



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

**THELMA TIRONE SILVÉRIO MATOS**

**Atividade antifúngica de heterociclos tiazólicos contra  
*Cryptococcus neoformans* e *C. gattii***

**Belo Horizonte**

**2017**



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

**Atividade antifúngica de heterociclos tiazólicos contra  
*Cryptococcus neoformans* e *C. gattii***

**THELMA TIRONE SILVÉRIO MATOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**Orientadora:** Profa. Susana Johann - Departamento de Microbiologia - UFMG

**Belo Horizonte**

**2017**

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria Rosália,  
que é a mulher mais incrível do mundo.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus e Nossa Senhora Aparecida por terem me tornado uma pessoa de uma infinita fé e alegria, que me ensinam a lutar pelos meus sonhos e objetivos com muita garra e dedicação.

Aos meus irmãos Raquel e Jones, meu sobrinho Matheus e principalmente a minha querida mãe Maria Rosália que me ajuda em todos os aspectos da minha vida, que tem uma paciência divina em meus momentos de estresse e angústia. Amo muito vocês! Agradeço também a minha tia Sueli que está sempre na torcida pelas minhas conquistas.

A todos meus amigos do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos e do Laboratório de Sistemática e Biodiversidade de Fungos. Lana, Grazi, Anzai, Cidi, Thaís, Katharina, Ana Raquel e Ohanna que foram mais que companheiros de laboratório. Em especial, agradeço a Isabel e ao Rafael que tiveram um papel importantíssimo nessa etapa da minha vida, jamais esquecerei os nossos momentos de estudos para passar na prova do mestrado.

Agradeço também a cumplicidade da equipe antifúngicos, Lana, Grazi, Carol, Nívea, Larissa, Simone e principalmente a minha orientadora Susana, por me receber e ensinar as partes fundamentais do laboratório.

À professora Renata e seus alunos Igor e Inácio da Faculdade de Farmácia da UFMG, por terem sintetizado e cedido para estudo às substâncias que trabalhei em meu projeto de mestrado, sem essa parceria nada seria possível.

À professora Elaine e sua aluna Gabrielle por terem contribuído com os ensaios de citotoxicidade das substâncias em estudo e também a professora Beth Fuchs pelos experimentos feitos em seu laboratório na University de Brown – EUA, pela minha querida amiga Lana.

À equipe do laboratório de Micologia da Santa Casa – BH, por terem me recebido como aluna de iniciação científica em meu primeiro contato com a micologia, em especial a minha amiga Fabi e ao Marcus Jabuti que tanto me ensinaram.

À todos do laboratório de Micologia da UFMG, principalmente ao Rafael, Marliete e Hellem. O laboratório de vocês é um exemplo de amizade e companheirismo. Todas as vezes que procurei ajuda, vocês me ajudaram com muita paciência. Muito obrigada.

Aos professores Carlos Rosa e Luiz Rosa pela confiança em me aceitarem no laboratório.

Às minhas amigas de caminhada, Polly, Lorem, Gleice, Bella, Agna, Bruna, Paola e Carol por serem minhas cúmplices no cotidiano, vocês são meu apoio por onde eu andar. Obrigada por estarem sempre presentes em minha vida, vocês me trazem paz, amor e alegrias, agradeço mais ainda por permanecerem comigo principalmente nos momentos mais difíceis da minha vida, é nesses momentos que conhecemos as verdadeiras amizades. Amo vocês!!

E com imenso carinho, agradeço a banca examinadora, Daniel, Danielle e Thaís por terem aceitado participar desse momento importante da minha jornada acadêmica.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA DE QUADROS .....	xiv
RESUMO .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Revisão bibliográfica.....	16
1.1.1. <i>Cryptococcus</i> .....	16
1.2 Característica da levedura .....	18
1.3 Fatores de virulência .....	19
1.4 Criptococose.....	23
1.5 Etiologia e patogênese.....	26
1.6 Agentes antifúngicos para o tratamento da criptococose .....	30
1.7 Tratamento .....	33
1.8 Novos fármacos e substâncias com potencial atividade antifúngica.....	34
1.9 Alvos potenciais para estudos de novos antifúngicos .....	35
1.10 Heterociclos tiazólicos .....	37
2. JUSTIFICATIVA.....	40
3. OBJETIVO.....	41
3.1. Objetivo geral.....	41
3.2. Objetivos Específicos.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	42
4.1. Micro-organismos .....	42
4.1.1 Identificação genotípica dos isolados de <i>Cryptococcus spp.</i> .....	42
Extração do DNA .....	43

4.2.	Substâncias experimentais.....	44
4.3.	Preparo do inóculo .....	45
4.4.	Triagens das substâncias .....	45
4.5.	Citotoxicidade em macrófagos murinos.....	47
4.6.	Microscopia eletrônica de fluorescência .....	48
4.7.	Hemólise em eritrócitos humanos .....	49
4.8.	Avaliação da lipossolubilidade.....	49
4.9.	Ensaio de microdiluição em caldo – Concentração inibitória mínima (CIM).....	50
4.10.	Ensaio da concentração fungicida mínima.....	51
4.11.	Índice de seletividade .....	51
4.12.	Ensaio de curva de morte .....	52
4.13.	Avaliação da concentração inibitória fracional .....	52
4.14.	Ensaio de fagocitose.....	53
4.15.	Extravasamento do material celular .....	55
4.16.	Integridade do biofilme .....	55
4.17.	Ensaio de proteção osmótica: Sorbitol .....	56
4.18.	Avaliação da interferência dos antifúngicos e substâncias em estudo em relação a cápsula 56	
4.19.	Microscopia eletrônica de Varredura .....	57
4.20.	Avaliação da produção de melanina.....	57
4.21.	Ensaio de toxicidade e sobrevida em <i>Galleria mellonella</i> .....	58
4.22.	Análise estatística.....	59
5.	RESULTADOS.....	60
5.1.	Identificação genotípica dos isolados de <i>Cryptococcus</i> spp.....	60
5.2.	Triagem inicial das substâncias sintéticas .....	62
5.3.	Avaliação da citotoxicidade das substâncias frente aos macrófagos murinos e avaliação da lipossolubilidade .....	65
5.4.	Hemólise em eritrócitos humanos .....	67

5.5.	Substâncias selecionadas.....	68
5.6.	Verificação da concentração inibitória mínima e Concentração Fungicida Mínima .....	68
5.7.	Índice de seletividade.....	70
5.8.	Análise da curva e morte.....	71
5.9.	Interação das substâncias HTI 7 e RI 82 com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol..	73
5.10.	Determinação do índice fagocítico.....	76
5.11.	Avaliação da integridade da membrana celular.....	77
5.12.	Avaliação de dano na parede celular fúngica.....	78
5.13.	Avaliação da integridade do biofilme .....	79
5.14.	Determinação da interferência dos antifúngicos e substâncias em relação ao tamanho da cápsula	80
5.15.	Microscopia eletrônica de Varredura .....	81
5.16.	Verificação da interferência na produção de melanina por <i>Cryptococcus</i> spp. quando tratado com as substâncias teste .....	83
5.17.	Avaliação da toxicidade das substâncias e sobrevivência em <i>Galleria mellonella</i> .....	85
6.	DISCUSSÃO.....	87
6.1.	Identificação genotípica dos isolados de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>C. gattii</i> do presente estudo	87
6.2.	Triagem das substâncias com potencial antifúngico e teste de análise citotóxica.....	89
6.3.	Avaliação da susceptibilidade de diversos isolados de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>C. gattii</i> e ensaios de viabilidade celular.....	91
6.4.	Inibição de possíveis fatores de virulência e danos na estrutura celular de <i>Cryptococcus</i> spp. frente ao tratamento com as substâncias RI 82 e HTI 7 .....	93
7.	RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO .....	96
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs - Absorbância

°C - Grau Celsius

CIM - Concentração inibitória mínima

CIF - Concentração inibitória fracional

CIFI - Índice de concentração inibitória fracional

CFM - Concentração fungicida mínima

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

DMSO – Dimetilsulfóxido

GL - Gay Lussac

HCl - Ácido clorídrico

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxi-1-piperazíno)etanosulfônico

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - Ácido fosfórico

IF% - Índice fagocítico

MM – Meio mínimo

MTT - 3-(4,5-dimetiltazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromido

MVM - McVeigh & Morton

NaNO<sub>2</sub> - Nitrato de sódio

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato

PBS - Tampão fosfato Tween-20 0,05%

pH - Potencial hidrogeniônico

RPM - Rotações por minuto

SNC - Sistema nervoso central

SFB - Soro fetal bovino

UFC - Unidade formadora de colônia

UV - Ultravioleta

% - Porcentagem

> - Maior

< - Menor

≥ - Maior ou igual

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - A) Células de *Cryptococcus neoformans* cultivadas em meio Sabouraud. B) Células de *C. neoformans* obtidas a partir do pulmão de um camundongo infectado há cinco semanas com a levedura, mostrando a diferença de tamanho entre o mesmo isolado cultivado em meio Sabouraud (ZARAGOZA et al., 2010).

**Figura 2** - A) Cápsula polissacarídica de *Cryptococcus neoformans*, coradas com tinta Nanquim B) Colônias marrons de *C. neoformans* em comparação com colônias brancas de *Candida albicans*, crescidas em meio de cultura com ágar semente de níger, que contém substratos difenólicos. *C. neoformans* produz melanina na presença de moléculas difenólicas (IDNURM et al., 2005).

**Figura 3** - Representação da via de infecção do *Cryptococcus neoformans* e *C. gatti*. O *Cryptococcus* spp. sobrevive no solo, árvores e excretas de aves. Os seres humanos inalam as células de levedura dessecadas ou esporos e estabelecem uma forma pulmonar da doença, podendo migrar para o sistema nervoso central (SNC) através de microcapilares da barreira hematoencefálica. Figura retirada e adaptada de: <<http://www.bmolchem.wisc.edu/labs/hull/research.html>>.

**Figura 4** – Esquemas do tamanho médio da célula ativa, dessecada e esporo de *Cryptococcus*. Imagem retirada e adaptada de KRONSTAD et al., 2011.

**Figura 5** – Esquema dos três possíveis métodos para as células criptococócicas atravessarem a barreira hematoencefálica. Retirado e adaptado de SEOANE, SCHNEIDER e MAY, 2016.

**Figura 6** – Esquema dos alvos de fármacos existentes e possíveis alvos contra *Cryptococcus* spp. Retirado e adaptado de COELHO; CASADEVALL, 2016.

**Figura 7** – Núcleo tiazolínico das substâncias da classe dos heterociclos tiazólicos. Retirada de DE SOUZA et al., 2005.

**Figura 8** – Principais moléculas medicamentosas com o anel tiazólico. Retirado de DE SOUZA et al., 2005.

**Figura 9** – Esquema da placa de microdiluição para o ensaio de triagem. Os ensaios de triagem foram realizados nas colunas 2 a 11. Como controle na coluna 1: CEM – esterilidade do meio RPMI mais MOPS (poços A - D), CN – controle negativo contendo inóculo e meio RPMI mais MOPS (poços E – H) e na coluna 12: Controle do DMSO – diluente das substâncias (poços A – D) e controle com antifúngico – anfotericina B (poços E – H).

**Figura 10** – Fotografia do gel de agarose dos isolados de *Cryptococcus neoformans* utilizando o primer (GTG)<sub>5</sub>.

**Figura 11** – Fotografia do gel de agarose dos isolados de *Cryptococcus gattii* utilizando o primer (GTG)<sub>5</sub>.

**Figura 12** – Imagens de microscopia eletrônica de fluorescência de macrófagos murinos BMDM- de medula óssea tratados com a CIM das substâncias **HTI 7**, **RI82** e **RI 06** e, na ausência de tratamento (controle). A coloração dos macrófagos foi feita com o corante Faloidina e DAPI que coram o citoesqueleto e o núcleo, respectivamente.

**Figura 13** – Atividade hemolítica das substâncias **RI 82** e **HTI 7**.

**Figura 14** – Gráficos do declínio da viabilidade celular de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* frente ao tratamento com o antifúngico fluconazol e as substâncias **HTI 7** e **RI 82**. **Legenda:** 14A: gráficos da curva de morte do antifúngico fluconazol no valor da CIM e 2X a CIM. 14B: gráficos da curva de morte da substância **HTI 7** no valor da CIM e 2X a CIM e 14C: gráficos da curva de morte da substância **RI 82** também nos valores da CIM e 2X a CIM.

**Figura 15** – Porcentagem do índice fagocítico de macrófagos murinos tratados com as substâncias **HTI 7** e **RI 82** em contato com *Cryptococcus gattii* (L27/10).

**Figura 16** – Verificação do extravasamento celular de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* frente aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol e as substâncias **RI 82** e **HTI 7**. **Legenda:** Utilizou-se o teste de comparação múltipla Newman-Keuls e valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

**Figura 17** – Integridade do biofilme de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* frente as substâncias **HTI 7** e **RI 82** legenda de figura é embaixo. **Legenda:** Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Neste estudo os valores foram significativos em valores de  $p < 0.001$ .

**Figura 18** – Avaliação do tamanho da cápsula de dois isolados de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* tratados com a anfotericina B, fluconazol e com as substâncias HTI 7 e RI 82.

**Figura 19** – Microscopia eletrônica de Varredura. 19A) Controle de crescimento de *C. gattii* (L27/01). 19B) Controle de crescimento de *C. neoformans* (ATCC 24067). 19C) Células de *C. gattii* tratadas com a CIM da substância RI 82. 19D) Células de *C. neoformans* tratadas com a CIM da substância RI 82. 19E) Células de *C. gattii* tratadas com a CIM da substância HTI 7. 19F) Células de *C. neoformans* tratadas com a CIM da substância HTI 7.

**Figura 20** – Porcentagem de sobrevivência de *Galleria mellonella* tratadas com as substâncias **RI 82** e **HTI 7** (10 mg/kg) .

**Figura 21** – Porcentagem de sobrevivência da *Galleria mellonella* tratada com o fluconazol e com as substâncias RI 82 e HTI 7.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Mudanças da nomenclatura proposta para o complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* por Hagen e colaboradores (2015).

**Tabela 2** - Relação de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* que foram feito os testes de identificação genotípica

**Tabela 3** – Isolados de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* que foram utilizados no presente estudo.

**Tabela 4** – Resultado da triagem realizada com 81 substâncias sintéticas contra *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*.

**Tabela 5** – Resultado do ensaio de citotoxicidade em macrófagos murinos utilizando as substâncias RI06, HTI 7 e RI 82 e os antifúngicos fluconazol e itraconazol como controles.

**Tabela 6** – Concentração inibitória mínima das substâncias RI 82 e HTI 7 e dos antifúngicos anfotericina B e fluconazol contra isolados de *C. gattii* e *C. neoformans*.

