 2011).

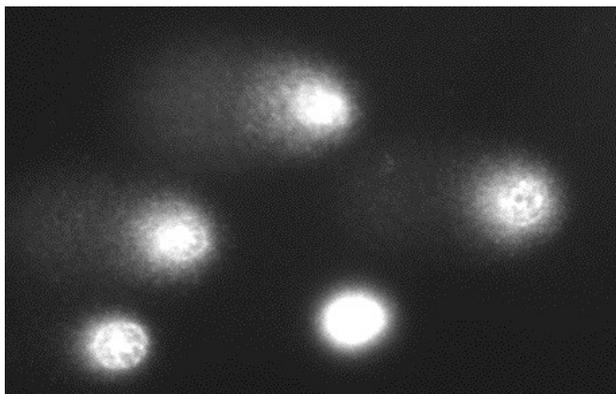


Figura 14: Imagem característica do cometa visualizada neste teste (arquivo pessoal)

Esse ensaio tem múltiplas aplicações na pesquisa avaliando-se dano ao DNA, em testes de genotoxicidade de novos produtos químicos e farmacêuticos, biomonitoramento ambiental, e monitoramento da população humana (SINGH et al., 1988; SPEIT e HARTMAN, 2012; COLLINS et al., 2014).

### 1.9 Modelos *in vivo* de criptococose

Os modelos de infecções experimentais ocupam uma posição essencial no estudo das doenças infecciosas como um resultado de problemas éticos da exposição de seres humanos a agentes potencialmente letais (WILES et al., 2006). Para a melhor compreensão da patogênese da criptococose, numerosos modelos *in vivo* e *in vitro* têm sido desenvolvidos para investigação das características da doença e responder questões como o curso da infecção, invasão de barreiras celulares e interações e evasão da resposta imune (SABIITI et al., 2012).

O principal modelo animal para estudos de criptococose tem sido o camundongo. Esses animais são susceptíveis à infecção e podem ser estudados em número suficiente para permitir a comparação de uma variedade de regimes de tratamento (NAJVAR et al., 1999). A infecção com *Cryptococcus* spp. pode ser realizada por uma variedade de métodos, incluindo as vias intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intravenosa e por inalação, o que amplia as oportunidades experimentais (SABIITI et al., 2012). Doenças fúngicas adquiridas por inalação de propágulos infecciosos, como a criptococose, podem ser reproduzidas pela injeção de uma suspensão de fungos via intranasal ou intratraqueal ou por inalação de células

fúngicas em modelos murinos. A vantagem da utilização de suspensões fúngicas para a infecção intranasal ou intratraqueal é que o inóculo pode ser precisamente quantificado e calibrado para se ter a mínima variabilidade inter-experimental. Além disso, esse método permite que uma ampla gama de inóculos sejam experimentados e, combinada com o uso da via intratraqueal, assegura que a quantidade real atinja os pulmões (HOHL, 2014).

Parâmetros experimentais clássicos que são, na maioria das vezes, avaliados em modelos animais de infecções fúngicas incluem carga fúngica do órgão, histopatologia de órgãos e sobrevivência (HOHL, 2014).

Modelos murinos de meningite criptocócica fornecem uma poderosa ferramenta para a avaliação de drogas antifúngicas, principalmente, porque os testes de susceptibilidade às drogas antifúngicas *in vitro* não têm um histórico comprovado de prever respostas clínicas. Além disso, experimentos bem desenhados e executados com animais podem facilmente demonstrar os efeitos (positivos ou negativos) da combinação de antifúngicos, ao mesmo tempo incorporando características clínicas conhecidas associadas com a resposta ao tratamento (LARSEN et al., 2006).

## 2 JUSTIFICATIVA

A incidência e a prevalência de micoses graves continuam a ser um problema de saúde pública. Apesar do tratamento com antifúngicos novos ou aqueles já estabelecidos, estas infecções são uma importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente, em pacientes imunocomprometidos. A criptococose é uma micose invasiva e de ocorrência mundial. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são os principais agentes etiológicos e afetam pacientes tanto imunocomprometidos quanto imunocompetentes. *C. neoformans* é o patógeno mais comumente encontrado em infecções do sistema nervoso central em pacientes HIV positivos. As infecções por *C. gattii*, no entanto, estão associadas a mais complicações neurológicas, uma resposta mais tardia à terapia e maior incidência de intervenções neurocirúrgicas. Apesar de existirem no mercado fármacos para o tratamento dessas infecções, existem problemas quanto ao espectro de ação, os custos e os efeitos adversos como a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, além da resistência a algumas drogas. Dessa forma, torna-se necessária a busca por novos compostos com atividade antifúngica e novos mecanismos de ação.

As aliliminas apresentam estruturas semelhantes ao grupo de antifúngicos alilaminas, contendo uma ligação dupla próxima ao átomo de nitrogênio presente na molécula. Baseando-se em resultados de estudos preliminares com os compostos 3D5 e 3D7, as aliliminas podem se constituir em alternativas terapêuticas para a criptococose por apresentarem atividade contra seus agentes.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Pesquisar a atividade antifúngica de vinte e duas aliliminas contra amostras clínicas e de referência de *Cryptococcus* spp., selecionar a mais ativa e menos tóxica e investigar sua atividade antifúngica contra fungos de importância clínica.

#### 3.2 Objetivos específicos

- 1 Determinar as concentrações inibitórias mínimas dos compostos contra amostras clínicas e de referência de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* e de outros fungos e bactérias de importância médica.
- 2 Avaliar a citotoxicidade dos compostos mais ativos em eritrócitos e em células das linhagens, renal e pulmonar humanas.
- 3 Avaliar a genotoxicidade dos compostos selecionados mais ativos e menos citotóxicos.
- 4 Selecionar a alilimina mais ativa e menos tóxica e avaliar sua atividade fungicida ou fungistática contra amostras *C. gattii* e *C. neoformans*.
- 5 Determinar a curva de morte da alilimina selecionada contra a amostra de *C. gattii* L27/01
- 6 Avaliar a atividade do composto selecionado em combinação com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol.
- 7 Investigar os efeitos da alilimina na cápsula, síntese de melanina, atividade de lacase, potencial zeta e parede celular.

- 8 Testar a alilimina mais ativa, pura e complexada em ciclodextrina, em monoterapia e associada com antifúngicos em modelo *in vivo* de criptococose causada por *C. gattii* avaliando a carga fúngica e o tempo de sobrevivência.
- 9 Analisar, por meio do teste SHIRPA, o efeito dos tratamentos nas alterações comportamentais dos animais infectados com *C. gattii*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma a seguir (FIGURA 15) resume os procedimentos adotados para a definição da atividade antifúngica das alilimas estudadas.

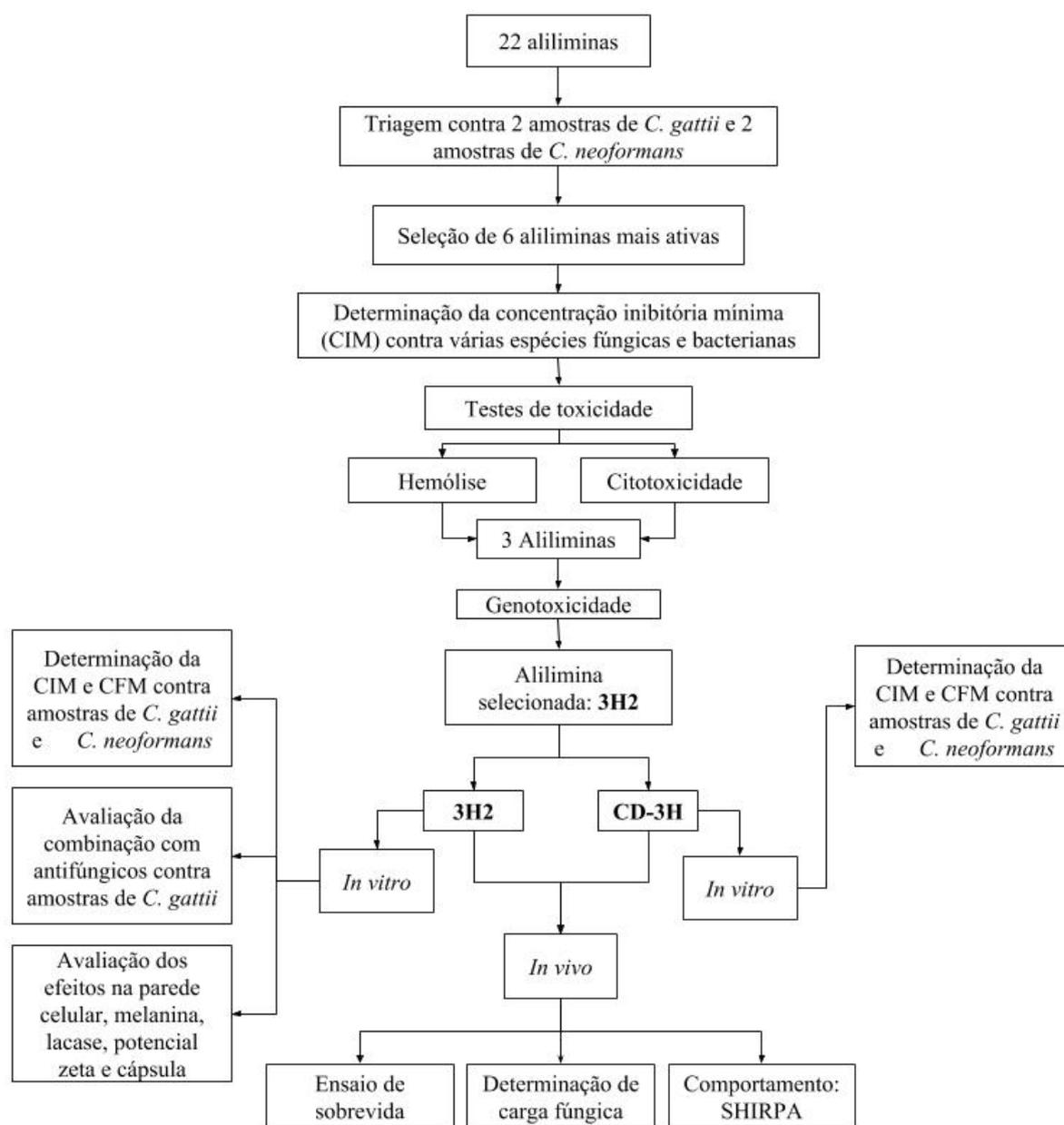
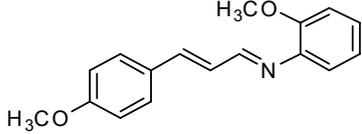
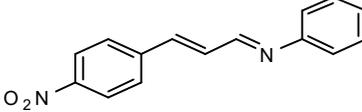
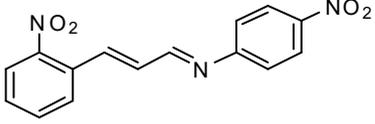
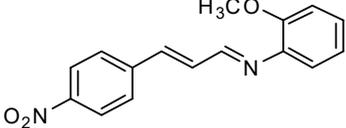
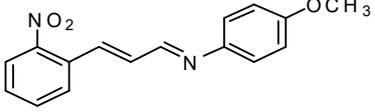
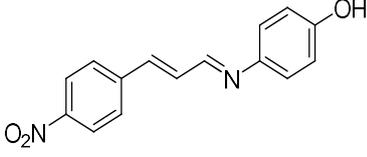
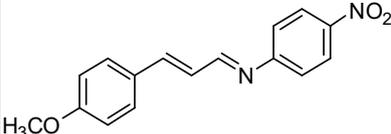
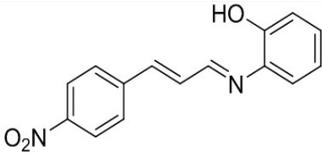


Figura 15: Fluxograma demonstrando, em resumo, os testes realizados no desenvolvimento da pesquisa da atividade antifúngica das alilimas. CD-3H – complexo de 3H2 em  $\beta$ -ciclodextrina. CIM – concentração inibitória mínima; CFM – concentração fungicida mínima.

## 4.1 Aliliminas

Os compostos utilizados apresentados no quadro a seguir foram sintetizados pelo Grupo de Estudos em Química Orgânica e Biológica (GEQOB) do Departamento de Química/ICEx da UFMG, coordenado pelo Prof. Dr. Ângelo de Fátima.

Código	Estrutura Química	Código	Estrutura Química
3D7		3G2	
3G3		3G7	
3G4		3G8	
3G5		3G9	
3G6		3G10	
3H4		3H2	
H5		3H9	

3H6		3H10	
3H7		3I2	
3H8		3I3	
3I4		3I5	

Quadro 1: Códigos e estruturas químicas das aliliminas utilizadas neste estudo.

## 4.2 Micro-organismos

Neste estudo foram utilizadas amostras de fungos de origem clínica, ambiental e de referência pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. As bactérias testadas foram cedidas gentilmente pela Professora Simone Gonçalves dos Santos do Laboratório de Microbiologia Oral e de Anaeróbios da UFMG. O QUADRO 2 exhibe os micro-organismos testados e suas origens.

Fungos							
<i>Cryptococcus gattii</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Fonsecaea pedrosoi</i>		<i>Candida spp.</i>	
Amostras	Origem	Amostras	Origem	Amostras	Origem	Amostras	Origem
ATCC 24065	Amostra referência	ATCC 24067	Amostra referência	ATCC 46428	Amostra referência	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	Amostra referência
ATCC 32608	Amostra referência	ATCC 28957	Amostra referência	F. p.1	clínica	<i>C. krusei</i> ATCC 20298	Amostra referência
135L/03	clínica	ATCC 62066	Amostra referência	F. p.3	clínica	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Amostra referência
L28/02	clínica	H99	Amostra referência	F. p. 5	clínica	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	Amostra referência
23/10993	clínica	F10	clínica	F. p.7	clínica	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	Amostra referência
196L/03	clínica	RN01	clínica	F. p.8	clínica	<i>Aspergillus spp.</i>	
1913/ER	clínica	C31	clínica	F. p. 9	clínica	Amostras	Origem
547 OTTI	ambiental	Wp	clínica	F. p.10	clínica	<i>A. fumigatus</i> ATCC 16913	Amostra referência
L27/01	clínica	5396	clínica	F. p. 11	clínica	<i>A. flavus</i> IMI 190443	Amostra referência
LMM 818	clínica	96806	clínica	F. p.13	clínica	<i>A. clavatus</i>	clínica
L24/01	clínica	27JF	clínica	F. p.14	clínica	<i>A. niger</i>	clínica
29/10893	clínica	28JF	clínica	F. p.15	clínica	<i>A. clavatus</i>	clínica
						<i>A. niger</i>	clínica
Bactérias							
Amostras		Origem		Amostras		Origem	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		Amostra referência		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13882		Amostra referência	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433		Amostra referência		<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606		Amostra referência	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		Amostra referência		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		Amostra referência	

Quadro 2: Relação das amostras utilizadas neste estudo.

### 4.3 Triagem inicial das aliliminas - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de 22 aliliminas contra amostras de *Cryptococcus spp.*

Para a avaliação da atividade antifúngica das 22 aliliminas estudadas foi realizado o teste da concentração inibitória mínima contra duas amostras de *Cryptococcus neoformans* e duas de *C. gattii*. Para isso, foi utilizado o método da microdiluição em caldo, conforme proposto pelo documento M27-A3 do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2008). Os antifúngicos fluconazol (FCZ) (Pfizer) e anfotericina B (AMB) (Sigma) foram utilizados como controles positivos.

Uma solução inicial de cada composto testado e da anfotericina B foi preparada utilizando-se como solvente o dimetilsulfóxido (DMSO) e o meio RPMI 1640 (Sigma) como diluente. O fluconazol foi dissolvido em água destilada esterilizada. Em seguida foram feitas diluições seriadas de modo que as concentrações testadas dos compostos variassem de 128 µg/mL a 0,25 µg/mL, para AMB de 16 µg/mL a 0,003 µg/mL e para o fluconazol de 64 µg/mL a 0,125 µg/mL. Posteriormente, alíquotas de 100 µL de cada concentração foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição de 96 poços. Como controle de crescimento e de esterilidade foi usado somente o RPMI, sem a adição do composto e solvente. Como controle de toxidez do solvente foi usado o meio de cultura, juntamente com o solvente (JOHANN et al., 2010). A cada orifício teste e de controle de crescimento foram acrescentados 100 µL de inóculo fúngico. As placas foram incubadas a 35°C por 72 horas. A leitura foi realizada visualmente (CLSI, 2008). Para as aliliminas e para AMB a CIM foi considerada a menor concentração que inibiu 100% do crescimento microbiano, após incubação. A CIM do fluconazol foi definida como a menor concentração que inibiu 50% do crescimento fúngico.

A partir dos resultados da triagem inicial com as 22 aliliminas estudadas, seis compostos mais ativos foram selecionados para maiores investigações de atividade antifúngica. Esses compostos tiveram também suas CIMs determinadas contra amostras de *Candida* spp., *Aspergillus* spp., e *Fonsecaea pedrosoi*. As placas com essas amostras foram incubadas a 35°C, sendo que o tempo de incubação foi de 48 horas para as primeiras e cinco dias para a última.

### **4.3.1 Preparo do inóculo**

#### **4.3.1.1 Leveduras**

Para as leveduras o inóculo fúngico foi preparado a partir de culturas incubadas a 35°C, por 48 h (*Cryptococcus* spp.) e 24 h (*Candida* spp.) em tubos contendo meio ágar Sabouraud Dextrose (ASD) inclinado. Uma alçada das culturas foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina esterilizada para obtenção de uma suspensão. As suspensões foram homogeneizadas em vórtex, lidas no espectrofotômetro a 530 nm e ajustadas à transmitância de 75 a 77%, a qual equivale à turbidez de 0,5 da escala de McFarland e corresponde à concentração de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFC/mL. A suspensão-padrão de

levedura foi homogeneizada durante 15 segundos em vórtex, diluída 1:50 e depois 1:20 com o meio RPMI 1640, para obtenção do inóculo 2X concentrado ( $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  UFC/mL). O inóculo (2X) foi diluído a 1:1 quando os poços foram inoculados, chegando-se à concentração final desejada ( $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL) (CLSI, 2008).

#### 4.3.1.2 Fungos filamentosos

Os inóculos dos fungos filamentosos foram preparados de acordo com o protocolo M-38 A2 do CLSI. As amostras foram cultivadas em tubos de ágar batata-dextrose durante 7 dias a 35°C. No momento do preparo do inóculo as colônias de sete dias de crescimento foram cobertas com aproximadamente 1 mL de solução salina a 0,85% estéril, foram misturadas delicadamente com a ponta de uma pipeta e em seguida foi acrescentada uma gota (0,01 mL) de Tween 20 para facilitar a preparação do inóculo. A mistura resultante de conídios e hifas foi retirada e transferida para tubo de ensaio esterilizado. Quando as partículas mais pesadas se depositaram no fundo (3 a 5 minutos) o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio estéril. As suspensões foram homogeneizadas em vórtex, lidas no espectrofotômetro a 530 nm e ajustadas à transmitância de 68-71% para amostras de *F. pedrosoi* e 80-82% para *Aspergillus* spp. A suspensão foi diluída 1:50 em meio RPMI, essa diluição corresponde a 2X a densidade necessária de  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL (DABOIT et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2011, CLSI, 2008).

#### 4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de seis aliliminas contra bactérias de importância clínica

Para o teste de susceptibilidade bacteriana às aliliminas selecionadas foi utilizado o método da microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M7-A6 do antigo NCCLS, atual CLSI (NCCLS, 2003). As amostras testadas foram duas bactérias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; e quatro Gram negativas, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13882, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. A partir de uma solução estoque em DMSO, as aliliminas foram diluídas em caldo Mueller Hinton a fim de se obter nos tubos testes concentrações que variaram de 128-0,25µg/mL. Os inóculos foram preparados em solução salina 0,85% a partir de colônias com crescimento de 24 h. A

suspensão foi homogeneizada e sua absorbância determinada espectrofotometricamente a 625nm de modo que ficasse entre 0,08 e 0,1, correspondendo a  $1 \times 10^8$  células/mL. Em seguida, o inóculo foi diluído 1:50, seguido de uma nova diluição 1:20 em caldo Muller Hinton e então aplicado na placa de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h para a determinação da CIM que foi considerada, por leitura visual, a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento bacteriano.

## 4.5 Toxicidade dos compostos

Após os testes de triagem com as 22 aliliminas, seis compostos foram selecionados para que suas toxicidades *in vitro* fossem avaliadas. O teste de hemólise foi realizado no departamento de doenças infecciosas do Alpert Medical School da Brown University em Providence, Rhode Island, EUA, sob a orientação do pesquisador Dr. Eleftherios Mylonakis. Já os experimentos de avaliação de toxicidade dos compostos em cultura de células foram realizados no Laboratório de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) sob a supervisão da Dra. Luciana Maria Silva.

### 4.5.1 Teste de Hemólise

O protocolo para avaliar se os compostos poderiam levar à lise dos eritrócitos humanos (Rockland Immunochemicals) foi adaptado da técnica de Evans e colaboradores (2013). A partir de uma solução estoque em DMSO a 10mg/mL todos os compostos foram diluídos em PBS variando suas concentrações de 64 a 0,25  $\mu\text{g/mL}$ , sendo 100  $\mu\text{L}$  de cada concentração aplicados em uma placa de 96 poços. Em seguida os eritrócitos foram diluídos em PBS a 4% e 100  $\mu\text{L}$  foram adicionados nos poços contendo as diferentes concentrações das aliliminas. PBS foi utilizado como controle negativo e Triton-X 1% como controle positivo. A placa foi então incubada a 37°C por 1h e, em seguida, centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos para sedimentação dos eritrócitos intactos. Um volume de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cada poço foi transferido para uma nova microplaca e a porcentagem de hemólise foi determinada pela medida da absorbância a 540nm. Os valores foram calculados considerando-se o tratamento com 1% de Triton-X como 100% de hemólise. Os testes foram realizados em duplicata.

#### **4.5.2 Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)**

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos que apresentaram melhor atividade antifúngica foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT conforme proposto por Mosmann e colaboradores (1983). Foram utilizadas as linhagens de células humanas normais renais HEK 293 (ATCC CRL-1593) e pulmonares MRC-5 (ATCC CCL-171). As células foram cultivadas em meio de cultura Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) suplementado com soro fetal bovino a 10% e incubadas em estufa a temperatura de 37°C, com umidade atmosférica, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Foram utilizadas placas de 96 poços onde as culturas celulares após 24 h de crescimento foram colocadas em contato com os compostos selecionados nas concentrações de 128 a 1 µg/mL e incubadas por 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação, os poços da placa de microdiluição foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) e a solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionada ao teste, que em seguida, foi incubado no escuro por três horas. Em seguida, as placas foram centrifugadas durante 10 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante foi removido. Foram adicionados 50 µL de DMSO em cada poço e a placa foi agitada levemente para a dissolução dos sais de formazan. A densidade óptica do material de análise foi avaliada em espectrofotômetro a 540 nm. A determinação do coeficiente de inibição de 50% do crescimento das células (IC<sub>50</sub>) e da concentração que inibe seu crescimento total (TGI) foi feita a partir de uma regressão linear.

#### **4.5.3 Avaliação da genotoxicidade - Ensaio do cometa**

Os três compostos selecionados a partir dos resultados do teste de citotoxicidade foram avaliados quanto à capacidade de dano ao DNA pelo ensaio do cometa de acordo com o protocolo estabelecido por Singh e colaboradores (1988).

##### **4.5.3.1 Preparo das lâminas**

Foram utilizadas lâminas de microscópio, previamente limpas com álcool 70% e secas à temperatura ambiente. Para fixação da primeira camada de agarose, as lâminas foram

mergulhadas no gel de agarose (1,5%) a aproximadamente 60°C. Os excessos de agarose foram limpos e as lâminas permaneceram em temperatura ambiente até secarem.

#### **4.5.3.2 Preparo do material biológico**

Foram preparadas placas de 24 poços, cujas quantidades celulares foram de  $2 \times 10^6$  células/ poço em meio EMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%. A linhagem celular utilizada neste teste foi a Hek 293. As células foram incubadas à 37°C em estufa com atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, por 24 h. Em seguida, o meio de cultura foi retirado, as placas foram lavadas com 400 µL de PBS 1X por poço e as células foram expostas às alilimas durante 24h, em quadruplicata. O meio EMEM sem suplemento foi usado como controle negativo. Posteriormente, essas células foram novamente incubadas à 37°C em incubadora com atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

#### **4.5.3.3 Fixação do material biológico às lâminas**

Ao término do tempo de incubação, foram adicionados 400 µL da solução de tripsina 0,025% em cada poço. Após 5 min, a suspensão celular foi transferida para um tubo de centrífuga, os poços foram novamente lavados com 400 µL de meio de cultura, para a retirada das células remanescentes e centrifugado a 810 rpm por 5 min. O precipitado celular foi ressuspensionado em 300 µL de meio de cultura. Para a fixação das células na lâmina, foram utilizados 15 µL da suspensão celular em 75 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Sobre as lâminas microscópicas, previamente preparadas com agarose (1,5%), foram depositadas 120 µL destas alíquotas e as mesmas foram recobertas com lamínula. Após 10 min a 4°C, a lamínula foi removida e a lâmina colocada em solução de lise.

#### **4.5.3.4 Etapas de lise e eletroforese**

As lâminas foram deixadas por 60 min. na solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10; Triton X-100 a 1% e DMSO a 10%). Na sequência, foram removidas e transferidas para cuba de eletroforese preenchida com tampão alcalino (1mM EDTA e 300 mM NaOH, pH>13) e permaneceram incubadas por 25 min, para a desnaturação do DNA e exposição dos sítios álcali-lábeis. Ambas as soluções foram recém-preparadas e armazenadas a 4°C até a hora do uso. Posteriormente, a eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por 25 min. Durante toda corrida a cuba foi mantida a 4°C. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas, por 3 vezes, com 5 mL solução de neutralização (0,4 M de

Tris, pH 7,5) durante 5 min, fixadas com 5mL de etanol absoluto e secas a temperatura ambiente.

#### 4.5.3.5 Coloração e análise das lâminas

Para a análise, as lâminas foram coradas com 40µl de solução de brometo de etídio (20 µg/ml) por 5 min, cobertas com lamínula e os nucleóides visualizados com o software Axio Vision Rel. 4.8 em microscópio de fluorescência da Carl Zeiss (aumento de 200X). Foram analisados 100 nucleóides por lâmina utilizando-se o sistema de captura de imagens *AutoComet*, acoplado ao software de análise *CometScore* ([http://www.tritekcorp.com/products\\_cometscore.php](http://www.tritekcorp.com/products_cometscore.php)). Para cada cometa, o programa gera vários parâmetros, dos quais se utilizou a porcentagem de DNA na cauda para a realização deste trabalho. Os danos celulares foram caracterizados em categorias estabelecidas segundo Kumaravel, 2009: 0 – sem danos (< 5%), 1 – baixo nível de danos (5 – 20%), 2 – médio nível de danos (20 – 40%), 3 - alto nível de danos (40 – 95%) e 4 – danos totais (> 95%). A análise dos danos foi realizada utilizando-se o Índice de danos ao DNA (IDN) e a Porcentagem de Classe de Danos (PCD). Os índices de danos foram obtidos através do somatório da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe. O valor do IDN pode variar de 0 a 400. Sendo 0 o valor que indica o menor grau de dano e 400 o grau máximo de dano (KUMARAVEL et al., 2009).

$$\text{Índice de danos} = (0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D) + (4 \times E)$$

Onde, A, B, C, D e E são os números de células encontradas para cada categoria analisada.

A Porcentagem de Classe de Danos foi obtida como a porcentagem de ocorrência de cada classe no total dos cometas analisados.

$$PCD = (\text{número de determinada classe} \times 100) / \text{número total de cometas}$$

## 4.6 Determinação da atividade anti-criptocócica do composto 3H2

Baseando-se nos resultados dos testes realizados, citados anteriormente, selecionou-se a alilimina 3H2 para maiores investigações quanto ao seu potencial anti-criptocócico.

Considerando-se a baixa solubilidade em meio aquoso do composto selecionado pretendeu-se avaliar também o complexo de inclusão de 3H2 em  $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H) com o intuito de verificar se essa modificação levaria a diferenças em seu potencial antifúngico. A complexação do composto selecionado foi realizada pela equipe do Prof. Dr. Sérgio Antônio Fernandes do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa.

#### **4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) contra 12 amostras de *Cryptococcus gattii* e de *C. neoformans***

O composto selecionado e seu complexo tiveram determinados seus valores de CIMs para 12 amostras de *C. gattii* e de *C. neoformans* conforme descrito no item 4.3, e, posteriormente, foram avaliados quanto à ação fungicida ou fungistática. Para tanto, alíquotas de 100  $\mu$ L foram removidas dos poços nos quais não foi detectado crescimento visível na CIM, além de 2XCIM e 4XCIM e foram subcultivadas em ASD e incubadas a 35°C. As amostras foram semeadas em placas de Petri em duplicata. A concentração fungicida mínima (CFM) foi definida como a menor concentração do composto em que nenhuma colônia foi observada após 72 horas de incubação (OBANDO et al., 2009). O composto foi considerado fungicida se a relação CFM/CIM foi  $\leq 4$  e fungistático se foi  $>4$  (HAZEN, 1998).

#### **4.6.2 Avaliação da curva de morte**

O composto estudado foi avaliado quanto ao efeito sobre a cinética de crescimento de uma amostra de *C. gattii* (L27/01) de acordo com a metodologia proposta por Klepser e colaboradores (1997). A cultura do fungo foi subcultivada em tubos contendo ágar Sabouraud por 48h e o inóculo foi realizado conforme descrito no item 4.3.1.1. O inóculo inicial ( $10^6$  UFC/mL) foi diluído dez vezes em tubos contendo as concentrações CIM, CIMx2 e CIMx4 do composto selecionado. Foi realizado um controle de crescimento onde o inóculo foi diluído dez vezes em meio RPMI. Os tubos foram incubados sob agitação (100 rpm) a 35°C. Amostras de 50 $\mu$ L foram removidas de cada tubo nos tempos 0, 6, 12, 24, 48 e 72h, diluídas em água destilada esterilizada, e 30  $\mu$ L foram plaqueados em ágar Sabouraud. Após 48h de incubação das placas a 35°C, as colônias foram contadas para elaboração da curva de morte.

#### 4.6.3 Atividade em combinação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B

A alilimina 3H2 foi avaliada quanto a sua atividade em combinação com a anfotericina B e fluconazol contra as amostras de *C. gattii*. Diluições seriadas do composto estudado e do antifúngico foram preparadas utilizando os mesmos solventes como no teste da CIM. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de cada diluição do composto foram adicionadas aos poços de uma placa de 96 poços na orientação horizontal e as alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de cada diluição do antifúngico foram adicionadas em uma orientação vertical, de modo que na placa obtiveram-se várias combinações de concentrações dos dois compostos (FIGURA 16) (SHIN e LIM, 2004).

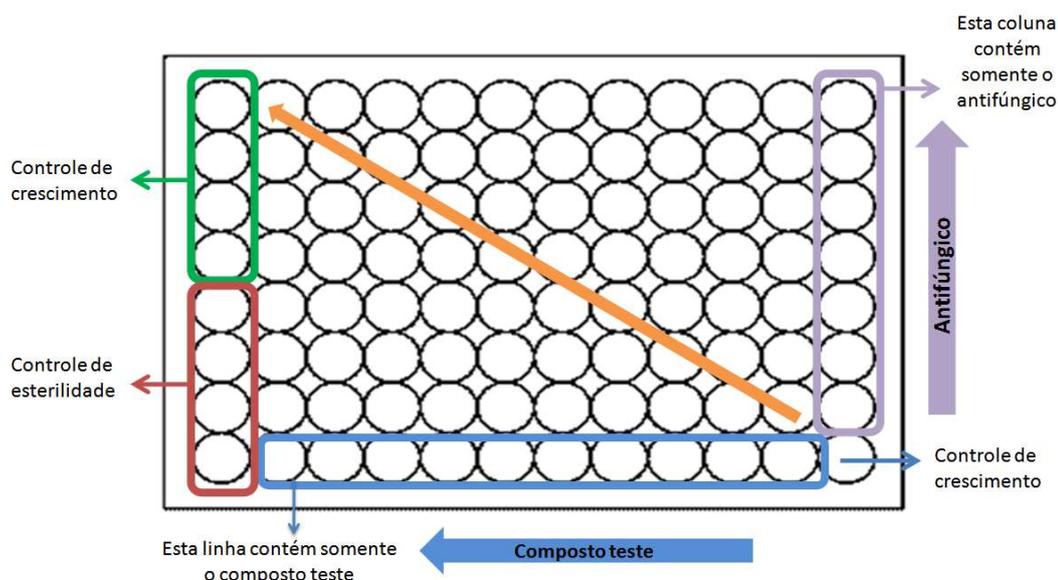


Figura 16: Esquema do protocolo experimental do teste de combinação. As setas indicam o aumento da concentração de cada agente individualmente e a seta em diagonal indica o aumento da concentração do antifúngico e composto teste em combinação (MAGALHÃES, 2012).

Após, cada poço foi inoculado com 100 $\mu\text{L}$  do inóculo preparado conforme descrito no item 4.3.1.1 e as placas incubadas a 35°C por 72 horas. A interação do composto com o agente antifúngico foi expressa como a soma da concentração inibitória fracionária (CIF) de cada agente. A CIF de cada agente é calculada como a CIM desse agente em combinação, dividido pela CIM do agente sozinho. O índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) foi calculado pela soma das CIFs:

$$ICIF = CIFA + CIFB = \frac{C_A^{comb}}{CIM_A^{individual}} + \frac{C_B^{comb}}{CIM_B^{individual}}$$

Onde  $CIM_A^{individual}$  e  $CIM_B^{individual}$  são as CIMs das drogas A e B quando agindo sozinhas e  $C_A^{comb}$  e  $C_B^{comb}$  referem-se às combinações. O ICIF foi interpretado como sinérgico quando  $\leq 0,5$ ; sem interação quando  $0,5 < ICIF < 4,0$  e como antagonista quando  $> 4,0$  (MUKHERJEE et al., 2005).

#### 4.6.4 Ensaio do sorbitol

Com o intuito de verificar se a parede celular seria um alvo de ação do composto 3H2, realizou-se o teste da concentração inibitória mínima contra 12 amostras de *C. gattii* conforme descrito no item 4.3, em que o meio utilizado RPMI-1640 foi acrescido de sorbitol 0,8M. O inóculo foi realizado conforme descrito anteriormente no item 4.3.1.1 e as placas incubadas a 35°C durante dez dias. As leituras de CIM foram realizadas três e dez dias após a incubação e os valores comparados com um teste sem a adição de sorbitol. Com o protetor osmótico (sorbitol) os valores de CIM aumentariam caso a droga testada atue inibindo a parede celular (FROST et al., 1995, EMRICK et al., 2013).

#### 4.6.5 Avaliação da produção de melanina

A alilimina 3H2 foi investigada quanto a sua capacidade de interferir na síntese da melanina da amostra de *C. gattii* L27/01. Foram preparados, em solução salina, e contados em câmara de Neubauer, diferentes inóculos ( $1 \times 10^4$ ;  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC/mL) da amostra testada, previamente cultivada em ágar Sabouraud por 48h. Em seguida, 10µL de cada inóculo foi aplicado, em duplicata, em placas de Petri de ágar meio mínimo (glicose 15 mM, MgSO4 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 29,4 mM, glicina 13 mM, vitamina B 3 µM, ágar 2%) acrescido de 1mM de L-dopa contendo a droga 3H2 nas concentrações 0,5XCIM e CIM. Foram realizados controles sem a adição de L-dopa e sem a adição da droga testada. Todas as placas foram embaladas em

papel alumínio, incubadas à 35°C, e visualizadas diariamente quanto ao à produção de melanina durante 10 dias (MARTINEZ et al., 2007).

#### 4.6.6 Determinação da atividade de lacase

Para avaliar se o composto 3H2 influenciava na atividade da enzima lacase da amostra de *C. gattii* L27/01 foi realizado o ensaio da oxidação do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) (MARTINEZ et al.,2007). A levedura foi cultivada no meio de asparagina (asparagina 1g/L, fosfato de sódio 10mM [pH 6,5], MgSO<sub>4</sub> 0,25g/L, CuSO<sub>4</sub> 10µM) com glicose (1,5g/L) por 72h a 30°C. As células foram coletadas por centrifugação, lavadas e um inóculo foi preparado em PBS na concentração de 1x10<sup>8</sup> células/mL sem tratamento ou com 3H2 0,5xCIM. A solução de ABTS foi preparada em água destilada esterilizada na concentração de 10mM. Um volume de 100µL do reagente foi diluído em 900µL da suspensão fúngica com ou sem tratamento e os tubos foram incubados por duas horas a 30°C. Em seguida, as células foram removidas por centrifugação e as absorbâncias dos sobrenadantes foram detectadas em espectrofotômetro a 420nm. PBS adicionado de ABTS foi utilizado como branco e uma solução de lacase produzida comercialmente (Sigma, 51639) a 1U/mL em PBS foi usada como controle positivo. Esse teste também foi conduzido incubando-se a lacase comercial com diferentes concentrações de 3H2.

#### 4.6.7 Potencial zeta das células de *C. gattii* tratadas com 3H2

A análise do potencial zeta foi realizada no laboratório de fluidos complexos e sistemas supramoleculares na Universidade Federal de Juiz de Fora – campus Governador Valadares em colaboração com os Professores Ângelo Márcio Leite Denadai e Gabriella Freitas Ferreira. As células de *C. gattii* L27/01 foram cultivadas em Agar Sabouraud por 72h a 35 °C. Os experimentos de potencial Zeta (pZ) foram feitos pela titulação de quatro injeções manuais de 50 µL de 3H2 nas concentrações finais de 8, 16 e 24µg/mL em uma suspensão salina contendo a levedura (1 x 10<sup>6</sup> UFC/mL) à temperatura ambiente. As amostras foram analisadas após 30 segundos de tempo de equilíbrio usando um analisador de potencial Zeta (Zeta sizer Nano ZS90; Malvern, Reino Unido) (NOSANCHUK et al.,1999).

#### 4.6.8 Avaliação do efeito do tratamento com a alilimina 3H2 na cápsula e tamanho da célula de amostras de *Cryptococcus gattii*

Para visualizar o efeito do tratamento com 3H2 sob a cápsula de *C. gattii* a amostra L27/01 foi cultivada em placas de ágar meio mínimo contendo a alilimina na concentração 0,5XCIM por 48h a 37°C. O crescimento da amostra em meio sem a alilimina foi considerado controle negativo. Posteriormente foram preparadas lâminas com tinta Nanquim para a visualização da formação da cápsula e da espessura da parede celular em microscópio ótico comum (400X) Nikon (Eclipse E-200). As imagens foram fotografadas com uma câmera Nikon Coolpix 4500 e para calcular o volume da cápsula, os diâmetros da célula inteira ( $D_{Ci}$ ) e do corpo celular ( $D_{Cc}$ ) foram medidos através do software de morfometria *image J* NIH 1.48v. De cada isolado, foi analisado o tamanho da cápsula e da célula de 30 leveduras em cada lâmina. O volume da cápsula foi definido como a diferença entre o volume da célula inteira (célula + cápsula) e o volume do corpo celular (limitado pela parede celular). Os volumes foram calculados pela equação do volume da esfera  $\frac{4\pi}{3} \times \left(\frac{D}{2}\right)^3$  (van DUIN et al.,2004).

#### 4.6.9 Visualização das células de *C. gattii* tratadas com 3H2 pela microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O efeito do tratamento com 3H2 na célula fúngica também foi analisado através da MEV. A amostra de *C. gattii* L27/01 foi cultivada nas mesmas condições descritas no item anterior em meio mínimo sem tratamento e tratado com 3H2 0,5XCIM. Em seguida, uma alçada da levedura crescida nos diferentes tratamentos foi ressuspensa em PBS, centrifugada por 5 minutos a 3000rpm e lavada duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e 10 $\mu$ L do *pellet* foram aplicados sobre lamínula com poli-L-lisina deixando-se secar em temperatura ambiente. Posteriormente, as lamínulas foram tratadas com o fixador (2,5% glutaraldeído e 0,1M de cacodilato de sódio) por no mínimo 1 hora a temperatura ambiente. O fixador foi então removido com a lavagem das amostras por três vezes com tampão contendo 0,1M de cacodilato, 0,2M de sacarose e 2mM MgCl. As amostras foram então enviadas ao Centro de Microscopia da UFMG onde as preparações foram processadas com a desidratação crescente de álcool etílico (35% 50% a 95% por 10 min. e 100% 3X-10 min.), com a secagem

em ponto crítico e, finalmente, a metalização com ouro. O material foi então visualizado no microscópio eletrônico de varredura - Quanta 200 - FEG - FEI operado a 15 Kv (van DUIN et al.,2004).

#### **4.7 Avaliação da atividade *in vivo* de 3H2 em modelo de infecção pulmonar causada por *Cryptococcus gattii***

Para o desenvolvimento do modelo animal foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 com seis a oito semanas, pesando aproximadamente 18,0g, adquiridos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos em microisoladores, manipulados com o uso de equipamentos de proteção individual e foram seguidas normas éticas e de biossegurança em experimentação animal. Os animais foram divididos em cinco por grupo, tiveram água e ração *ad libitum*, e ciclos de claro/escuro mantidos. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais com o protocolo nº11/2013.

##### **4.7.1 Infecção intratraqueal**

No modelo *in vivo* foi utilizada a linhagem de *C. gattii* L27/01 baseando-se nos experimentos *in vitro* previamente realizados e pela experiência do nosso grupo de pesquisa no curso da infecção causada por essa amostra (SANTOS et al.,2014, FERREIRA et al., 2015; COSTA et al.,2016; SILVA et al.,2016) .

Os camundongos foram previamente anestesiados com solução de cetamina e xilazina em PBS (80 mg/Kg/10 mg/Kg). Após 10 minutos, foi realizada uma pequena incisão na pele, próxima da região das glândulas tireóide e, após a separação das camadas dos tecidos, a traqueia foi exposta e inoculada com 30µL de uma suspensão fúngica contendo  $1 \times 10^4$  células de *C. gattii*. Em seguida, a incisão foi fechada e os animais monitorados até a recuperação da anestesia (GUIMARÃES et al., 2010 ; NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012; SANTOS et al.,2014).

##### **4.7.2 Tratamento dos animais**

Depois do processo de infecção os animais foram separados alocando-se cinco por gaiola. Os tratamentos iniciaram-se no dia seguinte à infecção por via intraperitoneal. Quando

tratados em combinação a administração de cada composto foi realizada separadamente, com cerca 30 minutos de intervalo. Ao longo do estudo diferentes grupos e tratamentos foram realizados (QUADRO 3), sendo todos tratados e monitorados diariamente. Qualquer camundongo que estivesse com sinais de doença muito avançados como convulsões ou falta de atividade motora era imediatamente eutanasiado, sendo anestesiado e, em seguida, realizado o deslocamento cervical.

As soluções para tratamento dos antifúngicos fluconazol (Sigma-Aldrich) e anfotericina B (Cristália) foram obtidas em água para injeção (HOSSAIN et al.,1999; BARCHIESI et al.,2000). A suspensão da alilimina 3H2 pura foi preparada utilizando-se 10% Kolliphor EL (Sigma-Aldrich), 5% Polietilenoglicol 400 (Sigma-Aldrich), 80% PBS e 5% Propilenoglicol (Sigma-Aldrich) (STRICKLEY., 2004) . A suspensão aquosa do complexo de inclusão de 3H2 em  $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H) foi preparada em PBS.

Grupos	Doses Administradas
Não Infectado (PBS)	----
Veículo	Kolliphor EL 10%, PEG 400 5%, propilenoglicol 5% e PBS 80%
Não tratado	----
3H2	30, 50, 100, 150 mg/kg
Fluconazol	1 mg/kg e 10mg/kg
3H2 + Fluconazol	30 mg/kg + 10mg/kg 30 mg/kg + 1mg/kg
Anfotericina B	0,3 mg/kg e 0,5mg/kg
3H2 + Anfotericina B	30mg/kg + 0,5mg/kg 30mg/kg + 0,3mg/kg
CD-3H	30 mg/kg
CD-3H + Anfotericina B	30mg/kg + 0,5mg/kg

Quadro 3: Diferentes grupos e doses de cada droga utilizada no tratamento do modelo de infecção pulmonar causada por *C. gattii*.

A quantidade de animais por grupo e o tempo de duração de cada experimento dependeu de seu objetivo ser curva de sobrevivência (5 animais, 130 dias), determinação de carga fúngica (6 animais, 15, 30 e 130 dias) ou análise de comportamento (SHIRPA) (6 animais, 45dias).

#### 4.7.3 Curva de sobrevida e determinação da carga fúngica

Os animais depois de infectados eram tratados e monitorados diariamente, sendo todos os óbitos registrados para a construção de uma curva de sobrevida. Foram inicialmente realizadas curvas de sobrevida dos animais infectados com *C. gattii* e tratados com 3H2 nas doses de 30, 50, 100 e 150 mg/kg. Em seguida, avaliou-se a alilimina associada com fluconazol e com anfotericina B, sendo a última também testada em associação com o complexo de 3H2 em  $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H) nas doses demonstradas no QUADRO 3.

Para a determinação da carga fúngica os animais foram eutanasiados 15, 30 ou 130 dias após a infecção e seus pulmões e cérebro foram assepticamente removidos, pesados, homogeneizados e diluídos em PBS. Alíquotas dos homogenatos foram plaqueadas em Ágar Sabouraud com cloranfenicol (SbC) e incubadas por 48h a 35°C quando as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e os resultados expressos em UFC/g de tecido (SANTOS et al.,2014).

#### 4.7.4 Análise comportamental dos animais infectados com *C. gattii* e tratados com 3H2, CD-3H e anfotericina B

Para avaliação comportamental dos animais durante o curso da infecção utilizou-se o protocolo SHIRPA (sigla que significa SmithKline Beecham Pharmaceuticals; Harwell MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit Imperial College School of Medicine at St Mary's Royal London Hospital; St Bartholomew's; Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment) (ROGERS et al., 2001). Esse protocolo semi-quantitativo de análise observacional compreende testes simples que proporcionam uma avaliação do perfil comportamental e funcional dos animais (LACERDA-QUEIROZ et al.,2010). A análise inicial consiste na observação do camundongo por cinco minutos em uma jarra no formato de um cilindro, a presença de micção, defecação, piloereção, tremor e postura são anotados. Nesse momento sua taxa de respiração também é observada. Posteriormente, o animal é transferido para uma arena onde seu comportamento motor é observado. Em seguida, sua força ao agarrar, acuidade visual, tônus corporal e reflexos são avaliados. Por fim, funções autônomas como frequência cardíaca e cor da pele são registradas (LACKNER et al.,2006).

O procedimento foi realizado após a infecção dos animais a cada dois dias. Nessa etapa foram avaliados os seguintes grupos: a) Não infectado; b) Não tratado, c) anfotericina B (AMB) (0,5mg/kg); d) 3H2 (30mg/Kg); e) 3H2 (30mg/kg) + AMB (0,5mg/Kg); e) CD3H (30mg/kg); f) CD3H(30mg/kg) + AMB (0,5mg/Kg). Os parâmetros individuais avaliados pelo SHIRPA foram então agrupados em cinco domínios funcionais (estado neuropsiquiátrico; comportamento motor; função autônoma; tônus muscular e força e reflexo e função sensorial) e foram determinados um escore geral e um para cada domínio (LACKNER et al.,2006; . PEDROSO et al.,2010).

#### **4.8 Análise estatística**

Para os cálculos de citotoxicidade dos compostos foi realizada uma regressão linear obtida por meio do programa SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para Windows. A análise estatística dos demais ensaios foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA.

Os ensaios de hemólise, genotoxicidade, curva de morte, potencial zeta e determinação da carga fúngica foram analisados através do teste de análise de variância. O protocolo SHIRPA foi analisado por ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls. As análises da atividade de lacase e de volume de cápsula foram realizadas pelo teste t de Student. A sobrevivência foi avaliada pela curva de Kaplan-Meier e pelo teste long-rank. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos estatisticamente.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de 22 alilimas contra amostras de *Cryptococcus* spp.

Foi realizada uma triagem inicial com 22 alilimas testadas contra amostras de *C. gattii* e *C. neoformans* (TABELA 1).

Tabela 1: Resultados da triagem inicial pela medida da concentração inibitória mínima (CIM) das alilimas testadas contra amostras de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.

	<i>C. neoformans</i> ATCC 28957	<i>C. neoformans</i> ATCC 62066	<i>C. gattii</i> ATCC 24065	<i>C. gattii</i> L27/01
<b>Compostos</b>	<b>CIM (µg/mL)</b>			
3D7	1	1	1	8
3G2	64	64	64	64
3G3	128	128	128	128
3G4	128	128	128	128
3G5	64	64	64	64
3G6	128	128	128	128
3G7	32	32	32	32
3G8	>128	>128	>128	>128
3G9	>128	>128	>128	>128
3G10	>128	>128	>128	>128
3H2	1	4	8	16
3H3	>128	>128	>128	>128
3H4	128	>128	>128	>128
3H5	16	64	32	32
3H6	128	>128	>128	>128
3H7	>128	>128	>128	>128
3H8	64	64	64	64
3H9	>128	>128	>128	>128
3H10	16	16	16	16
3I2	16	16	16	16
3I3	16	16	16	16
3I4	>128	>128	>128	>128
3I5	1	1	1	2
<b>Antifúngicos</b>				
Anfotericina B	0,125	0,125	0,125	0,25
Fluconazol	8	4	1	8

Os resultados foram bastante diversificados, sendo que muitos compostos não foram ativos (CIM >128 µg/mL) ou pouco ativos (CIM = 128 ou 64 µg/mL) nas concentrações testadas contra os fungos avaliados. Consideraram-se, arbitrariamente, bons valores de CIM quando estes foram menores ou iguais a 16 µg/mL. Dessa forma, as alilimas que se destacaram foram 3D7, 3H2, 3H10, 3I2, 3I3 e 3I5. A partir dos resultados obtidos neste teste inicial foram feitos outros experimentos com os compostos selecionados.

## 5.2 Determinação da concentração inibitória mínima contra outros fungos de importância clínica

As alilimas mais ativas (3D7, 3H2, 3H10, 3I2, 3I3 e 3I5) e os antifúngicos fluconazol (FCZ) e anfotericina B (AMB) também foram avaliados quanto à concentração inibitória mínima contra amostras de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (TABELA 2).

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) das alilimas selecionadas contra espécies de *Candida* e *Aspergillus*.

Amostras	Compostos						FCZ	AMB
	3D7	3H2	3H10	3I2	3I3	3I5		
	CIM (µg/mL)							
<b><i>Candida</i> spp.</b>								
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	32	>128	32	32	64	64	0,25	1
<i>C. krusei</i> ATCC 20298	>128	>128	32	32	64	64	32	0,5
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	64	>128	64	64	128	64	2	0,25
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	>128	>128	64	64	>128	128	2	0,5
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	64	>128	32	32	64	32	1	0,25
<b><i>Aspergillus</i> spp.</b>								
<i>A. fumigatus</i> ATCC 16913	32	>128	32	64	64	64	>64	1
<i>A. flavus</i> IMI 190443	>128	>128	64	64	>128	128	>64	1
<i>A. clavatus</i> Cl*	32	128	32	32	64	32	>64	0,03
<i>A. niger</i> Cl*	128	>128	64	64	>128	64	>64	0,03

\*Cl- amostra clínica

Embora as alilimas selecionadas tenham apresentado valores mais baixos de CIMs contra amostras de *Cryptococcus* spp., o mesmo não foi observado contra amostras de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. O composto menos ativo foi o 3H2 enquanto o mais ativo foi o 3H10, exibindo CIMs de 32 ou 64 µg/mL contra os fungos testados.

A atividade antifúngica das aliliminas mais ativas e da anfotericina B contra amostras clínicas e de referência de *Fonsecaea pedrosoi* também foi avaliada conforme demonstrado na TABELA 3.

Tabela 3: Concentração inibitória mínima da aliliminas 3D7, 3H2, 3H10, 3I2, 3I3, 3I5 e de anfotericina B contra 12 amostras de *Fonsecaea pedrosoi*.

	3D7	3H2	3H10	3I2	3I3	3I5	AMB
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )						
ATCC 46428	32	8	32	64	32	16	1
1	32	16	32	64	32	16	4
3	32	16	64	64	32	16	4
5	32	32	32	64	32	16	4
7	32	16	32	64	32	16	4
8	64	32	32	64	32	16	2
9	64	32	32	64	32	16	4
10	32	32	64	64	64	32	2
11	32	32	32	32	16	8	2
13	32	16	64	64	32	16	0,5
14	32	32	32	64	32	16	2
15	32	16	64	64	32	32	1
Média geométrica	35,9	21,4	40,3	60,4	32,0	17,0	2,1

Todas as amostras testadas foram sensíveis ao tratamento com os compostos avaliados. Os compostos 3H2 e 3I5 se destacaram com menores valores médios de CIM - 21,4 e 17,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

### 5.3 Determinação da concentração inibitória mínima contra bactérias de importância clínica

As aliliminas selecionadas também foram avaliadas quanto à sua atividade antibacteriana contra duas bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e quatro Gram negativas: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13882, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 (TABELA 4). Em geral as substâncias não foram ativas contra as bactérias testadas, exceto para a amostra de *S. aureus* que foi sensível à 3H2 e 3I5 com CIMs de 8 e 2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Tabela 4: Determinação dos valores de concentração inibitória mínima das aliliminas testadas contra bactérias de importância médica.

Amostras	3D7	3H2	3H10	3I2	3I3	3I5
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )					
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	64	8	64	>128	64	2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	128	128	64	128	64	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13882	>128	>128	>128	>128	128	128
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	>128	>128	64	128	64	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>128	>128	>128	>128	>128	>128

## 5.4 Toxicidade dos compostos

### 5.4.1 Teste de Hemólise

O percentual de hemólise causado pelas aliliminas e pelo controle positivo Triton-X foi avaliado. Foram testadas concentrações de 64 a 0,25  $\mu\text{g/mL}$  dos compostos e de 1% a 0,2% do controle (FIGURA 17).

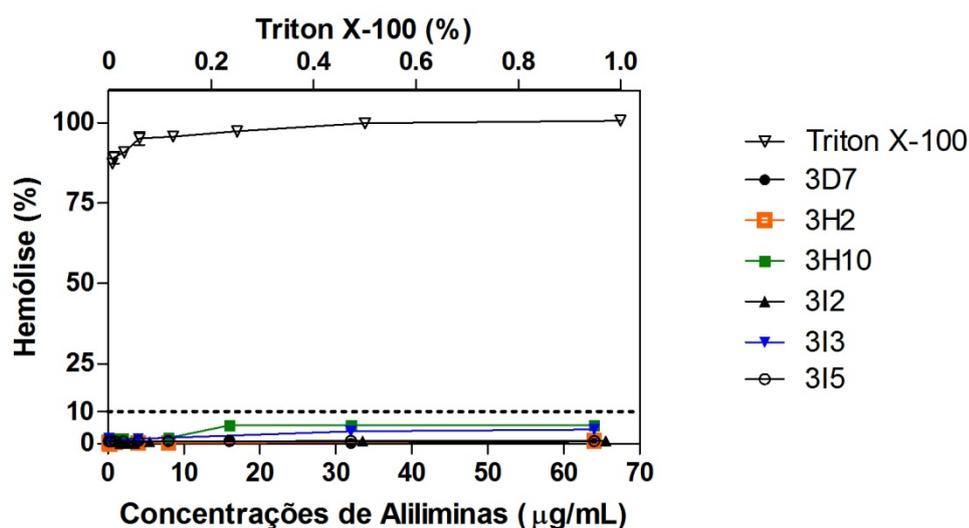


Figura 17: Resultados da avaliação *in vitro* da toxicidade das aliliminas e de Triton-X em eritrócitos humanos. A linha acima representa as diferentes concentrações do controle positivo Triton-X enquanto a linha inferior demonstra as concentrações dos compostos. Percentuais de hemólise superiores a 10% considerariam as drogas como tóxicas para os eritrócitos.

As aliliminas testadas apresentaram baixo percentual de hemólise, estando seu valor máximo próximo a 5%. Não houve diferença estatística entre os compostos testados, entretanto, todos foram significativamente distintos do Triton X-100% ( $P < 0,0001$ ).

#### 5.4.2 Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

A TABELA 5 exibe os resultados do ensaio *in vitro* de citotoxicidade das aliliminas selecionadas. O valor de  $IC_{50}$  representa a concentração da droga que inibiu 50% do crescimento celular, enquanto o valor de TGI representa a concentração que foi capaz de inibir totalmente este crescimento. Esses valores foram calculados através de uma curva de regressão linear obtida por meio do programa SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) para Windows.

Tabela 5: Valores de  $IC_{50}$  (concentração da droga que inibiu 50% do crescimento celular) e TGI (concentração que foi capaz de inibir totalmente o crescimento celular) das aliliminas selecionadas obtidos contra as linhagens celulares: pulmonar (MRC-5) e renal (HEK-293).

Compostos	Linhagens celulares	
	MRC-5	HEK-293
	$IC_{50}$ / TGI ( $\mu\text{g/mL}$ )	
3D7	36,0 / 145,6	51,2 / 121,9
3H2	81,3 / 140,4	63,4 / 135,5
3H10	19,51 / 124,5	46,0 / 125,3
3I2	63,0 / 118,4	62,4 / 119,9
3I3	83,0 / 150,4	79,4 / 137,5
3I5	38,9 / 120,9	77,7 / 120,6

A partir dos resultados de TGI dos compostos para as duas linhagens celulares e de seus valores de médios de CIM para amostras de *C. neoformans* e *C. gattii* calculou-se o valor de índice de seletividade (IS) de cada alilimina (TABELA 6). Esse índice é obtido a partir da razão entre o valor de TGI de cada droga e a média da CIM obtida para amostras de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. Os compostos com maiores valores de IS (3D7, 3H2 e 3I5) foram selecionados para se realizar o teste de genotoxicidade.

Tabela 6: Valores de índice de seletividade (IS) das aliliminas calculados a partir da razão entre o valor de TGI (concentração que foi capaz de inibir totalmente o crescimento celular) de cada droga e a média da CIM obtida para amostras de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*.

Compostos	Índices de Seletividade (IS)			
	MRC-5		HEK-293	
	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>
3D7	145,6	32,4	121,9	27,1
3H2	56,2	11,7	54,2	11,3
3I2	7,4	7,4	8,6	8,6
3I3	9,4	9,4	7,5	7,5
3H10	7,8	7,8	7,8	7,8
3I5	121,0	80,6	120,6	80,4

MRC-5 – linhagem de célula pulmonar; HEK-293 - linhagem de célula renal.

### 5.4.3 Avaliação da genotoxicidade - Ensaio do cometa

As aliliminas 3D7, 3H2 e 3I5 selecionadas após o teste de citotoxicidade foram avaliadas quanto ao dano no DNA. Para tanto, realizou-se o ensaio do cometa conforme proposto por Singh e colaboradores (1988) em células renais normais da linhagem Hek-293. Baseando-se na porcentagem de DNA na cauda, os danos celulares foram caracterizados em categorias estabelecidas: 0 – sem danos, 1 – nível baixo de danos, 2 – nível médio de danos, 3 – nível alto de danos e 4 – danos totais, em 100 células contadas por tratamento, obtendo-se assim a porcentagem de danos (FIGURA 18).

Os compostos testados obtiveram um perfil de danos bem semelhante ao observado no controle. Esse apresentou no máximo dano tipo 2, ou seja, nível médio de danos. Já no caso das drogas testadas foram obtidos danos de categorias maiores. Os compostos 3D7 e 3I5 apresentaram pequena quantidade de dano total (categoria 4), sendo que este último tipo não foi observado no composto 3H2.

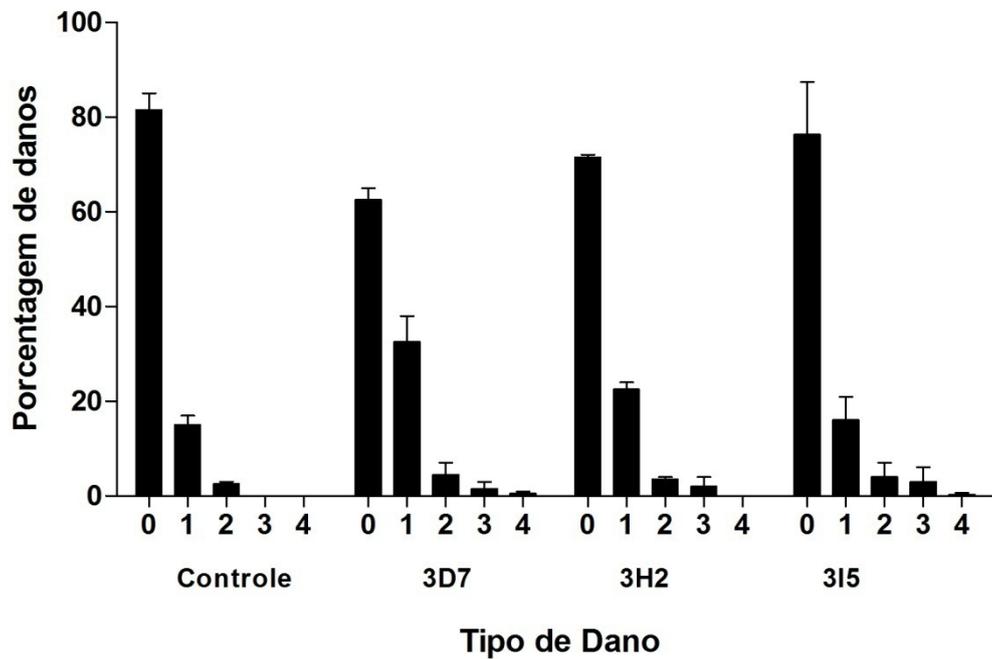


Figura 18: Porcentagem de danos em cada tratamento aplicado às células HEK-293. 0 – sem danos, 1 – baixo nível de danos, 2 – médio nível de danos, 3 - alto nível de danos e 4 – danos totais. CN – controle – células não tratadas. 3D7, 3H2 e 3I5 – compostos testados.

Além disso, foi calculado também o índice de danos ao DNA (IDN) e dessa forma, obteve-se o gráfico a seguir (FIGURA 19).