**Tabela 7** – Cálculo do índice de seletividade do fluconazol e das substâncias **RI 82** e **HTI 7**.

**Tabela 8** – Resultados da concentração inibitória fracional da substância RI 82 em interação com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol contra os isolados de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*

**Tabela 9** – Resultados da concentração inibitória fracional da substância HTI 7 em interação com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol contra os isolados de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*.

**Tabela 10** – Resultado da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias **RI 82** e **HTI 7** contra isolados de *Cryptococcus* spp. em meio RPMI com e sem sorbitol.

## LISTA DE QUADRO

**Quadro 1** – Avaliação da produção de melanina de isolados de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* após tratamento com as substâncias RI 82 e HTI 7.

## RESUMO

*Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* são os principais agentes causadores da criptococose em humanos, uma micose sistêmica que afeta principalmente o sistema nervoso central. Essa doença causa mundialmente a morte em mais de 625.000 indivíduos por ano. Existem poucos antifúngicos disponíveis para o tratamento da criptococose, como a anfotericina B, a flucitosina e derivados azólicos, com isso, a busca de novos antifúngicos é crucial para o tratamento da criptococose. O estudo selecionou-se duas substâncias sintéticas inéditas da classe dos heterociclos tiazólicos, nomeadas **RI 82** e **HTI 7**, ambas apresentaram baixa citotoxicidade frente a macrófagos murinos e eritrócitos humanos. As substâncias mostraram atividade antifúngica contra isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* com o valor do índice de seletividade maior que 10. A substância **HTI 7** apresentou ClogP = 6,2 e a substância **RI 82** ClogP = 3,97. As substâncias apresentaram um declínio da viabilidade celular no tempo de 12 horas após o tratamento. As duas substâncias testadas desintegraram o biofilme do isolado L27/01(*C. gattii*), porém, somente a substância **RI 82** desintegrou o biofilme do isolado ATCC 24067 (*C. neoformans*). A cápsula das células criptococócicas não apresentou diferença significativa de tamanho em relação ao controle após o tratamento com a CIM das substâncias quando analisadas em microscópio óptico. Entretanto, quando a cápsula foi analisada em microscópio eletrônico de varredura, observou-se que as células de *C. gattii* (L27/01) e *C. neoformans* (ATCC 24067) tratadas com a substância **HTI 7** apresentaram suas fibras capsulares maiores. Ao avaliar a produção da melanina em meio L-dopa contendo a substância **RI 82** no valor de CIM, foi visto que ocorreu a diminuição da produção da melanina para o isolado L27/01 (*C.gattii*) em 48 horas, no entanto, o mesmo não ocorreu para o isolado ATCC 24067 (*C. neoformans*). As duas substâncias não mostraram toxicidade em modelo *in vivo* utilizando *Galleria mellonella* e, no ensaio de sobrevivência também utilizando *G. mellonella*, foi visto que o tratamento com 5 mg/kg com a substância **HTI 7** prolongou a sobrevivência das larvas. Verificou-se que 70,58% dos isolados de *C. neoformans* em estudo eram da variedade *grubii*, Dentre os isolados de *C. gattii*, observou-se que 41,17% dos isolados foram identificados como VGII. Desta maneira, este trabalho direcionou duas novas substâncias da classe dos heterociclos tiazólicos com potencial atividade contra *C. neoformans* e *C. gattii*.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, antifúngicos, heterociclos tiazólicos.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Revisão bibliográfica

#### 1.1.1. *Cryptococcus*

O gênero *Cryptococcus* pertence à família Cryptococcaceae e a ordem Tremellales (LIU et al., 2015). Existe uma grande divergência entre os autores sobre as espécies válidas do gênero *Cryptococcus*. Kurtzman, Fell e Boekhout (2011) propuseram 70 espécies válidas para o gênero *Cryptococcus*, com posterior inclusão de mais 25 espécies. No entanto, em 2012, Richardson e Warnock classificaram somente 30 espécies como pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. Mais atualmente, Liu e colaboradores (2015) reclassificaram o gênero e propuseram apenas 10 espécies dentro do gênero *Cryptococcus*. Essas dez espécies incluem o complexo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*, *Filobasidiella depauperata* e *F. lutea*. As principais espécies do gênero causadoras de doença são *C. neoformans* e *C. gattii*, que são as formas anamórficas dos fungos, *Filobasidiella neoformans* e *Filobasidiella bacillispora*, respectivamente (CHEN et al., 2014; RICHARDSON e WARNOCK, 2012).

Durante as últimas décadas, foi demonstrado uma considerável heterogeneidade genética entre isolados da mesma espécie de *C. neoformans* e *C. gattii* (HAGEN et al., 2015). Isolados de cada subtipo molecular (descritos abaixo) diferem quanto à virulência, manifestações clínicas, susceptibilidade ao tratamento antifúngico, tipo de reprodução, epidemiologia, nichos ecológicos e hospedeiros (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; KIDD et al., 2004). A reclassificação das espécies de *C. gattii* e *C. neoformans* é baseada em estudos filogenéticos e ausência de recombinação genética entre isolados da mesma espécie (KWON-CHUNG et al., 2002).

O complexo *C. neoformans* / *C. gattii* é classificado em três variedades, cinco sorotipos e oito subtipos moleculares. O *C. neoformans* apresenta a sorotipo A, D e AD, sendo que o *C. neoformans* var. *grubii* possui o sorotipo A com 3 subtipos moleculares, VNI,

VNII e VNB. O *C. neoformans* var. *neoformans*, possui o sorotipo D com o subtipo VNIV e o híbrido das duas espécies com o sorotipo AD, possui o subtipo molecular VNIII. O sorotipo B e C, pertence ao *C. gattii* que compreende quatro genótipos distintos VGI, VGII, VGIII, VGIV e, o híbrido dos dois genótipos VGIV/VGIII (HAGEN et al., 2015).

A partir de análises filogenéticas de abordagens de concordância geneológicas e de estudos de genotipagem foi reconhecido por Hagen e colaboradores (2015) uma nova nomenclatura para os subtipos moleculares de *C. gattii* e *C. neoformans*. Os novos nomes propostos para o *C. gattii* foram: *C. gattii*, *C. deuterogattii*, *C. bacillisporus*, *C. tetragattii* e *C. decagattii* (VGI, VGII, VGIII, VGIV e VGIV/VGIII, respectivamente). Para os genótipos moleculares do *C. neoformans* a nova nomenclatura propôs que para os isolados de *C. neoformans* var. *grubii* o nome é *C. neoformans* (VNI, VNII e VNIII), e para o *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. deneoformans* (VNIV) e para a intervariedade híbrida de *C. neoformans* o nome proposto foi *C. neoformans* X híbrido *C. deneoformans* (Tabela 1).

Esta nova proposta de reclassificação das espécies de *C. gattii* em 5 espécies e *C. neoformans* em duas espécies, além dos híbridos, vem causando muitas divergências entre a comunidade de micologistas clínicos e taxonomistas. Com o objetivo de sanar esta discussão, Kwon-Chung e colaboradores (2017) publicaram um importante trabalho onde citam os benefícios e desvantagens desta proposta de reclassificação e recomendam a utilização de “*Cryptococcus neoformans* complexo de espécies” e “*C. gattii* complexo de espécies” como etapa intermediária antes de se criar mais espécies. Reconhecendo, desta forma, que existe uma diversidade genética dentro das espécies, mas que ainda não se tem dados suficientemente claros para que estas espécies sejam reconhecidas.

**Tabela 1** – Mudanças da nomenclatura proposta para o complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* por Hagen e colaboradores (2015).

Nome atual da espécie	Subtipo molecular	Sorotipo	Nome da espécie proposto
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNI	A	<i>C. neoformans</i>
	VNII	A	
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VNIV	D	<i>C. deneoformans</i>
Intervariabilidade híbrida de <i>C. neoformans</i>	VNIII	AD	<i>C. neoformans</i> X Híbrido de <i>C. deneoformans</i>

Nome atual da espécie	Subtipo molecular	Sorotipo	Nome da espécie proposto
<i>C. gattii</i>	VGI	B ou C	<i>C. gattii</i>
	VGII	B ou C	<i>C. deuterogattii</i>
	VGIII	B ou C	<i>C. bacillisporus</i>
	VGIV	B ou C	<i>C. tetragattii</i>
	VGIV/VGIII	B ou C	<i>C. decagattii</i>

## 1.2 Característica da levedura

As leveduras do gênero *Cryptococcus* se caracterizam por serem cápsuladas (algumas podem ser acápsulares), globosas ou ovaladas, com tamanho que pode variar de 3 a 8 µm de diâmetro e podem apresentar brotamento único ou múltiplo ou, podem não apresentarem brotamentos (KON et al., 2008; LIU et al., 2015). As colônias de *Cryptococcus* apresentam-se na cor branca a creme, brilhante, com textura mucóide e margem lisa e inteira, após três dias de cultivo à temperatura de 25 a 37°C nos meios como ágar Sabouraud glicose 2% e ágar extrato de malte (KON et al., 2008). O interior das células do *Cryptococcus* spp. é composto por um núcleo simples circundado por uma dupla membrana porosa e nucléolo em seu interior. O citoplasma contém organelas, incluindo mitocôndrias, vacúolos, retículo endoplasmático liso e rugoso, ribossomos e grânulos de reserva de lipídios e glicogênio (CASADEVALL et al., 1998).

A parede celular fúngica é uma estrutura que as diferenciam das células de mamíferos, é composta de polissacarídeos, principalmente de glucanas  $\alpha$  e  $\beta$  (sendo a  $\alpha$  1,3 – glucana mais abundante) (JAMES et al., 1990), quitina e mananas (RODRIGUES et al., 2011). Nas leveduras, a camada externa de polissacarídeos contém manose ou manoproteínas se sobrepondo a uma camada de glucana insolúvel, a qual está associada à resistência mecânica da parede celular (JAMES et al., 1990; RODRIGUES et al., 2011). A parede celular proporciona resistência e rigidez para a célula, protege contra o estresse ambiental, fornece suporte osmótico, regula a permeabilidade celular, determina o formato da célula, além de estar relacionada a eventos de sinalização celular, adesão e digestão extracelular (CHAI et al., 2011; DOERING, 2009; MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005).

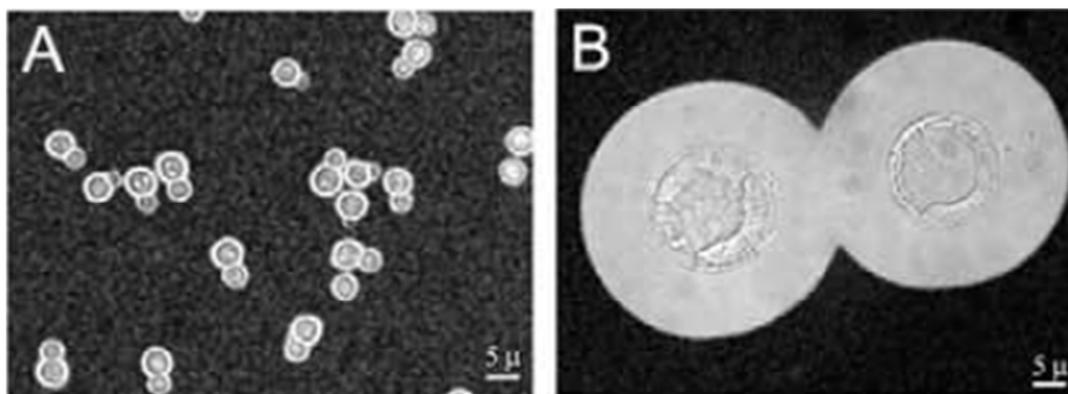
### 1.3 Fatores de virulência

*C. neoformans* e *C. gattii*, possuem fatores de virulência bem estabelecidos, como: a síntese de uma cápsula, produção de melanina, capacidade de sobreviver em macrófagos, aquisição de nutrientes através do hospedeiro, capacidade de crescerem à temperatura do corpo humano e produção de enzimas, como urease, lacase e fosfolipase B (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

A cápsula é composta com cerca de 90% de glucuronoxilomanana (GXM) e 10% de galactoxilomanana (GalXM) (GRANGER; PERFECT; DURACK, 1985; VARTIVARIAN et al., 1993). Doering (2009), propõe uma nova nomenclatura de glucuronoxilomananagalactana (GXMGal) para a galactoxilomanana (GalXM), baseando em estudos de sua composição (manose, xilose e ácido glucurônico). A glucuronoxilomanana (GXM) a qual, por reações sorológicas, determina os sorotipos A, B, C, D e AD, exerce importante papel inibitório sobre a resposta imune do hospedeiro. Já a galactoxilomanana (GalXM) exerce um potente efeito deletério sobre o sistema imune do hospedeiro, não tendo participação na determinação dos sorotipos (CASADEVALL; PIROFSKI, 2005; PERICOLINI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2011).

A síntese da cápsula é induzida pela localização da célula criptocócica no tecido do hospedeiro, pelo soro, limitações de nutrientes como o ferro e glicose, temperatura e níveis fisiológicos de CO<sub>2</sub> (KRONSTAD; HU; JUNG, 2013; O'MEARA; ANDREW ALSPAUGH, 2012; ZARAGOZA; FRIES; CASADEVALL, 2003). A cápsula interfere na fagocitose pelos macrófagos que são a primeira linha de defesa do sistema imunológico, esgota componentes do complemento, inibe a resposta imunológica do hospedeiro e também inibe a atividade dos antifúngicos (BOSE et al., 2003; MCFADDEN; CASADEVALL, 2001; ZARAGOZA et al., 2008). Essas características da cápsula promovem a sobrevivência intracelular, que pode ser crucial para latência de longa duração da levedura (IDNURM et al., 2005). No momento da infecção o *Cryptococcus* spp. depende de sua sobrevivência nos alvéolos pulmonares para sua disseminação para outros tecidos. Nesse momento, a cápsula possui importante papel, pois protege contra fagocitose e interage com as células do hospedeiro modulando suas atividades. A cápsula ainda possui exposta em sua superfície a proteína antifagocitose 1, a qual pode ser secretada para o meio extracelular. Essa proteína inibe a fagocitose pela ligação aos receptores do sistema de complemento CR2 e CR3 (STANO et al., 2009).

Em um experimento em modelo animal, Zaragoza e colaboradores (2010), demonstraram que células de *C. neoformans* podem aumentar até 900 vezes o seu tamanho em uma infecção, quando comparados aos isolados da levedura encontrados no meio de cultura Sabouraud (Figura 1). São classificadas como células gigantes ou titãs aquelas que apresentam diâmetro maior que 30  $\mu\text{m}$ , sendo esse tamanho 5-6 vezes maior que as células *in vitro* (ZARAGOZA et al., 2010).