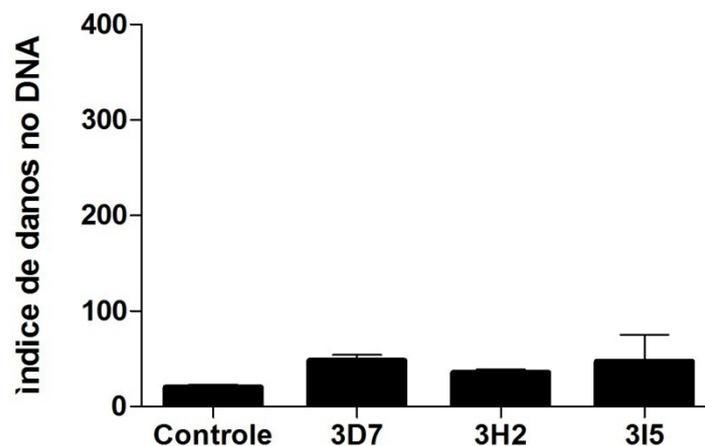


Figura 19: Índices de dano ao DNA (IDN) obtidos para os as aliliminas selecionadas.

Os índices de danos ao DNA, de forma geral, foram baixos em relação ao seu valor máximo (400) e não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao

controle. Esses resultados demonstram a baixa toxicidade das aliliminas selecionadas direcionando, assim, à possibilidade de serem realizados testes *in vivo* com estes compostos.

Embora não haja diferença significativa entre os compostos, o 3H2, por não ter provocado danos tipo 4 às células testadas, por ter o menor IDN e por apresentar bons resultados de atividade antifúngica tornou-se o principal candidato a maiores investigações quanto à sua atividade anti-criptocócica.

## **5.5 Determinação da atividade anti-criptocócica do composto 3H2**

Baseando-se em várias características observadas no composto 3H2, esta alilimina foi selecionada para maiores investigações quanto ao seu potencial antifúngico.

### **5.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) contra 12 amostras de *Cryptococcus gattii* e de *C. neoformans***

As TABELAS 7 e 8 exibem os valores determinados de CIM e CFM em  $\mu\text{g/mL}$  do composto 3H2, seu complexo de inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H) e dos antifúngicos fluconazol e anfotericina B testados contra amostras clínicas e de referência de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*. Os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> correspondem à concentração necessária para inibir o crescimento fúngico de 50% e 90%, respectivamente, das amostras testadas. CFM<sub>50</sub> e CFM<sub>90</sub> são as concentrações em que 50% ou 90%, respectivamente, das linhagens foram mortas. No teste da atividade fungicida/fungistática, de acordo com Hazen (1998) os compostos foram considerados fungicidas se a relação CFM/CIM for  $\leq 4$  e fungistáticos se for  $>4$ .

Tabela 7: Médias geométricas dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) em  $\mu\text{g/mL}$  de 3H2, CD3H e dos antifúngicos fluconazol (FCZ) e anfotericina B (AMB) contra linhagens de *Cryptococcus gattii* realizados em triplicata.

Amostras	3H2	CD-3H	Fluconazol	Anfotericina B
<i>Cryptococcus gattii</i>	CIM / CFM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
ATCC 24065	8,0/16,0	8,0/16,0	4,0/64,0	0,3/0,4
ATCC 32608	11,3/64,0	8,0/64,0	16,0/32,0	0,5/0,8
135L/03	16,0/64,0	16,0/64,0	8,0/45,3	0,4/0,6
L28/02	5,7/90,5	8,0/128,0	11,3/64,0	0,6/1,0
23/10993	4,0/32,0	4,0/32,0	4,0/22,6	0,5/0,7
196L/03	5,7/90,5	5,7/90,5	16,0/32,0	0,5/0,6
1913/ER	5,7/64,0	5,7/64,0	8,0/16,0	0,5/0,6
547 OTTI	11,3/128,0	11,3/128,0	16,0/128,0	0,4/0,6
L27/01	16,0/90,5	16,0/64,0	16/64,0	0,3/0,5
LMM 818	5,7/90,5	5,7/90,5	16,0/32,0	0,5/0,7
L24/01	11,3/128,0	8/128,0	8,0/64,0	0,4/0,6
29/10893	5,7/45,2	5,7/45,2	4,0/22,6	0,3/0,6
<b>média geométrica</b>	8,0/65,8	7,8/65,8	9,2/41,5	0,4/0,6
CIM <sub>50</sub> / CFM <sub>50</sub>	5,7/64,0	8,0/64,0	8,0/32,0	0,4/0,6
CIM <sub>90</sub> / CFM <sub>90</sub>	16,0/128,0	16,0/128,0	16,0/64,0	0,5/0,7
CFM/CIM <sup>a</sup>	8,2	8,4	4,5	1,5

<sup>a</sup> Razão entre concentração fungicida mínima (CFM) e concentração inibitória mínima (CIM) que determina atividade fungicida (CFM/CIM $\leq$ 4) ou fungistática (CFM/CIM $>$ 4) das drogas testadas.

Todas as amostras de *Cryptococcus gattii* foram sensíveis aos tratamentos com a alilimina selecionada, sendo que suas CIMs variaram de 4 a 16  $\mu\text{g/mL}$ . O complexo de 3H2 em  $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H) exibiu a mesma faixa de valores de CIM que a substância pura. No caso dos antifúngicos, para o fluconazol foram encontradas CIMs de 4 a 32  $\mu\text{g/mL}$  enquanto a anfotericina B foi ativa com concentrações bem menores (0,3 a 0,6  $\mu\text{g/mL}$ ). Considerando-se os valores das médias geométricas de CIM e CFM das substâncias testadas, 3H2, CD-3H e fluconazol apresentaram atividade fungistática enquanto a anfotericina B atividade fungicida.

Tabela 8: Médias geométricas dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) em  $\mu\text{g/mL}$  de 3H2, CD3H e dos antifúngicos fluconazol (FCZ) e anfotericina B (AMB) contra linhagens de *Cryptococcus neoformans* realizados em triplicata.

	3H2	CD-3H	Fluconazol	Anfotericina B
<i>C. neoformans</i>	CIM / CFM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
ATCC 24067	2,0/2,0	2,0/2,0	5,7/64,0	0,125/0,5
ATCC 28957	2,0/2,0	2,0/2,0	1,4/32,0	0,125/0,5
ATCC 62066	4,0/16,0	4,0/4,0	8,0/16,0	0,125/0,125
H99	4,0/4,0	4,0/4,0	4,0/8,0	0,25/0,25
F10	4,0/8,0	4,0/4,0	4,0/16,0	0,125/0,5
RN01	4,0/4,0	4,0/4,0	4,0/8,0	0,25/0,25
C31	2,0/2,0	2,0/2,0	2,0/4,0	0,5/1,0
Wp	4,0/4,0	4,0/8,0	8,0/64,0	0,5/1,0
5396	4,0/8,0	4,0/8,0	5,7/22,6	0,125/0,125
96806	4,0/32,0	4,0/32,0	45,3/64,0	0,125/0,125
27JF	4,0/16,0	4,0/16,0	4,0/64,0	0,5/1,0
28JF	2,0/4,0	2,0/4,0	5,7/22,6	0,5/0,5
<b>média geométrica</b>	3,2/5,7	3,2/5,0	5,2/22,6	0,2/0,4
CIM <sub>50</sub> / CFM <sub>50</sub>	4,0/4,0	4,0/4,0	4,0/16,0	0,125/0,5
CIM <sub>90</sub> / CFM <sub>90</sub>	4,0/16,0	4,0/16,0	8,0/64,0	0,5/1,0
CFM/CIM <sup>a</sup>	1,8	1,6	4,3	2

<sup>a</sup> Razão entre concentração fungicida mínima (CFM) e concentração inibitória mínima (CIM) que determina atividade fungicida ( $\text{CFM}/\text{CIM} \leq 4$ ) ou fungistática ( $\text{CFM}/\text{CIM} > 4$ ) das drogas testadas.

O composto 3H2 e seu complexo foram, igualmente, ativos contra amostras de *C. neoformans*, com os valores de CIM entre 2 e 4  $\mu\text{g/mL}$  e valores de CFM entre 4 e 32  $\mu\text{g/mL}$ . Nesse caso todos os compostos testados apresentaram atividade fungicida contra as amostras testadas, assim como a anfotericina B. No entanto, observou-se como na espécie anterior a atividade fungistática em fluconazol.

Como 3H2 e seu complexo CD-3H apresentaram *in vitro* o mesmo perfil de atividade antifúngica todos os demais ensaios foram realizados com a droga pura com exceção dos testes *in vivo*.

### 5.5.2 Avaliação da curva de morte

A influência dos tratamentos com a alilimina 3H2 na cinética de crescimento da amostra de *C. gattii* L27/01 foi avaliada (FIGURA 20). O fungo foi colocado em contato com a droga e alíquotas foram retiradas e plaqueadas em diferentes tempos (0, 6, 12, 24, 48, 72h) e

as placas foram incubadas a 35°C e suas colônias contadas para se determinar a quantidade de Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL).

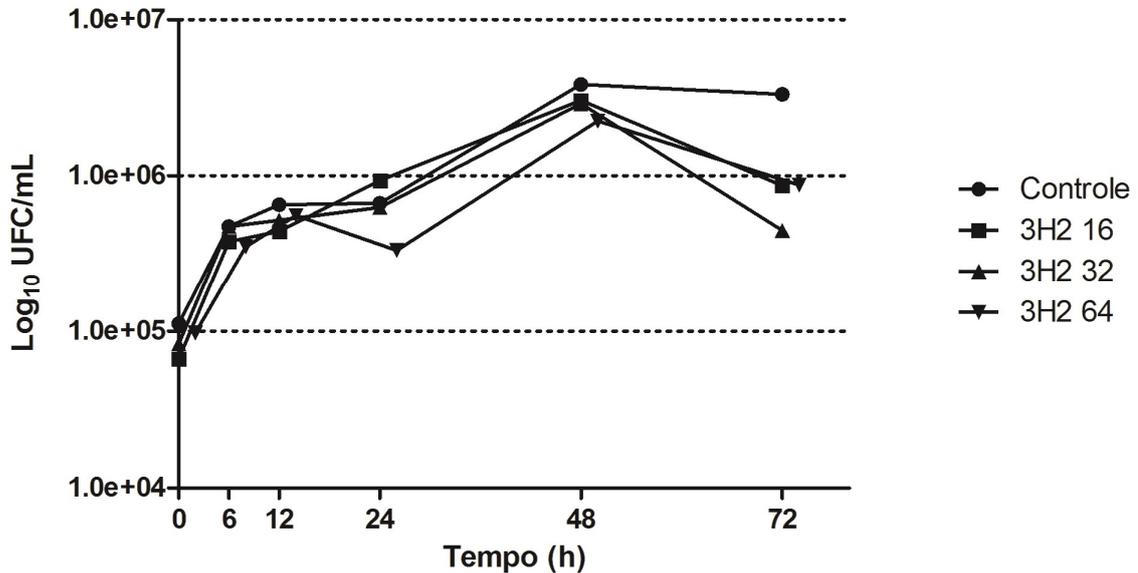


Figura 20: Curva de morte da amostra de *C. gattii* L27/01 sem tratamento (controle) e tratada com o composto 3H2 nas concentrações de 16,32 e 64 µg/mL avaliada nos tempos de 0, 6, 12, 24, 48 e 72h.

Como pôde ser verificado no teste da curva de morte, o composto 3H2 não foi capaz de eliminar a população fúngica nas condições testadas. Este resultado corrobora os resultados do teste de atividade fungicida/fungistática evidenciando o caráter fungistático da alilimina estudada. Embora não tenha sido fungicida, no tempo de 72h o composto nas três concentrações testadas reduziu com diferença estatística a quantidade de células de *C. gattii* ( $P < 0,05$ ).

### 5.5.3 Atividade do composto 3H2 em combinação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B

A alilimina 3H2 foi testada em combinação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B. Seus valores médios do índice concentração inibitória fracionária (ICIF) foram calculados (TABELA 9) e, a partir destes valores, sua interação com os antifúngicos foi classificada sendo sinérgica quando  $\leq 0,5$ ; indiferente quando  $0,5 < \text{ICIF} < 4,0$  e como antagonista quando  $> 4,0$  (MUKHERJEE et al., 2005).

Tabela 9: Índice da concentração inibitória fracionária (ICIF) e natureza da interação entre o composto 3H2 e os antifúngicos fluconazol (FCZ) e anfotericina B (AMB). S, sinergismo ( $ICIF \leq 0,5$ ); I, indiferente ( $0,5 < ICIF \leq 4$ ).

<i>Cryptococcus gattii</i>	Combinações	
	3H2 + FCZ	3H2 + AMB
ATCC 24065	1,2 (I)	0,5 (S)
ATCC 32608	2,0 (I)	0,6 (I)
135L/03	1,2 (I)	0,4 (S)
L28/02	1,2 (I)	0,8 (I)
23/10993	1,3 (I)	0,9 (I)
196L/03	1,2 (I)	0,6 (I)
1913/ER	1,2 (I)	0,6 (I)
547 OTTI	1,1 (I)	0,5 (S)
L27/01	0,7 (I)	0,8 (I)
LMM 818	1,8 (I)	0,6 (I)
L24/01	0,7 (I)	0,5 (S)
29/10893	1,2(I)	0,9 (I)

O composto 3H2 foi indiferente para todas as amostras na combinação com o fluconazol. Entretanto, na combinação com a anfotericina B esse apresentou atividade sinérgica para 4 das 12 amostras testadas. Para verificar se estas interações eram dependentes da quantidade de droga utilizada construíram-se tabelas de CIF em função da concentração de antifúngico (TABELAS 10 e 11).

Tabela 10: Determinação do tipo de interação em função da concentração de fluconazol

<i>Cryptococcus gattii</i>	Concentração de FCZ ( $\mu\text{g/mL}$ )									
	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	32,0	64,0
	CIF ( $\mu\text{g/mL}$ )									
ATCC 24065	1,1	1,1	1,3	1,5						
ATCC 32608	1,0	2,1	2,1	2,3	2,5					
135L/03	1,1	1,1	1,3	1,5						
L28/02	1,0	1,0	1,1	1,1	1,3	1,5				
23/10993	1,1	1,3	1,5							
196L/03	1,0	1,0	1,1	1,1	1,3	1,5				
1913/ER	1,1	1,1	1,3	1,5						
547 OTTI	<b>0,5*</b>	1,0	1,1	1,1	1,3	1,5				
L27/01	<b>0,5*</b>	<b>0,5*</b>	0,6	0,6	0,8	1,0				
LMM 818	2,0	2,0	2,1	2,1	1,3	1,5				
L24/01	0,5	0,6	0,6	0,8	1,0					
29/10893	1,1	1,1	1,3	1,5						

Valores em negrito \*Sinergismo

Na combinação de 3H2 com o fluconazol, mesmo em diferentes concentrações a interação entre os dois foi, de maneira geral, indiferente. Somente para as amostras 547 OTTI e L27/01 é que se verificou sinergismo nas menores concentrações do antifúngico.

Já na combinação com a anfotericina B foi observada atividade sinérgica em diferentes concentrações do antifúngico para várias amostras. A concentração de 0,25 µg/mL de AMB se destaca, uma vez que apresentou sinergismo para todas as amostras testadas (TABELA 11).

Tabela 11: Determinação do tipo de interação em função da concentração de anfotericina B

	Concentração de AMB (µg/mL)									
	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0
<i>Cryptococcus gattii</i>	CIF (µg/mL)									
ATCC 24065	0,6	<b>0,4*</b>	<b>0,5*</b>	<b>0,5*</b>						
ATCC 32608	1,0	0,6	<b>0,4*</b>	<b>0,3*</b>	0,6					
135L/03	<b>0,3*</b>	<b>0,3*</b>	<b>0,4*</b>	<b>0,3*</b>	<b>0,5*</b>					
L28/02	<b>0,5*</b>	1,1	1,1	<b>0,5*</b>	0,6					
23/10993	1,0	1,1	1,1	<b>0,5*</b>	0,6					
196L/03	0,6	<b>0,4*</b>	<b>0,5*</b>	<b>0,5*</b>	1,0					
1913/ER	1,0	0,6	<b>0,4*</b>	<b>0,3*</b>	0,6					
547 OTTI	1,0	<b>0,3*</b>	<b>0,4*</b>	<b>0,3*</b>	<b>0,5*</b>					
L27/01	1,0	1,1	1,1	<b>0,4*</b>	0,6					
LMM 818	1,0	0,6	0,6	<b>0,4*</b>	0,6					
L24/01	<b>0,5*</b>	0,6	0,6	<b>0,3*</b>	0,6					
29/10893	1,0	1,1	1,1	<b>0,4*</b>						

Valores em negrito \*Sinergismo

Com os valores médios das CIMs dos compostos combinados com fluconazol e anfotericina B, construíram-se as curvas da atividade *in vitro* em combinação das drogas contra todos os isolados de *C. gattii* (FIGURAS 21 E 22).

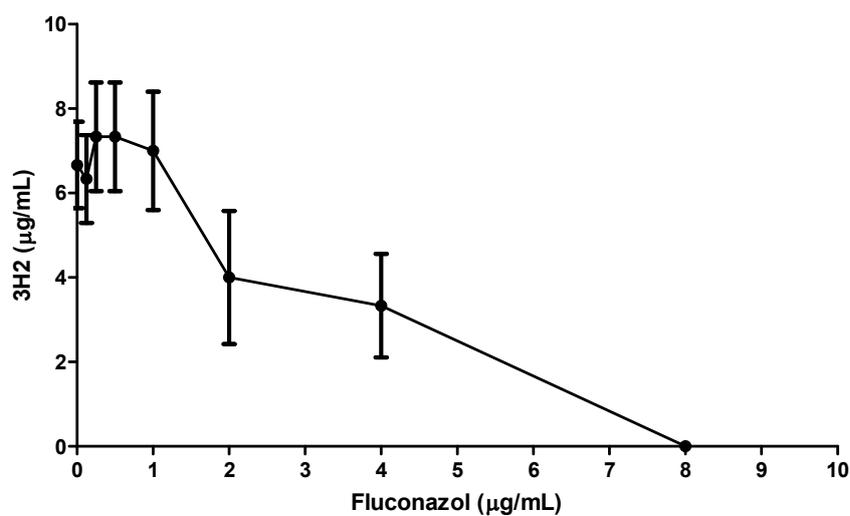


Figura 21: Atividade *in vitro* de 3H2 combinado com fluconazol contra linhagens de *Cryptococcus gattii*.

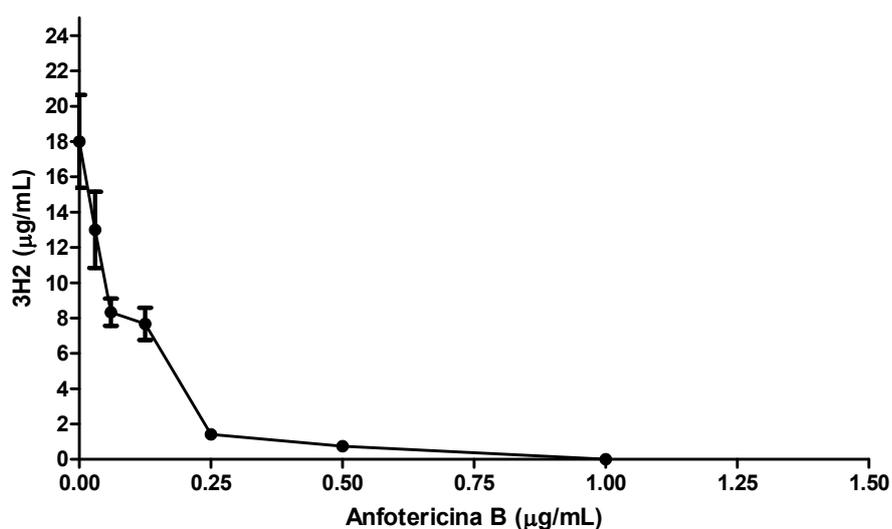


Figura 22: Atividade *in vitro* de 3H2 combinado com anfotericina B contra linhagens de *Cryptococcus gattii*.

#### 5.5.4 Ensaio do Sorbitol

Para investigar se a parede celular poderia ser um alvo de ação do composto 3H2, determinou-se a concentração inibitória mínima através do teste da microdiluição em caldo conforme descrito no item 4.3 utilizando-se o meio RPMI acrescido de sorbitol 0,8M. O meio sem sorbitol foi utilizado como controle negativo. Foram testadas 12 amostras de *Cryptococcus gattii* e a leitura dos valores de CIM foi realizada três e dez dias após a incubação.

A TABELA 12 exibe os valores de CIM para 3H2 em meio com e sem sorbitol em que se pode observar que não houve diferença na sensibilidade das leveduras nas diferentes condições.

Tabela 12: Valores de concentração inibitória mínima (CIM) em  $\mu\text{g/mL}$  de 3H2 contra linhagens de *Cryptococcus gattii* determinados pelo teste da microdiluição em caldo utilizando-se o meio RPMI com e sem 0,8M de sorbitol.

<i>Cryptococcus gattii</i>	CIM 3H2 ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	3 dias		10 dias	
	s/ sorbitol	c/ sorbitol	s/ sorbitol	c/ sorbitol
ATCC 24065	4	4	4	4
ATCC 32608	16	16	16	16
135L/03	16	8	16	8
L28/02	8	8	8	8
23/10993	4	4	4	4
196L/03	4	8	4	8
1913/ER	8	8	8	8
547 OTTI	8	8	8	8
L27/01	16	16	16	16
LMM 818	8	4	8	4
L24/01	16	8	16	8
29/10893	8	4	8	4

### 5.5.5 Avaliação da produção de melanina

A alilimina 3H2 foi investigada quanto a sua capacidade de interferir na síntese da melanina da amostra de *C. gattii* L27/01. Diferentes inóculos da amostra foram adicionados em placas de Petri contendo ágar meio mínimo + L-dopa acrescido de 3H2 em diferentes concentrações. As placas foram visualizadas, diariamente, durante 10 dias, quanto à produção de melanina (FIGURA 23). Na figura pode ser observada a diferença de pigmentação das colônias do grupo controle (A) em relação aos grupos com a presença de 3H2 no meio de cultura (B) e (C).

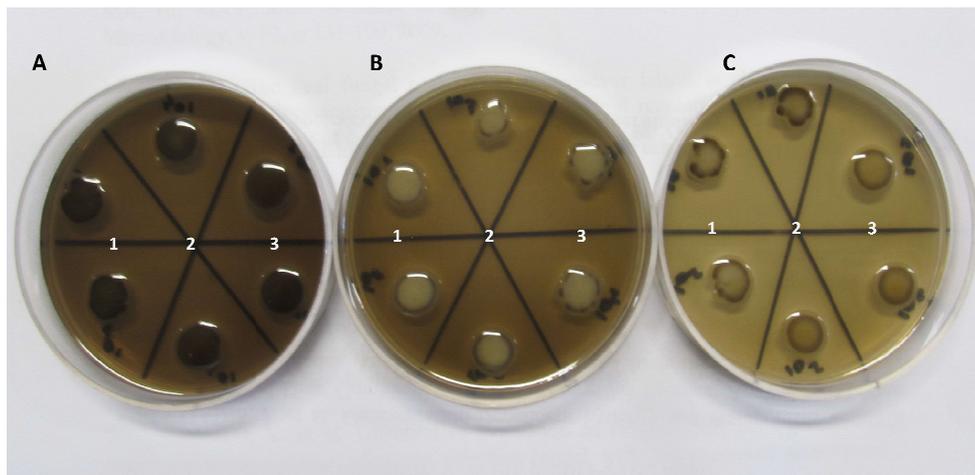


Figura 23: Avaliação da produção de melanina pela amostra de *Cryptococcus gattii* L27/01 após 10 dias de cultivo em Agar meio mínimo com L-dopa 1mM sem tratamento (A) tratada com 3H2 nas concentrações de 0,5xCIM (B) e CIM (C). Foram testados os inóculos de  $10^3$  (1);  $10^4$  (2) e  $10^5$  (3) em duplicata.

### 5.5.6 Determinação da atividade de lacase

Realizou-se o teste da oxidação do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) para verificar a ação de 3H2 na atividade da enzima lacase. As células de *C. gattii* L27/01 depois de cultivadas em meio mínimo foram tratadas com 3H2 0,5xCIM em PBS adicionado de ABTS 1mM e incubadas por duas horas a 30°C. Foram preparados controles com o fungo sem tratamento e somente com o PBS com o reagente. Como controle positivo foi utilizado uma solução de lacase produzida comercialmente. As células depois de centrifugadas e removidas tiveram as absorvâncias de seus sobrenadantes detectadas em espectrofotômetro a 420 nm. A FIGURA 24 exhibe os resultados de atividade de lacase da amostra testada de *C. gattii* tratada com a alilimina estudada e também a influência de diferentes concentrações de 3H2 na atividade de uma concentração fixa da enzima produzida comercialmente.

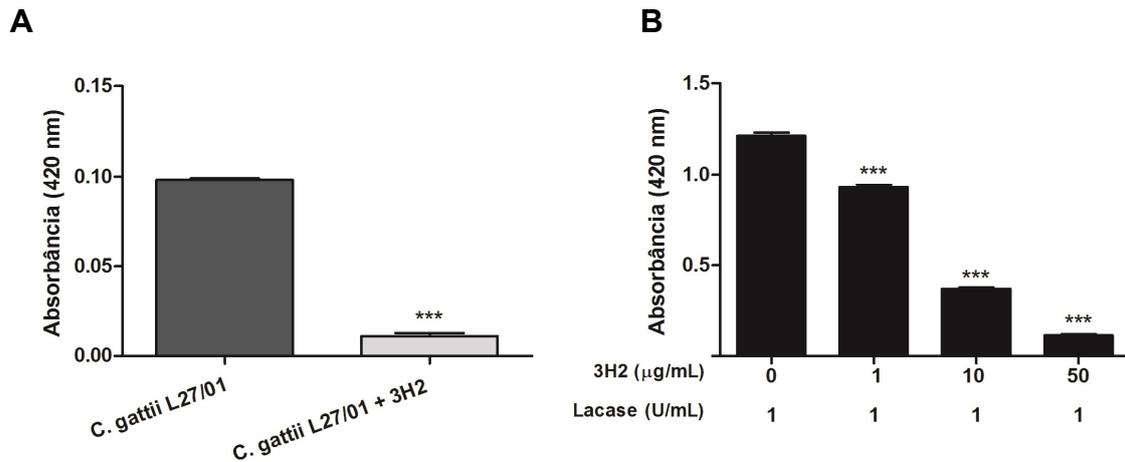


Figura 24: A alilimina 3H2 reduz a atividade de lacase. A amostra de *C. gattii* L27/01 foi tratada com 3H2 na concentração 0,5xCIM com redução significativa na atividade da enzima (A). A enzima produzida comercialmente foi testada com diferentes concentrações da alilimina (B). (\*\*\*) $P < 0,0001$

### 5.5.7 Potencial zeta de *C. gattii* tratado com 3H2

Para avaliar o efeito de 3H2 sobre a carga da célula de *C. gattii* avaliou-se o potencial Zeta. Foram testadas diferentes concentrações do composto em contato com uma suspensão fúngica contendo  $1 \times 10^6$  UFC/mL que então foram analisadas no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (FIGURA 25). Foi verificado que a incubação de células da amostra de *C. gattii* L27/01 nas concentrações 8, 16 e  $24 \mu\text{g/mL}$  de 3H2 levou a uma redução na carga da superfície celular ( $P < 0,0001$ ).

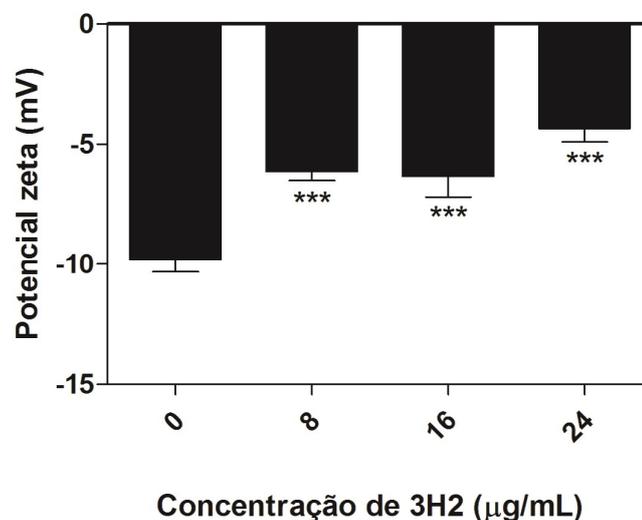


Figura 25: Potencial zeta determinado nas células de *C. gattii* tratadas com 3H2. (\*\*\*) $P < 0,0001$

### 5.5.8 Avaliação do efeito do tratamento com 3H2 na cápsula da amostra de *Cryptococcus gattii* L27/01

A amostra L27/01 foi cultivada em placas de ágar meio mínimo contendo 3H2 na concentração 0,5xCIM para que seu efeito sob a cápsula fúngica fosse avaliado. A amostra cultivada em meio sem a droga foi considerada como controle negativo. Foram preparadas lâminas em tinta Nanquim que então foram visualizados em microscópio óptico e fotografados para que o volume da cápsula, os diâmetros da célula total (célula + cápsula) e do corpo celular fossem medidos com o uso do software de morfometria *image J* NIH 1.48v. Avaliaram-se tamanhos de célula e cápsula de 30 leveduras em cada lâmina e os volumes foram calculados com a equação de volume de esfera (FIGURA 26).

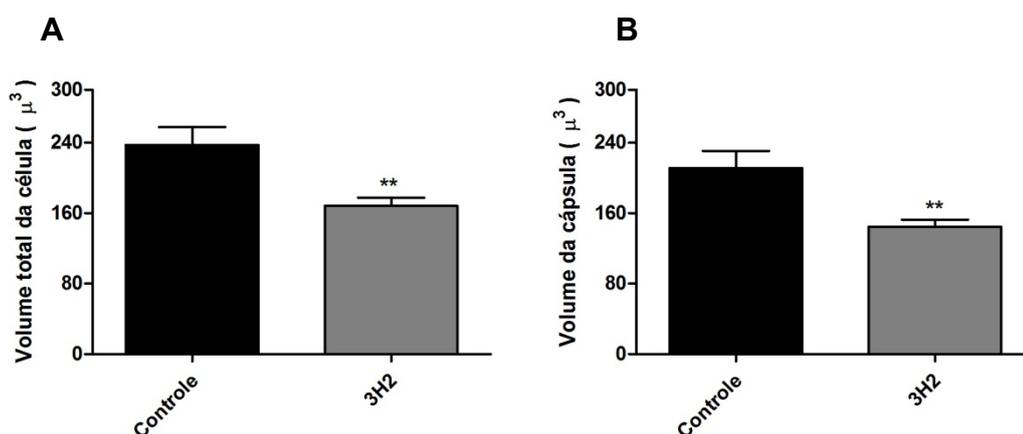


Figura 26: Efeito do tratamento com 3H2 sobre a cápsula da amostra de *Cryptococcus gattii* L27/01. Volume total da célula considerando cápsula e corpo celular (A), volume da cápsula (B) (\*\*  $P < 0,001$ ).

O tratamento com 3H2 foi capaz de reduzir o volume total da célula devido à sua redução significativa observada no volume de cápsula ( $P < 0,01$ ). Com isso, o volume do corpo celular não foi alterado com o tratamento com a alilimina.

### 5.5.9 Visualização das células de *C. gattii* tratadas com 3H2 pela microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para visualizar em microscopia eletrônica de varredura (MEV) o efeito do tratamento com 3H2 nas células de *C. gattii*, a amostra L27/01 foi cultivada em placas de ágar meio mínimo

contendo a alilimina na concentração 0,5xCIM por 48h a 37°C. As células depois de centrifugadas foram aplicadas em lamínulas de poli-L-lisina, fixadas e lavadas com os tampões adequados. Por fim as preparações foram processadas pela desidratação seriada em etanol, foi obtido o ponto crítico e a metalização com ouro. O material foi então visualizado no microscópio eletrônico de varredura - Quanta 200- FEG- FEI operado a 15Kv.