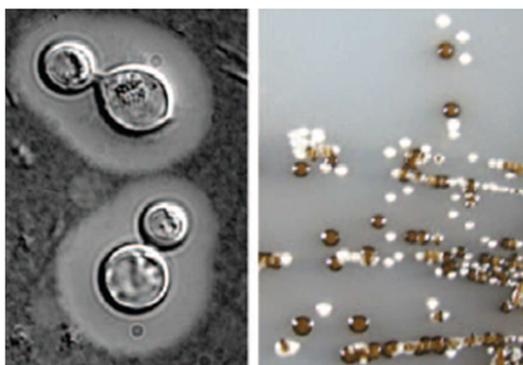


**Figura 1** - A) Células de *Cryptococcus neoformans* cultivadas em meio Sabouraud. B) Células de *C. neoformans* obtidas a partir do pulmão de um camundongo infectado há cinco semanas com a levedura, mostrando a diferença de tamanho entre o mesmo isolado cultivado em meio Sabouraud (ZARAGOZA et al., 2010).

A melanina é um pigmento marrom escuro que protege o fungo da radiação ultravioleta, pois, absorve a radiação eletromagnética (DADACHOVA et al., 2008), promove a estabilidade da parede celular e além disso, confere resistência contra metais pesados e susceptibilidade reduzida a predadores ameboides (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). A melanina também reduz a susceptibilidade da levedura quando exposta a anfotericina B (IKEDA et al., 2003) e a caspofungina (DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). Isto ocorre porque a melanina produz uma barreira que pode impedir ou diminuir a passagem do antifúngico para o interior da célula. Durante o desenvolvimento da doença a melanina pode ser formada pela oxidação das catecolaminas, tais como, a dopamina, que são encontradas principalmente no cérebro do hospedeiro, e este fato pode estar associado ao tropismo do fungo pelo sistema nervoso central. No hospedeiro, a melanina protege o fungo de radicais tóxicos produzidos pelo sistema imunológico (EISENMAN et al., 2005; NOSANCHUK et al., 2000; ZHU; WILLIAMSON, 2004).

A síntese da melanina é dependente da enzima lacase e da presença de substratos exógenos, tais como, o L3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) e epinefrina (BOSE et al., 2003; GRANGER; PERFECT; DURACK, 1985). A oxidação desses precursores pela enzima lacase inicia a via de biossíntese da melanina nesses micro-organismos (EISENMAN et al., 2007). A enzima lacase é uma difenoloxidase associada com a parede celular, que catalisa a oxidação de compostos difenólicos para as suas respectivas quinonas (WILLIAMSON, 1994; ZHU et al., 2001).

Em um modelo de infecção animal, comparando isolados de *C. neoformans* melanizados e não melanizados, foi observado que isolados de *C. neoformans* não melanizados são menos virulentos, mostrando a importância da melanina à virulência (KWON-CHUNG; POLACHECK; POPKIN, 1982) (Figura 2).



**Figura 2** - A) Cápsula polissacarídica de *Cryptococcus neoformans*, coradas com tinta Nanquim B) Colônias marrons de *C. neoformans* em comparação com colônias brancas de *Candida albicans*, crescidas em meio de cultura com ágar semente de níger, que contém substratos difenólicos. *C. neoformans* produz melanina na presença de moléculas difenólicas (IDNURM et al., 2005).

Outro fator importante e primordial para a patogênese de *C. neoformans* e *C. gattii* é a capacidade dessas leveduras crescerem a temperatura corporal de 37 a 39 °C, mostrando ser um importante fator de risco para humanos (ALSPAUGH et al., 2000). Existem outras espécies de *Cryptococcus* que possuem outros fatores de virulência semelhantes aos encontrados em *C. neoformans* e *C. gattii*, como a produção da cápsula e a produção da enzima lacase, porém, são incapazes de crescer a temperatura corporal de mamíferos, não possuindo, desta forma, capacidade de serem patogênicos para o homem (PETTER et al., 2001).

Outras enzimas importantes para o *Cryptococcus* são as fosfolipases, ureases e proteinases. As fosfolipases são enzimas que degradam os fosfolipídios, atuam na homeostase da membrana, aquisição de nutrientes, geração de moléculas bioativas e podem ter papel na patogênese e virulência dos micro-organismos (GUIMARÃES et al., 2011; MCFADDEN et al., 2007). A fosfolipase B é secretada por *C. neoformans* durante a infecção e, pode aumentar a sobrevivência da levedura dentro dos fagócitos (COX et al., 2001). Em um experimento laboratorial, onde, adicionou-se fosfolípídios de protozoários ou de mamíferos às culturas de *C. neoformans*, evidenciou-se o aumento do crescimento da cápsula, o que levou à sugestão de que os fosfolípídios são detectados pelo fungo como um sinal de perigo ou sinal de alerta de fagócito (CHRISMAN et al., 2011).

A enzima urease apresenta um papel importante na migração da levedura pela barreira hematoencefálica, como mostrado em um experimento, onde foram injetados inibidores de urease em camundongos infectados com *C. neoformans* e estes apresentaram uma taxa de sobrevivência prolongada. A contagem de unidades formadora de colônias (UFC) foi significativamente menor no cérebro em comparação com o grupo de camundongos controle, que não receberam o inibidor de urease (SHI et al., 2010). A proteinase também é excretada pelo *C. neoformans* e apresenta fatores de virulência importantes, como a destruição do tecido do hospedeiro e de suas proteínas importantes para o sistema imunológico (YOO et al., 2004).

Outro fator de virulência característico de *Cryptococcus* spp. é a formação do biofilme, uma matriz polimérica que protege as células fúngicas. Uma das funções mais relevantes do ponto de vista médico da matriz extracelular é sua capacidade de proporcionar uma barreira física entre as células do biofilme e o ambiente circundante. Em um hospedeiro humano, o biofilme protege as células microbianas de células e produtos do sistema imunológico e, muitas vezes, de medicamentos utilizados para o tratamento (COSTERTON, 1999; DONLAN, 2001). *C. neoformans*, tem a capacidade de formar biofilmes em placas de poliestireno e nas superfícies de dispositivos médicos, como os *shunts* usados para diminuir a hipertensão intracraniana, na neurocriptococose (MARTINEZ; CASADEVALL, 2015).

Os biofilmes de *C. neoformans* são mais resistentes às mudanças de temperatura, pH e luz UV em comparação com as células planctônicas, evidenciando que a formação do biofilme proporciona uma vantagem protetora (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007). Alvarez e colaboradores (2008) mostraram em um estudo a formação de micro colônias de *C.*

*neoformans* e *C. gattii* semelhantes a biofilmes no sistema circulatório, essas micro colônias estariam associadas a resistência à fagocitose.

A compreensão dos fatores que estão envolvidos na virulência do *Cryptococcus* spp. é de suma importância não só para o entendimento da criptococose, mas também para o desenvolvimento de terapias alternativas e efetivas no tratamento da doença. No entanto, este organismo tem numerosos mecanismos de virulência bem caracterizados que são susceptíveis de interferência farmacológica e são assim potenciais alvos terapêuticos (COELHO; CASADEVALL, 2016). Isolados da mesma espécie tem demonstrado fatores de virulências distintos, indicando uma necessidade de estudos aprofundados em isolados dentro da mesma espécie (KRONSTAD et al.; 2011).

#### 1.4 Criptococose

A criptococose, conhecida anteriormente como, torulose, blastomicose Européia ou doença de Busse-Buschke, é uma importante micose sistêmica. A doença é causada pelo fungo do gênero *Cryptococcus*, onde destacam as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (CASADEVALL et al., 1998). *C. neoformans* foi descrito pela primeira vez por Sanfelice a partir da fermentação do suco de pêssego em 1894 (IDNURM et.al., 2005). No mesmo momento, Busse e Buschke anunciavam o primeiro caso de criptococose humana causada por esse fungo na lesão de tibia de uma mulher de 31 anos. Durante os anos seguintes, o fungo foi isolado de secreções de homens e animais. Em 1951, Emmons relatou o isolamento de *C. neoformans* em solos e, em 1955, mostrou que isolados virulentos de *C. neoformans* foram encontradas em excretas de pombos. A partir daí, concluiu-se que a exposição de homens e animais a fezes de pombos poderia explicar adequadamente a epidemiologia da criptococose, com a forma inalatória sendo o principal meio de infecção (EMMONS, 1995). No Brasil, a criptococose foi relatada pela primeira vez pelo professor Dr. Carlos da Silva Lacaz e o Dr. Floriano de Almeida, no ano de 1941 e depois em 1944 (REIS-FILHO et al. 1985).

Mundialmente, aproximadamente 95% das infecções criptococócicas são causadas pelo *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e os outros 4-5% das infecções são causadas pelo *C. neoformans* var. *neoformans* (Sorotipo D) e *C. gattii* ( sorotipos B e C) (LIN, 2009; PARK et al., 2009; XU; VILGALYS; MITCHELL, 2000). Raramente são relatados casos de

criptococose ocasionadas por espécies diferentes de *C. neoformans* e *C. gattii* em humanos. As infecções causadas por outras espécies de *Cryptococcus* ssp. ocorrem em raríssimas exceções (COELHO; CASADEVALL, 2016). No entanto, nos últimos 40 anos houve um aumento de infecções causadas por outras espécies de *Cryptococcus*, sendo as espécies *C. laurentii* e *C. albidus*, em conjunto, responsáveis por 80% dos casos notificados de criptococose não relacionadas com o complexo *C. neoformans* / *C. gattii*. Além desses, outras espécies como, *C. curvatus*, *C. humicolus*, e *C. uniguttulatus* também têm sido associados com infecções oportunistas em seres humanos, sendo a imunodepressão o fator de risco mais importante para a infecção desses outros fungos, onde as manifestações clínicas são as mesmas vistas em *C. neoformans* e *C. gattii* (KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007; RAGUPATHI; REYNA, 2015).

O *C. neoformans* é um agente oportunista. *C. neoformans* var. *grubii* é um agente cosmopolita e o *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) é observado principalmente em países europeus. As duas variedades estão associadas a condições de imunodepressão e, em alguns casos, em pacientes aparentemente imunocompetentes (IDNURM et al., 2005; KON et al., 2008; MITCHELL et al. 2011; MEYER et al. 2011). O *C. gattii*, causa a criptococose principalmente em indivíduos aparentemente imunocompetentes, e em poucos casos em indivíduos imunodeprimidos (MITCHELL et al. 2011). Anteriormente, *C. gattii* era caracterizado por causar surtos apenas em regiões tropicais e subtropicais, porém, há relatos de surtos em regiões de clima temperado, como na ilha de Vancouver e em áreas dentro do Canadá, no noroeste dos Estados Unidos da América (EUA) e em regiões da Europa, possivelmente relacionados a mudança da temperatura e umidade global (HARRIS et al., 2011; HOANG et al., 2004; KIDD et al., 2004; MAZIARZ; PERFECT, 2016; MEYER et al. 2011).

A criptococose pode afetar indivíduos de todas as idades (CORRÊA et al., 1999), contudo, ocorre com mais frequência em adultos jovens e pessoas de meia idade, especialmente do sexo masculino. No grupo pediátrico a micose basicamente ocorre nos imunodeprimidos (SOUZA, 2005). As infecções por *Cryptococcus* spp. aumentaram drasticamente como consequência da época de transplantes e da pandemia da SIDA. Até o ano de 1980 a criptococose era uma infecção rara, não chegando a atingir um total de 500 a 1.000 pessoas por ano nos Estados Unidos da América (EUA) (CASADEVALL et al., 1998). No entanto, a partir de 1981, a criptococose tem emergido como uma das principais causas de

doença e de morte entre os pacientes com infecção pelo HIV em fase tardia e é uma das causas mais comuns de meningite em hospitais onde estes indivíduos são tratados (CASADEVALL et al., 1998; MICELI; DÍAZ; LEE, 2011).

A criptococose é responsável por uma alta taxa de mortalidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. É uma doença que causa anualmente um milhão de novas infecções e a morte de mais de 625.000 indivíduos, fazendo desse patógeno uma ameaça global (PARK et al., 2009). O tratamento adequado com antirretrovirais e antifúngicos reduz o número de mortes por criptococose em pacientes com HIV, no entanto, se o tratamento é limitado, como em países em desenvolvimento essa taxa pode aumentar. A incidência de infecção por *C. neoformans* em pacientes com SIDA difere de um continente para outro, variando entre 5-10% nos EUA e 30% em partes da África Sub-Saariana (CASADEVALL et al., 1998; IDNURM et al., 2005). A mortalidade da criptococose em pacientes com SIDA é estimada em 55-70% na América Latina e África Sub-Saariana (PARK et al., 2009). A neurocriptococose é a terceira complicação neurológica mais frequente em pacientes com SIDA (DEL VALLE; PIÑA-OVIEDO, 2006).

A criptococose causada por *C. neoformans* e outras micoses que afetam o sistema nervoso central é a terceira causa principal de infecção oportunista em pacientes com SIDA no Brasil (PINTO et al., 2006). Dos mais de 215 mil pacientes registrados no Brasil com SIDA entre 1980 e 2002, 6% foram diagnosticados com criptococose (NUCCI et al., 2010). A criptococose é a segunda causa de morte entre as micoses sistêmicas e ~24 a cada 1.000 mortes relacionadas à SIDA são atribuídos à infecção criptococócicas (PRADO et al., 2009).

A criptococose causada pelo *C. neoformans* ocorre em todas as regiões do Brasil, sendo que o sorotipo A prevalece no país, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (NISHIKAWA et al., 2003), já o *C. gattii* geralmente infecta jovens e crianças HIV-negativos e sem evidências de imunodepressão do Norte e Nordeste do Brasil (LAZERA, 2005; MARTINS et al., 2011). Com isso, a criptococose por *C. gattii* é considerada endêmica da região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012; CHEN et al., 2014). As regiões Sul e Sudeste mostram infecções esporádicas por *C. gattii* (PINTO JUNIOR et al., 2010). Assim como em outros países, a taxa de *C. gattii* em pacientes com SIDA são menores em relação a população com outras doenças subjacentes, ou mesmo sem imunodepressão (PAPPALARDO; MELHEM, 2003). Martins e colaboradores (2011) fizeram um levantamento do genótipo molecular de 63 isolados de *Cryptococcus* spp. recuperados do líquido cefalorraquidiano de

pacientes em Teresina, Piauí. Dos 63 pacientes, 37 (58,7%) possuíam HIV e 26 (41,3%) eram HIV negativos. Dos 63 isolados, 37 (58,7%) foram identificados como *C. neoformans* VNI, predominantemente em doentes HIV positivos (32/37, 86,5%). Vinte e quatro dos 63 isolados (38,1%) foram identificados como *C. gattii* VGII, principalmente em pacientes HIV negativos (21/26, 80,8%).