A visualização pela MEV revelou que as leveduras cultivadas no meio contendo 0,5x CIM de 3H2 apresentaram diferentes morfologias comparadas com as células crescidas no meio sem droga (FIGURA 27). No grupo sem tratamento observaram-se células típicas cobertas com uma rede densa de fibras capsulares soltas (FIGURA 27A-C). As fibras capsulares das células cultivadas com 3H2, quando presentes, aparentavam ser mais curtas, e mais aderidas à superfície celular (FIGURA 27D-F).

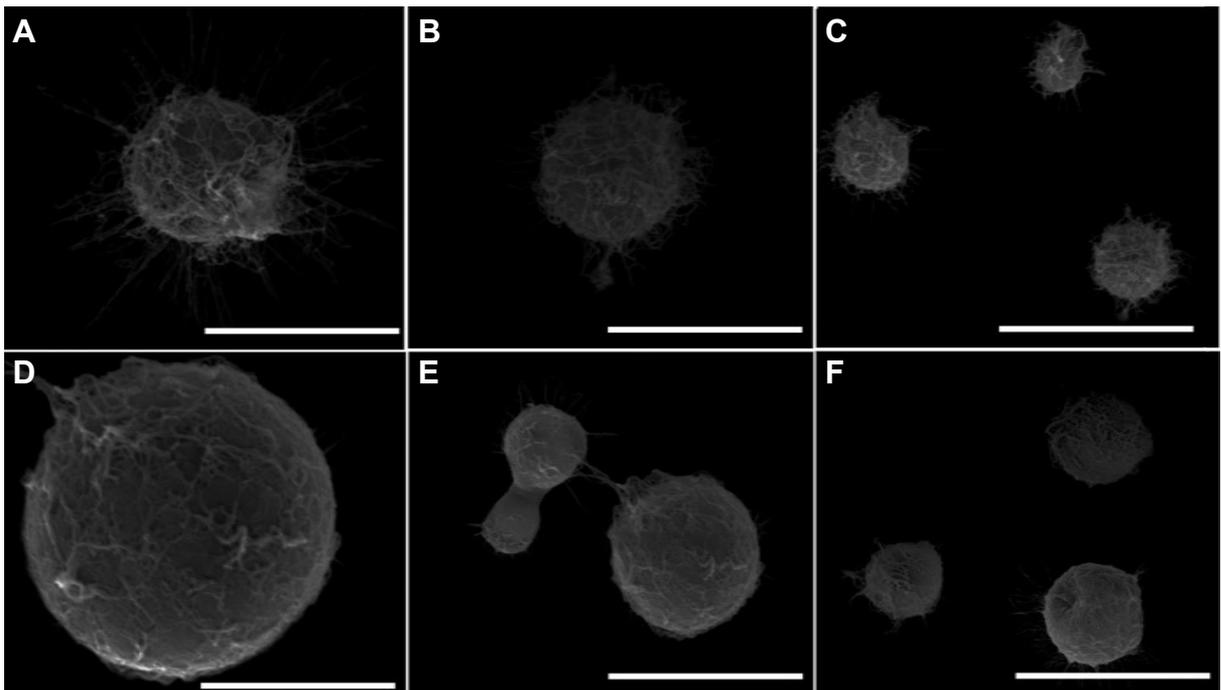


Figura 27: Microscopia eletrônica de varredura das células de *C. gattii* L27/01. As células foram cultivadas em meio mínimo (A, B e C) e meio mínimo acrescido de 0,5xCIM de 3H2 (D,E e F). As barras de escala representam 5µm nas figuras A, B, e D; e 10 µm nas figuras C, E e F.

### 5.5.10 Avaliação da atividade *in vivo* de 3H2 e seu complexo em $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H) em modelo de infecção pulmonar causada por *Cryptococcus gattii*

#### 5.5.10.1 Curvas de sobrevivência

Todos os animais foram infectados via intratraqueal com um inóculo contendo  $10^4$  células da amostra de *C. gattii* L27/01. Foi inicialmente determinada uma curva de sobrevivência dos animais infectados, tratados com 3H2 nas doses de 30, 50, 100 e 150 mg/kg, para se definir a dose mais efetiva da alilimina (FIGURA 28).

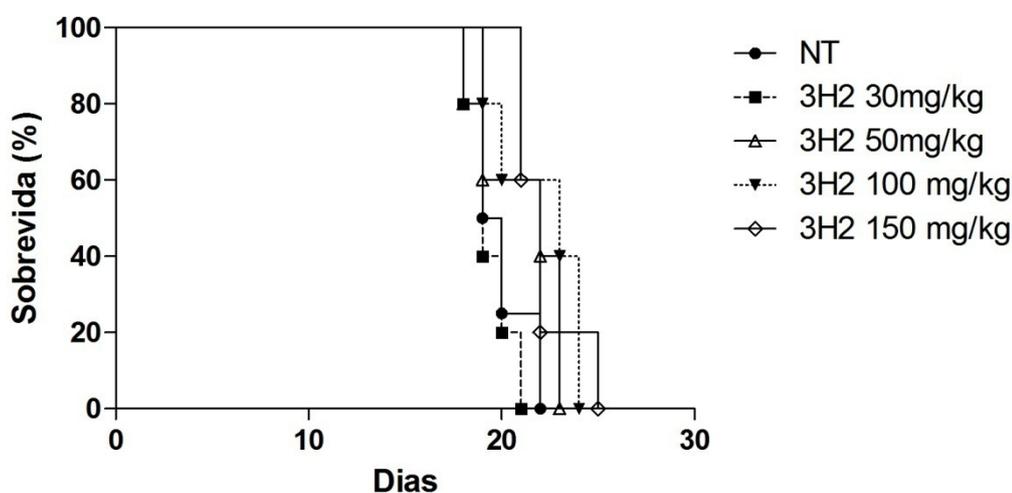


Figura 28: Curva de sobrevivência dos camundongos C57BL/6 infectados intratraquealmente ( $10^4$  células) e tratados com 3H2 em diferentes doses, além do controle não tratado (NT). Foram também realizados controles não infectados e tratados com a alilimina. ( $P > 0,05$ )

Nenhuma das doses testadas de 3H2 foi capaz de prolongar a sobrevivência dos animais infectados com *C. gattii* L27/01 em relação ao grupo sem tratamento. Assim, pretendeu-se avaliar a atividade de 3H2 associada com os agentes antifúngicos fluconazol (FIGURA 29) e anfotericina B (FIGURA 30). Como nenhuma dose foi efetiva selecionou-se a menor dose testada (30mg/kg) para ser avaliada na terapia combinada.

Os animais tratados com fluconazol (FCZ) 10mg/kg e a associação 3H2 30mg/kg + FCZ 10 mg/kg sobreviveram, igualmente, em média 27 dias enquanto os não tratados sobreviveram aproximadamente 20 dias ( $P < 0,001$ ). A alilimina associada com fluconazol, portanto, não foi capaz de aumentar o tempo de vida dos animais infectados em relação ao tratamento com fluconazol individualmente. O grupo tratado com dose mais baixa de

fluconazol (1mg/kg) e sua associação com 3H2 apresentaram a mesma sobrevivência que o grupo sem tratamento, em torno de 20 dias (FIGURA 29).

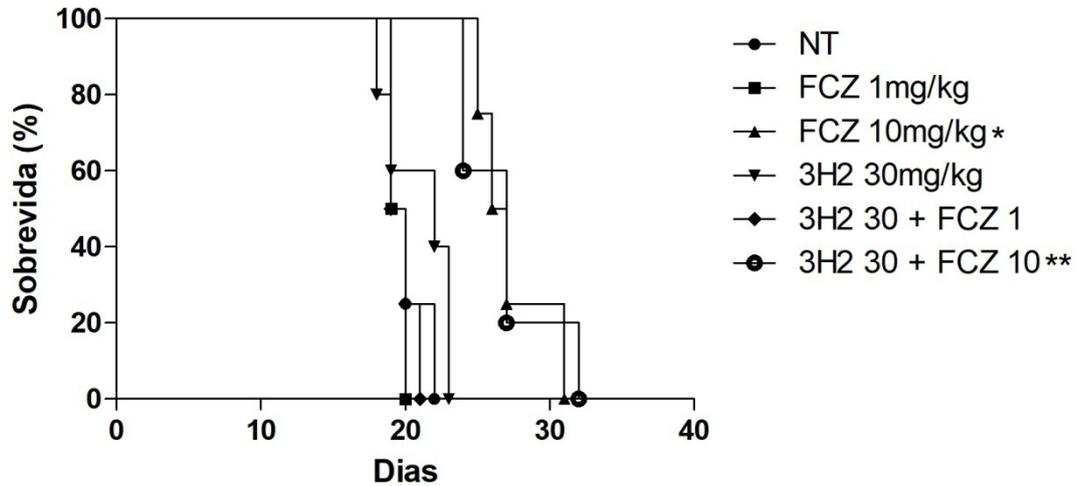


Figura 29: Sobrevivência dos animais infectados com *C. gattii* L27/01 sem tratamento (NT) e tratados com 3H2 30mg/kg, fluconazol (FCZ) nas doses de 1 e 10mg/kg e associações com 3H2 30mg/kg. (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$  em comparação com o grupo NT).

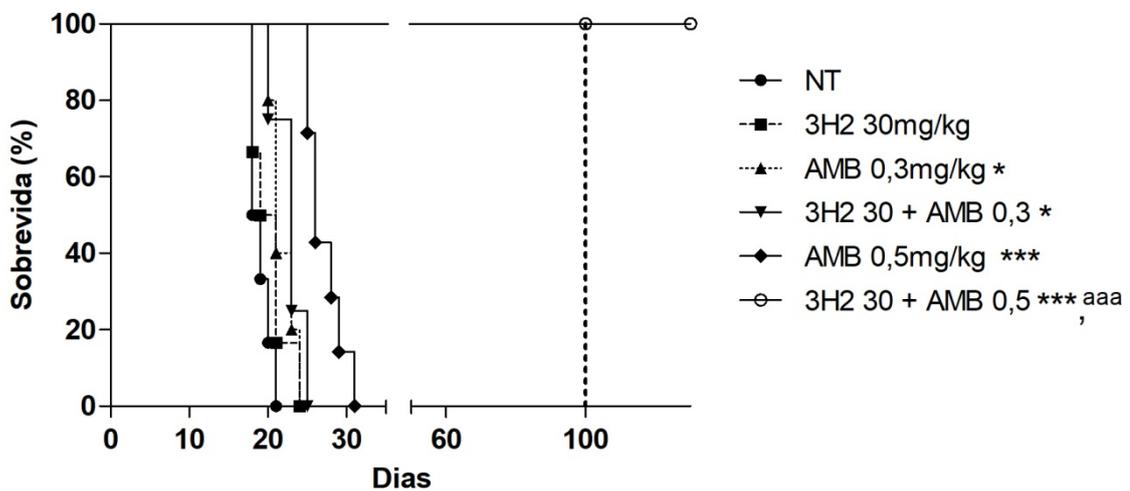


Figura 30: Sobrevivência dos animais infectados com *C. gattii* L27/01 sem tratamento (NT) e tratados com 3H2 30mg/kg, anfotericina B (AMB) nas doses de 0,3 e 0,5mg/kg e associações com 3H2 30mg/kg. Os símbolos representam diferenças estatísticas entre os diferentes grupos (\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,0001$  - diferenças com o grupo NT), (aaa  $P < 0,0001$  - diferença com anfotericina B 0,5mg/kg).

O tratamento com anfotericina B (AMB) 0,3mg/kg levou a um discreto aumento da sobrevivência dos animais infectados com *C. gattii* sendo seu tempo médio de sobrevivência de aproximadamente 22 dias, enquanto o grupo não tratado sobreviveu por cerca de 19 dias

( $P < 0,05$ ). No entanto, a associação de AMB 0,3 mg/kg com 3H2 30 mg/kg apresentou o mesmo perfil quando comparado com o antifúngico em monoterapia. O aumento da dose de AMB para 0,5mg/kg eleva significativamente o tempo de sobrevivência dos animais passando de 19 dias (grupo não tratado) para 26 dias ( $P < 0,001$ ). Contudo, quando o antifúngico nessa dose foi associado com 3H2 30mg/kg foi observada a sobrevivência dos animais durante todo o tempo de duração do experimento, sendo esse grupo tratado por 100 dias e monitorado por mais 30 dias após a interrupção do tratamento ( $P < 0,001$ ) (FIGURA 30).

Nesse contexto, considerando-se a dose estabelecida de 3H2 como 30mg/kg, testou-se, nessa mesma dose, seu complexo de inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H) individualmente e associado com AMB 0,5mg/kg (FIGURA 31).

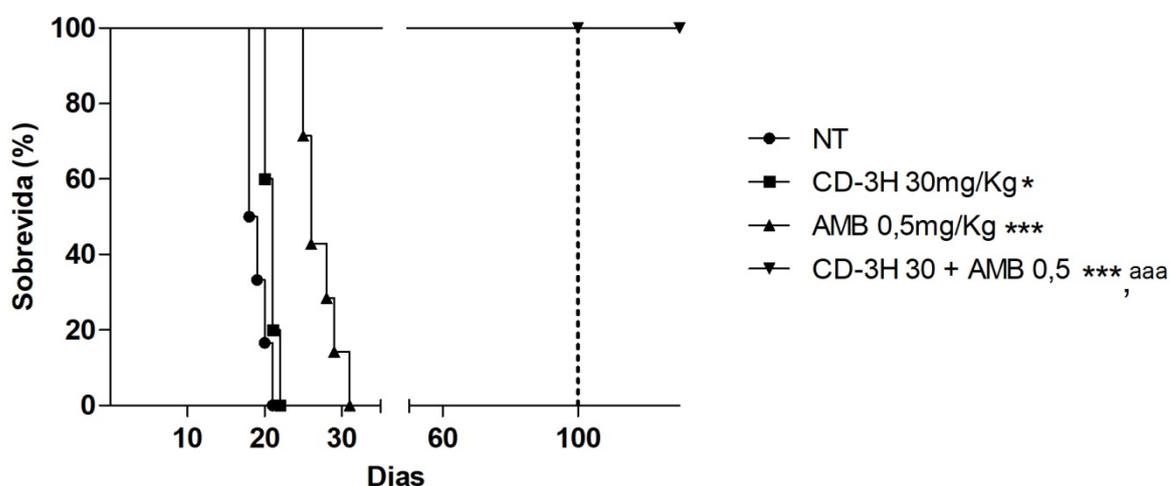


Figura 31: Sobrevida dos animais infectados com *C. gattii* L27/01 sem tratamento (NT) e tratados com anfotericina B (AMB) nas dose de 0,5mg/kg e associada com o complexo de inclusão de 3H2 em  $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H) 30mg/kg. (\* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,0001$  – diferenças com o grupo NT), (aaa  $P < 0,0001$  - diferença com anfotericina B 0,5mg/kg).

Observou-se o mesmo perfil de sobrevida verificado no tratamento com 3H2 puro, sendo a droga em monoterapia incapaz de prolongar a sobrevida dos animais enquanto sua associação com AMB leva à sobrevivência dos animais também até os 100 dias de tratamento e mais 30 dias em que o grupo foi monitorado ( $P < 0,001$ ) (FIGURA 31).

Dados os resultados de curva de sobrevida pretendeu-se analisar a carga fúngica dos animais infectados com *C. gattii* e tratados com 3H2 e CD-3H e suas associações com Anfotericina B.

### 5.5.10.2 Determinação da carga fúngica

Após o processo de infecção intratraqueal com  $10^4$  células de *C. gattii* L27/01os animais, sendo seis por grupo, passaram a ser tratados e monitorados diariamente. Baseando-se nos resultados de curva de sobrevivência dois pontos de corte foram estabelecidos para o sacrifício dos animais para a determinação da carga fúngica. A primeira eutanásia foi de 15 dias pós- infecção (p.i.) para todos os grupos [NT, AMB(0,5mg/kg), 3H2(30mg/kg), CD-3H(30mg/kg), 3H2(30mg/kg) + AMB(0,5mg/kg) e CD-3H(30mg/kg) + AMB(0,5mg/kg)] e a segunda foi de 30 dias p.i. somente para os grupos de 3H2 e seu complexo associados com AMB pois esses foram os grupos em que os animais sobreviveram por mais tempo. Além disso, aqueles animais que, na curva de sobrevivência, foram tratados até 100 dias também foram eutanasiados após 30 dias da interrupção do tratamento.

Os animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical e seus pulmões e cérebro foram removidos assepticamente, homogeneizados e plaqueados em Agar Sabouraud com cloranfenicol para a contagem das colônias recuperadas e determinação da quantidade de UFC/g em cada órgão. A FIGURA 32 exibe os resultados obtidos de carga fúngica nos pulmões e no cérebro 15 dias após a infecção com *C. gattii*.

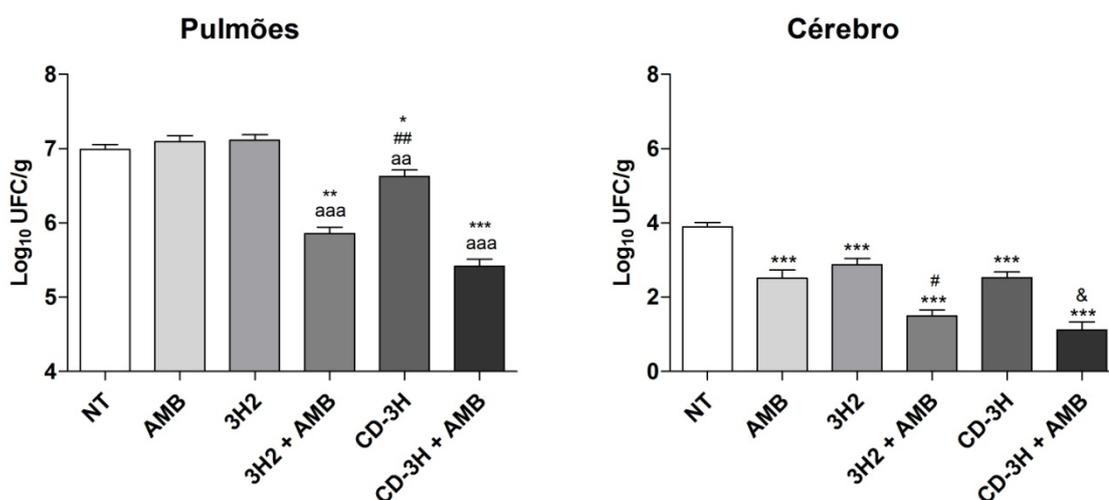


Figura 32: Carga fúngica nos pulmões e cérebro dos animais infectados com *C. gattii* sem tratamento (NT) e tratados com Anfotericina B (AMB), 3H2, CD-3H e suas associações com AMB por 15 dias. Os símbolos representam diferenças estatísticas entre os diferentes grupos. (<sup>aa</sup> P<0,001; <sup>aaa</sup> P<0,0001 - diferenças com anfotericina B), (\*P<0,05; \*\* P<0,001; P<0,0001 - diferenças com o grupo NT), (# P<0,05 ##; P<0,001 - diferenças com o grupo 3H2), (& P<0,05 - diferença com o grupo CD-3H).

Nos pulmões quase todos os regimes em monoterapia não foram eficazes na redução da carga fúngica comparados com o grupo sem tratamento (NT), com exceção do grupo CD-3H ( $P < 0,05$ ). Quando se observam as associações percebe-se uma redução significativa na carga fúngica pulmonar para 3H2 + AMB ( $P < 0,001$ ) e CD-3H + AMB ( $P < 0,0001$ ), entretanto sem diferença entre esses grupos. Os grupos associados com AMB ( $P < 0,0001$ ) e, inclusive, o complexo de 3H2 (CD-3H) ( $P < 0,001$ ) apresentaram diferenças comparados com o antifúngico sozinho. Comparando-se a alilimina pura e seu complexo, o último foi capaz de reduzir a carga fúngica pulmonar ( $P < 0,001$ ). No cérebro foi verificada a redução da carga fúngica com todos os tratamentos tanto em monoterapia quanto quando associados ( $P < 0,0001$ ). Os grupos associados com AMB obtiveram melhores resultados que somente 3H2 ou CD-3H ( $P < 0,05$ ) (FIGURA 32).

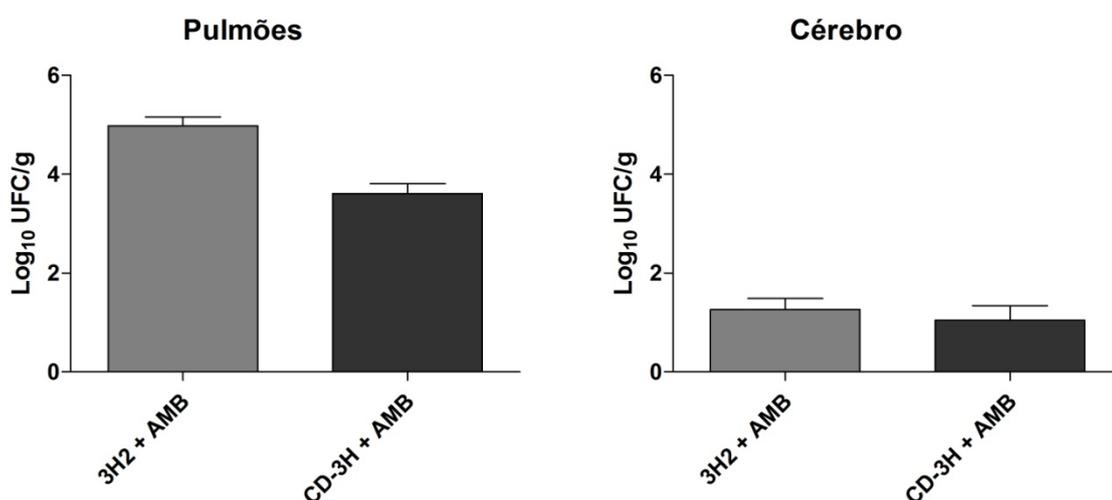


Figura 33: Carga fúngica nos pulmões e cérebro dos animais infectados com *C. gattii* e tratados com 3H2 e CD-3H associadas com AMB, sacrificados 30 dias pós-infecção.

Após 30 dias de infecção os animais dos grupos 3H2+AMB e CD-3H + AMB foram sacrificados e suas cargas fúngicas dos pulmões e cérebro foram determinadas (FIGURA 33). Pode-se observar que, embora os tratamentos associando-se 3H2 e seu complexo em  $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H) com anfotericina B sejam capazes de prolongar a sobrevivência dos animais infectados com *C. gattii* L27/01, esses não conseguem eliminar, completamente, nos pulmões e cérebro a presença da levedura. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

Os animais que foram tratados durante 100 dias foram monitorados por mais 30 dias sem tratamento até que foram sacrificados e tiveram a carga fúngica de seus pulmões e cérebro determinada (FIGURA 34).

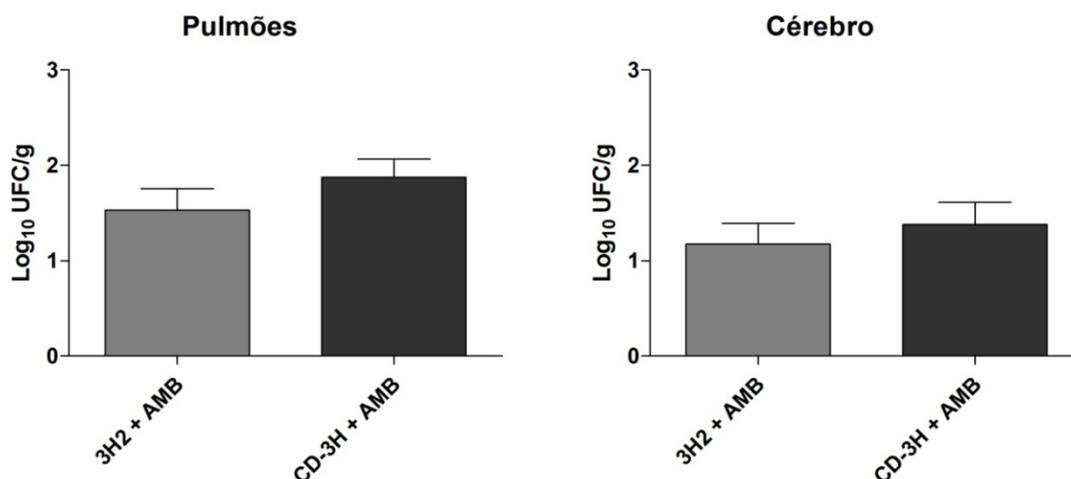


Figura 34: Carga fúngica em UFC/g determinada nos pulmões e cérebro dos animais infectados com *C. gattii* L27/01, tratados com 3H2 e CD-3H associadas com AMB durante 100 dias e sacrificados 30 dias após a interrupção do tratamento.

Depois de 100 dias de tratamento ainda foi possível detectar leveduras nos órgãos analisados, entretanto em grau bem menor em relação à carga fúngica dos animais sacrificados após 30 dias de infecção. Também não foi verificada diferença estatística entre os grupos 3H2 + AMB e CD-3H + AMB (FIGURA 34).

#### 5.5.11 Análise comportamental dos animais infectados com *C. gattii* e tratados com 3H2, CD-3H e anfotericina B

O protocolo SHIRPA foi aplicado para se avaliar o comportamento animal diante da infecção por *C. gattii* e o efeito dos tratamentos com 3H2, CD-3H e anfotericina B (AMB) em monoterapia, bem como as associações 3H2 + AMB e CD-3H + AMB. Nesse teste são avaliados reflexos sensoriais, estado neuropsiquiátrico, funções motoras e autônomas, e peso corporal dos animais.

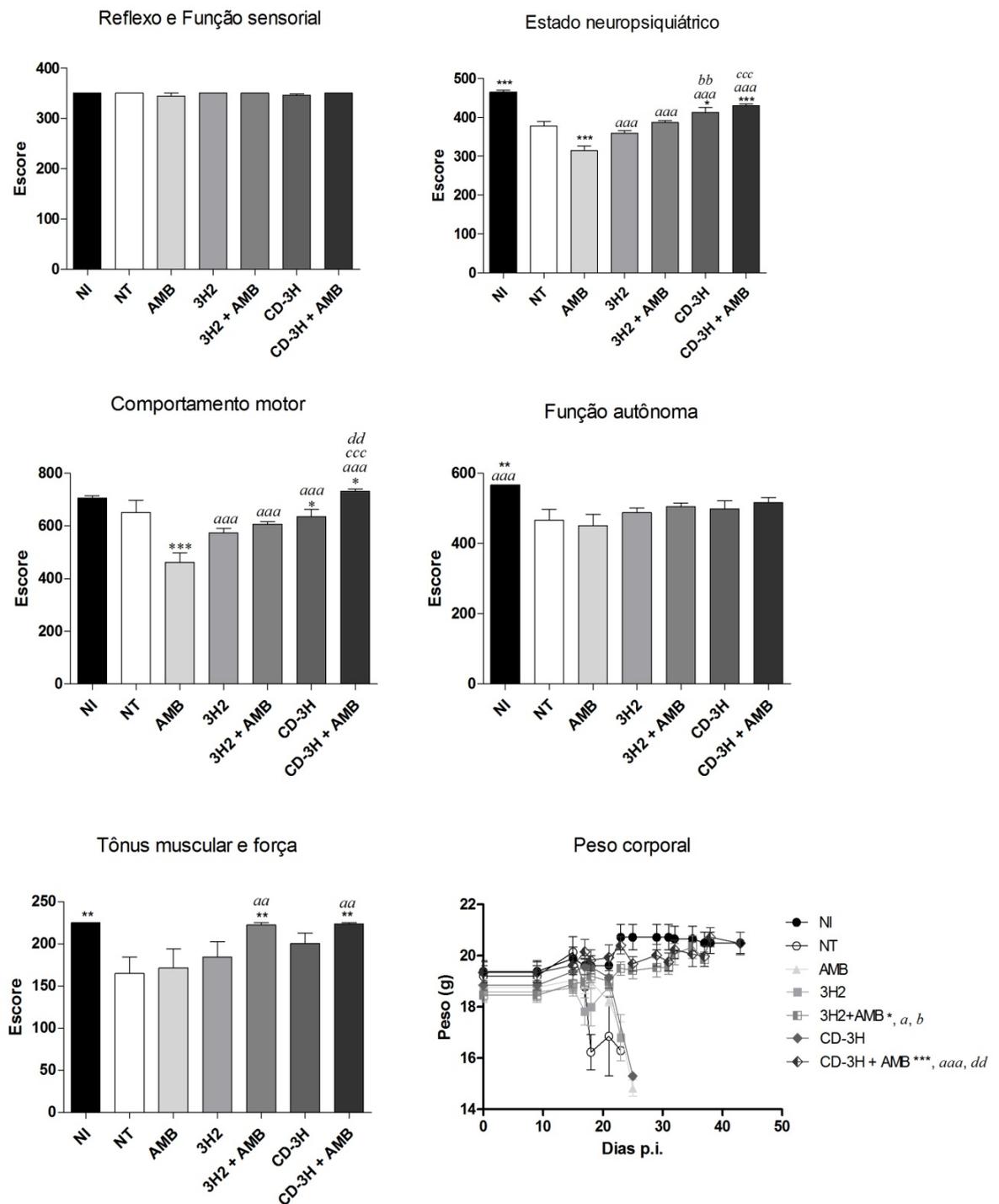


Figura 35: Teste SHIRPA avaliando o comportamento animal a cada dois dias após a infecção com *C. gattii* e com duração de 45 dias realizado com os grupos Não infectado (NI), Não tratado (NT), anfotericina B (AMB), 3H2 e seu complexo em  $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H) e suas associações com AMB: 3H2 + AMB e CD-3H + AMB. Os símbolos representam diferenças estatísticas entre os diferentes grupos. (<sup>a</sup>  $P < 0,05$ ; <sup>aa</sup>  $P < 0,001$ ; <sup>aaa</sup>  $P < 0,0001$  - diferenças com anfotericina B), (<sup>\*</sup>  $P < 0,05$ ; <sup>\*\*</sup>  $P < 0,001$ ; <sup>\*\*\*</sup>  $P < 0,0001$  - diferenças com o grupo NT), (<sup>b</sup>  $P < 0,05$ ; <sup>bb</sup>  $P < 0,001$  - diferença com o grupo 3H2); (<sup>c</sup>  $P < 0,05$ ; <sup>ccc</sup>  $P < 0,0001$  - diferença com o grupo 3H2 + AMB) (<sup>d</sup>  $P < 0,05$ ; <sup>dd</sup>  $P < 0,001$  - diferença com o grupo CD-3H).

O teste foi realizado a cada dois dias após a infecção com *C. gattii* e teve a duração de 45 dias. Os parâmetros individuais avaliados foram então agrupados em cinco domínios funcionais (estado neuropsiquiátrico; comportamento motor; função autônoma; tônus muscular e força, e reflexo e função sensorial) e foi determinado um escore geral para cada domínio (FIGURA 35). Os escores foram analisados por ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls e foram consideradas as diferenças entre o grupo não tratado NT(\*), AMB (*a*), 3H2(*b*), 3H2 + AMB (*c*) e CD-3H (*d*).

Não foram observadas diferenças entre os grupos na análise de reflexo e função sensorial. No entanto, com relação ao estado neuropsiquiátrico o tratamento com AMB levou a uma redução do escore em relação ao grupo sem tratamento ( $P < 0,0001$ ). Os animais tratados em monoterapia com CD-3H apresentaram melhora significativa neste domínio quando comparados aos animais tratados somente com 3H2 ( $P < 0,001$ ). Nessa análise o estado neuropsiquiátrico dos animais tratados com a associação CD-3H + AMB foi significativamente melhor do que daqueles tratados com associação entre 3H2 e AMB ( $P < 0,0001$ ).