A criptococose não é considerada uma doença contagiosa, porém, casos raros como o relatado por Wang e colaboradores (2005), de uma transmissão nosocomial de criptococose em uma unidade de terapia intensiva, entre dois pacientes idosos merecem um estudo aprofundado para conhecimento da causa da transmissão.

Já foram relatados casos de criptococose ocasionados por *C. neoformans* var *grubii* (sorotipo A) e *C. gattii* (sorotipo B) em cães, gatos, furões, bovinos, caprinos, equinos, ovinos, primatas e em um pássaro. Em bovinos ocorrem surtos de mastite e nas demais espécies de animais de pequeno porte ocorre à forma disseminada da doença (LESTER et al., 2004). Após a morte desses animais, eles podem reintroduzir isolados virulentos de volta para o ambiente (IDNURM et al., 2005).

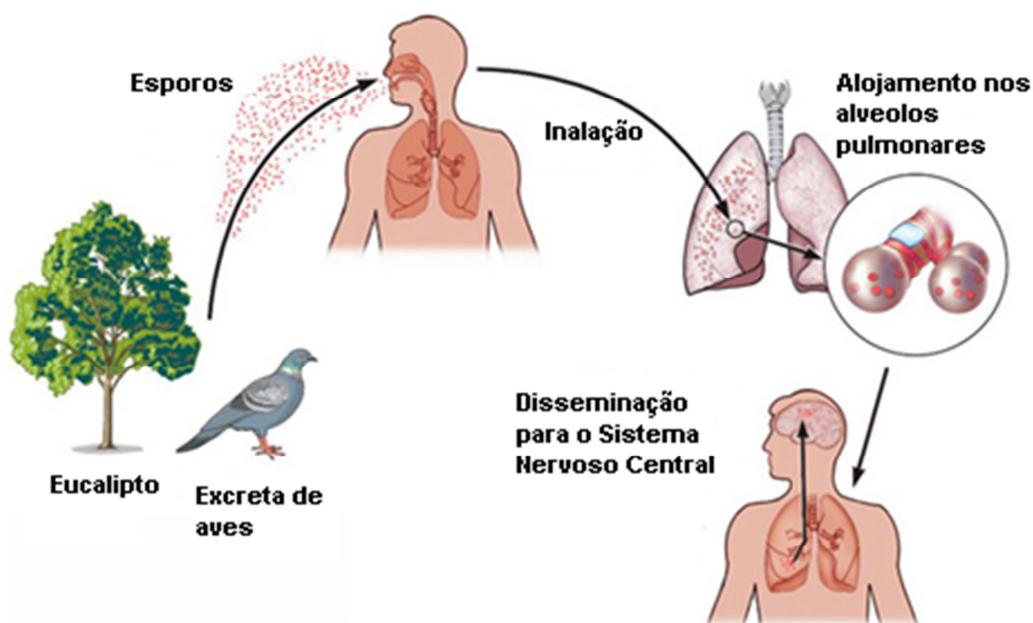
## 1.5 Etiologia e patogênese

Isolados de *C. neoformans* são normalmente relacionados a aves, como pombos, canários e periquitos, por este motivo são facilmente encontrados em ninhos e excrementos desses animais que são ricos em fonte de nitrogênio, na forma de ureia e creatinina (DO PSE COSTA et al., 2009; KON, 2008; KRONSTAD et al., 2011; NEGRONI, 2012). A vasta distribuição e peculiar adaptação de pombos a centros urbanos relacionam-se com a ubiquidade deste agente fúngico (CASTAÑÓN-OLIVARES et al., 2000 ; CHEN et al., 2000). É comumente encontrado na poeira doméstica, demonstrando um risco à saúde humana e animal. A levedura também já foi isolada em vegetais, como eucalipto (*Eucalyptus* spp.), ipê Rosa (*Handroanthus heptaphyllus*), almendoeiras (*Prunus dulcis*) e em madeira em decomposição (LAZERA et al., 1993; LAZERA et al., 1996; MSEDDEI et al., 2011; NOGUERA; ESCANDÓN; CASTAÑEDA, 2015).

O *C. gattii* é encontrado em associação com vegetais, usualmente associado com espécies de *Eucalyptus* spp., onde é encontrada na casca, frutos e no solo, próximo a esse

vegetal. Além disso, *C. gattii* foi isolado no ar e em corpos d'água (CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011; NEGRONI, 2012; NOGUERA; ESCANDÓN; CASTAÑEDA, 2015). Esta levedura é encontrada em ocos de outras espécies de árvores, o fungo já foi isolado também em guanos de morcegos na cidade do Rio de Janeiro, Brasil (LAZÉRA et al., 1993), e a partir de excrementos de pássaros psitacídeos de um zoológico no Rio Grande do Sul, Brasil (ABEGG et al., 2006).

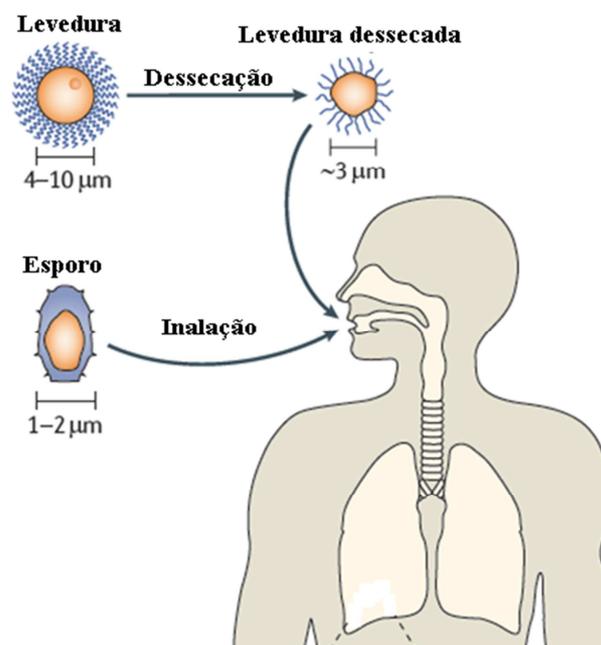
A exposição inicial ao *C. neoformans* e *C. gattii* é através da inalação de propágulos infecciosos, como, esporos ou células de leveduras dessecadas, causando uma infecção normalmente assintomática que pode desaparecer espontaneamente ou evoluir para granulomas pulmonares que podem se dispersar para outros órgãos, particularmente o sistema nervoso central (Figura 3) (IDNURM et al., 2005; MAZIARZ; PERFECT, 2016; NEGRONI, 2012; SUKROONGREUNG et al., 1998). Em casos raros, pode ocorrer a inoculação traumática da levedura (CHRISTIANSON et al., 2003). Ambas as espécies infectam o sistema nervoso central, causando a meningite/meningoencefalite (CME), que é a manifestação clínica mais comum da criptococose. A meningite/meningoencefalite pode ser acompanhada ou não, de lesão pulmonar evidente (na maioria dos casos, a primeira via de infecção são os pulmões), fungemia e focos secundários na pele, olho, ossos e geniturinário (KON et al., 2008; MICELI; DÍAZ; LEE, 2011).



**Figura 3** - Representação da via de infecção do *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. O *Cryptococcus* spp. sobrevive no solo, árvores e excretas de aves. Os seres humanos inalam as

células de levedura dessecadas ou esporos e estabelecem uma forma pulmonar da doença, podendo migrar para o sistema nervoso central (SNC) através de microcapilares da barreira hematoencefálica. Figura retirada e adaptada de: <<http://www.bmolchem.wisc.edu/labs/hull/research.html>>.

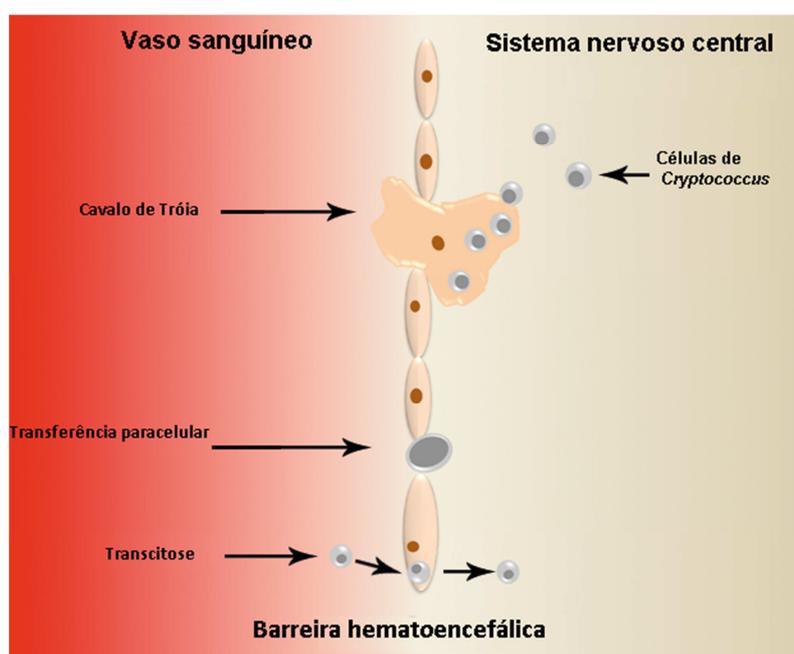
As células dessecadas do *Cryptococcus* ssp. tem um tamanho médio de  $3\mu\text{m}$ , inferior ao tamanho das células vegetativas que possuem uma média de tamanho de 4 a  $10\mu\text{m}$ . Os esporos possuem um tamanho ainda menor, de  $1-2\mu\text{m}$  (Figura 4). O tamanho das células dessecadas e dos esporos facilitam a dispersão no ambiente e a entrada nos pulmões durante a inalação, fazendo com que a levedura consiga atingir locais profundos dos alvéolos pulmonares. Essas características fazem com que sejam tradicionalmente considerados propágulos infecciosos (BOTTS et al., 2009; GILES et al., 2009; VELAGAPUDI et al., 2009).



**Figura 4** – Esquemas do tamanho médio da célula ativa, dessecada e esporo de *Cryptococcus*. Imagem retirada e adaptada de KRONSTAD et al., 2011.

Após a inalação da levedura, ela se reativa e prolifera no local da infecção inicial, podendo, posteriormente se disseminar para outros locais do corpo (SANTANGELO et al.,

2004). As leveduras são transportadas dos pulmões para o sistema nervoso central por microcapilares que interagem com a barreira hematoencefálica. As leveduras podem ser encontradas dispersas no sangue ou em células mononucleares, tais como, macrófagos e neutrófilos (CHRÉTIEN et al., 2002; SANTANGELO et al., 2004). Existem três possíveis formas para que as células criptocócicas atravessassem a barreira hematoencefálica tais como: transferência paracelular, onde as leveduras atravessam os espaços intercelulares da barreira hematoencefálica; o mecanismo de cavalo de Tróia, em que a levedura parasita fagócitos mononucleares e se dispersa pela corrente sanguínea; pela transcitose, que é um processo que envolve a captação das leveduras pelas células endoteliais da barreira hematoencefálica e a transmigração da levedura através do citoplasma celular para atingir o cérebro (Figura 5) (IDNURM et al., 2005; PRICE et al., 2011; SABIITI; MAY, 2012; SEOANE; SCHNEIDER; MAY, 2016).



**Figura 5** – Esquema dos três possíveis métodos para as células criptocócicas atravessarem a barreira hematoencefálica. Retirado e adaptado de SEOANE, SCHNEIDER; MAY, 2016.

A criptococose pode apresentar-se por diferentes manifestações clínicas que incluem febre, problemas visuais, alterações mentais (BRIZENDINE; PAPPAS, 2010), perda de peso, fadiga, sudorese noturna, tosse, dores no peito, cefaléia, vômitos e rigidez do pescoço (PHILLIPS et al., 2015). Em 2002, Pappalardo observou sinais e sintomas de 35 pacientes que possuíam a criptococose. Foi observada cefaleia em 97,1% dos pacientes, náuseas e vômitos em 51,4%, febre em 34,3%, distúrbio visual em 20%, alteração mental em 11,4% e

apreensão em 8,6%. A cefaleia é a segunda causa de dor em pacientes com SIDA e a criptococose no SNC é responsável por 40% deste sintoma (AIRES, 2002).

## 1.6 Agentes antifúngicos para o tratamento da criptococose

A anfotericina B desoxilato (AMB), 5-flucitosina (5-FC) e derivados azólicos, como o fluconazol (FLC) e itraconazol (ITC), são os principais antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose, que são administrados de acordo com forma clínica da criptococose e o estado imunológico do hospedeiro (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006). A “Infectious Diseases Society of America” (IDSA) publicou, em 2010, um guia que fornece informações aos profissionais da saúde sobre o tratamento e profilaxia dessa micose. Os principais medicamentos recomendados por esse guia consistem na anfotericina B e nos azólicos (PERFECT et al., 2010).

A AMB é um polieno, produzido pela espécie de *Streptomyces nodosus*, que foi descoberto em 1950. Seu mecanismo de ação é no ergosterol presente na membrana plasmática fúngica (ZACCHINO; GUPTA, 2007). A AMB induz a formação de poros através da ligação aos esteróis de membrana, alterando a permeabilidade da membrana e ocasionando eventual morte celular (COELHO; CASADEVALL, 2016; GHANNOUM, 1999; ODDS; BROWN; GOW, 2003). A AMB também pode provocar danos intracelulares mediados pela produção de radicais livres antes da lesão na membrana celular em *C. neoformans* (SANGALLI-LEITE et al., 2011). Embora, a AMB seja muito utilizada no tratamento de infecções por leveduras e fungos filamentosos, ela é altamente hepatotóxica e nefrotóxica e pode causar anemia grave (TONOMURA et al., 2009). A AMB também pode causar dano às membranas das células de mamíferos, devido o seu alvo de ação, o ergosterol, ser análogo ao colesterol (COWEN, 2008). Isolados de *Cryptococcus* naturalmente resistentes a anfotericina B são raros (ROGERS, 2006), embora algumas possam adquirir resistência durante o curso do tratamento clínico (COELHO; CASADEVALL, 2016).

A 5 - flucitosina é uma pirimidina fluorinada sintética análoga ao ácido nucleico (NETO; FER; CASTRO, 1996). Ela funciona como um agente antifúngico através da conversão para 5-fluorouracil no interior das células alvo. O fluorouracil é incorporado no RNA, causando a terminação prematura da cadeia, e inibindo a síntese de DNA, afetando a

timidilato sintetase (ODDS; BROWN; GOW, 2003). As células dos mamíferos não convertem a flucitosina em fluorouracila, o que é crucial para ação seletiva da substância (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). Isolados resistentes de *Candida albicans* e de *C. neoformans* são muito comuns, razão pela qual é raramente utilizada isoladamente (COELHO; CASADEVALL, 2016). Sua principal indicação é no tratamento da neurocriptococose, em associação com a anfotericina B (NETO; FER; CASTRO, 1996).

O primeiro agente azólico foi sintetizado em 1944, e atualmente é o grupo de antifúngicos mais desenvolvidos e utilizados para o tratamento de micoses sistêmicas. Os azólicos são substâncias sintéticas com um anel imidazólico, que podem ter dois ou três nitrogênios, sendo imidazóis e triazóis, respectivamente. São fungistáticos e apresentam amplo espectro de ação frente às leveduras, fungos filamentosos e fungos dimórficos (ODDS; BROWN; GOW, 2003; ZACCHINO; GUPTA, 2007).

O fluconazol e o itraconazol são agentes triazólicos. Ambos exercem atividade antifúngica mediante a inibição da enzima lanosterol 14- $\alpha$  demetilase no complexo do citocromo P-450 dos fungos, impedindo assim a conversão de lanosterol em ergosterol (ZACCHINO; GUPTA, 2007). Ao contrário da AMB e da 5-FC, os azólicos, especialmente o fluconazol, demonstram menos efeitos colaterais, adequada penetração em vários tecidos, incluindo o sistema nervoso central, excelente biodisponibilidade e tolerabilidade (ALLEN et al., 2015; ZAVREL; WHITE, 2015). O itraconazol é menos eficaz que o fluconazol no tratamento da criptocose devido à sua baixa biodisponibilidade e penetração na barreira hematoencefálica (BICANIC; HARRISON, 2004; KON et al., 2008). A escolha da utilização de agentes azólicos para profilaxia e terapia de manutenção para a criptococose, pode ser considerada um fato importante no surgimento de isolados resistentes (SAAG et al., 2000). Há uma grande população de isolados de *Cryptococcus* resistentes aos agentes azólicos, onde, um outro fator de resistência, se deve a natureza fungistática do fármaco, uma vez que uma percentagem da população sobreviverá à exposição ao azol. Apesar da resistência de alguns isolados frente aos azólicos, esta classe de fármacos continua a ser útil atingindo uma elevada taxa de sucesso de tratamento (COELHO; CASADEVALL, 2016).

O uso de fungicidas azólicos na agricultura também é uma provável causa da emergência de isolados resistentes a essa classe de antifúngicos, mas ainda não está comprovado (SNELDERS et al., 2012). A restrição do uso de fungicidas azólicos na

agricultura seria o primeiro passo para conter o surgimento de isolados resistentes, porém é um desafio devido a falta de fungicidas alternativos (DENNING; BROMLEY, 2015).

As equinocandinas agem na biossíntese da  $\beta$ -glucana na parede celular, porém, são ineficientes contra as espécies de *Cryptococcus* ssp., não sendo utilizadas no tratamento da criptococose (FELDMESSER et al., 2000; MALIGIE; SELITRENNIKOFF, 2005).

Apesar da disponibilidade dos agentes antifúngicos possuindo atividade anticriptocócicas, a mortalidade e insucesso do tratamento prevalecem altos devido a emergência de isolados que se tornaram resistentes a alguns dos agentes antifúngicos mais amplamente utilizados, como, o fluconazol e a anfotericina B em raríssimas exceções (KELLY et al., 1994; PEETERMANS et al., 1993). A resistência e a recorrência de infecções têm sido associadas comumente a tratamentos incompletos e interrompidos. A emergência de novas espécies de fungos patogênicos e o aumento da resistência aos antifúngicos mais utilizados, em decorrência de novas práticas médicas, tem se tornado um sério problema de saúde pública (COWEN, 2008).

Várias estratégias de resistência contra os fármacos são desenvolvidas pelos fungos, um exemplo, é o efluxo da droga que é o mecanismo mais utilizado por uma gama de espécies fúngicas. Um segundo mecanismo comum pelo qual as células adquirem resistência é com a alteração ou amplificação do alvo, que minimiza o impacto da droga sobre a célula. E um terceiro mecanismo são alterações celulares que minimizam a toxicidade da droga. A maioria dos exemplos envolvem alterações na via da biossíntese do ergosterol que são associados à resistência aos azóis (COWEN, 2008). Em *Cryptococcus* spp. a resistência aos azóis tem sido atribuída, principalmente, ao efluxo da droga (ALVES et al., 2001). As infecções fúngicas são difíceis de tratar devido a altas taxas de mortalidade e alto custo do sistema de cuidados de saúde (WILSON et al., 2002). E infelizmente, as classes de antifúngicos disponíveis atualmente não são tão eficientes e/ou são tóxicos para o hospedeiro humano.

Dados clínicos têm mostrado que a espécie *C. gattii* é mais resistente à terapia antifúngica que o *C. neoformans*, podendo requerer maior tempo de tratamento, o que corrobora com estudos *in vitro* que mostram que *C. gattii* é menos susceptível a agentes antifúngicos, principalmente ao fluconazol (ALVES et al., 2001; GOMEZ-LOPEZ et al., 2008; TRILLES et al., 2004).

## 1.7 Tratamento

Os indivíduos que desenvolvem a criptococose podem ser agrupados em três categorias gerais: aqueles com infecção avançada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), indivíduos transplantados fazendo o uso da terapia imunossupressora e, o grupo dos não-HIV, não transplantados e os sem uma desordem imunológica aparente. Embora o tratamento clínico de todos os grupos seja semelhante, a abordagem terapêutica é adaptada para cada tipo de caso. Como por exemplo, em pacientes com HIV positivo, a melhor forma para o tratamento é fazer o controle da carga viral e da contagem de células T CD4 +, enquanto que em pacientes transplantados, pode ser feita uma mudança dos imunossupressores que estão sendo administrados, por outros que reduzem a imunossupressão. Estas estratégias podem levar à Síndrome de Reconstituição Imune (IRIS), um agravamento paradoxal de sintomas atribuídos a danos nos tecidos devido a uma resposta imune exuberante dirigida as leveduras ainda no tecido (COELHO; CASADEVALL, 2016; PERFECT et al., 2010).

O tratamento para a meningite criptococócica é dividido em uma fase inicial de duas semanas chamada de fase de indução, seguida por uma fase de consolidação de oito semanas e, posteriormente, uma fase de manutenção prolongada que varia de acordo com o estado imunológico do paciente (CHEN; PLAYFORD; SORRELL, 2010; KAPLAN et al., 2009; PERFECT; BICANIC, 2016; VAN DER HORST et al., 1997). Para este tratamento é utilizada uma combinação das drogas na fase inicial e depois é feita uma manutenção com agentes azólicos. Os antifúngicos e suas combinações, são similares em todos os indivíduos, porém, como dito anteriormente, o tratamento para cada indivíduo muda de acordo com o seu estado imunológico. Na fase de indução, a combinação da AMB (0,7 – 1,0 mg/kg por dia) mais a 5-flucitosina (100 mg/kg por dia) é utilizada, seguido da fase de consolidação com o uso de 6 mg/kg por dia do fluconazol e fase da manutenção prolongada utilizando 200 mg por dia do fluconazol (CHEN; PLAYFORD; SORRELL, 2010; PERFECT et al., 2010). A combinação da AMB mais a 5-flucitosina esterilizam o líquido cefalorraquidiano (LCR) mais rapidamente quando comparados ao uso da AMB sozinha, AMB mais o fluconazol ou o uso do fluconazol sozinho (BICANIC et al., 2007; DROMER et al., 2008).

A AMB pode ser substituída por suas formulações lipídicas, incluindo a anfotericina B lipossomal (3-4 mg/kg por dia) e o complexo lipídico da anfotericina B (5 mg/kg por dia) durante a fase de indução, quando o paciente apresentar pré-disposição para disfunção renal. Em localidades em que a 5-flucitosina não estiver disponível, a fase de indução pode ser substituída pelo uso AMB (0.7 mg/kg por dia) mais fluconazol (800 mg por dia), seguida da fase de consolidação de fluconazol (800 mg por dia) por 8 semanas. E quando não houver a AMB, usa-se o fluconazol (800 – 1200mg por dia) mais 5-flucitosina (100 mg/kg por dia) durante 6 semanas durante a fase de indução (PERFECT et al., 2010).

Casos de pneumonia leve a moderada, o uso de fluconazol ou itraconazol por 6-12 meses é recomendado (PERFECT et al., 2010). O itraconazol não é recomendado para pacientes com neurocriptococose por não ter boa penetração no líquido (SUBRAMANIAN; MATHAI, 2005).

## **1.8 Novos fármacos e substâncias com potencial atividade antifúngica**

O voriconazol e o posaconazol são novos agentes antifúngicos azólicos, onde seu alvo de ação também é na enzima lanosterol 14- $\alpha$  demetilase. Não há dados sobre o uso do voriconazol e posaconazol como tratamento primário da meningoencefalite criptocócica, porém, são indicados como terapia alternativa quando o fluconazol se encontra indisponível ou é contraindicado (CHEN et al., 2013; PERFECT et al., 2010). O voriconazol possui excelente atividade no tratamento contra a criptococose (MATTEI et al., 2013; SCOTT; SIMPSON, 2007). O último agente azólico lançado em 2006, foi o isavuconazol, que possui formulações intravenosas e orais, e é necessário apenas uma dose diária com um perfil de segurança muito bom (GAFFI, 2016). O isavuconazol é um triazol de amplo espectro que tem demonstrado boa atividade contra isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* em ensaios de microdiluição em caldo (ESPINEL-INGROFF et al., 2015; THOMPSON et al., 2016). Outros antifúngicos, como a nistatina ou alilaminas, não são suficientemente absorvidos ou são tóxicas, portanto, seu uso é limitado para o tratamento da criptococose (COELHO; CASADEVALL, 2016).

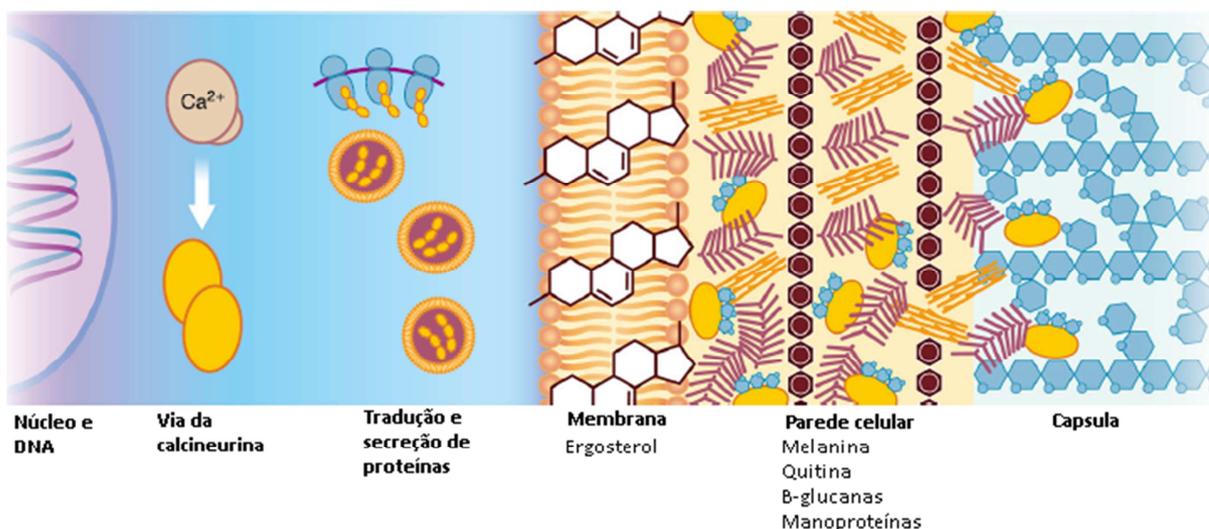
Compostos sintéticos como os heterociclos tiazólicos têm mostrado excelente atividade antifúngica *in vitro* contra *C. neoformans* e *C. gattii* e baixa toxicidade (PEREIRA

DE SÁ et al., 2015). Derivados de tienopirrolidona também mostraram atividade antifúngica *in vitro* contra uma gama de fungos, incluindo, *C. neoformans*, *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus*, mostrando ser uma classe de substâncias que merecem maiores estudos (CAO et al., 2015).

Coelho e Casadevall (2016) citam em sua revisão, diversos fármacos utilizados para outros fins que possuem atividade anticriptocócica, como, alguns anti-helmínticos, antivirais, fármacos que atuam em neurotransmissores, inibidores da via da calcineurina, inibidores da redutase 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA e alguns imunomoduladores como, os anticorpos e interferon  $\gamma$ .

### **1.9 Alvos potenciais para estudos de novos antifúngicos**

As semelhanças entre a maquinaria celular dos fungos e dos seres humanos proporcionam um desafio no tratamento das doenças fúngicas, por isso, há menos medicamentos disponíveis para tratar doenças fúngicas em comparação com doenças bacterianas ou virais (IDNURM et al., 2005). Existe uma variedade de macromoléculas essenciais para a sobrevivência, crescimento, virulência e morfogênese celular dos fungos que tem sido proposto como potenciais alvos de novos agentes antifúngicos (ODDS; BROWN; GOW, 2003). Os fármacos utilizados atualmente apresentam alvos fortemente focados, direto ou indiretamente sobre a parede celular e na membrana plasmática, e em particular no ergosterol ou em sua biossíntese. Alvos em outros locais da célula seriam, portanto, uma inovação para novos agentes antifúngicos (Figura 6) (ODDS; BROWN; GOW, 2003).



**Figura 6** – Esquema dos alvos de fármacos existentes e possíveis alvos contra *Cryptococcus* spp. Retirado e adaptado de COELHO; CASADEVALL, 2016.

Um importante alvo de estudo para novos fármacos contra *Cryptococcus* spp. é a cápsula polissacarídica e sua via de biossíntese (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015), pois, é uma estrutura que o difere das outras leveduras e apresenta importantes fatores de virulência (DOERING, 2009). É visto também que mutantes acápsulares não são virulentos (SIONOV; CHANG; KWON-CHUNG, 2013). Outro alvo importante é a melanina ou a enzima produtora da melanina, a lacase. A melanina pode absorver radicais do estresse oxidativo e compostos tóxicos, como moléculas antifúngicas (DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006). As enzimas produzidas pelo *Cryptococcus* também merecem destaque quando se tratando de novos alvos. As fosfolipases, ureases e proteinases possuem fatores de virulência importante para a infecção da doença (GUIMARÃES et al., 2011; MCFADDEN et al., 2007; SHI et al., 2010; YOO et al., 2004). Outra alvo de ação que merece estudo é a via da calcineurina que é uma via altamente conservada e está relacionada a capacidade de *C. neoformans* e *C. gattii* crescerem a alta temperatura. É visto que os imunossupressores inibem a calcineurina (COELHO; CASADEVALL, 2016).