Houve melhora no comportamento motor dos animais tratados com 3H2 , 3H2 + AMB, CD-3H e CD-3H + AMB em relação àqueles tratados somente com AMB ( $P < 0,0001$ ). Comparando-se as associações com anfotericina B, verificou-se uma melhora nesse domínio quando se utilizou na combinação a forma complexada em  $\beta$ -ciclodextrina ( $P < 0,0001$ ).

Somente a função autônoma dos animais não tratados e tratados com AMB foi reduzida comparando-se com os animais não infectados. Verificou-se melhora significativa no tônus muscular dos animais tratados com a associação de AMB com CD-3H e com 3H2, quando comparados àqueles não tratados ou tratados somente com AMB ( $P < 0,001$ ).

Na manutenção do peso corporal dos animais também se observou que as combinações foram mais efetivas que as monoterapias empregadas ( $P < 0,05$ ). Os animais tratados com CD-3H + AMB ( $P < 0,001$ ) e 3H2 + AMB ( $P < 0,5$ ) apresentaram a melhor média de peso corporal comparando-se com aqueles não tratados ou tratados com anfotericina B (FIGURA 35).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de 22 aliliminas contra amostras de *Cryptococcus* spp.

Alguns estudos têm sido feitos quanto ao potencial antifúngico de aliliminas. Manrao e colaboradores (2007) avaliaram diversas aliliminas variando seus grupos substituintes (metila, cloro, nitro e hidroxil) nas posições *orto*, *meta* e *para* no anel proveniente da amina, contra fungos fitopatogênicos. Halli e Sumathi (2012) verificaram a atividade antimicrobiana de algumas aliliminas e seus complexos metálicos contendo cobalto, níquel, cobre, cádmio, zinco e mercúrio contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* e os fungos *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Cladosporium oxosporium* e *Candida albicans*. Esses autores comprovaram que os complexos de cádmio, zinco e mercúrio apresentaram elevada atividade antifúngica.

As aliliminas são estruturalmente relacionadas às aminas derivadas do cinamaldeído. Singh e Mathela (2014) avaliaram a atividade antibacteriana de 10 aminas dessa classe que foram ativas, pelo método da difusão em ágar e pela microdiluição em caldo, contra as espécies Gram positivas: *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis* e as Gram negativas: *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Complexos metálicos de bases de Schiff derivadas do cinamaldeído contendo ferro, cobre, cério e gadolínio também foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana contra as mesmas bactérias do estudo anterior, além dos fungos *A. niger* e *C. albicans* (UBANI et al., 2015).

Nosso grupo de pesquisa já havia descrito a atividade anti-criptocócica de duas aliliminas (3D5 e 3D7) (MAGALHÃES, 2012). O presente trabalho avaliou a atividade de 22 aliliminas contra amostras de *Cryptococcus* spp. e os resultados obtidos foram bastante diversificados. As aliliminas testadas diferem entre si pelos seus ligantes e posições destes no anel proveniente da amina de partida (A) e no anel proveniente do aldeído de partida (B). A FIGURA 36 exibe a estrutura geral dos compostos testados, que corresponde à alilimina 3G2, e seus diferentes anéis aromáticos.

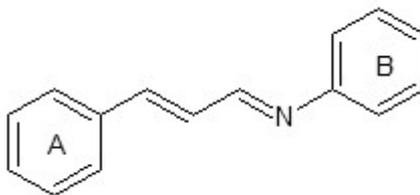


Figura 36: Estrutural básica das aliliminas investigadas neste estudo

Os diferentes grupos nitro, flúor, metoxila, trifluorometil, ciano, tiometil e dimetilamino foram introduzidos em diferentes posições nos anéis A e B, e, provavelmente, este fato foi determinante na presença ou não de atividade antifúngica nesses compostos. Os compostos mais ativos foram 3D7, 3H2, 3H10, 3I2, 3I3 e 3I5. As moléculas de 3H10, 3I2, 3I3 e 3I5 possuem em comum o grupo nitro na posição *para* do anel A e esse ligante pode estar relacionado com a atividade antifúngica desses compostos. As aliliminas 3D7, 3H2 e 3I5 apresentam como característica em comum o grupo hidroxila na posição *orto* do anel B. Silva e colaboradores (2011) avaliando a atividade antifúngica de aril-aldiminas verificaram que a presença do grupo hidroxila nessa posição foi fundamental na atividade antifúngica dos compostos estudados (SILVA, et al., 2011). Em outro estudo de nosso grupo de pesquisa, comprovou-se a atividade anti criptocócica *in vitro* de hidroxialdiminas sendo todas com o grupo hidroxila no anel proveniente da amina de partida na posição orto (MAGALHÃES et al., 2013).

A partir desta triagem inicial com as 22 aliliminas, os compostos mais ativos (3D7, 3H2, 3H10, 3I2, 3I3 e 3I5) foram selecionados para posteriores estudos.

## 6.2 Determinação da concentração inibitória mínima contra fungos e bactérias de importância clínica

As infecções fúngicas invasivas (IFI) aumentaram significativamente devido ao crescimento da população de risco. *Aspergillus* e *Candida* spp. são o principais micro-organismos isolados com maior frequência a partir de pacientes imunocomprometidos, seguidos por *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp., zigomicetos e fungos demáceos (PFALLER e DIEKEMA, 2004; BADIEE e HASHEMIZADEH, 2014).

Assim, os compostos mais ativos foram avaliados quanto à concentração inibitória mínima também contra amostras de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. Comparando-se com os resultados do antifúngico fluconazol, para as amostras de *Candida* spp. não foram obtidos valores satisfatórios de concentração inibitória mínima com relação às alilimas. No entanto, as amostras de *Aspergillus* spp. testadas foram sensíveis ao tratamento com as alilimas selecionadas, embora tenham sido valores de CIM mais elevados em relação aos de Anfotericina B.

As alilimas foram também avaliadas contra uma amostra de referência e 11 amostras clínicas de *Fonsecaea pedrosoi*. Todas as amostras foram sensíveis aos tratamentos. Os compostos 3H2 e 3I5 se destacaram com menores valores médios de CIM - 21,4 e 17,0 µg/mL, respectivamente.

O fungo demáceo *Fonsecaea pedrosoi* é um dos agentes da cromoblastomicose, uma infecção fúngica de tratamento extremamente difícil, sendo pouco responsiva às intervenções terapêuticas. A anfotericina B é utilizada em seu tratamento, porém a função renal do paciente deve ser monitorizada devido à sua nefrotoxicidade (DABOIT et al., 2013). Assim, os compostos testados, por apresentarem atividade contra *Fonsecaea pedrosoi* poderão vir a serem alternativas possíveis na terapia dessa infecção fúngica.

As alilimas selecionadas também foram avaliadas quanto à sua atividade antibacteriana. Em geral as substâncias não foram ativas contra as bactérias testadas, exceto para a amostra de *S. aureus* que foi sensível à 3H2 e 3I5 com CIMs de 8 e 2 µg/mL, respectivamente. As várias diferenças entre a célula fúngica (eucariota) e a bacteriana (procariota) poderiam explicar o fato de os compostos estudados não serem tão ativos contra as espécies bacterianas testadas. Assim, esse fato demonstra a especificidade das alilimas pela célula fúngica em relação à célula bacteriana.

### 6.3 Citotoxicidade dos compostos

Antes de qualquer investigação de atividade biológica de uma nova molécula é importante a realização de ensaios de citotoxicidade. A determinação da viabilidade e proliferação celular são ferramentas amplamente utilizadas em testes de toxicidade (NEDEL et al., 2009).

O uso de eritrócitos representa um bom modelo para se avaliar a citotoxicidade de moléculas orgânicas e inorgânicas, naturais ou sintéticas, pela medida do dano celular (PAGANO e FAGGIO, 2015). A hemólise ocorre com a lise ou ruptura da membrana eritrocítica levando à liberação de hemoglobina no plasma. A detecção da taxa de hemólise causada por um agente externo constitui uma boa alternativa na avaliação de toxicidade de uma nova molécula (ROTHER et al.,2005)

Os percentuais de hemólise das aliliminas 3D7, 3H2, 3H10, 3I2, 3I3 e 3I5 foram avaliados e considerou-se o composto como não tóxico quando seu valor de hemólise fosse inferior a 10% (FISCHER et al., 2003). Nenhum dos compostos testados apresentou percentual de hemólise superior a 10% sendo que os maiores valores observados foram em média de 4 a 6%, nas maiores concentrações de 3I3 e 3H10, respectivamente. Conhecer o potencial hemolítico no desenvolvimento de uma droga é importante para a garantia futura da segurança no tratamento do paciente.

Ensaio de viabilidade também são muito úteis na toxicologia evidenciando-se a resposta celular a um agente, dando informações sobre morte celular, sobrevivência e atividade metabólica (ASHARANI et al., 2009). O ensaio do MTT é um ensaio colorimétrico sensível, quantitativo e confiável que mede a viabilidade, proliferação e ativação de células. O ensaio baseia-se na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial celular em células vivas reduzir o substrato amarelo solúvel em água (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MTT) a um produto de formazana azul escuro que é insolúvel em água. A quantidade de formazana produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis (VEGA-AVILA e PUGSLEY,2011).

As seis aliliminas selecionadas tiveram seus valores de  $IC_{50}$  e TGI determinados através do ensaio do MTT. O valor de  $IC_{50}$  representa a concentração da droga que inibiu 50% do crescimento celular, enquanto o valor de TGI representa a concentração que foi capaz de inibir totalmente este crescimento. Foram testadas duas linhagens de células normais MRC-5 (pulmão) e Hek-293 (rim). A partir dos resultados de TGI dos compostos para as duas linhagens celulares e de seus valores de médios de CIM para amostras de *C. neoformans* e *C. gattii* calculou-se o valor do índice de seletividade (IS) de cada alilimina. O índice de seletividade pode indicar a afinidade de um composto pelo patógeno em relação a uma célula normal do hospedeiro, indicando assim o potencial uso clínico de uma droga. Quanto maior for o IS de uma substância, mais seguro ele é. Consideram-se compostos que apresentem

valores de IS iguais ou superiores a 10 como bons candidatos para estudos *in vivo* (MAGALHÃES et al.,2013). As alilimas 3I2, 3I3 e 3H10 apresentaram valores de IS inferiores a 10, ao contrário de 3H2, 3D7e 3I5. As duas últimas, inclusive, se destacaram com valores de IS maiores que 100. Assim, os compostos 3D7, 3H2 e 3I5 foram selecionados para o teste de genotoxicidade através do ensaio do cometa.

Os testes de genotoxicidade são utilizados para identificar candidatos a medicamentos potencialmente perigosos (AHUJA e SHARMA, 2014). O ensaio do cometa está ganhando cada vez mais importância nos testes de genotoxicidade. É um método simples, rápido, barato, flexível e sensível para detectar danos no DNA (PING et al., 2013). Esse ensaio baseia-se em uma eletroforese de células em uma matriz de agarose, após a lise celular e desenrolamento do DNA. No campo elétrico, o DNA migra em direção ao ânodo que conduz a uma taxa de migração mais elevada para menores fragmentos de DNA. Após a coloração com fluorescência, as células com DNA fragmentado aparecem na forma de um “cometa”, consistindo na “cabeça de um cometa”,que representa o conteúdo de DNA sem danos do núcleo e os fragmentos resultantes do DNA danificado aparecem formando a “cauda do cometa” (RITTER e KNEBEL, 2009).

No ensaio do cometa os compostos selecionados foram testados na IC<sub>50</sub> determinada no teste de citotoxicidade contra células da linhagem renal (Hek-293). Nessa análise foi considerada a extensão da cauda formada, sendo os nucleóides classificados de 0 a 4 de acordo com o comprimento da cauda. Os nucleóides classificados como de classe 1 e 2 representam nucleóides com fragmentação moderada e aqueles classificados como de classes 3 e 4 representam fragmentação intensa. Dessa forma, analisaram-se a porcentagem de cada tipo de dano e o índice de danos causados pelo tratamento das células com os compostos estudados. A maioria dos danos observados nos compostos foi do tipo 0, sem dano. O índice de danos no DNA analisado nos compostos não apresentou diferença estatística em relação ao controle ( $P > 0,05$ ). Portanto, esses testes demonstraram a baixa toxicidade *in vitro* das alilimas estudadas. A alilima 3H2, por ter apresentado o menor índice de danos ao DNA, foi a selecionada para o início dos testes *in vivo*.

## 6.4 Determinação da atividade anti-criptocócica do composto 3H2

### 6.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) contra 12 amostras de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*

A meningite criptocócica, causada principalmente por *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, é uma infecção fúngica grave que afeta indivíduos hígidos e imunocomprometidos (ANTINORI, 2013). A espécie de *C. neoformans* é a mais frequentemente isolada em todo o mundo (COGLIATI et al., 2013). Ademais, as infecções causadas por *C. gattii* incluem uma taxa mais elevada de lesões de massa cerebral, são mais refratárias à terapia antifúngica, mais agressivas, levando a um tempo de tratamento mais prolongado (CHAN et al., 2014). Dessa forma, a busca por novos agentes antifúngicos que sejam ativos contra esses patógenos é de grande relevância.

A alilimina 3H2 e seu complexo em  $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H) foram ativas contra todas as amostras de *C. gattii* testadas. Seus valores médios de CIMs foram comparáveis ao do antifúngico fluconazol. Além disso, de acordo com os valores de CIM e de CFM obtidos, os compostos estudados apresentaram natureza fungistática. O mesmo foi observado para o fluconazol que já é, comprovadamente, de efeito fungistático (VENSEL, 2002).

Embora mais pesquisas sejam necessárias, considera-se que para pacientes gravemente imunocomprometidos, um agente fungicida seja preferível a um agente fungistático. Entretanto, a comprovação do efeito fungistático de uma droga *in vitro* não define sua atividade *in vivo*, em que o sistema imune age em combinação com o antifúngico para a eliminação do patógeno (GRAYBILL et al., 1997).

Quando analisadas as amostras de *C. neoformans* tratadas com 3H2 e CD-3H verificaram-se menores faixas de CIMs (2-4 $\mu$ g/mL) e CFMs (2-32 $\mu$ g/mL), além da atividade fungicida desses compostos contra essas amostras. Vários autores relatam que isolados de *C. gattii* são menos sensíveis ao tratamento antifúngico (KHAN et al., 2009; MATOS et al., 2012; GUTCH et al., 2015) e isso explicaria as diferenças de CIMs e CFMs dos compostos estudados diante das diferentes espécies.

Não foi verificada diferença na atividade antifúngica do composto 3H2 comparado com sua forma encapsulada em  $\beta$ -ciclodextrina (CD-3H). Esse fato indica que a incorporação da molécula dentro da cavidade da ciclodextrina não impediu sua ação *in vitro*, sendo liberada para o meio aquoso. Tang e colaboradores (2016) obtiveram a mesma conclusão testando o complexo de inclusão do antifúngico posaconazol em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina em que manteve-se a atividade antifúngica com aumento na solubilidade da droga. Tebuconazol complexado com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) também manteve seu potencial antifúngico quando testado contra *Aspergillus fumigatus* (STEPNIAK et al.,2015). Complexos do antiviral ribavirina em  $\alpha$  e  $\beta$ -ciclodextrina aumentaram sua atividade *in vitro* contra o vírus do sarampo em comparação com a droga não complexada (GRANCHER et al.,2004). O complexo de inclusão de clorexidina em  $\beta$ -CD reduziu quatro vezes o valor de concentração inibitória mínima contra *C. albicans* em relação à substância sozinha (TEIXEIRA et al.,2012). Por outro lado, Kfoury e colaboradores (2016) avaliando a solubilidade e atividade antifúngica de fenilpropanóides encapsulados em ciclodextrinas, verificaram que, embora a solubilidade dos complexos tenha melhorado, houve uma piora no teste de germinação de esporos de *Fusarium oxysporum* em comparação com a forma não complexada. Nesse caso, os autores justificaram que a ciclodextrina poderia ter agido como fonte de carboidrato necessário na germinação de esporos.

#### **6.4.2 Avaliação da curva de morte**

O teste da curva de morte visou avaliar o efeito do composto 3H2, comparado com o controle não tratado, sobre a cinética de crescimento da amostra de *C. gattii* L27/01. O composto 3H2 leva a uma redução da população microbiana ao decorrer do tempo e em concentrações maiores, porém não o suficiente para sua total eliminação (FIGURA 20). Este resultado comprova o caráter fungistático do composto testado. Os resultados obtidos nesse teste para esse composto assemelham-se ao padrão de curva de morte observado nos antifúngicos fungistáticos azólicos como fluconazol, itraconazol e voriconazol contra amostras de *Cryptococcus neoformans* (KLEPSEK et al., 1997; 2000; BURGESS et al., 2000).

### 6.4.3 Atividade dos compostos em combinação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B

A combinação de antifúngicos é a terapia padrão na meningite criptocócica e tem sido cada vez mais utilizada na aspergilose e em infecções causadas por outros fungos oportunistas (KONTOYIANNIS e LEWIS, 2004). Essa ferramenta tem sido utilizada para contornar a emergência de fungos resistentes e os efeitos colaterais graves dos atuais antifúngicos disponíveis (PARAMYTHIOTOU et al., 2014).

É possível classificar as interações entre os medicamentos em três tipos distintos: sinergismo, indiferença, e antagonismo (KONTOYIANNIS e LEWIS, 2004). A interação definida como antagonista ocorre quando os efeitos resultantes no tratamento combinado forem menores do que o que seria esperado com uma droga única. Quando os efeitos resultantes da combinação não tiverem diferença entre o tratamento com as drogas individualmente, a interação é classificada como indiferente. O antagonismo entre dois ou mais fármacos pode ocorrer devido a concorrência para se alcançar o mesmo alvo, enquanto na interação indiferente os medicamentos em combinação não têm efeito negativo sobre a resposta terapêutica (MUKHERJEE et al., 2005, SANTOS et al., 2012). O sinergismo ocorre quando os efeitos do tratamento combinando-se os medicamentos são maiores que quando utiliza-se uma única droga.

Vários modelos podem explicar o efeito sinérgico entre drogas. O modelo de alvo em comum propõe que duas drogas atuem em sítios diferentes de um mesmo alvo. No modelo de inibição paralela dois fármacos atuam em vias paralelas essenciais para um resultado comum observado. Por fim, o modelo da biodisponibilidade propõe que uma droga aumentaria a disponibilidade da outra nas células (ZIMMERMANN et al., 2007; CHEN et al., 2014b).

Neste estudo o composto 3H2 foi avaliado em combinação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B contra amostras clínicas e de referência de *Cryptococcus gattii*. Verificou-se que a interação do composto com o fluconazol foi classificada como indiferente para todas as amostras testadas. A interação sinérgica entre essas duas drogas só foi observada para duas amostras em baixas concentrações de fluconazol. Quando avaliada a interação da alilimina com a anfotericina B a atividade sinérgica foi observada em um terço das amostras testadas, sendo indiferente para as demais. Essa interação foi concentração-dependente e

verificou-se o sinergismo em todas as amostras testadas na concentração de 0,25 µg/mL de anfotericina B. Os resultados da interação de 3H2 com esse antifúngico direcionam e justificam os testes *in vivo* do modelo murino de criptococose.

A associação de anfotericina B com 5-flucitosina é o melhor exemplo da associação de dois antifúngicos com efeito sinérgico comprovado *in vitro* e *in vivo* e que, inclusive na clínica, é a terapia indicada no tratamento da criptococose (MEDOFF et al., 1971; SCHWARZ et al., 2006; PERFECT et al., 2010). Santos e colaboradores (2012) verificaram que a interação entre fluconazol e anfotericina B *in vitro* contra amostras de *Cryptococcus gattii* é dose dependente podendo variar de sinérgica a antagônica, sendo que altas doses do azólico podem comprometer o tratamento em combinação.

#### 6.4.4 Ensaio do Sorbitol

A primeira estrutura determinante da resistência dos fungos aos estresses ambientais é a parede celular. A arquitetura geral da parede celular é conservada em todas as espécies de fungos e essencialmente consiste de uma estrutura de polímeros, incluindo quitina, glucanas e manana/galactomanana (DICHTL et al., 2016).

Considerando uma possível interferência da alilimina na parede da célula fúngica, foi realizado o ensaio de proteção do sorbitol. Neste teste, na presença de inibidores de parede celular, as células protegidas pelo sorbitol conseguem crescer, enquanto que na ausência do sorbitol seu crescimento é inibido. Este efeito é detectado por um aumento nos valores de CIM obtidos com sorbitol em comparação com os valores de CIM sem sorbitol (FROST et al., 1995). Os valores de CIM em ambos os experimentos foram semelhantes, sugerindo que 3H2 não age inibindo a síntese da parede celular fúngica.

As equinocandinas são uma classe de moléculas que inibem a síntese de  $\beta$ -1,3-glucana que é essencial na manutenção da integridade da parede celular. Moléculas que interferem na parede celular fúngica geralmente levam à lise celular e, assim, para a maioria das espécies, são fungicidas (HARTLAND et al., 2016). Para *Cryptococcus*, no entanto, as equinocandinas têm uma atividade muito fraca e não são utilizadas na clínica (ABRUZZO et al 1997). A síntese de  $\beta$ -1,3-glucana é inibida pelas equinocandinas *in vitro*, e assim o motivo da falta de eficácia desse grupo de moléculas no tratamento da criptococose permanece desconhecido

(MALIGIE e SELITRENNIKOFF; 2005). Recentemente, Hartland e colaboradores (2016) descreveram benzotriurêias que inibem a via de manutenção da integridade da parede celular de *Cryptococcus neoformans* que poderão, futuramente, tornarem-se novos antifúngicos.

#### 6.4.5 Avaliação da produção de melanina

A síntese de melanina está associada à virulência em vários fungos patogênicos como espécies de *Cryptococcus*, *Sporothrix*, *Histoplasma*, *Fonsecaea* e *Paracoccidioides* (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2003). A síntese de melanina em *C. neoformans* é catalisada pela enzima lacase na presença de certos compostos de difenólicos, tal como a 3,4-di-hidroxifenilalanina (L-Dopa). No ambiente, a melanina protege o fungo da radiação UV e altas temperaturas (CASADEVALL et al., 2000). A melanina também atua protegendo o fungo da ação de drogas, sendo isolados melanizados relacionados à menor sensibilidade a alguns antifúngicos como a anfotericina B (van DUIN et al., 2004). Muitas drogas, como anfotericina B e caspofungina, se ligam à melanina, perdendo sua atividade antifúngica, o que poderia explicar a redução *in vitro* na susceptibilidade das amostras de *C. neoformans* melanizadas (NOSANCHUK e CASADEVALL, 2006).

Avaliando o efeito de antifúngicos sob células melanizadas de *C. neoformans* e *Histoplasma capsulatum*, van Duin e colaboradores (2002) comprovaram que a adição de L-dopa ao meio RPMI leva à formação de precipitados quando as drogas são adicionadas ao meio com ou sem a presença da levedura. Assim, os autores sugerem que o protocolo do CLSI não seria adequado para distinguir diferenças em susceptibilidade entre as células melanizadas e não melanizadas (van DUIN et al., 2002; NOSANCHUK e CASADEVALL, 2006). Dessa forma, para investigar se o composto 3H2 atuaria na síntese de melanina avaliou-se o efeito do tratamento com a droga na produção do pigmento em ágar meio mínimo, contendo o substrato L-dopa. Ao longo de dez dias de observação do teste concluiu-se que o tratamento com 3H2 reduziu e retardou a produção de melanina em comparação com o controle, mas não foi capaz de inibir sua síntese conforme observado na FIGURA 23. A produção mais demorada do pigmento também foi observada por Martinez e colaboradores (2007) em células de *Cryptococcus neoformans* tratadas com voriconazol. O mesmo efeito também foi verificado pelo tratamento com a substância Ptilomycacin, isolada de uma espécie de esponja marinha (DALISAY et al., 2011).

#### 6.4.6 Determinação da atividade de lacase

A melanização em *C. neoformans* é catalisada pela enzima lacase, uma fenoloxidase associada à parede celular que catalisa a oxidação de compostos difenólicos para as suas respectivas quinonas (EISENMAN e CASADEVALL, 2012). Esta enzima pode oxidar várias catecolaminas e, além da produção de melanina, também está associada à produção da prostaglandina PGE<sub>2</sub> em *Cryptococcus* sp. (WILLIAMSON, 1994; EISENMAN et al.,2007; ERB-DOWNWARD et al.,2008).

Como se verificou uma redução na produção de melanina nas colônias de *C. gattii* tratadas com 3H2 decidiu-se avaliar se esse fato ocorria pela ação do composto na atividade da enzima lacase. Dessa forma, um inóculo da amostra L27/01 foi preparado e incubado com 0,5xCIM de 3H2 por duas horas na presença do substrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e, após a leitura espectrofotométrica, foi possível comprovar a ação inibitória da alilimina sob a enzima fúngica (FIGURA 24). Quando analisada a interação de 3H2 com a enzima produzida comercialmente observou-se que concentrações maiores da alilimina geravam menores valores de absorbância, ou seja, menor atividade de lacase. Assim, concluiu-se que a interação entre enzima e 3H2 foi concentração dependente. Esses resultados levam à conclusão de que a redução na produção de melanina verificada na levedura tratada com alilimina se deu pela redução na atividade de lacase que é responsável pela produção do pigmento. A lacase é um alvo potencial para o desenvolvimento de novas terapias contra micro-organismos produtores de melanina (EISENMAN et al.,2007).

Ao contrário da melanização em *Cryptococcus* sp. em que para a formação do pigmento são necessárias catecolaminas de origem externa, os fungos como *Alternaria alternata* e *Fonsecaea pedrosoi*, que utilizam a via da dihidroxinaftaleno-melanina, têm seus pigmentos produzidos a partir de substratos endógenos (LANGFELDER et al.,2003). Assim, embora 3H2 tenha atividade contra amostras do fungo negro *F. pedrosoi*, pode-se afirmar que sua atividade antifúngica contra essa espécie não ocorre pela inibição da enzima lacase.

#### 6.4.7 Potencial zeta de *C. gattii* tratado com 3H2

As partículas dispersas num líquido, muitas vezes têm uma carga sobre a superfície. Se um campo elétrico é aplicado no estado líquido então estas partículas carregadas irão avançar na direção dos pólos positivo ou negativo. A direção que as partículas tomam indica suas cargas, e a velocidade com que elas se movem é proporcional à magnitude da carga. A partir dessas informações é calculado o potencial zeta (FRASES et al.,2011). As medições do potencial zeta permitem uma estimativa rápida das diferenças relativas na composição entre polímeros iônicos (PONTES e FRASES.,2015). Os componentes da cápsula de *Cryptococcus* sp. galactoxilomanas e glucuronoxilomanana são carregados negativamente (JESUS et al.,2010).

O potencial zeta da amostra *C. gattii* L27/01 tratada com 3H2 nas concentrações 8,16 e 24 µg/mL foi detectado e verificou-se a redução da sua carga negativa na presença da alilimina. Nosanchuck e colaboradores (1999) observaram o mesmo efeito de redução da carga celular testando amostras de *C. neoformans* em concentrações sub-inibitórias de anfotericina B e fluconazol. Esses autores também verificaram que as células tratadas previamente com os antifúngicos eram mais frequentemente fagocitadas que as leveduras não tratadas. Como a propriedade antifagocítica da cápsula de *C. neoformans* está relacionada com sua alta carga negativa, os autores sugerem que a redução na carga das células tratadas tenha facilitado a interação com os macrófagos e, conseqüentemente, sendo mais células fagocitadas (NOSANCHUCK et al.,1999). Em outro trabalho Nosanchuck e Casadevall (1997) já haviam estabelecido a relação entre tamanho de cápsula e potencial zeta. Foi verificado também que células de *C. neoformans* cultivadas em L-dopa (melanizadas) apresentaram potencial zeta mais negativo em relação ao controle (NOSANCHUCK e CASADEVALL.,1997).

Uma vez que o potencial zeta está relacionado com a carga da superfície de uma partícula, os resultados do tratamento com 3H2 podem sugerir alterações na composição da cápsula polissacarídica fúngica. Esse fato pode ser comprovado pela redução do volume de cápsula obtida em células de *C. gattii* tratadas com o composto estudado.

#### **6.4.8 Avaliação do efeito do tratamento com 3H2 na cápsula de amostras de *Cryptococcus gattii***

A cápsula polissacarídica é um dos principais fatores de virulência de *C. gattii* e *C. neoformans* apresentando atividade antifagocítica e imunossupressora (O'MEARA e ALSPAUGH, 2012). Durante a infecção de mamíferos, o tamanho da cápsula aumenta drasticamente e acredita-se que este fenômeno seja necessário para a patogênese da criptococose (FELDMESSER et al., 2001). O tamanho da cápsula é muito variável, não só entre as linhagens, mas também entre as células individuais da mesma amostra, de tal modo que uma dada amostra pode apresentar grandes diferenças no tamanho da cápsula, dependendo das condições ambientais específicas (ZARAGOZA et al., 2009).

Nesse estudo a alilimina 3H2 foi capaz de reduzir o volume total da célula com a redução do volume da cápsula. Nosanchuk e colaboradores (1999) verificaram *in vitro* a redução no tamanho da célula e cápsula de *C. neoformans* em concentrações subinibitórias de fluconazol e anfotericina B (NOSANCHUK et al.,1999). A alilamina terbinafina também já foi descrita na redução da cápsula de *C. neoformans* (GUERRA et al.,2012).

O efeito causado nas células tratadas com 3H2 levou à redução da cápsula polissacarídica, um dos fatores de virulência mais importantes em *Cryptococcus*. Com isso, células menores, com menor percentual de cápsula e menor carga poderão ser mais facilmente fagocitadas e eliminadas por macrófagos (BOJARCZUK et al.,2016; NOSANCHUCK et al.,1999).

O crescimento da cápsula em *Cryptococcus neoformans* ocorre principalmente na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular e requer o acúmulo de novos polissacarídeos (GARCÍA-RODAS et al.,2014; ZARAGOZA et al.,2003). Este fato poderia indicar um possível alvo de ação da droga 3H2 que foi capaz reduzir a cápsula em células de *C. gattii*.

#### **6.4.9 Avaliação da atividade *in vivo* de 3H2 em modelo de infecção pulmonar causada por *Cryptococcus gattii***

Modelos *in vivo* podem complementar os resultados de ensaios *in vitro* e são ferramentas valiosas em novas descobertas e na comprovação de hipóteses (SABIITI et

al.,2012). Até o momento esse é o primeiro trabalho avaliando a atividade antifúngica de aliliminas *in vivo*. A alilimina 3H2 foi testada inicialmente em diversas doses no modelo murino de criptococose sem produzir efeito na sobrevivência dos animais infectados. Vale ressaltar, nesse caso, que nenhum animal morreu decorrente da toxicidade da droga, uma vez que todos os óbitos foram no mesmo tempo em relação ao grupo sem tratamento. Nos modelos *in vivo* os resultados da exposição a uma droga são influenciados pela introdução de outras variáveis como absorção, eliminação, diferenças de penetração nos tecidos, carga fúngica e sistema imune do hospedeiro (GRAYBILL et al.,1997). Dessa forma, essas variáveis podem ter influenciado na falta de eficácia de 3H2 *in vivo* no modelo estudado. Deve-se considerar também o uso da amostra clínica *C. gattii* L27/01 que apresenta valores elevados de CIM frente aos antifúngicos e, como comprovada pela rápida progressão da criptococose no modelo usado, é bastante virulenta (FERREIRA et al.,2015; SANTOS et al.,2014). Esses fatores podem ter, de certa forma, subestimado os efeitos da alilimina testada.