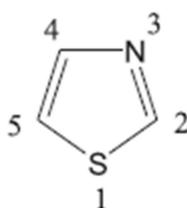
O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas (GUIDO et al., 2008). Os avanços expressivos da química e biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas,

proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Na aplicação de estratégias de planejamento de fármacos, os estudos dos processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para a afinidade e seletividade. Diante desse complexo paradigma, as ferramentas biotecnológicas tem fornecido informações extremamente úteis para a descoberta de fármacos (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). O desenvolvimento de fármacos sintéticos e semissintéticos, a realização de modificações estruturais produzidas pela introdução ou a substituição de grupamentos químicos podem alterar as propriedades físico-químicas das moléculas, tais como a hidrofobicidade e a densidade eletrônica, levando ao desenvolvimento de análogos mais ativos, seletivos e menos tóxicos (MUSIOL et al., 2010).

### **1.10 Heterociclos tiazólicos**

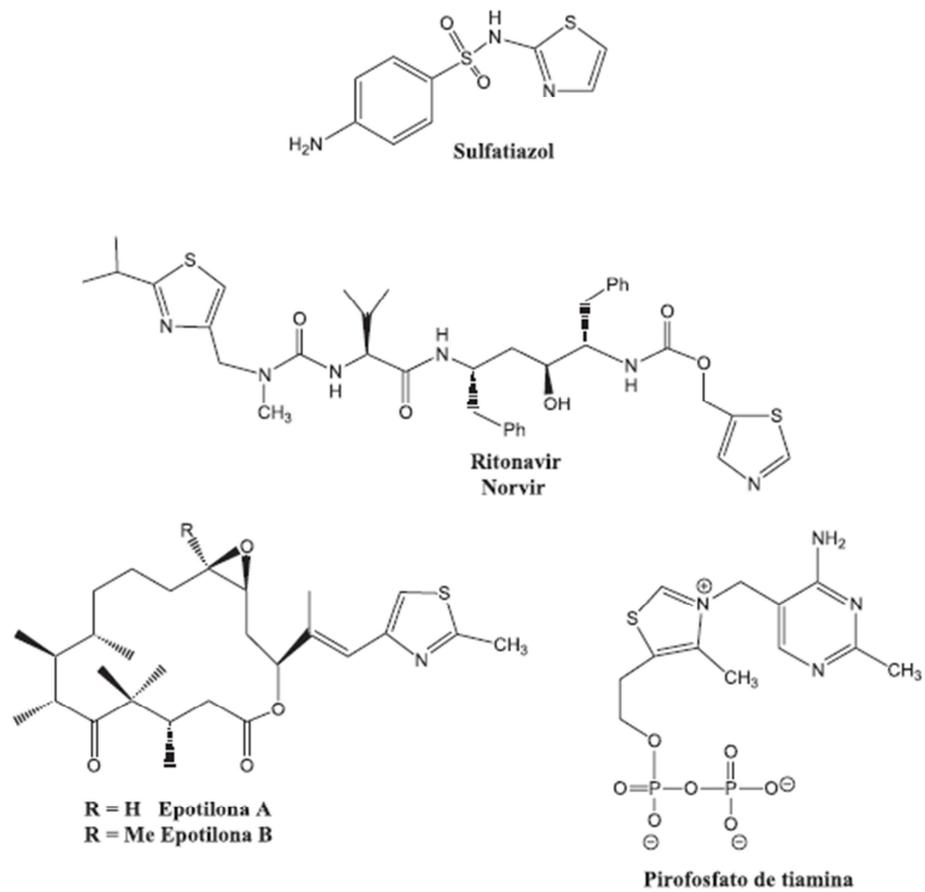
As substâncias da classe dos heterociclos tiazólicos são formadas por um anel aromático de cinco membros contendo enxofre na primeira posição e nitrogênio na terceira (Figura 7). Esse anel pode ser substituído nas diversas posições, sendo a 2 e 4 as mais comuns. Os tiazóis possuem uma cor amarelo claro e seu ponto de ebulição é de 116-118°C. A classe dos heterociclos tiazólicos é usada como um intermediário para a fabricação de drogas sintéticas, fungicidas e corantes, sendo que o anel de tiazol é encontrado naturalmente na vitamina B1 (SIDDIQUI et al., 2009). A busca por novas terapias farmacológicas tem levado vários pesquisadores estudarem os heterociclos tiazólicos, devido as suas propriedades farmacológicas. Vários estudos tem mostrado que esses compostos têm potentes ações microbianas, anti-inflamatórias, anticonvulsivantes, hipoglicemiante, antimicrobiana, anti-inflamatória e analgésica (GORCZYNSKI et al., 2004; HOLLA et al., 2003; KUMAR et al. 2007; LESYK et al., 2006).



**Figura 7** – Núcleo tiazolínico das substâncias da classe dos heterociclos tiazólicos. Retirada de DE SOUZA et al., 2005.

Há vários medicamentos contendo o núcleo tiazolínico, sendo comercializados por diversos laboratórios no mundo (Figura 8). Sendo os mais conhecidos o sulfatiazol (METZGER, 1979; KLEEMAN; ENGEL, 2001), um importante antibiótico bacteriostático de amplo espectro, que é análogo a estrutura do ácido para-aminobenzóico (PABA) e atua inibindo competitivamente a enzima bacteriana, di-hidropteroato sintetase, que é responsável pela incorporação de PABA no ácido dihidrofólico, o precursor imediato do ácido fólico. Isto bloqueia a síntese de ácido dihidrofólico e diminui a quantidade de ácido tetrahidrofólico metabolicamente ativo, um cofator para a síntese de purinas, timidina e DNA (GILMAN et al., 1990). O ritonavir (Norvir®), um medicamento utilizado no combate ao vírus HIV que atua inibindo a protease do HIV e inativa potencialmente o citocromo P4503A4 (CYP3A4), a principal enzima humana metabolizadora de fármacos. Ao inibir o CYP3A4, o ritonavir aumenta as concentrações plasmáticas de outros fármacos anti-VIH oxidados pelo CYP3A4, melhorando assim a eficácia clínica (SEVRIOUKOVA; POULOS, 2010). As epotilonas A e B, produtos naturais que possuem potente atividade antitumoral e o pirofosfato de tiamina, presente em uma variedade de enzimas que catalisam reações de descarboxilação (descarboxilases) e de condensação do tipo aldólica (aldolases) (DE SOUZA et al., 2005).

Em estudos *in vitro* utilizando substâncias tiazolínicas contra isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, foi visto que as substâncias apresentaram os menores valores de CIM de 0,45 µg/ml para o isolado ATCC 24067 (*C. neoformans*) e CIM de 0,9 µg/ml para o isolado ATCC 24065 (*C. gattii*). O estudo mostrou uma triagem em busca de um possível alvo de ação da substância na célula de *Cryptococcus* spp. porém, ainda não é concreto o alvo de ação dessas substâncias no micro-organismo (PEREIRA DE SÁ et al., 2015).



**Figura 8** – Principais moléculas medicamentosas com o anel tiazólico. Retirado de DE SOUZA et al., 2005.

## 2. JUSTIFICATIVA

A criptococose é uma micose sistêmica com uma alta taxa de mortalidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Essa doença causa anualmente um milhão de novos casos e a morte de mais de 625.000 indivíduos. As espécies que se destacam causando a criptococose são *C. neoformans* e *C. gattii*. Ambas infectam o sistema nervoso central, causando a meningoencefalite (CME), que é a manifestação clínica mais comum da criptococose. As infecções por *Cryptococcus* spp. aumentaram drasticamente como consequência da época de transplantes e da pandemia da SIDA em 1980.

Em comparação com os antibióticos e antivirais, a quantidade de antifúngicos disponíveis no mercado são poucos, sendo a anfotericina B, flucitosina e derivados azólicos os fármacos utilizados para o tratamento da criptococose. Apesar da disponibilidade dos agentes antifúngicos possuindo atividade anticriptocócica, a mortalidade e insucesso do tratamento prevalece alto devido à emergência de isolados que se tornaram resistentes a alguns dos agentes antifúngicos. Além disso, alguns dos antifúngicos de mercado são tóxicos para os humanos e sua administração deve ser controlada. Algumas regiões do mundo não fazem a administração de determinado fármaco por não possuírem condições financeiras. Os antifúngicos que mostram um melhor resultado no tratamento da criptococose são caros e em muitos países subdesenvolvidos que não possuem condições financeiras para o tratamento adequado, utilizam apenas fluconazol, sendo necessário, em muitos casos, utilizar doses muito elevadas por um longo período, favorecendo o surgimento de isolados resistentes a esse fármaco. A partir deste cenário, é clara a necessidade de se desenvolver novos fármacos que sejam de baixo custo, seguros e eficientes para o tratamento da criptococose.

O estudo de substâncias sintéticas com atividade biológica e a manipulação química na estrutura molecular dessas substâncias pode levar ao desenvolvimento de novas moléculas com melhor atividade antifúngica, que apresentem menor toxicidade e um menor tempo de tratamento das infecções fúngicas. Nesse contexto, o estudo para o direcionamento de novas substâncias sintéticas com potencial antifúngico contra *C. neoformans* e *C. gattii* a partir da avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo* auxilia no desenvolvimento de novos medicamentos, ampliando o arsenal de drogas eficientes para o tratamento da criptococose.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a atividade antifúngica de compostos sintéticos e estudar os efeitos fenotípicos causados por essas substâncias em *C. neoformans* e *C. gattii*.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Triar um arsenal de substâncias sintéticas e obter aquelas que apresentem atividade contra *C. neoformans* e *C. gattii* e que, além disto, apresentem baixa citotoxicidade em células de mamíferos e uma boa lipossolubilidade.
- Analisar a concentração inibitória mínima das substâncias escolhidas contra isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*.
- Avaliar o sinergismo das substâncias escolhidas com os antifúngicos já utilizados no tratamento da criptococose.
- Caracterizar os possíveis danos causados na estrutura celular da levedura, pela ação da substância contra o *Cryptococcus*.
- Verificar a inibição de fatores de virulência das células criptococócicas frente às substâncias de estudo.
- Análise da genotipagem molecular dos isolados de *Cryptococcus* spp. em estudo.
- Verificação da toxicidade das substâncias e sobrevida em *Galleria mellonella*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Micro-organismos

#### 4.1.1 Identificação genotípica dos isolados de *Cryptococcus* spp.

Os micro-organismos utilizados no presente estudo foram gentilmente cedidos pelo professor Daniel de Assis Santos, do Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG. Todos os isolados de *C. gattii* e *C. neoformans* foram armazenados a -80°C em caldo Gymp com 15 % de glicerol. A identificação genotípica molecular foi feita para os isolados descritos na tabela 2. Para a comparação do bandejamento, foram utilizados padrões sabidamente identificados quanto à genotipagem molecular. São eles os isolados: CN55, CN56, CN57, CN58 e H99 da espécie *C. neoformans* e CG59, CG60, CG61, CG62, R265 da espécie de *C. gattii*. Os isolados ATCC32608, 290933 e 29/2893 da espécie *C. gattii* também foram inclusos para identificação molecular.

**Tabela 2** - Relação de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* que foram feitos os testes de identificação genotípica.

<i>Cryptococcus gattii</i>			<i>Cryptococcus neoformans</i>		
Nome do isolado	Genotipagem	Sorotipagem	Nome do isolado	Genotipagem	Sorotipagem
CG59	VGI		CN55	VNI	A
CG60	VGII		CN56	VNII	A
CG61	VGIII		CN57	VNIII	AD
CG62	VGIV		CN58	VNIV	D
ATCC 24065			ATCC 24067		
1913ER			96806		
23093			ATCC 28957		
ATCC 24056			WP		
196L/03			F10		
23/10993			CN31		
175/01			VM-		
L28/02			MCMMPI		
L24/01			ATCC 62066		
			5396		

<i>Cryptococcus gattii</i>			<i>Cryptococcus neoformans</i>		
Nome do isolado	Genotipagem	Sorotipagem	Nome do isolado	Genotipagem	Sorotipagem
L27/01			28 JF		
547/OTTI/94-PI-10			LMM820		
ICB 181			27JF		
R265	VGII	B	H99	VNI	A
ATCC32608			CNP3		
290933			CN78		
			RN01		
29/2893			CNN818		

### ***Extração do DNA***

Para extração do DNA total, os isolados de *Cryptococcus* spp. do presente estudo foram crescidos em ágar Sabouraud por 24-48 horas a 37 °C. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 µl de tampão de lise [Tris-HCl 0,05M, EDTA 0,005M, NaCl 0,1M e SDS 1% (p/v)] e incubadas em banho-maria a 65 °C por 45 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) aos tubos e os mesmos foram homogeneizados 20 vezes por inversão e centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta e transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado (v/v) de isopropanol. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos para precipitação do DNA. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, e ao *pellet* formado, foram acrescentados 200 µl de etanol 70%. Efetuou-se novamente uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e acrescentou novamente 200 µl de etanol 70%, seguido da centrifugação a 14.000 rpm. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente *overnight* para evaporação total do etanol. Após essa etapa, o DNA foi ressuspendido em 50µl de tampão Tris-EDTA 0,1M (TE) pH 8,0 e estocado a -20°C.

### ***PCR fingerprinting (GTG)<sub>5</sub>***

Para confirmação do agrupamento genotípico das leveduras, os isolados foram submetidos à análise molecular, por meio de PCR utilizando-se o iniciador (GTG)<sub>5</sub> (5'-CTGGCTTGGTGTATG-3'), segundo de Meyer e colaboradores (1993). Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µl, contendo 2,5 µl de tampão de PCR 10X (Thermo Fisher Scientific), 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> 1,5 M (Thermo Fisher Scientific), 1,0 µl de dNTP 10 mM, 2,0 µl do iniciador (GTG)<sub>5</sub> a 10 pmol/ µl (MWG Biotech), 100 a 250 ng de DNA e 0,2 µl de Taq DNA Polimerase 1,25 U/l (Thermo Fisher Scientific) e o volume final foi completado com água deionizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador Eppendorf flexlid nexus SXle. O programa de ciclagem consiste de uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 93 °C por 45 segundos, anelamento a 50 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto, a extensão final a 72 °C por 6 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4% (p/v) em tampão TBE 0,5 X (54 g de Tris-base, 27,5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0,5M, pH 8,0). Os amplicons foram previamente corados com solução de GelRed (Biotium, USA), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França).