Quando associado com fluconazol o composto 3H2 não levou a um aumento na sobrevivência dos animais comparado com o antifúngico em monoterapia. Fluconazol é o medicamento de escolha na fase de consolidação e manutenção na terapia da meningite criptocócica (PERFECT et al.,2010). Vários autores descrevem a atividade sinérgica *in vivo* desse antifúngico associado com produtos naturais ou sintéticos (SILVA et al.,2016; VU e GELLI.,2010; CHEN et al.,2014b). No entanto, o mesmo não é observado na associação dos antifúngicos fluconazol e anfotericina B. Day e colaboradores (2013) avaliando pacientes portadores do vírus HIV com criptococose não verificaram melhora no tratamento em comparação com anfotericina B em monoterapia. Esse fato já foi explicado *in vitro* por Santos e colaboradores (2012) onde a interação entre esses antifúngicos é concentração dependente e que altas doses de fluconazol podem, inclusive, antagonizar a ação de anfotericina B. No presente estudo, tanto no ensaio *in vitro* quanto no *in vivo* a interação entre 3H2 e fluconazol foi indiferente. A combinação de dois compostos com atividade fungistática como é o caso desses poderia justificar esse fato.

Por outro lado, quando os animais infectados por *C. gattii* foram tratados com associação de anfotericina B (AMB) e 3H2 esses sobreviveram por até 130 dias, quando não foram mais monitorados. A associação de AMB e 5-flucitosina é considerada o padrão ouro na terapia de indução no tratamento da criptococose (PERFECT et al.,2010). A combinação entre esses agentes, um fungicida e um fungistático, já é bastante descrita e utilizada na clínica (ODDS.,1982; SCHWARZ et al.,2006; SOARES et al.,2008; DAY et al.,2013).

Entretanto, essa associação deve ser usada com cautela e os pacientes devem ser monitorados devido à toxicidade dos agentes (BICANIC et al., 2008; FOLKS et al., 2016). No caso do sinergismo entre AMB e 3H2, que também havia sido verificado *in vitro*, a interação pode ter ocorrido por ações complementares em um mesmo alvo, pelo aumento da biodisponibilidade de uma das drogas ou pela ação das drogas em vias paralelas levando a um resultado em comum.

Entre as várias dificuldades de se testar novas drogas em modelos animais têm-se questões como distribuição, absorção e solubilidade da droga (BLEICHER et al., 2003). Fármacos com baixa solubilidade em água estão predispostos à baixa biodisponibilidade e, por conseguinte, resposta clínica variável (WILLIAMS et al., 2013). Com o intuito de verificar se a melhora na solubilidade de 3H2 levaria a uma melhora na sua atividade antifúngica *in vivo* testou-se no modelo murino de criptococose o complexo de inclusão da alilimina em  $\beta$ -ciclodextrina. Foi utilizada a mesma dose da droga não complexada e, embora tenha sido observada uma melhora na solubilidade, não foi possível o preparo de uma solução, sendo essa administrada nos animais na forma de suspensão, porém sem a necessidade da utilização de co-solventes. Os resultados da curva de sobrevivência dos animais tratados com a forma complexada (CD-3H) foram idênticos aos de 3H2, inclusive no prolongamento da sobrevivência dos animais tratados com a associação de CD-3H e AMB.

As ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão solúveis em água com muitos fármacos lipofílicos pouco solúveis. Assim, esses complexos são formados para melhorar a solubilidade da droga e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade. Embora a  $\beta$ -ciclodextrina seja uma das mais utilizadas na formação de complexos de inclusão, sua solubilidade em água é limitada resultando na precipitação desses complexos (KURKOV e LUFTSSON, 2013) e isso poderia explicar a suspensão formada no preparo de CD-3H. Vários derivados das ciclodextrinas naturais têm sido preparados com o objetivo de melhorar a solubilidade dessas ainda mais. As ciclodextrinas contendo os substituintes hidroxipropil, metil e sulfobutileter têm sido comercialmente utilizadas como novos excipientes farmacêuticos (TIWARI et al., 2010; JAMBHEKAR et al., 2016; TANG et al., 2016).

No que tange à determinação da carga fúngica nos tempos de 15, 30 e 130 dias após a infecção pôde se observar algumas diferenças nos tratamentos entre os vários grupos. Nos pulmões, após 15 dias de infecção a carga fúngica determinada foi bastante elevada nos grupos tratados com 3H2 e com AMB em monoterapia e semelhante ao grupo sem tratamento

(NT). Silva e colaboradores (2012) também não detectaram diferença na carga fúngica pulmonar dos animais infectados com *C. neoformans* tratados com anfotericina B 1,5mg/kg por 15 dias em relação ao grupo não tratado. No entanto, quando esse antifúngico foi associado com voriconazol obteve-se uma redução significativa no número de colônias recuperadas dos pulmões. Em nosso estudo, as associações de 3H2 e CD-3H com AMB e, inclusive a forma complexada em monoterapia, foram capazes de reduzir a carga fúngica do pulmão. A redução da carga fúngica pulmonar pelo complexo CD-3H individualmente, o que não ocorreu na droga não complexada, pode ter ocorrido devido a uma melhora na biodisponibilidade da droga causada pela inclusão em ciclodextrina. Guimarães e colaboradores (2015) comprovaram que a encapsulação de carvacrol, um monoterpene presente no óleo essencial de orégano, com  $\beta$ -ciclodextrina, melhorou a resposta farmacológica em protocolos experimentais de dor (GUIMARÃES et al.,2015). A formação do complexo de inclusão em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina de itraconazol elevou a biodisponibilidade e a atividade desse antifúngico (BARONE et al.,1998; PRENTICE et al.,2005).

Todos os tratamentos foram capazes de reduzir a quantidade de colônias recuperadas no cérebro após 15 dias de infecção em comparação com o grupo não tratado. Também foi observada que as associações de 3H2 e CD-3H com anfotericina B resultaram em maior redução da carga fúngica quando comparadas com essas em monoterapia. O fato de os animais tratados com 3H2 e seu complexo em  $\beta$ -ciclodextrina terem apresentado redução na carga fúngica do cérebro poderia ser um indicativo da penetração desses compostos no sistema nervoso central. O uso de estudos de biodistribuição poderá ser uma boa ferramenta na confirmação dessa hipótese.

Os principais fatores que afetam a distribuição de medicamentos são o tamanho molecular, carga, grau de ligação às proteínas, e a via de eliminação (ASHLEY et al.,2006). O antifúngico fluconazol consiste em uma molécula pequena e que apresenta ótima penetração no SNC (NAU et al.,2010; CHIN et al., 1990). Enquanto a anfotericina B é uma molécula grande, o que dificulta sua penetração no sistema nervoso central. Entretanto, mesmo sendo detectada em baixas concentrações no líquido cefalorraquidiano continua sendo o fármaco de escolha no tratamento da meningoencefalite criptocócica (NAU et al.,2010; ASHLEY et al.,2006). Nesse caso, postula-se que os níveis dessa droga nos tecidos contribuiriam para a sua eficácia (GROLL et al.,2000).

Nos animais sacrificados 30 e 130 dias após a infecção recuperaram-se leveduras ainda presentes nos pulmões e cérebro dos animais tratados com as associações de 3H2 e CD-3H com AMB, sendo esses os únicos grupos analisados por conseguirem prolongar a sobrevivência dos animais por mais de 130 dias. No tempo de 30 dias após a infecção pôde-se observar uma carga fúngica ainda elevada nos pulmões, mas que foi bastante reduzida nos animais sacrificados após 130 dias de infecção. No cérebro, tanto nos tempos de 30 e de 130 dias a carga fúngica detectada foi semelhante. Esse fato poderia indicar que durante o tratamento não ocorreu maior disseminação para o cérebro, sendo as leveduras restritas aos pulmões e sua quantidade reduzida ao longo do tempo com as associações de 3H2 e CD-3H com AMB. É interessante observar que mesmo com a interrupção da terapia antifúngica por 30 dias a carga fúngica do material analisado, embora não tenha sido reduzida a níveis não detectáveis com o tratamento, também não foi aumentada. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as duas associações, exibindo o mesmo perfil de carga fúngica nos órgãos analisados.

Os resultados obtidos de determinação de carga fúngica comprovam a reprodutibilidade do modelo *in vivo* utilizado com a confirmação da presença da levedura nos pulmões dos animais e com a disseminação de *Cryptococcus gattii* para o sistema nervoso central. Ngamskulrunroj e colaboradores (2012) comparando as principais espécies causadoras de criptococose em modelo murino verificaram que *C. gattii* tem maior propensão a causar infecções pulmonares em relação a *C. neoformans*. Em nosso estudo comparando-se com o cérebro, a carga fúngica detectada nos pulmões dos animais não tratados foi bastante elevada e esse fato pode ter sido determinante na progressão da doença e morte dos animais.

A terapia de combinação surgiu como uma abordagem para melhorar a eficácia dos medicamentos antifúngicos. Seu principal objetivo é conseguir uma interação sinérgica aumentando os efeitos antifúngicos e reduzindo os efeitos tóxicos em relação a cada substância individualmente (SVETAZ et al.,2016). A maioria dos trabalhos que fazem uso de anfotericina B no tratamento do modelo murino de criptococose utilizam doses que variam de 0,5 a 1,5mg/kg (BARCHIESI et al.,2000;CALVO et al.,2010; SILVA, E.G. et al.,2012). No presente trabalho, para que se pudessem minimizar os efeitos tóxicos desse antifúngico utilizaram-se a menor dose de AMB que fosse capaz de prolongar a sobrevivência dos animais infectados com *C. gattii*. Desse modo, foi possível observar o aumento da sobrevivência desses animais tratados com AMB em monoterapia, e o prolongamento ainda maior desse parâmetro

quando se utilizou a associação de 3H2 e CD-3H com esse antifúngico. Esse aumento na sobrevivência dos animais tratados com as associações citadas pode ser diretamente relacionado com a redução da quantidade de leveduras detectadas nos cérebros dos animais e, principalmente, nos pulmões.

#### **6.4.10 Análise comportamental dos animais infectados com *C. gattii* e tratados com 3H2, CD-3H e anfotericina B**

O protocolo SHIRPA tem sido amplamente utilizado em diversos laboratórios e é uma ferramenta confiável na avaliação da função neurológica em modelos murinos de diversas doenças (MARTINS et al.,2010, PEDROSO et al.,2010, SANTOS et al.,2014; SILVA et al.,2016 ). A análise comportamental de animais infectados com a amostra de *C. gattii* L27/01 já havia sido descrita em outros trabalhos (SANTOS et al.,2014; COSTA et al.,2016; SILVA et al.,2016) e as alterações detectadas nos camundongos são semelhantes aos sintomas observados nos pacientes com criptococose. Sintomas como tosse, febre, desconforto respiratório, fadiga, perda de apetite e alterações de personalidade foram relatados em um estudo com pacientes com criptococose não portadores do vírus HIV no Japão (KOHNO et al.,2015). Além dessas manifestações clínicas, outros autores também relatam perda de peso, convulsões e alterações motoras (ASLAM e CHANDRASEKHARA.,2009; CHEN et al., 2012; COOKMAN e HUGL.,2013).

No teste SHIRPA várias funções foram analisadas e comprovou-se o melhor estado dos animais tratados com as combinações em relação ao uso de AMB em monoterapia. O QUADRO 4 exhibe os parâmetros avaliados na análise comportamental e os domínios em que esses estão inseridos.

Os parâmetros avaliados relacionados ao reflexo e função sensorial dos animais foram mantidos nos animais infectados com *C. gattii*. Nas avaliações de estado neuropsiquiátrico e comportamento motor os escores obtidos dos animais tratados com anfotericina B foram inferiores inclusive aos animais não tratados. Até o momento esse é o primeiro trabalho descrevendo análise comportamental de animais tratados com AMB e esses resultados podem estar relacionados com a elevada toxicidade desse antifúngico. Relatos de manifestações neurológicas ocasionadas pelo tratamento com AMB são frequentes na literatura (HABER, 1962; REUHL et al.,1993; GLASSER et al.,2011; SATO et al.,2015). Dentre os parâmetros

avaliados no domínio do comportamento motor tem-se o tremor que está diretamente relacionado com o tratamento com AMB e que também contribuiu na redução desse escore em relação ao grupo sem tratamento.

<b>Reflexo e função sensorial</b>	<b>Estado neuropsiquiátrico</b>	<b>Comportamento motor</b>	<b>Função autônoma</b>	<b>Tônus muscular</b>
Posicionamento visual	Atividade Espontânea	Posição corporal	Defecação	Força ao agarrar
Pinna Reflex	Excitação de transferência	Tremor	Micção	Tônus corporal
Reflexo corneal	Escape ao toque	Atividade Locomotora	Taxa respiração	Tônus dos membros
Beliscada dos dedos	Passividade posicional	Ambulação	Fechamento de pálpebras	Tônus abdominal
Reflexo postural	Mordida provocada	Elevação pélvica	Piloereção	
	Medo	Elevação de cauda	Cor da pele	
	Irritabilidade	Encurvamento de tronco	Batimentos cardíacos	
	Agressão	Segurar as patas	Lacrimação	
	Vocalização	Manobra no arame	Salivação	
		Geotaxis negativo		

Quadro 4: Parâmetros avaliados no protocolo SHIRPA para análise comportamental dos animais infectados com *C. gattii* com e sem tratamento.

Quando estado neuropsiquiátrico e comportamento motor são avaliados nos animais tratados com 3H2 e CD-3H associadas com AMB percebem-se uma melhora nos escores em comparação com os animais tratados somente com o antifúngico, o que poderia sugerir a reversão da sua toxicidade. Nesses mesmos domínios se verificou que a forma complexada associada ao antifúngico apresentou melhor escore que a forma livre o que pode ter ocorrido como resultado de uma melhora na biodistribuição da molécula.

Os animais tratados com 3H2 em monoterapia apresentaram escores de estado neuropsiquiátrico comparáveis aos dos animais sem tratamento. Como pode ser observado no QUADRO 4, o primeiro domínio avalia entre outros, a atividade espontânea, a excitação de

transferência e o escape ao toque, parâmetros que são muito comprometidos com a progressão da doença nesse grupo de animais.

A função autônoma dos animais não tratados e tratados com AMB foi bastante comprometida. Nesse domínio são avaliadas taxa de respiração, cor da pele e batimentos cardíacos que foram bastante alteradas nesses grupos.

O tônus muscular e a força dos animais tratados com 3H2, CD-3H e não tratados foi bastante comprometido, o que pode ser associado à redução do peso corporal, deixando os animais mais fracos e afetando seu tônus muscular e força. Esse domínio foi preservado somente nos animais tratados com as combinações.

Todos esses fatores revelam que o tratamento combinado de 3H2 ou CD-3H com anfotericina B não somente prolonga a sobrevida dos animais, mas também mantém a qualidade de vida desses. Assim, o protocolo SHIRPA serviu para complementar os promissores dados obtidos nos ensaios de sobrevida e determinação de carga fúngica.

## 7 CONCLUSÕES

As aliliminas apresentam boa atividade antifúngica principalmente contra amostras de *Cryptococcus* spp. e *Fonsecaea pedrosoi*. Amostras de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. e , inclusive espécies bacterianas foram, em geral, pouco sensíveis ao tratamento com esses compostos.

As aliliminas mais ativas 3D7, 3H2, 3H10, 3I2, 3I3 e 3I5 não foram consideradas causadoras de hemólise nem citotóxicas. Os compostos 3H2, 3I5 e 3D7 apresentaram os valores mais elevados de índice de seletividade, sendo, portanto, seus usos mais seguros no desenvolvimento de uma nova droga. Estas moléculas não foram consideradas genotóxicas e o composto 3H2, por ter demonstrado os menores índices de danos ao DNA foi selecionado para maiores estudos de atividade anti-criptococócica.

O composto 3H2 foi ativo contra amostras de *C. gattii* e *C. neoformans* no teste da concentração inibitória mínima e sua atividade foi considerada fungistática para a primeira espécie e fungicida para a segunda. Essa alilimina, embora tenha sido indiferente na combinação com o antifúngico fluconazol, apresentou atividade sinérgica com a anfotericina B.

Esta alilimina interfere na produção de fatores de virulência de *C. gattii*, prejudicando a produção de melanina, reduzindo a atividade da enzima lacase e reduzindo o tamanho da cápsula desse fungo.

O sinergismo com anfotericina B também foi verificado *in vivo*, uma vez que a associação da alilimina com esse antifúngico foi capaz de prolongar a sobrevivência dos animais, reduzir a carga fúngica nos pulmões e melhorar parâmetros no comportamento dos animais infectados com *C. gattii* e tratados com a combinação de 3H2 e antifúngico. A complexação da alilimina estudada em  $\beta$ -ciclodextrina não alterou sua atividade *in vitro*, no entanto, foi possível observar *in vivo* seu melhor potencial na redução de carga fúngica pulmonar e, conseqüentemente no comportamento animal.

Dessa forma, considerando os resultados de baixa toxicidade, atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de 3H2, além da necessidade de se buscar terapias alternativas no tratamento da criptococose, esse composto torna-se um promissor agente antifúngico.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUZZO, G. K., FLATTERY, A. M., GILL, C. J., KONG, L., SMITH, J. G., PIKOUNIS, V. B., BALKOVEC, J. M., BOUFFARD, A. F., DROPINSKI, J. F., ROSEN, H., KROPP, H., BARTIZAL, K. Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41(11), p. 2333-8, 1997.

AHUJA, V., SHARMA, S. Drug safety testing paradigm, current progress and future challenges: an overview. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34:, p.576–594, 2014.

ALBUQUERQUE, P.C., RODRIGUES, M. L. Research trends on pathogenic *Cryptococcus* species in the last 20 years: a global analysis with focus on Brazil. *Future Microbiology*, v. 7, n.3, p. 319–329, 2012.

ALCAZAR-FUOLI, L., MELLADO, E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. **British Journal of Haematology**, v. 166, p. 471–484, 2014.

ALEXANDER, B. D., JOHNSON, M.D. , PFEIFFER, C. D. , JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C., CATANIA, J., BOOKER, R., CASTANHEIRA, M., MESSER, S. A., PERLIN, D. S., PFALLER, M. A. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: Clinical Failure Correlates With Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations . **Clinical Infectious Diseases**, v.56, n.12, p.1724–1732,2013.

ANTINORI, S. New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. **ISRN AIDS**, p. 1-22, 2013.

ANZAI, M. C., LAZERA, M. S., WANKE, B., TRILLES, L., PAULA, V.D.D. A. J., NAKAZATO, L., TAKAHARA, D.T., SIMI, W. B., HAHN, R.C. *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. . **Mycoses**, v. 57, p. 414–418, 2014.

ARAUJO, G. E. S., FONSECA, F. L., PONTES, B., TORRES, A., CORDERO, R. J., ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M., CASADEVALL, A., VIANA, N. B., NIMRICHTER, L., RODRIGUES, M. L., GARCIA, E. S., SOUZA, W., FRASES, S.. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29561, 2012.

ASHARANI, P. V. , MUN, G.L.K., HANDE, M.P., VALIYAVEETIL, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. **ACSNano**, v. 3, n. 2, p.279–290, 2009.

ASHLEY, E. S. D., LEWIS, R., LEWIS, J. S., MARTIN, C., ANDES, D. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. **Clinical Infectious Diseases**, v 43:S28–39, 2006.

ASLAM, S. M. S., CHANDRASEKHARA, P. Study of Cryptococcal Meningitis in HIV Seropositive Patients in a Tertiary Care Centre. **Journal Indian Academy of Clinical Medicine**, v. 10, n. 3, p.110-115 | 2009.

BADIEE, P., HASHEMIZADEH,Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. **Indian Journal of Medical Research**, v. 139, p. 195-204, 2014.

BAL , A. M. The echinocandins: three useful choices or three too many? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 13–18, 2010.

BANERJEE, P., HAIDER, M., TREHAN, V., MISHRA, B., THAKUR, A., DOGRA, V., LOOMBA, P. *Cryptococcus laurentii* Fungemia. **Indian Journal Medical Microbiology**, v. 31, p. 75-77, 2013.

BARCHIESI, F., SCHIMIZZI, A. M., CASELLI, F., NOVELLI, A., FALLANI, S., GIANNINI, D., ARZENI, D., DI CESARE, S., DI FRANCESCO, L. F., FORTUNA, M., GIACOMETTI, A., CARLE, F., MAZZEI, T., SCALISE, G. .Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 9, p. 2435-41, 2000.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 27, p. 875-904. jun. 2010.

BARONE, J. A., MOSKOVITZ, B. L., GUARNIERI, J., HASSELL, A. E., COLAIZZI, J. L., BIERMAN, R. H. , JESSEN, L. Enhanced bioavailability of itraconazole in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin solution versus capsules in healthy volunteers. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 7, p. 1862-5, Jul 1998.

BICANIC, T., WOOD, R., MEINTJES, G., REBE, K., BROUWER, A., LOYSE, A., BEKKER, L. G., JAFFAR, S. , HARRISON, T. High-dose amphotericin B with flucytosine

for the treatment of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients: a randomized trial. **Clin Infect Dis**, v. 47, n. 1, p. 123-30, Jul 2008.

BIRNBAUM, J. E. Pharmacology of the allylamines. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 23, p. 782-785. Out. 1990.

BLEICHER, K.H., BÖHM, H.J., MÜLLER K., ALANINE, A.I. Hit and Lead Generation: Beyond High-Throughput Screening. **Nature Reviews**, v.2, p.369-378, 2003.

BOEKHOUT, T., THEELEN, B., DIAZ, M., FELL, J.W., HOP, W. C. J., ABELN, E.C. A., DROMER, F., MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, p.891–907, 2001.

BOJARCZUK, A., MILLER, K. A., HOTHAM, R., LEWIS, A., OGRYZKO, N. V., KAMUYANGO, A. A., FROST, H., GIBSON, R. H., STILLMAN, E., MAY, R. C., RENSHAW, S. A., JOHNSTON, S. A. *Cryptococcus neoformans* Intracellular Proliferation and Capsule Size Determines Early Macrophage Control of Infection. **Sci Rep**, v. 6, p. 21489, 2016.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 1, p.S4-12, mar. 2008.

BRITO-SANTOS, F., BARBOSA, G. G., TRILLES, L., NISHIKAWA, M. M., WANKE, B., MEYER, W., CARVALHO-COSTA, F. A., LAZÉRA, M. O. S. Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro basin. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0115866, 2015.

BURGESS, D. S., HASTINGS, R. W. A comparison of dynamic characteristics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.38, p. 87–93, 2000.

CALVO, E., PASTOR, F. J., RODRÍGUEZ, M. M., PUJOL, I. , GUARRO, J. Antifungal therapy in a murine model of disseminated infection by *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 10, p. 4074-7, Out 2010.

CAMPOS, F. L.; BARONI, F. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n.2, p. 83-89, 2010.

CARDOSO, P. H., BARONI, F. E. A., SILVA, E. G., NASCIMENTO, D. C., MARTINS, M. O. A., SZEZS, W. , PAULA, C. R. Feline nasal granuloma due to *Cryptococcus gattii* type VGII. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3-4, p. 303-7, Out 2013.

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

CASTANHEIRA, M., MESSER, S.A., JONES, R.N., FARRELL, D.J., PFALLER, M.A. Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 1-7, 2014.

CHAMILOS, G.; KONTOYIANNIS, D.P. Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. **Drug Resistance Updates**, v. 8, p. 344-358. dez. 2005.

CHAN, M., LYE, D., WIN, M. K., CHOW, A., BARKHAM, T. Clinical and microbiological characteristics of cryptococcosis in Singapore: predominance of *Cryptococcus neoformans* compared with *Cryptococcus gattii*. **International Journal of Infectious Diseases**, p1–6, 2014.

CHARLIER, C., NIELSEN, K., DAOU, S., BRIGITTE, M., CHRETIEN, F., DROMER, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 1, p. 120-7, Jan 2009.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, p.507-544, 2006.

CHEN, C. H., CHANG, C. C., CHANG, W. N., TSAI, N. W., LUI, C. C., LIN, W. C., CHEN, N. C., CHEN, C., HUANG, C. W., LU, C. H. Neuro-psychological sequelae in HIV-negative cryptococcal meningitis after complete anti-fungal treatment. **Acta Neurol Taiwan**, v. 21, n. 1, p. 8-17, Mar 2012.

CHEN, L.; BLANK, E. S.; CASADEVALL A. Extracellular Proteinase Activity of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v.3, n.5, p. 570–574, 1996.

CHEN, S. C. A., MULLER, M., ZHOU, J.Z., WRIGHT, L. C., SORRELL, T. C. Phospholipase Activity in *Cryptococcus neoformans*: A New Virulence Factor? **The Journal of Infectious Diseases**, v, 175, p.414-420, 1997.

CHEN, S. C. A.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **The Medical Journal of Australia**, v. 187, n. 7, p.404-409, 2007.

CHEN, S. C.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 4, p. 980-1024, Oct 2014a.

CHEN, S. C.A.; PLAYFORD, E. G.; SORRELL, T. C.. Antifungal therapy in invasive fungal infections. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p.1-9, 2010.

CHEN, S. C.A.; SLAVIN, M.A.; SORRELL, T.C. Echinocandin antifungal Drugs in Fungal Infections. **Drugs**, v. 71, n.1, p.11-41, 2011

CHEN, X., REN, B., CHEN, M., LIU, M. X., REN, W., WANG, Q. X., ZHANG, L. X., YAN, G. Y. ASDCD: antifungal synergistic drug combination database. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86499, 2014b.

CHIN, T.; FONG, I. W.; VANDENBROUCKE, A. Pharmacokinetics of fluconazole in serum and cerebrospinal fluid in a patient with AIDS and cryptococcal meningitis. **Pharmacotherapy**, v. 10, n. 4, p. 305-7, 1990.

CHOI, J., REIPA, V., HITCHINS, V. M., GOERING, P. L., MALINAUSKAS, R. A. Physicochemical characterization and in vitro hemolysis evaluation of silver nanoparticles. **Toxicol Sci**, v. 123, n. 1, p. 133-43, Set 2011.

CHONG, Y., SHIMODA, S., YAKUSHIJI, H., ITO., Y., MIYAMOTO, T., SHIMONO, N., KAMIMURA, T., AKASHI, K. Fatal candidemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. **Journal of Infectious Chemotherapy**, v. 18, p.741–746, 2012.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27–A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of filamentous fungi; Approved Standard- Second Edition. CLSI document M38–A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, p.1-23, 2013.

COLLINS, A., KOPPEN, G., VALDIGLESIAS, V., DUSINSKA, M., KRUSZEWSKI, M., MØLLER, P., ROJAS, E., DHAWAN, A., BENZIE, I., COSKUN, E., MORETTI, M., SPEIT, G., BONASSI, S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutation Research**, v.759, p. 27–39, 2014.

COOKMAN, L. AND HUGI, M. Meningitis secondary to *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen affecting immunocompetent hosts', **World J Emerg Med**, v.4(2), p. 151-3, 2013.

CORNELY, O. A. *Aspergillus* to *Zygomycetes*: Causes, Risk Factors, Prevention, and Treatment of Invasive Fungal Infections. **Infection**, v. 36, p.296–313, 2008.

COSTA, M, M., TEIXEIRA, F. M., SCHALCHER, T. R., BRITO, M,T,F, M., VALÉRIO, E. S.; MONTEIRO, M. C. Cryptococcosis, A Risk for Immunocompromised and Immunocompetent Individuals. **The Open Epidemiology Journal**, v. 6, p. 9-17, 2013.

COSTA, M. C., SANTOS, J. R., RIBEIRO, M. J., FREITAS, G. J., BASTOS, R. W., FERREIRA, G. F., MIRANDA, A. S., ARIFA, R. D., SANTOS, P. C., MARTINS, F. O. S., PAIXÃO, T. A., TEIXEIRA, A. L., SOUZA, D. G., SANTOS, D. A. The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*. **Int J Med Microbiol**, v. 306, n. 4, p. 187-95, Jun 2016.

COX, G.M., MUKHERJEE, J., COLE, G. T., CASADEVALL, A., PERFECT, J. R. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.

COX, G.M.; McDADE, H.C.; CHEN, S.C.A.; TUCKER, S.C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L.C.; SORRELL, T.C.; LEIDICH, S.D.; CASADEVALL, A.;

DABOIT,T.C., MAGAGNIN, C. M., HEIDRICH, D., ANTOCHEVIS, L. C., VIGOLO, S., MEIRELLES, L. C., ALVES, K., SCROFERNEKER, M.L. *In vitro* susceptibility of

chromoblastomycosis agents to five antifungal drugs and to the combination of terbinafine and amphotericin B. **Mycoses**, v. 57, n.2, p.116-120, 2013.

DALISAY, D. S.; SALUDES, J. P.; MOLINSKI, T. F. Ptilomycalin A inhibits laccase and melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Bioorg Med Chem**, v. 19, n. 22, p. 6654-7, Nov 2011.

DARZÉ, C., LUCENA, R., GOMES, I. AND MELO, A. [Prognosis factors in cryptococcal meningoencephalitis]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 57, n. 3A, p. 649-52, Set 1999.

DATTA, K.; BARTLETT, K. H.; BAER, R.; BYRNES, E.; GALANIS, E.; HEITMAN, J.; HOANG, L.; LESLIE, M. J.; MACDOUGALL, L.; MAGILL, S. S.; MORSHED, M. G.; MARR, K. A. Spread of *cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 1185-1191. ago. 2009.

DAY, J. N.; CHAU, T. T.; LALLOO, D. G. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. **N Engl J Med**, v. 368, n. 26, p. 2522-3, Jun 2013.

DEL POETA, M.; CASADEVALL, A. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 303-10, Jun 2012.

DENNING, D.W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet**; v. 362, p.1142–1151, 2003.

DICHTL, K.; SAMANTARAY, S.; WAGENER, J. Cell wall integrity signaling in human pathogenic fungi. *Cell Microbiol*, 2016.

ECHEVARRÍA, A.; DURANTE, A.G.; ARECHAVALA, A.; NEGRONI, R. Estudio comparativo de dos medios de cultivo para la detección de la actividad fosfolipasa en cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, p.95-98, 2002.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and assembly of fungal melanin. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, n. 3, p. 931-40, Fev 2012.

EISENMAN, H. C., MUES, M., WEBER, S. E., FRASES, S., CHASKES, S., GERFEN, G. AND CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA, **Microbiology**, v.153(12), p. 3954-62, 2007.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 7, p. 1642-4, Jul 1990.

EMRICK,D., RAVICHANDRAN,A., GOSAI,J., LU, S., GORDON, D. M. SMITH, L. The Antifungal Occidiofungin Triggers an Apoptotic Mechanism of Cell Death in Yeast. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 829–838, 2013.

ERB-DOWNWARD, J. R., NOGGLE, R. M., WILLIAMSON, P. R., HUFFNAGLE, G. B. The role of laccase in prostaglandin production by *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 68, n. 6, p. 1428-37, Jun 2008.

EVANS, B. C., NELSON, C. E., YU, S. S., BEAVERS, K. R., KIM, A. J., LI, H., NELSON, H. M., GIORGIO, T. D. AND DUVALL, C. L. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. **J Vis Exp**, n. 73, p. e50166, 2013.

FAVALESSA, O. C.; RIBEIRO, L. C.; TADANO, T.; FONTES, C. J. F.; DIAS, F. B.; COELHO, B. P. A.; HAHN, R. C. Primeira descrição da caracterização fenotípica e susceptibilidade in vitro a drogas de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp. isoladas de pacientes HIV positivos e negativos, Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p.661-665, dez. 2009.