#### **4.2. Substâncias experimentais**

No presente trabalho foi realizada uma triagem com 81 substâncias sintéticas, pertencentes ao banco de substâncias sintéticas da professora Renata Barbosa de Oliveira do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

### 4.3. Preparo do inóculo

Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens, com crescimento em ágar Sabouraud Dextrose (ASD), durante 48-72 horas, a 35°C e então, ressuspendidas em tubos contendo solução salina (0,9%) estéril. A transmitância dos inóculos foi então ajudada para 75-77% sob o comprimento de onda de 530 nm, o que corresponde a  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/ml. Logo, este inóculo inicial foi diluído em RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) acrescido de MOPS 0,165 mol/L, numa proporção de 1:50 e, em seguida, novamente diluído, numa proporção de 1:20, de maneira a atingir uma suspensão com  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^5$  células/ml, de acordo com o protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008).

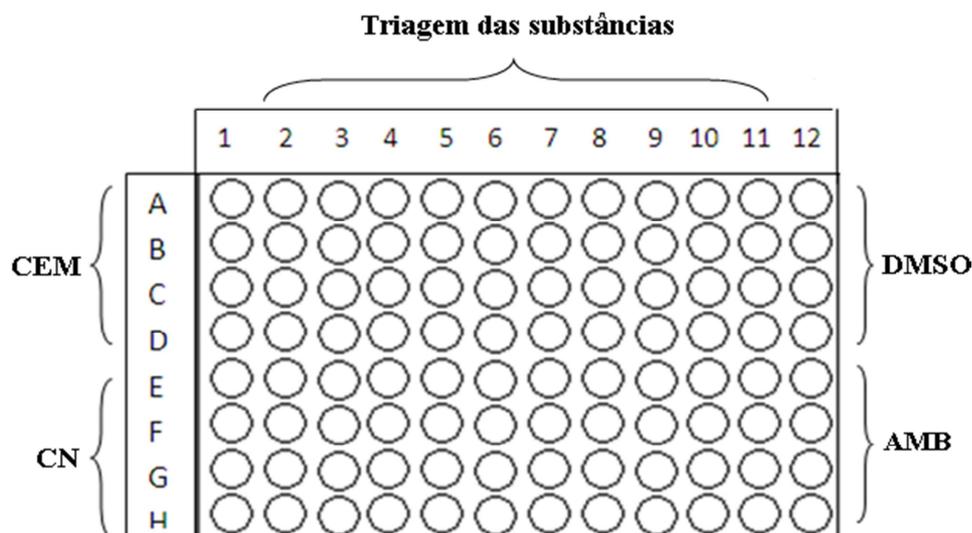
### 4.4. Triagens das substâncias

A triagem das substâncias foi realizada contra os isolados de *Cryptococcus neoformans* (ATCC24067) e *C. gattii* (L27/01). Os ensaios de microdiluição foram realizados seguindo as orientações prescritas no CLSI, protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008). As substâncias foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO 0,5%) e diluídas em meio RPMI-1640 com MOPS 0,165 mol/L para se obter uma concentração final de 250 µg/ml das substâncias.

Os controles foram realizados nas colunas 1 e 12:

- a) Controle de esterilidade do meio – CEM: 200 µl do meio RPMI com o MOPS. (coluna 1, poços A a D).
- b) Controle negativo – CN: 100 µl de meio RPMI com MOPS e 100 µl do inóculo (coluna 1, poços E a H).
- c) Controle do diluente das substâncias – DMSO: 100 µl de meio RPMI com MOPS + DMSO a 0,5% e 100 µl de inóculo (coluna 12, poços A a D).
- d) Controle de antifúngico – Anfotericina B: 100 µl de meio RPMI com MOPS e Anfotericina a 1,0 µg/ml e 100 µl de inóculo (coluna 12, poços A a D).

A figura 9 a seguir apresenta a disposição das substâncias e dos controles na microplacas empregadas nos teste de microdiluição.



**Figura 9** – Esquema da placa de microdiluição para o ensaio de triagem. Os ensaios de triagem foram realizados nas colunas 2 a 11. Como controle na coluna 1: CEM – esterilidade do meio RPMI mais MOPS (poços A - D), CN – controle negativo contendo inóculo e meio RPMI mais MOPS (poços E - H) e na coluna 12: Controle do DMSO – diluente das substâncias (poços A - D) e controle com antifúngico – anfotericina B (poços E - H).

Na triagem de microdiluição foram preparadas 2 microplacas (uma para cada isolado de *Cryptococcus*). Cada poço da placa entre as colunas 2 a 11 contiam 100 µl da substância a 250 µg/ml (concentração adotada para aumentar a propabilidade de se encontrar maior número de substâncias com atividade antifúngica).

Após a preparação das placas, todos os poços contendo as substâncias e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100 µl do inóculo fúngico. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos três vezes. As placas foram incubadas a 35°C durante 72 horas e a leitura foi realizada visualmente, sendo que a CIM foi considerada como a inibição total do crescimento quando comparado ao crescimento do controle. As substâncias que tiveram uma concentração inibitória mínima (CIM), maior que 250 µg/ml foram dispensadas e as que tiveram uma CIM menor sofreram diluições seriadas em meio RPMI-1640 mais MOPS para chegar a CIM da substância.

#### 4.5. Citotoxicidade em macrófagos murinos

O ensaio para verificação de citotoxicidade das substâncias em macrófagos murinos foi feito em parceria com a professora Elaine Maria de Souza-Fagundes do departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Foram obtidos macrófagos peritoneais de três camundongos BALB/c fêmeas de 6 semanas. Para isso, foram injetados 3 ml de tioglicolato de sódio (3%) por via intraperitoneal. Após 72 horas, os camundongos foram submetidos à eutanásia e mergulhados em álcool 70°GL para desinfecção. Em um fluxo laminar, a membrana peritoneal foi exposta e injetados 5 ml de PBS 1X na cavidade peritoneal a fim de coletar os macrófagos. Esse processo foi repetido duas vezes. O volume foi aspirado com o auxílio de uma seringa que em seguida foi transferido para um tubo de polietileno 50 ml e, posteriormente, centrifugado (10 min, 150 g, 4°C). O sedimento de células foi ressuspensionado em RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB) e a densidade celular determinada por contagem dos macrófagos em câmara de Neubauer.

Para execução do ensaio, utilizaram-se placas de 24 poços, onde, colocou-se  $1 \times 10^5$  células/poço de macrófagos, foram pré incubados a 37 °C por 12 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, o meio de cultura foi removido e foram acrescentados 100 µl de meio de cultura RPMI + 10% SFB contendo as substâncias experimentais na concentração de 0,032 a 500 µg/ml. Em cada poço identificado como “branco” foram acrescentados 100 µl de meio de cultura RPMI + 10% de SFB. Também foi feito o controle utilizando o fluconazol e o itraconazol nas mesmas concentrações das substâncias. Após o tratamento, as células foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Depois da incubação, foi adicionado 10 µL de MTT (0,5 mg/ml) por poço e incubou por mais 4 horas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os cristais de formazan foram dissolvidos com uma solução de isopropanol/HCl 0,04M. A absorbância (Abs) das amostras a 485nm foi determinada no leitor de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices).

#### 4.6. Microscopia óptica de fluorescência

O ensaio de microscopia para avaliar possíveis danos na estrutura dos macrófagos BMDM - de medula óssea, foi feito em parceria com a Dra. Juliana Alves Silva do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para o procedimento de aquisição dos macrófagos, foram utilizados camundongos machos de 8-10 semanas. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e desinfetados com etanol 70%. Após a desinfecção foi feita uma incisão no abdômen para exposição das patas traseiras, visando expor as articulações: bacia/fêmur e fêmur/tíbia. Após a remoção, as patas traseiras foram colocadas em um tubo contendo álcool durante 1 minuto e depois colocadas em PBS 1X. Removeu-se todo o tecido muscular dos ossos com auxílio de tesoura e gaze estéril. A medula foi coletada pelo canal medular do fêmur e da tíbia com 2 a 5ml de RPMI gelado, sendo transferida para um tubo falcon mantido em gelo. Após a coleta, as células foram centrifugadas em meio RPMI-1640, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 20 ml de RPMI-1640. As concentrações das células foram ajustadas para  $1 \times 10^5$  ml. Adicionou-se penicilina e estreptomicina para o controle microbiano das células. Em uma placa de 24 poços contendo lamínulas circulares, foi plaqueado 1 ml da solução, onde as placas foram incubadas por 7 dias em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37 ° C para a diferenciação celular.

Após a diferenciação celular, os macrófagos foram lavados uma vez com salina para remoção da penicilina e estreptomicina. Os macrófagos ( $1 \times 10^5$ ) foram tratados com as substâncias RI 82, HTI 7 e RI 06 na concentração igual à concentração inibitória mínima (CIM) em meio DMEM, por 30 minutos, sendo mantidas em estufa a  $\pm 36^\circ\text{C}$ . Os macrófagos foram lavados com PBS 1X e adicionou-se 500  $\mu\text{l}$  de paraformaldeído 4%. As lamínulas foram retiradas das placas e colocadas sob lâminas, que em seguida foram coradas com faloidina e DAPI e visualizadas em um microscópio eletrônico de fluorescência Nikon Elements em 100X.

#### **4.7. Hemólise em eritrócitos humanos**

O ensaio de hemólise em eritrócitos humano foi executado em parceria com a professora Beth Burgwyn Fuchs e o professor Eleftherios Mylonakis da Brown University – EUA.

A atividade hemolítica das substâncias foi determinada utilizando o protocolo de (ROSCH et al., 2010). Em uma placa de 96 poços, 100 µl de 2% de eritrócitos humanos foram adicionados a 50 µl das substâncias nas concentrações de 0,063–64 µg/ml diluídas em série e incubados por 1 hora a 37°C. Após esse procedimento, a placa foi centrifugada a 500 xg durante 5 minutos e então, 50 µl do sobrenadante foi transferido para uma nova placa, e a absorbância a 540 nm foi mensurada. Como controles foram incluídos: apenas PBS (0% de lise) e Triton X-100 em diferentes concentrações (1% a 0,001%). A atividade hemolítica foi determinada pela quantidade de proteína necessária para lisar 50% das células dentro do tempo atribuído.

#### **4.8. Avaliação da lipossolubilidade**

A lipossolubilidade das substâncias ativas foi avaliada, segundo a metodologia usada por Masunari & Tavares (2006), visando obter informações sobre a hidrofobicidade das moléculas, permitindo inferir sobre a capacidade destas de transpor a membrana hematoencefálica. Para isso, os descritores estruturais utilizados para representar a hidrofobicidade das substâncias foi o logaritmo do coeficiente de partição calculado, CLogP (CLogP Program versão 4.0, Biobyte Co). Este cálculo foi realizado pela Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

#### 4.9. Ensaio de microdiluição em caldo – Concentração inibitória mínima (CIM)

Esse ensaio foi realizado com as substâncias que apresentaram atividade no teste de triagem e não apresentaram toxicidade em macrófagos murino. Os testes de CIM foram realizados seguindo as orientações prescritas no CLSI, protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008) com doze isolados de *C. gattii* e doze isolados de *C. neoformans* descritos na tabela 3. Assim, as substâncias teste foram dissolvidas DMSO 0,5% e, em seguida, foram preparadas diluições seriadas em meio RPMI 1640 mais MOPS 0,165 mol/L. Posteriormente 100 µl de cada diluição foi distribuída em microplacas de 96 poços. O controle de crescimento do microorganismo foi constituído de 100 µl do inóculo da levedura mais 100 µl de RPMI, e o controle de esterilidade apenas com o meio de cultura. A faixa intervalar para a diluição das substâncias teste foi de 250 – 0,48 µg/ml. O fluconazol e a anfotericina B (Sigma, USA) foram incluídos como controles positivos dos antifúngicos e a faixa intervalar das concentrações dos fármacos foram de 32 – 0,6 µg/ml e 8 – 0,01 µg/ml, respectivamente. Após a preparação das placas, todos os poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100 µl do inóculo fúngico. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos três vezes. As placas foram incubadas a 35°C durante 72 horas e a leitura foi realizada visualmente, sendo que a CIM foi considerada como a inibição total do crescimento quando comparado ao crescimento do controle. Para a leitura do fluconazol foi considerada a inibição de 80% do crescimento quando comparado ao crescimento do controle. Esse ensaio foi feito com todos os isolados de *Cryptococcus* spp. do estudo.

**Tabela 3** – Isolados de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* que foram utilizados no presente estudo.

<i>Cryptococcus gattii</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>	
<b>ATCC 24065</b>	Isolado clínico	<b>ATCC 24067</b>	Isolado clínico
<b>1913ER</b>	Isolado clínico	<b>96806</b>	Isolado clínico
<b>230933</b>	Isolado clínico	<b>ATCC 28957</b>	Isolado clínico
<b>ATCC 24056</b>	Isolado clínico	<b>WP</b>	Isolado clínico
<b>196L/03</b>	Isolado clínico	<b>F10</b>	Isolado clínico

<i>Cryptococcus gattii</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>	
<b>23/10993</b>	Isolado clínico	<b>CN31</b>	Isolado ambiental
<b>175/01</b>	Isolado clínico	<b>VM-MCMMPI</b>	Isolado clínico
<b>L28/02</b>	Isolado clínico	<b>ATCC 62066</b>	Isolado clínico
<b>L24/01</b>	Isolado clínico	<b>5396</b>	Isolado clínico
<b>L27/01</b>	Isolado clínico	<b>28 JF</b>	Isolado clínico
<b>547/OTTI/94-PI-10</b>	Isolado ambiental	<b>LMM820</b>	Isolado clínico
<b>ICB 181</b>	Isolado ambiental	<b>27JF</b>	Isolado clínico

**Legenda:** ATCC - American Type Culture Collection

#### 4.10. Ensaio da concentração fungicida mínima

Este ensaio foi feito de acordo com Regassini e colaboradores (2009). A concentração fungicida mínima (CFM) *in vitro* de cada substância foi determinada por meio do estriamento de todo o conteúdo de cada poço que apresentou 100% de inibição no teste da CIM, em placas de Petri contendo o ágar Sabouraud dextrose (ASD). Essas placas foram incubadas a 35°C por 72 horas. A menor concentração em que não houve crescimento de colônias foi considerada a CFM. Esse experimento foi realizado três vezes e em duplicata, com todos os isolados de *Cryptococcus* spp. mencionados no item 4.7.

#### 4.11. Índice de seletividade

Dados do IC<sub>50</sub> em macrófagos murinos e de concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizados para calcular o índice de seletividade (IS) de cada substância, como proposto anteriormente por Protopopova e colaboradores (2005). O IS foi determinado pela razão do valor do IC<sub>50</sub> em macrófagos murinos dividido pelo valor do CIM. Calculou-se o  $IS = IC_{50}/CIM$ . Valores maiores que 10 foram considerados indicativos de ausência de toxicidade, enquanto substâncias com valores abaixo de 10 foram consideradas tóxicas. Esse cálculo matemático foi realizado com os valores de IC<sub>50</sub> em macrófagos murinos e o valor de CIM de cada isolado de *Cryptococcus* spp. mencionados no item 4.7.