FELDMESSER, M., KRESS, Y., CASADEVALL, A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. **Microbiology**, v. 147, p. 2355–2365, 2001.

FERREIRA, G. F., SANTOS, J. R., COSTA, M. C., HOLANDA, R. A., DENADAI, Â., FREITAS, G. J., SANTOS, Á., TAVARES, P. B., PAIXÃO, T. A. AND SANTOS, D. A. Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 8, p. 4600-9, 2015.

FIKROVÁ, P., ŠTĚTINA, R., HRONEK, M., HYŠPLER, R., TICHÁ, A., ZADÁK,Z. Application of the comet assay method in clinical studies. **Wien Klin Wochenschr** , v.123, p. 693–699, 2011.

FINKELSTEIN, E.; AMICHAÏ, B.; GRUNWALD, M. H. Griseofulvin and its uses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 6, p.189-194, 1996.

FISCHER, D., LI, Y., AHLEMEYER, B., KRIEGLSTEIN, J., KISSEL, T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. **Biomaterials**, v. 24, n. 7, p. 1121-31, Mar 2003.

FOLK, A., COTORACI, C., BALTA, C., SUCIU, M., HERMAN, H., BOLDURA, O. M., DINESCU, S., PAIUSAN, L., ARDELEAN, A., HERMENEAN, A. Evaluation of Hepatotoxicity with Treatment Doses of Flucytosine and Amphotericin B for Invasive Fungal Infections. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 5398730, 2016.

FORTES, S. T.; LAZERA, M.S.; NISHIKAWA, M. M.; MACEDO, R. C. L.; WANKE, B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. **Mycoses**, v. 44, p. 137-140. jan. 2001.

FORTÚN, J. Actualización en terapia antifúngica: nuevos fármacos e indicaciones. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29 n. 5, p.38-44, 2011.

FRACETO, L.L., GONÇALVES, M. M., MORAES, C. M., ARAÚJO, D. R., ZANELLA, L., PAULA, E., PERTINHEZ, T. A. Caracterização do Complexo de Inclusão Ropivacaína:B-Ciclodextrina. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p.1203-1207, 2007.

FRASES, S.; VIANA, N. B.; CASADEVALL, A. Biophysical methods for the study of microbial surfaces. **Front Microbiol**, v. 2, p. 207, 2011.

FRESHNEY, I. Application of Cell Cultures to Toxicology. **Cell Biology and Toxicology**, v. 17, p. 213–230, 2001.

FROST, D.J., BRANDT, K.D., CUGIER, D., GOLDMAN, R.J. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v.48, p.306-310, 1995.

GALANIS, E.; HOANG, L.; KIBSEY, P.; MORSHED, M.; PHILLIPS, P. Clinical presentation, diagnosis and management of *Cryptococcus gattii* cases lessons learned from British Columbia. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 20, n. 1, p.23-28, 2009.

GANENDREN, R.; CARTER, E.; SORRELL, T.; WIDMER, F.; WRIGHT, L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. **Microbes and Infection**, v. 8, p.1006-1015, 2006.

GARCÍA-RODAS, R., CORDERO, R. J. B., TREVIJANO-CONTADOR, N., JANBON, G., MOYRAND, F., CASADEVALL, A., ZARAGOZA, O. Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* Is Coordinated with Cell Cycle Progression. **mBio**, V. 5 n. 3, p. 1-13, 2014

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p.501-517, out. 1999.

GLASSER, J. S.; MURRAY, C. K. Central nervous system toxicity associated with liposomal amphotericin B therapy for cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, n. 4, p. 566-8, Apr 2011.

GOVENDER, N. P., MEINTJES, G., BICANIC, T., DAWOOD, HARRISON, J H., T. S., JARVIS, N., KARSTAEDT, A. S. MAARTENS, G., MCCARTHY, K. M., RABIE, H., VARIAVA, E., VENTER, W. D. F., BOULWARE, D. R., CHILLER, T., MEYA, D. B., SCRIVEN, J. Guideline for the prevention, diagnosis and management of cryptococcal meningitis among HIV-infected persons: 2013 update. **Southern African Journal of HIV Medicine**, v. 14, n.2, p. 1-20, 2013.

GOVENDER, N. P.; PATEL, J.; WYK, M. V.; CHILLER, T. M.; LOCKHART, S. R. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* obtained through population-based surveillance, South Africa, 2002-2003 and 2007-2008. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, p. 1-34. mar. 2011.

GRANCHER, N., VENARD, V., KEDZIEREWICZ, F., AMMERLAAN, W., FINANCE, C., MULLER, C. P. LE FAOU, A. Improved antiviral activity in vitro of ribavirin against measles virus after complexation with cyclodextrins. **Antiviral Res**, v. 62, n. 3, p. 135-7, Jun 2004.

GRAYBILL, J.R. BURGESS, D.S. HARDIN, T.C. Key Issues Concerning Fungistatic versus Fungicidal Drugs. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 16, p.42-50, 1997.

GROLL, A. H., GIRI, N., PETRAITIS, V., PETRAITIENE, R., CANDELARIO, M., BACHER, J. S., PISCITELLI, S. C., WALSH, T. J. Comparative efficacy and distribution of

lipid formulations of amphotericin B in experimental *Candida albicans* infection of the central nervous system. **J Infect Dis**, v. 182, n. 1, p. 274-82, Jul 2000.

GROLL, A. H.; MICKIENE, D.; WERNER, K.; PISCITELLI, S.C.; WALSH, T. J. High-performance liquid chromatographic determination of liposomal nystatin in plasma and tissues for pharmacokinetic and tissue distribution studies. **Journal of Chromatography**, v. 735, p. 51-62, 1999.

GROVER, C.; ARORA, P.; MANCHANDA, V. Comparative evaluation of griseofulvin, terbinafine and fluconazole in the treatment of *tinea capitis*. **International Journal of Dermatology**, v. 51, p.455–458, 2012.

GUERRA, C. R., ISHIDA, K., NUCCI, M., ROZENTAL, S. Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n.5, p.582-590, 2012.

GUIMARÃES, A. G., OLIVEIRA, M. A., ALVES, R. O. S., MENEZES, P. O. P., SERAFINI, M. R., ARAÚJO, A. A., BEZERRA, D. P., QUINTANS JÚNIOR, L. J. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with  $\beta$ -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chem Biol Interact**, v. 227, p. 69-76, Fev 2015.

GUIMARÃES, A. J., FRASES, S., CORDERO, R. J. B., NIMRICHTER, L., CASADEVALL, A., NOSANCHUK, J.D. *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size in vitro and in vivo. **Cell Microbiology**, v. 12, n.6, p. 740–753, 2010.

GULLO, F. P., ROSSI, S. A., SARDI, J. C. O., TEODORO, V. L. I., MENDES-GIANNINI, M. J. S., FUSCO-ALMEIDA, A. M. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 32, p.1377–1391, 2013.

GUPTA, A.K.; RYDER, J.E.; COOPER, E.A. Naftifine: a review. **Journal of cutaneous medicine and surgery**, v. 12, n. 2, p.51-58, 2008.

GUTCH, R. S., NAWANGE, S. R., SINGH, S. M., YADU, R., TIWARI, A., GUMASTA, R. AND KAVISHWAR, A. Antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates in Jabalpur, a city of Madhya Pradesh in Central India. **Braz J Microbiol**, v. 46, n. 4, p. 1125-33, 2015.

HABER, R. W.; JOSEPH, M. Neurological manifestations after amphotericin B therapy. **Br Med J**, v. 1, n. 5273, p. 230-1, Jan 1962.

HAGEN, F., CERESINI, P. C., POLACHECK, I., MA, H., VAN NIEUWERBURGH, F., GABALDÓN, T., KAGAN, S., PURSALL, E. R., HOOGVELD, H. L., VAN IERSEL, L. J., KLAU, G. W., KELK, S. M., STOUGIE, L., BARTLETT, K. H., VOELZ, K., PRYSZCZ, L. P., CASTAÑEDA, E., LAZERA, M., MEYER, W., DEFORCE, D., MEIS, J. F., MAY, R. C., KLAASSEN, C. H., BOEKHOUT, T. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71148, 2013

HAGEN, F., HARE JENSEN, R., MEIS, J. F., ARENDRUP, M. C. Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility testing of 108 *clinical Cryptococcus neoformans sensu lato* and *Cryptococcus gattii sensu lato* isolates from Denmark. **Mycoses**. 2016.

HAGEN, F., KHAYHAN, K., THEELEN, B., KOLECKA, A., POLACHECK, I., SIONOV, E., FALK, R., PARNMEN, S., LUMBSCH, H. T., BOEKHOUT, T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet Biol**, 78, pp. 16-48. 2015.

HALLI, M.B., SUMATHI, R.B. Synthesis, spectroscopic, antimicrobial and DNA cleavage studies of new Co(II), Ni(II), Cu(II), Cd(II), Zn(II) and Hg(II) complexes with naphthofuran-2-carbohydrazide Schiff base. **Journal of Molecular Structure**, v. 1022, p.130–138, 2012.

HARTLAND, K., PU, J., PALMER, M., DANDAPANI, S., MOQUIST, P. N., MUNOZ, B., DIDONE, L., SCHREIBER, S. L., KRYSAN, D. J. High-Throughput Screen in *Cryptococcus neoformans* Identifies a Novel Molecular Scaffold That Inhibits Cell Wall Integrity Pathway Signaling. **ACS Infect Dis**, v. 2, n. 1, p. 93-102, Jan 2016.

HAZEN, K. C. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: An *in vitro* comparison. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.38, p. S37-S41. maio 1998.

HENRIKSSON, E.; KJELLÉN, E.; WAHLBERG, P.; WENNERBERG, J.; KJELLSTRÖM, J.H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 42, n. 10, p.320-323, 2006.

HOANG, L.M.N., PHILIPS, P., GALANIS, E. *Cryptococcus gattii*: a Review of the Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Management of This Endemic Yeast in the Pacific Northwest. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 33, n.24, 2011.

HOHL, T.M. Overview of vertebrate animal models of fungal infection. **Journal of Immunological Methods**, p.1-13, 2014.

HOSSAIN, M. A., MAESAKI, S., MITSUTAKE, K., KAKEYA, H., SASAKI, E., TOMONO, K., TASHIRO, T. AND KOHNO, S. *In-Vitro* And *In-Vivo* Activities of Sch56592 Against *Cryptococcus neoformans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 44, n. 6, p. 827-9, Dec 1999.

HUSTON, S. M.; MODY, C.H. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, n. 2, p.253-264, jun. 2009.

IDNURM, A.; BAHN, Y.S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J. A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews**, v. 3, p. 753-764. out. 2005.

IDNURM, A.; LIN, X. Rising to the challenge of multiple *Cryptococcus* species and the diseases they cause. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 1-6, 2015.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: solubilization, binding constant, and complexation efficiency. **Drug Discov Today**, v. 21, n. 2, p. 363-8, 2016.

JARVIS, J. N.; MEINTJES, G.; WILLIAMS, A. Y.; BROWN, Y.; CREDE, T.; HARRISON, T. S. Adult meningitis in a setting of high HIV and TB prevalence: findings from 4961 suspected cases. **Bmc Infectious Diseases**, v. 10, p. 1-6. out. 2010.

JESUS, M., CHOW, S. K., CORDERO, R. J., FRASES, S. AND CASADEVALL, A. Galactoxylomannans from *Cryptococcus neoformans* varieties *neoformans* and *grubii* are structurally and antigenically variable. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 7, p. 1018-28, Jul 2010.

JITMUANG, A., PANACKAL, A. A., WILLIAMSON, P. R., BENNETT, J. E., DEKKER, J. P., ZELAZNY, A. M. Performance of the Cryptococcal Antigen Lateral Flow Assay in Non-HIV-Related Cryptococcosis. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 2, p. 460-3, 2016.

JOHANN, S.; CISALPINO, P. S.; WATANABE, G. A.; COTA, B. B.; SIQUEIRA, E. P.; PIZZOLATTI, M.G.; ZANI, C. L.; RESENDE, M.A. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p.388-396, 2010.

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.211-224, 2009.

KATHIRAVAN, M. K., SALAKE, A.B., CHOTHE, A.S., DUDHE, P. B., WATODE, R. P., MUKTA, M.S., GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p.5678–5698, 2012.

KFOURY, M., LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, A., BOURDON, N., LARUELLE, F., FONTAINE, J., AUEZOVA, L., GREIGE-GERGES, H., FOURMENTIN, S. Solubility, photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins. **Food Chem**, v. 196, p. 518-25, 2016.

KHAN, Z. U., RANDHAWA, H. S., CHEHADEH, W., CHOWDHARY, A., KOWSHIK, T., CHANDY, R. *Cryptococcus neoformans* serotype A and *Cryptococcus gattii* serotype B isolates differ in their susceptibilities to fluconazole and voriconazole. **Int J Antimicrob Agents**, v. 33, n. 6, p. 559-63, Jun 2009.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review. **Infection**, v. 35, p.51-58, 2007.

KIDD, S. E.; CHOW, Y.; MAK, S. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia Canada and the Pacific Northwest of the United States 2007. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p.1433-1443, mar. 2007.

KLEPSEK, M. E., MALONE, D., LEWIS, R. E., ERNST, E. J., PFALLER, M. A. Evaluation of voriconazole pharmacodynamics using time-kill methodology. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 7, p. 1917-20, Jul 2000.

KLEPSEK, M. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**, v. 26, p. 225e1-225e10. nov. 2011.

KLEPSEK, M.E.; WOLFE, E.J.; JONES, R.N.; NIGHTINGALE, C.H.; PFALLER, M.A. Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of Fluconazole and Amphotericin B Tested against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 1392–1395, n. 6, 1997.

KNASMÜLLER, S., PARZEFALL, W., HELMA, C., KASSIE, F., ECKER, S., SCHULTE HERMANN, R. Toxic Effects of Griseofulvin: Disease Models, Mechanisms, and Risk Assessment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 27, n. 5, p. 495-537, 1997.

KOHNO, S., KAKEYA, H., IZUMIKAWA, K., MIYAZAKI, T., YAMAMOTO, Y., YANAGIHARA, K., MITSUTAKE, K., MIYAZAKI, Y., MAESAKI, S., YASUOKA, A., TASHIRO, T., MINE, M., UETANI, M. AND ASHIZAWA, K. Clinical features of pulmonary cryptococcosis in non-HIV patients in Japan. **J Infect Chemother**, v. 21, n. 1, p. 23-30, 2015.

KONTOYIANNIS, D.P.; LEWIS, R. E. Toward more effective antifungal therapy: the prospects of combination therapy. **British Journal of Hematology**, v. 126, p. 165-175, 2004.

KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-*albicans Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, p. 243-260, 2002.

KROCKENBERGER, M. B., MALIK, R., NGAMSKULRUNGROJ, P., TRILLES, L., ESCANDON, P., DOWD, S., ALLEN, C., HIMMELREICH, U., CANFIELD, P. J., SORRELL, T. C., MEYER, W. Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus gattii* infection: a rat model. **Mycopathologia**, v. 170, n. 5, p. 315-30, Nov 2010.

KRONSTAD, J.; JUNG, W. H.; GUANGGAN, H.U. Beyond the big three: systematic analysis of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. **Cell Host & Microbe**, p. 308-309. out. 2008.

KUMARAVEL TS, VILHAR B, FAUX SP, JHA AN. Comet Assay measurements: a perspective. **Cell Biol Toxicol**; 25:53–64, 2009.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **Int J Pharm**, v. 453, n. 1, p. 167-80, 2013.

KWON-CHUNG, K.J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. V. 68, p. 943–46. **Mycologia**, 1976.

LACERDA-QUEIROZ, N., RODRIGUES, D. H., VILELA, M. C., MIRANDA, A. S., AMARAL, D. C., CAMARGOS, E. R., CARVALHO, L. J., HOWE, C. L., TEIXEIRA, M. M., TEIXEIRA, A. L. Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. **Exp Parasitol**, v. 125, n. 3, p. 271-8, 2010.

LACKNER, P. et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 32, n. 2, p. 177-88, 2006.

LANGFELDER, K., STREIBEL, M., JAHN, B., HAASE, G. AND BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genet Biol**, v. 38(2), p. 143-58, 2003.

LANIADO-LABORIN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 26, p. 223-227. dez. 2009.

LARSEN, R.A.; BAUER, M.; THOMAS, A.M.; SANCHEZ, A. Models of cryptococcal meningitis. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 3, n.1, p.55-61, 2006.

LEON, C. G.; LEE, J. U.; BARTLETT, K.; GERSHKOVICH, P; WASAN E. K.; ZHAO, J.; CLEMENT, J. G.; WASAN, K. M. *In vitro* cytotoxicity of two novel oral formulations of Amphotericin B (iCo-009 and iCo-010) against *Candida albicans*, human monocytic and kidney cell lines. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 1-7. dez. 2011.

LIAPPIS, A. P., KAN, V. L., RICHMAN, N. C., YOON, B., WONG, B., SIMON, G. L. Mannitol and inflammatory markers in the cerebral spinal fluid of HIV-infected patients with cryptococcal meningitis. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 27, p.477-479, 2008.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p.401-416, fev. 2009.

LOYSE, A., THANGARAJ,H., EASTERBROOK, P., FORD, N., ROY, M., CHILLER, T., GOVENDER, N., HARRISON, T. S., BICANIC,T. Cryptococcal meningitis: improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries. **Lancet Infectious Diseases**, v. 13, p. 629-637, 2013.

MA, H.; HAGENB, F., STEKELA, D. J., JOHNSTONA, S. A., SIONOVD, E., FALKD, R., POLACHECKD, I., BOEKHOUTB, T., MAYA, R. C. Mitochondria and the regulation of

hypervirulence in the fatal fungal outbreak on Vancouver Island. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 31, p. 12980-12985, 2009.

MAGALHÃES, T. F. F. **Atividade Antifúngica de Aldiminas Derivadas do 2-Aminofenol Contra Agentes da Criptococose**. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MAGALHÃES, T.F.F., DA SILVA, C.M., DE FÁTIMA, A., DA SILVA, D.L., MODOLO, L.V., MARTINS, C.V.B., ALVES, R.B., RUIZ, A.L.T.G., LONGATO, G.B., DE CARVALHO, J.E., RESENDE-STOIANOFF, M.A. Hydroxyaldimines as potent in vitro anticryptococcal agents. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p. 137-143, 2013.

MAKADZANGE, A.T., NDHLOVU, C.E., TAKARINDA, K., REID, M., KURANGWA, M., GONA, P., HAKIM, J. G. Early versus Delayed Initiation of Antiretroviral Therapy for Concurrent HIV Infection and Cryptococcal Meningitis in Sub-Saharan Africa. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n.11, p.1532–1538, 2010.

MALIGIE, M. A.; SELITRENNIKOFF, C. P. *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3)beta-glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 7, p. 2851-6, Jul 2005.

MANDAL, S. M., MAHATA, D., MIGLIOLO, L., PAREKH, A., ADDY, P.S., MANDAL, M., BASAK, A. Glucose directly promotes antifungals resistance in the fungal pathogen, *Candida* spp. **Journal of biological chemistry**, p.1-9, 2014.

MANRAO, M.R.; MATTU, H. K.; KAUL, V. K.; SHARMA, J. R. Biological potential of cinnamalanilines: effect of nature and position of the substituent. **Journal of Mycology and Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 435-438, 2007.

MARTINEZ, L. R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *C. neoformans* var *grubii* (serotype A) strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3365-3367. set. 2001.

MARTINEZ, L. R.; MIHU, M. R.; HAN, G.; FRASES, S.; CORDERO, R. J.B.; CASADEVALL, A.; FRIEDMAN, A. J.; FRIEDMAN, J. M.; NOSANCHUK, J. D. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**, v. 31, p.669-679, 2010.

MARTINEZ, L. R.; NELIS, H. J.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy Methods**, v.50, p. 1021-1033. mar. 2006.

MARTINEZ, L.R.; NTIAMOAH, P.; GÁCSER, A.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Voriconazole Inhibits Melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, n.12, p.4396-4400, 2007

MARTINEZ, M.C., AFONSO, S. G., BUZALEH, A.M., BATLLE, A. Protective Action of Antioxidants on Hepatic Damage Induced by Griseofulvin. **The Scientific World Journal**, p.1-8, 2014.

MARTINS, C.V.B.; RESENDE, M.A. de; MAGALHÃES, T.F.F.; LIMA, B.H.S.; WATANABE, G.A.; RUIZ, A.L.T.G.; de CARVALHO, J.E.; PILLI, R.A.; de FÁTIMA, Â. Antifungal activity of goniiothalamine enantiomers. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 5, n. 1, p.74-78, 2008.

MARTINS, H. P. R.; SILVA, M.C.; PAIVA, L. C. F.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Efficacy of Fluconazole and Nystatin in the Treatment of Vaginal *Candida* Species. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 92, p. 78-82, 2012.

MARTINS, L. M.S. , WANKE, B., LAZÉRA, M. S., TRILLES, L., BARBOSA, G. G., MACEDO, R.C.L., CAVALCANTI, M.A. S., EULÁLIO, K. D., CASTRO, J. A. F., SILVA, A. S., NASCIMENTO, F. F., GOUVEIA, V. A., MONTE, S. J. H. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n.6, p. 725-730, 2011.

MARTINS, Y. C., WERNECK, G. L., CARVALHO, L. J., SILVA, B. P., ANDRADE, B. G., SOUZA, T. M., SOUZA, D. O. AND DANIEL-RIBEIRO, C. T. Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol. **Malar J**, v. 9, p. 85, 2010.

MATOS, C. S., DE SOUZA ANDRADE, A., OLIVEIRA, N. S., BARROS, T. F. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 7, p. 1647-52, Jul 2012.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.

MAZUELOS, E. M.; GARCÍA, A. I. A., Aspectos microbiológicos de la criptococosis en la era post-TARGA. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 28, p. 40-45. jan. 2010.

McFADDEN, D.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 11, p.497-505, 2006.

MEDOFF, G.; COMFORT, M.; KOBAYASHI, G. S. Synergistic action of amphotericin B and 5-fluorocytosine against yeast-like organisms. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 138, n. 2, p. 571-4, Nov 1971.

MENDES, C., BUTTCHEVITZ, A., KRUGER, J. H., KRATZ, J. M., SIMÕES, C. M., DE OLIVEIRA BENEDET, P., OLIVEIRA, P. R., SILVA, M. A. Inclusion complexes of hydrochlorothiazide and  $\beta$ -cyclodextrin: Physicochemical characteristics, *in vitro* and *in vivo* studies. **Eur J Pharm Sci**, v. 83, p. 71-8, 2016.

MEYER, W., AANENSEN, D. M., BOEKHOUT, T., COGLIATI, M., DIAZ, M. R., ESPOSTO, M. C., FISHER, M., GILGADO, F., HAGEN, F., KAOCHAROEN, S., LITVINTSEVA, A. P., MITCHELL, T. G., SIMWAMI, S. P., TRILLES, L., VIVIANI, M. A., KWON-CHUNG, J. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Med Mycol**, v. 47, n. 6, p. 561-70, 2009.

MICELI, M. H.; KAUFFMAN, C. A. Isavuconazole: A New Broad-Spectrum Triazole **Antifungal Agent**. **Clin Infect Dis**, v. 61, n. 10, p. 1558-65, Nov 2015.

MITCHELL, D.H., SORRELL, T.C., ALLWORTH, A.M., HEATH, C.H., MCGREGOR, A.R., PAPANAOUM, K., RICHARDS, M.J., GOTTLIEB, T. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n.3, p.611-616, 1995

MOLINA-LEYVA, A., RUIZ-CARRASCOSA, J.C., LEYVA-GARCIA, A., HUSEIN-ELAHMED, H. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, p. 1232-1233, 2013.

MORA, D. J.; COLOMBO, E. R. C.; FERREIRA-PAIM, K.; ANDRADE-SILVA, L. E.; NASCENTES, G. A. N.; SILVA-VERGARA, M. L. Clinical, epidemiological and outcome features of patients with cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, p. 1-7. dez. 2011.

MORETTI M.L.; RESENDE, M.R.; LAZERA, M.S.; COLOMBO, A.L.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Consenso em criptococose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 524-544. 2008.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 163-194.. 2005.

NAJVAR, L.K.; BOCANEGRA, R.; GRAYBILL, J.R. An Alternative Animal Model for Comparison of Treatments for Cryptococcal Meningitis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 43, n. 2 , p. 413-414, 1999.

NAU, R.; SÖRGEL, F.; EIFFERT, H. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 4, p. 858-83, 2010.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 . NCCLS, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEDEL, F.; SOKI, F. N.; CONDE, M. C.M.; ZEITLIN, B. D.; TARQUINIO, S. B. C.; NOR, J. E.; DEMARCO, F. F. Comparação de dois diferentes métodos colorimétricos, SRB e WST-1, na avaliação da proliferação de células-tronco pulpare. In: XI ENPOS, I Mostra Científica. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2009.

NGAMSKULRUNGROJ, P., CHANG, Y., SIONOV, E., KWON-CHUNG, K. J. The Primary Target Organ of *Cryptococcus gattii* Is Different from That of *Cryptococcus neoformans* in a Murine Model. **mBio**, v. 3, n. 3, p.1-11, 2012.

NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C. L.; BEZERRA, C.C. F.; PEREZ, M. A.; CARDARELLI, P.;

WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 73-77. jan. 2003.

NOGUEIRA, L. J., DE RESENDE, M. A., OLIVEIRA, S. R., DE ARAÚJO, M. H., MAGALHÃES, T. F., DE OLIVEIRA, M. B., MARTINS, C. V., LOPES, M. T., ARAÚJO E SILVA, A. C., DONNICI, C. L. *In vitro* susceptibility of *Aspergillus* spp. to dithiocarbamate organoruthenium compounds, **Mycoses**, v. 54(5), p. e323-9, 2011.

NOLAN, R. P., LANGER, A. M., HARINGTON, J. S., OSTER, G., SELIKOFF, I. J. Quartz hemolysis as related to its surface functionalities. **Environ Res**, v. 26, n. 2, p. 503-20, 1981.

NOSANCHUK, J. D., CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203–223, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans*: contributions from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. **Infect Immun**, v. 65, n. 5, p. 1836-41, May 1997

NOSANCHUK, J.D., CASADEVALL, A. Impact of Melanin on Microbial Virulence and Clinical Resistance to Antimicrobial Compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3519–3528, 2006.

NOSANCHUK, J.D., CLEARE, W., FRANZOT, S. P., CASADEVALL, A. Amphotericin B and Fluconazole Affect Cellular Charge, Macrophage Phagocytosis, and Cellular Morphology of *Cryptococcus neoformans* at Subinhibitory Concentrations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 233–239, .1999.

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, 2012.

OBANDO, D.; PANTARAT, N.; HANDKE, R.; KODA, Y.; WIDMER, F.; DJORDJEVIC, J. T.; ELLIS, D.H.; SORRELL, T. C.; JOLLIFFE, K. A. Synthesis, antifungal, haemolytic and cytotoxic activities of a series of bis(alkylpyridinium)alkanes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p.6329-6339, 2009.

ODDS, F. C. Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. **Mycologist**, v. 17, n. 2, p.1-9, maio 2003.

ODDS, F. C. Interactions among amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole, and miconazole against pathogenic fungi *in vitro*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 22, n. 5, p. 763-70, Nov 1982.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 272-9, Jun 2003.

OLIVEIRA, R. B., ATOBE, J. H., SOUZA, S. A. DE CASTRO LIMA SANTOS, D. W. Epidemiology of invasive fungal infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome at a reference hospital for infectious diseases in Brazil. **Mycopathologia**, v. 178, n. 1-2, p. 71-8, Ago 2014.

PAGANO, M.; FAGGIO, C. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. **Cell Biochem Funct**, v. 33, n. 6, p. 351-5, 2015.

PAPPALARDO, M. C.; MELHEM, M. S. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 45, p. 299-305. dez. 2003.

PAPPAS, P. G. Cryptococcosis in the developing world: an elephant in the parlor. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 356-346. dez. 2010.

PAPPAS, P. G.; ALEXANDER, B.D.; ANDES, D.R.; HADLEY, S.; KAUFFMAN, C. A.; FREIFELD, A.; ANAISSIE, E. J.; BRUMBLE, L. M.; HERWALDT, L.; ITO, J.; KONTOYIANNIS, D. P.; LYON, G. M.; MARR, K. A.; MORRISON, V. A.; PARK, B. J.; PATTERSON, T. F.; PERL, T. M.; OSTER, R. A.; SCHUSTER, M. G.; WALKER, R.; WALSH, T. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; CHILLER, T. M. Invasive Fungal Infections among Organ Transplant Recipients: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 1101–1111, 2010.

PARAMYTHIOTOU, E., FRANTZESKAKI, F., FLEVARI, A., ARMAGANIDIS, A., DIMOPOULOS, G. Invasive Fungal Infections in the ICU: How to Approach, How to Treat. **Molecules**, v. 19, p. 1085-1119, 2014.

PARK, B. J., WANNEMUEHLER, K. A., MARSTON, B. J., GOVENDER, N., PAPPAS, P. G., CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v., 23, p.525–530, 2009.

PEDROSO, V. S. P., VILELA, M. C., SANTOS, P.C., CISALPINO, P.S., ARANTES, R. M. E., RACHID, M. A., TEIXEIRA, A.L. Development of a Murine Model of Neuroparacoccidioidomycosis. **Journal of Neuroparasitology**, v. 1, p. 39-45, 2010.

PEMÁN, J., SALAVERT, M. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 2, p. 90-98, 2012.

PÉREZ, F., AVILA, O., VÉLEZ, N., ESCANDÓN, P. Cryptococcosis in Dogs: A Case Report in a Labrador retriever in Bogotá, Colombia. **iMedPub**, v 1, n.1:4, p.1-4, 2015.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: A sugar-coated killer with designer genes. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 45, p. 395-404. jul. 2005.

PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genet Biol**, v. 78, p. 49-54, May 2015.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L., GRAYBILL, J. R. HAMILL, R.J.; HARRISON, T. S.; LARSEN, R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M. H.; PAPPAS, P. G., POWDERLY, W. G, SOBEL, N. S. J. D.; SORRELL, T. C.. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases: Guidelines for Management of Cryptococcosis**, v. 50, fev. 2010.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, p. S3-S13. jan. 2012.

PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J. Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology** p. 4419–4431, 2004.

PING, K.Y., DARAHA, I., CHEN, Y., SASIDHARAN, S. Cytotoxicity and genotoxicity assessment of *Euphorbia hirta* in MCF-7 cell line model using comet assay. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 9, p. 692-696, 2013.

POETA, M. D.; CASADEVALL, A. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Mycopathologia**, p. 1-7. set. 2011.

PONTES, B.; FRASES, S. The *Cryptococcus neoformans* capsule: lessons from the use of optical tweezers and other biophysical tools. **Front Microbiol**, v. 6, p. 640, 2015.

PRADO, M.; da SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 3, p.513-521, maio 2009.

PRENTICE, A. G.; GLASMACHER, A. Making sense of itraconazole pharmacokinetics. **J Antimicrob Chemother**, v. 56 Suppl 1, p. i17-i22, 2005.

PUTNAM, K.P.; BOMBICK, D.W.; DOOLITTLE, D.J. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. **Toxicology in Vitro**, v.16, p. 599–607, 2002.

RAGUPATHI, L., REYNA, M. Case Report of *Cryptococcus albidus* Peritonitis in a Peritoneal Dialysis Patient and a Review of The Literature. **Peritoneal Dialysis International**, v. 1, 2014.

RAVI, S.; PIERCE, C.; WITT, C.; WORMLEY JR., F.L. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* under distinct environmental conditions. **Mycopathologia**, v. 167, n. 6, p.307-314, jun. 2009.

REUHL, K. R., VAPIWALA, M., RYZLAK, M. T., SCHAFFNER, C. P. Comparative neurotoxicities of amphotericin B and its mono-methyl ester derivative in rats. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 37, n. 3, p. 419-28, Mar 1993.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p.i5-i11, 2005.

RITTER, D., KNEBEL, J. Genotoxicity testing in vitro – Development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p.1570–1575, 2009.

ROCHA, M.F.G.; SIDRIM, J.J.C. Drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica contemporânea. In: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2010. cap. 6, p. 50-62.

RODRIGUES, M. L., NAKAYASU, E. S., ALMEIDA, I. C., NIMRICHTER, L. The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. **J Proteomics**, v. 97, p. 177-86, Jan 2014.

RODRIGUES, M. L., NAKAYASU, E. S., OLIVEIRA, D. L., NIMRICHTER, L., NOSANCHUK, J. D., ALMEIDA, I. C., CASADEVALL, A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryot Cell**, 7(1), pp. 58-67, 2008.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C., ARENAS, R., MORENO-COUTIÑO, G., VÁSQUEZ, E., FERNÁNDEZ, R., CHANG, P. Systemic Fungal Infections in Patients with human immunodeficiency virus. **Actas Dermosifiliográficas**, v. 105, n.1, p.5-17, 2014.

ROEMER, T., KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. **Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine**, v. 4, p.1-14, 2014

ROGERS, D. C., PETERS, J., MARTIN, J. E., BALL, S., NICHOLSON, S. J., WITHERDEN, A. S., HAFEZPARAST, M., LATCHAM, J., ROBINSON, T. L., QUILTER, C. A., FISHER, E. M. SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. **Neurosci Lett**, v. 306, n. 1-2, p. 89-92, Jun 2001.

ROSARIO, I.; ACOSTA, B.; COLOM, F.. Pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 1, p.S13-S18, mar. 2008.

ROTHER, R. P., BELL, L., HILLMEN, P., GLADWIN, M. T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **JAMA**, v. 293(13), p. 1653-62, 2005.

RYBAK, J. M., MARX, K. R., NISHIMOTO, A. T., ROGERS, P. D. Isavuconazole: Pharmacology, Pharmacodynamics, and Current Clinical Experience with a New Triazole Antifungal Agent. **Pharmacotherapy**, v. 35, n. 11, p. 1037-51, Nov 2015.

SABIITI, W., MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiology**, v. 7, n.11, p. 1297–1313, 2012.

SABIITI, W.; MAY, R.C.; PURSALL, E.R. Experimental Models of Cryptococcosis. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, p. 626745, 2012.

SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; MESA-ARANGO, A. C.; CASAS, C.; HERRERO, E.; GIANINNI, M. J.S.M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection**, v.13, p. 457-467. jan. 2011.

SANTI, L., BEYS-DA-SILVA, W. O., BERGER, M., CALZOLARI, D., GUIMARÃES, J. A., MORESCO, J. J., YATES, J.R. Proteomic Profile of *Cryptococcus neoformans* Biofilm Reveals Changes in Metabolic Processes. **Journal of Proteome Research**, v. 13, p. 1545–1559, 2014.

SANTOS, J. R., HOLANDA, R. A., FRASES, S., BRAVIM, M., ARAUJO, G. E. S., SANTOS, P. C., COSTA, M. C., RIBEIRO, M. J., FERREIRA, G. F., BALTAZAR, L. M., MIRANDA, A. S., OLIVEIRA, D. B., SANTOS, C. M., FONTES, A. C., GOUVEIA, L. F., RESENDE-STOIANOFF, M. A., ABRAHÃO, J. S., TEIXEIRA, A. L., PAIXÃO, T. A., SOUZA, D. G. AND SANTOS, D. A. 'Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis', **PLoS One**, v. 9(11), p. e112669, 2014.

SANTOS, J.R.A., GOUVEIA, L. F., TAYLOR, E. L. S., RESENDE-STOIANOFF, M. A., PIANETTI, G.A., CÉSAR, I. C., SANTOS, D. A. Dynamic Interaction between Fluconazole and Amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n.5, p. 2553–2558, 2012

SATO, M., HIRAYANAGI, K., MAKIOKA, K., IKEDA, Y. Reversal of leukoencephalopathy induced by liposomal amphotericin B in a patient with cryptococcal meningitis. **J Neurol Sci**, v. 350, n. 1-2, p. 118-9, Mar 2015.

SCHWARZ, P., DROMER, F., LORTHOLARY, O., DANNAOUI, E. Efficacy of amphotericin B in combination with flucytosine against flucytosine-susceptible or flucytosine-resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* during disseminated murine cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 1, p. 113-20, Jan 2006.

SEVERO, C.B.; XAVIER, M. O.; GAZZONI, A. F.; SEVERO, L. C. Cryptococcosis in children **Pediatric Respiratory Reviews**, v. 10, p. 166-171. fev. 2009.

SHARP, S. E. *Cryptococcus gattii*. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 31, n. 11, p.84-86, 2009.

SHEAR, N. H.; VILLARS, V.V.; MARSOLAIS, C. Terbinafine: An Oral and Topical Antifungal Agent. **Clinics in Dermatology**, v. 9, p. 487-495, 1992.

SHI, M., LI, S. S., ZHENG, C., JONES, G. J., KIM, K. S., ZHOU, H. , KUBES, P., MODY, C. H. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n.5, p.1683-1693, 2010.

SHIN, S.; LIM, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p.1289-1296, 2004.

SHOR E.; WANG, Y.; PERLIN, D., XUE, C. *Cryptococcus* flips its lid - membrane phospholipid asymmetry modulates antifungal drug resistance and virulence. **Microbial Cell** v.3, n.8 p.358-360, 2016.

SIDRIM, J.J. C., COSTA, A.K. F., CORDEIRO, R. A., BRILHANTE, R.S.N., MOURA, F. E. A., CASTELO-BRANCO, D.S.C.M., NETO, M. P.A., ROCHA, M. F. G. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v.56, p.445-458, 2010.

SILVA, B. K., FREIRE, A. K., BENTES, A. O. S., SAMPAIO, I. E. L., SANTOS, L. O., DOS SANTOS, M. S., DE SOUZA, J. V. Characterization of clinical isolates of *the Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex from the Amazonas State in Brazil. **Rev Iberoam Micol**, v. 29, n. 1, p. 40-3, 2012 Jan-Mar 2012.

SILVA, C. M.; SILVA, D. L.; MARTINS, C. V.B.; RESENDE, M. A.; DIAS, E. S.; MAGALHÃES, T. F.F.; RODRIGUES, L. P.; SABINO, A. A.; ALVES, R. B.; FÁTIMA, A. Synthesis of aryl aldimines and their activity against fungi of clinical interest. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 78, p. 810-845, 2011.

SILVA, D. L., MAGALHÃES, T. F., DOS SANTOS, J. R., DE PAULA, T. P., MODOLO, L. V., DE FÁTIMA, A., BUZANELLO MARTINS, C. V., SANTOS, D. A., DE RESENDE-STOIANOFF, M. A.. Curcumin enhances the activity of fluconazole against *Cryptococcus gattii*-induced cryptococcosis infection in mice. **J Appl Microbiol**, v. 120, n. 1, p. 41-8, Jan 2016.

SILVA, E. G., PAULA, C. R., DE ASSIS BARONI, F., GAMBALE, W. Voriconazole, combined with amphotericin B, in the treatment for pulmonary cryptococcosis caused by *C. neoformans* (serotype A) in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 445-9, Jun 2012.

SINGH, A., PANTING, R.J., VARMA, A., SAIJO, T., WALDRON, K. J., JONG, A., NGAMSKULRUNGROJ, P., CHANG, Y.C., RUTHERFORD, J.C., KWON-CHUNG, K. J. Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 4, n.3, p. 1-11 , 2013.

SINGH, K.K.; MATHELA, C.S. Synthesis, characterization and in vitro antibacterial activity of cinnamyl amine derivatives. **Indian Journal of Chemistry**, v 53(7). p. 907-912, 2014.

SINGH, N.P., MCCOY, M. T., TICE, R. R., SCHNEIDER, E. L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research** , v. 175, p. 184-191, 1988.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; GARRAFFO, H. M.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 2804-2815, 2009.

SLOAN, D. J., PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology**, v.6, p.169–182, 2014.

SOARES, B.M., SANTOS, D.A., KOHLER, L.M., CÉSAR, G.C., CARVALHO, I. R., MARTINS, M.A., CISALPINO, P. S. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 242-245, 2008.

SORRELL, T. C., JUILLARD, P. G., DJORDJEVIC, J. T., KAUFMAN-FRANCIS, K., DIETMANN, A., MILONIG, A., COMBES, V., GRAU, G. E. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. **Microbes Infect**, v. 18, n. 1, p. 57-67, Jan 2016.

SPEIT, G., HARTMANN, A. The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. **Methods in Molecular Biology**, v. 314, p. 275-286, 2006.

SPRINGER, D.J.; CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p.14-20, jan. 2010.

STEIER, Z., VERMITSKY, J.P., TONER, G., GYGAX, S.E., EDLIND, T., KATIYARA, S. Flucytosine Antagonism of Azole Activity versus *Candida glabrata*: Role of Transcription Factor Pdr1 and Multidrug Transporter Cdr1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57 n.11 p. 5543–5547, 2013.

STEPHEN, C. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. **Canadian Veterinary Journal**, V.43, p. 792-794, 2002.

STEPNIAK, A., BELICA-PACHA, S., ROZALSKA, S., DLUGONSKI, J., URBANIAK, P., PALECZ, B. Study on a host–guest interaction of  $\beta$ -cyclodextrin with tebuconazole in water. **Journal of Molecular Liquids** , v 211, p. 288–293, 2015.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. **Pharm Res**, v. 21, n. 2, p. 201-30, Feb 2004.

SVETAZ, L. A., POSTIGO, A., BUTASSI, E., ZACCHINO, S. A., SORTINO, M. A. Antifungal drugs combinations: a patent review 2000-2015. **Expert Opin Ther Pat**, v. 26, n. 4, p. 439-53, 2016.

TANG, P., MA, X., WU, D., LI, S., XU, K., TANG, B., LI, H. Posaconazole/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin host-guest system: Improving dissolution while maintaining antifungal activity. **Carbohydr Polym**, v. 142, p. 16-23, 2016.

TEIXEIRA, K. I., ARAÚJO, P. V., SINISTERRA, R. D., CORTÉS, M. E. Chlorhexidine: beta-cyclodextrin inhibits yeast growth by extraction of ergosterol. **Braz J Microbiol**, v. 43, n. 2, p. 810-8, Apr 2012.

THOMAS, C. J.; LEE, J.Y.; CONN, L. A.; BRADLEY M.E., GILLESPIE R.W., DILL S.R., PINNER R.W., PAPPAS P.G. Surveillance of cryptococcosis in Alabama, 1992-1994. **Annals of Epidemiology**, v. 8, n. 4, p.212-6, maio 1998.

THOMPSON III, G. R.; CADENA, J.; PATTERSON, T. F. Overview of antifungal agents. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, p.203-215, 2009.

TIWARI, G., TIWARI, R. AND RAI, A. K. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 2(2), p. 72-9, 2010.

TSENG, H. K., HUANG, T. Y., WU, A. Y., CHEN, H. H., LIU, C. P., JONG, A. How *Cryptococcus* interacts with the blood-brain barrier. **Future Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 1669-82, 2015.

UBANI, O.C., OFORKA, N.C., NGOCHINDO, R.I. AND ODOKUMA, L.O. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Studies of Cinnamaldehydebenzylamine Schiff base Metal ion Complexes. **Research Journal of Chemical Sciences**, Vol. 5(3), p. 14-22,2015.

VAN DUIN, D., CASADEVALL, A., NOSANCHUK, J.D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n.11, p. 3394–3400, 2002.

VAN DUIN, D., CLEARE, W., ZARAGOZA, O., CASADEVALL, A., NOSANCHUK, J.D. Effects of Voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2014–2020, 2004.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M.K. An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, p. 10-14, 2011.

VENSEL, T. D. H. Fluconazole: A Valuable Fungistatic. **Antibiotics Review**, v.9, N. 5, p.181-183, 2002.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H.-J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p.171-179, 2000.

VIDAL, J. E., OLIVEIRA, A. C. P., DAUAR, R. F., BOULWARD, D. R. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.17, n.3 p.353–362, 2013.

VIDAL, J. E.; BOULWARE, D. R. Lateral flow assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of hiv care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57 Suppl 19, p. 38-45, 2015.

VIVIANI, M. A. Cryptococcal meningitis: Diagnosis and treatment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 6, p.169-173, 1996.

VOELZ, K., JOHNSTON, S. A., SMITH, L. M., HALL, R. A., IDNURM, A., MAY, R. C. 'Division of labour' in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak. **Nat Commun**, v. 5, p. 5194, 2014.

VU, K.; GELLI, A. Astemizole and an analogue promote fungicidal activity of fluconazole against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*. **Med Mycol**, v. 48, n. 2, p. 255-62, 2010.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v.48, p. 1-12. set. 2007.

WILES, S.; HANAGE, W.P.; FRANKEL, G.; ROBERTSON, B. Modelling infectious disease — time to think outside the box? **Nature Reviews – Microbiology**, v. 4, p. 307-312, 2006.

WILLIAMS, H. D., TREVASKIS, N. L., CHARMAN, S. A., SHANKER, R. M., CHARMAN, W. N., POUTON, C.W., PORTER, C. J. H. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. **Pharmacological Reviews**, v. 65, p.315–499, 2013.

WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol*, v. 176, n. 3, p. 656-64, 1994.

World Health Organization. Rapid advice: diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children. Geneva: WHO, 2011. [http://www.who.int/hiv/pub/cryptococcal\\_disease2011/en/index.html](http://www.who.int/hiv/pub/cryptococcal_disease2011/en/index.html). (acessado em 29 de julho-2014)

XIE, J.L., POLVI, E.J., SHEKHAR-GUTURJA, T., COWEN, L. E. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. *Future Microbiology*, v. 9, n.4, p. 523–542, 2014.

YAN, J., WANG, X., CHEN, S. Systematic review of severe acute liver injury caused by terbinafine. **Internacional Journal of Clinical Pharmacy**, p.1-5, 2014.

ZARAGOZA, O., FRIES, B. C., CASADEVALL, A. Induction of Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO<sub>2</sub>. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11 p. 6155–6164, 2003.

ZARAGOZA, O., RODRIGUES, M.L. JESUS, M., FRASES, S., DADACHOVA, E., CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**; v.68, p.133–216, 2009.

ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. **Curr Opin Microbiol**, v. 16, n. 4, p. 409-13, 2013.

ZHANG, M., LI, J. C., LIN, H., ZHANG, W., LIN, M., WU, L., LIU, W., MU, J. S., YE, J. X., CUI, X. P. Diagnostic value of cytological and microbiological methods in cryptococcal meningitis. **Genet Mol Res**, v. 13, n. 4, p. 9253-61, 2014.

ZIMMERMANN, G. R.; LEHÁR, J.; KEITH, C. T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. **Drug Discov Today**, v. 12, n. 1-2, p. 34-42, 2007.

## 9 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

### Participação em eventos:

- IX Fórum de Microbiologia – A Microbiologia e a imunidade inata – UFMG – Belo Horizonte, 2013.
- 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia – Natal, 2013.
- I Simpósio de Microbiologia da UFMG – A Microbiologia e a sociedade – UFMG – Belo Horizonte, 2014.
- II Simpósio de Microbiologia da UFMG –Microbiologia translacional: do ambiente natural às aplicações biotecnológicas – UFMG – Belo Horizonte, 2015.

### Formação complementar:

- “Research Fellowship in Medicine” de 01 de Fevereiro a 30 de Abril. Brown University – Providence, RI – EUA – 2016.
- V Percursos Formativos em Docência do Ensino Superior. Carga horária: 60 horas – UFMG – Belo Horizonte – 2014.
- Participação das aulas teóricas do Curso “Molecular methods for microbial diagnosis, genomic analysis and biotechnological applications”. Carga horária: 20 horas. UFMG – Belo Horizonte – 2012.

### Artigos publicados:

SILVA, D. L. ; MAGALHAES, T. F. F. ; SANTOS, J. R. A. ; PAULA, T. P. ; MODOLO, L. V. ; DE FATIMA, A. ; MARTINS, C. V. B. ; SANTOS, D. A. ; RESENDE STOIANOFF, M. A. . Curcumin enhances the activity of fluconazole against *Cryptococcus gattii*-induced cryptococcosis infection in mice.. Journal of Applied Microbiology (Print), v. 120, p. 41-48, 2016.

RODRIGUES, RODRIGO ARAÚJO LIMA ; SILVA, LUDMILA KAREN DOS SANTOS ; DORNAS, FÁBIO PIO ; DE OLIVEIRA, DANILO BRETAS ; MAGALHÃES, THAIS FURTADO FERREIRA ; SANTOS, DANIEL ASSIS ; COSTA, ADRIANA OLIVEIRA ; DE MACÊDO FARIAS, LUIZ ; MAGALHÃES, PAULA PRAZERES ; BONJARDIM, CLÁUDIO ANTÔNIO ; KROON, ERNA GEESIEN ; LA SCOLA, BERNARD ; CORTINES, JULIANA REIS ; ABRAHÃO, JÔNATAS SANTOS . Mimivirus fibrils are

important for viral attachment to microbial world by a diverse glycoside interaction repertoire. *Journal of Virology* 2015.

FREITAS, L.B.O. ; BOAVENTURA, M. A. D. ; SANTOS, W. L. ; STEHMANN, J. R. ; JUNIOR, D. D. ; LOPES, M.T.P. ; **MAGALHÃES, T.F.F.** ; DA SILVA, D. L. ; DE RESENDE, M.A. Allelopathic, cytotoxic and antifungic activities of new dihydrophenanthrenes and other constituents of leaves and roots extracts of *Banisteriopsis anisandra* (Malpighiaceae). *Phytochemistry Letters (Print)*, v. 12, p. 9-16, 2015.

ABRANCHES, P. A. S. ; VAREJAO, E. V. V. ; DA SILVA, CM ; DE FATIMA, A. ; **MAGALHAES, T. F. F.** ; SILVA, D. L. ; RESENDE-STOIANOFF, M.A. ; REIS, S. ; NASCIMENTO JR, C. S. ; ALMEIDA, W. B. ; FIGUEIREDO, I. ; FERNANDES, S. A. . Complexes of Fluconazole with Sodium *p*-Sulfonatocalix[*n*]arenes: Characterization, Solubility and Antifungal Activity. *RSC Advances: an international journal to further the chemical sciences*, v. 5, p. 44317-44325, 2015.

SOUZA, T. B. ; BRETAS, A. C. O. ; ALVES, R. J. ; **MAGALHAES, T. F. F.** ; RESENDE STOIANOFF, M. A. . SYNTHESIS AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PALMITIC ACID-BASED NEOGLYCOLIPIDS RELATED TO PAPULACANDIN D. *Química Nova* p. 1282-1288, 2015.

DONNICI, C. L. ; NOGUEIRA, L. J. ; ARAUJO, M. H. ; OLIVEIRA, S. R. ; **MAGALHAES, T. F. F.** ; LOPES, M. T. P. ; SILVA, A. C. A. ; FERREIRA, A. M. C. ; MARTINS, C. V. B. ; RESENDE-STOIANOFF, M.A. . In vitro studies of Dithiocarbamate Organoruthenium Complexes Against Clinically Relevant Fungal Pathogens.. *Molecules (Basel. Online)*, v. 19, p. 5402-5420, 2014.

**MAGALHAES, T. F. F.** ; SILVA, C. ; DE FATIMA, A. ; MODOLO, L. V. ; MARTINS, C. V. B. ; ALVES, R. B. ; Ruiz, A. L. T. G. ; LONGATO, G. ; CARVALHO, J. ; RESENDE-STOIANOFF, M.A. . Hydroxyaldimines as potent in vitro anticryptococcal agents. *Letters in Applied Microbiology*, v. 57, p. 137-143, 2013

#### **Artigo Aceito para publicação**

DA SILVA, C. M.; DA SILVA, D. L.; **MAGALHÃES, T.F.F.**; ALVES, R.B.; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; MARTINS, F. T. DE FÁTIMA, A. Iminecalix[4]arenes: Microwave-assisted synthesis, X-ray crystal structures, and anticandidal activity. *Arabian Journal of Chemistry* (2016) xxx, xxx–xxx.

#### **Livro publicado:**

SOUSA, G. R. ; SILVEIRA, L. B. ; FERREIRA, M. V. L. ; Soares BM ; AMORIM, J. C. F. ; PIETRA, R. C. C. S. ; CRUZ, R. C. ; ALVES, O. A. ; TOUBES, K. M. P. ; VALADARES, R. C. L. ; SOUSA, V. B. ; OLIVEIRA, A. R. M. R. ; PIANCASTELLI, A. C. C. ; SILVA, D.

L. ; **MAGALHAES, T. F. F.** ; RESENDE-STOIANOFF, M. A. ; BARBOSA, M. P. .  
Terapia Fotodinâmica em Odontologia. Atlas Clínico. 1. ed. Nova Odessa: Napoleão Editora,  
2013. v. 1. 223p

### Resumos publicados em anais de Congressos:

- **MAGALHAES, T. F. F.** ; SILVA, D. L. ; FREITAS, G. J. C. ; ROCHA, K. M. ; CARNEIRO, H. S. ; MARTINS, C. V. B. ; SANTOS, D. A. ; Resende Stoianoff, M. A. . Efeitos do tratamento com anfotericina B e fluconazol na cápsula de linhagens de *Cryptococcus gattii*.. In: II Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2015, Belo Horizonte MG. Resumos do II Simpósio de Microbiologia da UFMG. Belo Horizonte MG: UFMG, 2015. v. 1. p. 27-27.
- RIBEIRO, N. Q. **MAGALHAES, T. F. F.**; FONTES, A. L. C. ; . ; OLIVEIRA, L. V. N. ; FREITAS, G. J. C. ; SANTOS, D. A. Atorvastatina, um fármaco promissor no tratamento da criptococose causada por *Cryptococcus gattii*. In: II Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2015, Belo Horizonte MG. Programa do II Simpósio de Microbiologia da UFMG. Belo Horizonte MG: UFMG, 2015.
- **MAGALHAES, T. F. F.** ; da SILVA, CM ; SILVA, D. L. ; ALMEIDA, S. Q. ; FREITAS, G. J. C. ; SILVEIRA, R. R. ; MARTINS, C. V. B. ; DE FATIMA, A. ; SANTOS, D. A. ; Resende-Stoianoff M.A.A. . Allylimines: antifungal activity alone and in combination with amphotericin B against *Cryptococcus gattii* strains.. In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2015, 2015, Florianópolis SC. Programa do 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2015. Florianópolis SC: SBM, 2015. v. 1. p. 1366-1-1366-1.
- RIBEIRO, N. Q.; COSTA, M.C. CARNEIRO, H.C.S, **MAGALHAES, T. F. F.**; . ; OLIVEIRA, L. V. N.; SANTOS, D. A. Repositioning of drugs for criptococose treatment caused by *Cryptococcus gattii*. In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2015, 2015, Florianópolis SC. Programa do 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2015. Florianópolis SC: SBM, 2015. v. 1.
- ALMEIDA, S. Q. ; **MAGALHAES, T. F. F.** ; da SILVA, CM ; SILVA, D. L. ; MARTINS, C. V. B. ; DE FATIMA, A. ; RESENDE-STOIANOFF, M. A. . Avaliação da associação in vitro de Alilimina com Anfotericina B contra *Fonsecaea pedrosoi*.. In: Semana do Conhecimento da UFMG, XXIV Semana de Iniciação Científica/PRpq, 2015, Belo Horizonte MG. Resumos da Semana do Conhecimento da UFMG, XXIV Semana de Iniciação Científica/PRpq. Belo Horizonte MG: UFMG, 2015. v. 1.

- ALMEIDA, S. Q. ; **MAGALHAES, T. F. F.** ; da SILVA, CM ; SILVA, D. L. ; DE FATIMA, A. ; RESENDE STOIANOFF, M. A. ; MARTINS, C. V. B. ; SILVEIRA, R. R. . Aliliminas: avaliação in vitro da atividade antifúngica contra agentes da Cromoblastomicose.. In: XXII Semana de Iniciação Científica UFMG, 2014, Belo Horizonte, MG. Resumos da XXII Semana de Iniciação Científica UFMG. Belo Horizonte, MG: UFMG, 2014. v. 1.
- SILVEIRA, R. R. ; **MAGALHAES, T. F. F.** ; ALMEIDA, S. Q. ; SILVA, D. L. ; MARTINS, C. V. B. ; DE FATIMA, A. ; RESENDE STOIANOFF, M. A. . Atividade da terbinafina contra amostras de *Cryptococcus gattii*.. In: XXII Semana de Iniciação Científica UFMG, 2014, Belo Horizonte, MG. Resumos da XXII Semana de Iniciação Científica UFMG. Belo Horizonte, MG: UFMG, 2014. v. 1.
- **MAGALHAES, T. F. F.** ; SILVA, D. L. ; SILVA, C. ; FERREIRA, L. B. ; ALMEIDA, S. Q. ; SILVEIRA, R. R. ; PRATA, F. C. R. ; MARTINS, C. V. B. ; DE FATIMA, A. ; SANTOS, D. A. ; Resende Stoianoff, M. A. . Atividade antifúngica de aliliminas contra amostras de *Fonsecaea pedrosoi*.. In: VIII Congresso Latinoamericano de Micologia., 2014, Medellin, Colômbia. Anales del VIII Congreso Latinoamericano de Micologia.. Medellin, Colômbia: ALAM, 2014. v. 1.
- RESENDE-STOIANOFF, M. A.; **MAGALHAES, T. F. F.** ; da SILVA, CM ; SILVA, D. L. ; MARTINS, C. V. B. ; SILVEIRA, R. R. ; MARQUES, S. G. ; SILVA, C. M. P. . Alilimines: in vitro antifungal activity against agents of Chromoblastomycosis. In: 100 years of Chromoblastomycosis, 2014, São Luiz, MA. Program of 100 years of Chromoblastomycosis. São Luiz, MA: ISHAM, 2014. v. 1.
- **MAGALHAES, T. F. F.** ; Da Silva, CM ; SILVA, D. L. ; ALMEIDA, S. Q. ; FREITAS, G. J. C. ; SILVEIRA, R. R. ; MARTINS, C. V. B. ; DE FATIMA, A. ; RESENDE-STOIANOFF, M.A. . Aliliminas contra fungos de importância clínica.. In: I Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2014, Belo Horizonte MG. Programa do I Simpósio de Microbiologia da UFMG. Belo Horizonte MG: UFMG, 2014. v. 1. p. 23-23.
- **MAGALHÃES, T.F.F.**, SILVA, D.L., DA SILVA, C.M., FERREIRA, L.B., CREPALDE, R.S., MARTINS, C.V.B., FÁTIMA, A., SANTOS, D.A., RESENDE-STOIANOFF, M.A. Atividade Antifúngica de Aliliminas Contra Biofilme de *Cryptococcus neoformans* 27°. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal, RN. Programa e Resumos do 27°. Congresso Brasileiro de Microbiologia. São Paulo: SBM, 2013. v. 1
- RESENDE STOIANOFF, M. A. ; SILVA, D. L. ; SANTOS, R. C. ; **MAGALHAES, T. F. F.** ; MARTINS, C. V. B. ; SANTOS, D. A. ; DE FATIMA, A. . Atividade de aldiminas hidroxiladas contra fungos de interesse clínico.. In: XLIX Congresso da

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical., 2013, Campo Grande MS. Resumos do XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.. Uberaba: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2013. v. 1. p. 63-63.

- RESENDE-STOIANOFF, M.A. ; SILVA, D. L. ; SANTOS, JRA ; **MAGALHAES, T. F. F.** ; SANTOS, R. C. ; ALMEIDA, S. Q. ; MODOLO, L. V. ; MARTINS, C. V. B. ; NOGUEIRA, L. J. ; SANTOS, D. A. ; DE FATIMA, A. . Atividade de curcumina em modelo murino de criptococose. In: 27º. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal, RN. Programa e Resumos do 27º. Congresso Brasileiro de Microbiologia. São Paulo: SBM, 2013.
- **MAGALHAES, T. F. F.** ; DA SILVA, CM ; SILVA, D. L. ; ALMEIDA, S. Q. ; FREITAS, G. J. C. ; MARTINS, C. V. B. ; SANTOS, D. A. ; DE FATIMA, A. ; RESENDE STOIANOFF, M. A. . Potencial antifúngico de aldiminas derivadas do cinamaldeído. VII Congresso Brasileiro de Micologia,. In: VII Congresso Brasileiro de Micologia, 2013, Belém, PA. Programa e Resumos do VII. Congresso Brasileiro de Micologia. Belém, PA: SBMy, 2013.
- **MAGALHAES, T. F. F.** ; SILVA, C. ; RESENDE-STOIANOFF, M.A. ; SILVA, D. L. ; MODOLO, LV ; MARTINS, C. V. B. ; ALVES, R. B. ; RUIZ, A. L. T. G. ; LONGATO, G. B. ; CARVALHO, J. E. ; DE FATIMA, A. . Hydroxilamines as potent in vitro anticryptococcal agents.. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia., 2012. Programa e Resumos. Santos: ALAM, 2012. p. 176.
- RESENDE-STOIANOFF, M.A. ; SILVA, D. L. ; TAYLOR, E. L. S. ; CARVALHO, V. ; **MAGALHAES, T. F. F.** ; MARTINS, C. V. B. ; MOREIRA, C. ; SANTOS, D. A. ; DE FATIMA, A. . Atividade de aldiminas contra *Fusarium solani* isolado de guano de morcego em uma caverna de turismo do Brasil.. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia., 2012. Programa e Resumos. Santos: ALAM, 2012. p. 99.
- SILVA, D. L. ; **MAGALHAES, T. F. F.** ; MARTINS, C. V. B. ; REIS, M. F. ; MODOLO, LV ; DE FATIMA, A. ; RESENDE-STOIANOFF, M.A. . Atividade da curcumina contra fungos de interesse médico e biofilmes de *Cryptococcus* sp.. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia., 2012, Santos. Programa e Resumos. Santos: ALAM, 2012. p. 98.
- **MAGALHAES, T. F. F.** ; DE FATIMA, A. ; MARTINS, C. V. B. ; SILVA, D. L. ; NOGUEIRA, L. J. ; RESENDE-STOIANOFF, M.A. . Avaliação da atividade antifúngica da associação da anfotericina B com duas bases de Schiff contra *Cryptococcus* spp.. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia., 2012, Santos. Programa e Resumos. Santos: ALAM, 2012. p. 96

**Outras atividades:**

Co-orientação da aluna Vívian Marta Aleixo na monografia intitulada “Terapia antifúngica em infecções oportunistas”. Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG, março 2016.

Co-orientação do aluno Gleiton Vieira Mendes na monografia intitulada “Paracoccidioidomicose – Relevância do diagnóstico precoce”. Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG, março 2015.

Co-orientação da aluna Vânia Assunção Saturnino na monografia intitulada “Onicomicoses causadas por fungos filamentos septados hialinos e não dermatófitos”. Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG, abril 2014.

Participação como banca debatedora da monografia intitulada “Onicomicoses e a terapia fotodinâmica”, da aluna Raquel Bruneli de Resende. Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG, março 2015.