#### **4.12. Ensaio de curva de morte**

Após a determinação da CIM, foram preparadas placas contendo diluições das substâncias experimentais, em concentração igual ao valor de CIM e duas vezes a concentração da CIM, um controle negativo, apenas com meio de cultura e um controle positivo com meio RPMI 1640 acrescido de MOPS 0,165 mol/L mais o inóculo fúngico. Após a preparação das placas, todos os poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100 µl do inóculo fúngico preparado conforme o item 4.2. Essas placas foram incubadas a 35°C por 72 horas e durante esse período foram realizadas leituras em diferentes intervalos de tempo, começando com o momento da inoculação (tempo zero) e seguindo com leituras em 3, 6, 12, 18, 24, 48 e 72 horas. Nos intervalos pré-determinados, foram removidas alíquotas de 100 µl de cada poço e plaqueadas em placas de Petri contendo ASD e incubadas a 35°C por 72 horas. Após a incubação, as colônias foram contadas para determinação das unidades formadoras de colônias (UFC). Para a elaboração da curva de morte em função da porcentagem de células viáveis ao longo do tempo, mensuradas com base na absorbância, foram adicionados aos 100 µl restantes, 10 µl de MTT (3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Amresco, EUA), um sal tetrazólico de cor amarelo utilizado para a mensuração da sobrevivência e proliferação celular (MOSMANN, 1983) e as placas foram novamente incubadas por 3 horas. A leitura foi realizada em leitor de microplacas VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular devices), com absorbância de 490 nm. Os valores de absorbância dos poços com as diluições foram comparados com o controle positivo, e os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis, comparado com o crescimento do controle ao longo do tempo de incubação (SANTOS et al., 2012). Esse experimento foi realizado apenas uma vez e em duplicata, com todos os isolados de *Cryptococcus* spp. mencionados no item 4.7.

#### **4.13. Avaliação da concentração inibitória fracional**

As substâncias experimentais foram diluídas oito vezes, as concentrações utilizadas foram escolhidas de acordo com os resultados encontrados no ensaio da CIM. Também foram

preparadas diluições do fluconazol e da anfotericina B (Sigma, USA). Posteriormente, 50 µl de cada diluição da substância a ser testada foi adicionada nas placas de 96 poços em orientação vertical e 50 µl das diluições do fluconazol foram adicionadas em posição horizontal. Dessa forma, cada placa apresentou várias combinações de concentrações da substância a ser testada com o fluconazol. O mesmo procedimento foi realizado em combinação com a anfotericina B. O inóculo foi preparado de acordo com o item 4.2 e as placas foram incubadas a 35°C por um período de 72 horas.

A concentração inibitória fracional (CIF) foi calculada pela combinação da CIM da substância com anfotericina B (ou fluconazol) dividida pela CIM da substância sozinha e da CIM da anfotericina B (ou fluconazol) sozinha. O índice de CIF (CIFI) foi calculado pela soma das CIFs da anfotericina B e da substância experimental. O efeito de sinergismo foi considerado quando o valor de CIFI foi  $\leq 0,5$ , e a ausência de interação quando o índice foi de  $>0,5$  até 4,0 e o antagonismo quando o índice foi  $>4,0$  (CUENCA-ESTRELLA, 2004). Esse experimento foi realizado duas vezes em duplicata, com todos os isolados de *Cryptococcus* spp. mencionados no item 4.7.

#### **4.14. Ensaio de fagocitose**

##### *Cultura de macrófagos peritoneais*

O lavado peritoneal dos camundongos foi obtido conforme o descrito no item 4.4. Em seguida, as células obtidas foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 9 ml de água e 1 ml de PBS 10X ao mesmo tempo, ambos estéreis, para a lise das hemácias. O material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, adicionou-se 1 ml de RPMI 1640 suplementado com HEPES (6g/l) e 10% de soro fetal bovino inativado.

Para a verificação da fagocitose, foram preparadas placas de 24 poços contendo uma lamínula circular e a quantidade de  $3 \times 10^5$  macrófagos em cada poço em um volume final de 2 ml de RPMI com soro fetal bovino (NETSKI; KOZEL, 2002). Para verificação da atividade fungicida dos macrófagos as placas não tinham lamínulas, mas seguiram os outros passos da preparação. As placas foram incubadas *overnight* em estufa com 5% CO<sub>2</sub> à 37°C.

### *Inóculo*

O isolado L27/01 de *C. gattii* foi cultivado em ASD a 35°C durante 48 horas. As células crescidas foram transferidas para uma solução salina estéril e o inóculo foi quantificado em câmara de Neubauer para  $6 \times 10^4$  leveduras por poço, seguindo a proporção de 5 leveduras para cada macrófago. O inóculo foi ajustado em meio RPMI.

### *Atividade fagocítica e fungicida de macrófagos murinos*

As células fúngicas foram previamente tratadas com as substâncias experimentais, na concentração igual a CIM, em meio RPMI com soro fetal bovino, por 30 minutos, sendo mantidas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Após este período as células foram lavadas e 1 ml da suspensão de leveduras foi adicionado às placas, as quais foram novamente incubadas por 2 horas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> à 37°C.

Após o período de incubação, o meio foi retirado das placas e cada poço foi lavado com 1 ml de PBS, e depois descartado. Em seguida, adicionou-se 300 µl de metanol e as lamínulas foram retiradas e colocadas sobre as lâminas para, posteriormente, serem coradas com o Kit panótico (Renylab, Brasil). Durante a análise das lâminas, além da contagem e avaliação da proliferação de leveduras intracelulares, foram observados e contabilizados a cada 100 macrófagos o número de macrófagos fagocíticos e o número de leveduras em seu interior. O índice fagocítico (IF<sub>%</sub>) foi determinado segundo a fórmula a seguir:

$$IF_{( \% )} = \% \text{ células fagocíticas} \times N^{\circ} \text{ de partículas fagocitadas}$$

Para a verificação da atividade fungicida, os poços das placas foram lavados com 1 ml de PBS e depois lavadas 4 vezes com 250 µl de água estéril para lise dos macrófagos e liberação das leveduras fagocitadas. Em seguida, 100 µl da suspensão de cada poço foram plaqueados em placas de Petri contendo ASD. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e analisadas nos períodos de 24 e 36 horas para a contagem das UFC recuperadas (ALANIO; DESNOS-OLLIVIER; DROMERA, 2011).

#### 4.15. Extravasamento do material celular

A análise da perda de material celular foi feita a partir do método de Bennis e colaboradores (2004), com pequenas modificações. Os isolados *C. gattii* (L27/01) e *C. neoformans* (ATCC24067), foram cultivados em ASD a 35°C durante 48 horas e uma suspensão de células ( $2,5 \times 10^7$  UFC/ml) foi preparada em 10 ml de salina. Essa suspensão foi tratada com diferentes concentrações das substâncias em estudo (sub-inibitória - CIM e 2X a CIM) durante 2 e 24 horas. Foi feito um controle negativo com células não tratadas e controles positivos tratado com anfotericina B e fluconazol. Depois do tratamento as amostras foram centrifugadas a 7.000 rpm durante 10 minutos, e as absorbâncias do sobrenadante foram lidas a 260 nm utilizando o espectrômetro Shimadzu Cell Positioner CPS-2404.

#### 4.16. Viabilidade do biofilme

A verificação da viabilidade do biofilme foi realizada como descrito anteriormente por Martinez e colaboradores (2016), com algumas modificações. Os isolados L27/01 e ATCC24067 de *C. gattii* e *C. neoformans* respectivamente, foram cultivados em caldo Sabouraud a 30°C por 24 horas em um agitador a 150 rpm (fase estacionária precoce). As células foram então centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e lavadas duas vezes com PBS 1X. Para preparação do inóculo, as células foram diluídas em meio mínimo até alcançar  $10^7$  células/ml. Em seguida, adicionou-se 100 µl do inóculo em placas de 96 poços e estas foram incubadas a 35°C por 48 horas, para que ocorresse a formação do biofilme. Em seguida, adicionou-se 100 µl de cada substância teste e da anfotericina B no valor da CIM e incubou-se novamente a 35°C por 24 horas. Para posterior comparação da integridade do biofilme, foi realizado um controle negativo sem células de *Cryptococcus* spp. (somente com o caldo Sabouraud) e um controle positivo de crescimento da levedura. Após as 24 horas, os poços foram lavados três vezes com Tween 20 0,05% em PBS 1X para remover as células criptococócicas não aderidas. Todos os ensaios foram realizados em 40 repetições. A quantificação do biofilme foi feita pela avaliação da redução celular utilizando o 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-tetrazólio (XTT). Posteriormente foi adicionado 100µl de XTT (1mg/ml em PBS) em cada poço das placas e incubadas a 35°C

durante 5 horas. A transmitância de 492 nm dos poços foram lidas em um leitor de placas VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular devices).

#### **4.17. Ensaio de proteção osmótica: Sorbitol**

O ensaio utilizando sorbitol, tal como descrito por Frost e colaboradores (1995), foi realizado utilizando o procedimento de microdiluição em caldo. O ensaio foi realizado com todos os isolados de *Cryptococcus* ssp. descritos no item 4.7. Os testes foram feitos em duas placas de 96 poços; uma contendo 100 µl das diluições das substâncias do teste e outra contendo as substâncias a serem testadas mais 0,8 M de sorbitol como um osmoprotetor. Todos os poços foram inoculados com 100 µl do inóculo (item 4.2), e as placas foram incubadas a 35°C. O volume final do ensaio foi 200 µl em cada poço. As placas foram lidas em 2 e 7 dias. A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu visivelmente o crescimento fúngico e avaliou os próximos 10 dias de incubação. Cada experimento foi repetido três vezes e em duplicata.

#### **4.18. Avaliação da interferência dos antifúngicos e substâncias em estudo em relação à cápsula**

Os isolados L27/01 e ATCC24065 de *C. gattii* e ATCC24067 e CN31 de *C. neoformans*, foram tratados com concentrações sub-inibitórias das substâncias em meio RPMI-1640 a 35°C por 48 horas. Após o tratamento as células de *Cryptococcus* spp. foram fixadas em lâminas e coradas com tinta nanquim para visualização da cápsula em microscópio óptico (Leica DFC 425). As imagens foram visualizadas e ajustadas com o programa Leica Application Suite version 3.8.0. O tamanho da cápsula foi medido usando o software Image J 1.47. Para verificação do tamanho da cápsula foi feita a medição do diâmetro total da célula (corpo da célula mais cápsula) menos o tamanho do diâmetro do corpo celular. Para cada tratamento foi medido 50 células criptocócias e foi calculado a média e desvio padrão do tamanho das células. O tamanho da cápsula das células criptocócias foi comparada com um controle de células sem tratamento. O ensaio foi realizado duas vezes.

#### **4.19. Microscopia eletrônica de Varredura**

A microscopia eletrônica de varredura foi executada de acordo com Glauber et al. (2016), com algumas modificações. Para se observar os possíveis efeitos das substâncias sobre a morfologia celular de *C. gattii* (L27/01) e *C. neoformans* (ATCC 24067) foi feito um inóculo em meio de cultura RPMI 1640 acrescido de MOPS 0,165 mol/L. A transmitância das amostras de *Cryptococcus* spp. foi ajustada para 70% sob o comprimento de onda de 530 nm. As substâncias a serem testadas foram adicionadas ao inóculo na concentração da CIM. As amostras foram incubadas em falcons a 35°C sob agitação de 150 rpm. Posteriormente as células foram centrifugadas a 7000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Colocou-se 1mL de PBS 1X e transferiu para um tubo eppendorf onde foi novamente centrifugada e lavada com PBS 1X. O mesmo foi realizado com o inóculo das leveduras sem adição de substâncias, como controle positivo. As amostras foram fixadas por 1 hora a temperatura ambiente com 1mL de 2,5% de glutaraldeído diluído em tampão cacodilato 0,1M. O fixador foi lavado com PBS1X e as amostras foram levadas ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Em seguida as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M contendo 0,2 M de sacarose e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e, posteriormente, as células foram aderidas em lamínulas revestidas com 0,01% de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich), durante 20 min. As células aderidas foram desidratadas com uma série de soluções de etanol (30, 50 e 70% por 5 minutos/passos, seguida de 95% e duas vezes de 100%, por 10 minutos/passos). Os passos da desidratação foram monitorados para que não ocorresse o colapso da parede celular. As amostras foram então submetidas a secagem em pontos críticos (EM CPD 300, Leica) imediatamente após a desidratação e, em seguida, montadas em esferas metálicas, revestidas com uma camada de ouro de 15-20 nm (Balzers UnionFL-9496, Balzers) e visualizadas em um microscópio electrónico de varredura JEOL JSM - 6360LV.

#### **4.20. Avaliação da produção de melanina**

O ensaio de melanização foi feito de acordo com Martinez e colaboradores (2007), com algumas modificações. Os isolados L27/01 e ATCC24067 de *C. gattii* e *C. neoformans*,

respectivamente, foram cultivados em ASD por 48 horas a 35°C. Foi preparado um inóculo em solução salina de  $10^4$  células/mL. Em seguida, 10 µl desse inóculo foi plaqueado em 6 pontos diferentes de uma placa contendo meio de cultura L-dopa (Glicose – 0,1%; L-asparagina – 0,1%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,3%;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,025%; L-dopa – 0,1%). O meio de cultura L-dopa foi feito contendo o valor sub-inibitório, a CIM e 2X o valor da CIM das substâncias em estudo. Também foi feito um controle da produção de melanina sem a presença das substâncias.

#### **4.21. Ensaio de toxicidade das substâncias em *Galleria mellonella***

O ensaio de toxicidade e sobrevivência em *Galleria mellonella* foi executado em parceria com a professora Beth Burgwyn Fuchs e o professor Eleftherios Mylonakis da Brown University – EUA.

Previamente ao ensaio de sobrevivência foi feito o ensaio de toxicidade das substâncias em *Galleria mellonella*, onde, as larvas foram tratadas com as substâncias na concentração de 10 mg/kg, sendo que as substâncias foram injetadas na última pata (do inglês: *proleg*) direita da larva. A toxicidade foi avaliada por um período de 6 dias.

#### **4.22. Ensaio de sobrevivência da *Galleria mellonella* tratada com as substâncias**

O ensaio de toxicidade e sobrevivência em *Galleria mellonella* foi executado em parceria com a professora Beth Burgwyn Fuchs e o professor Eleftherios Mylonakis da Brown University – EUA.

Para o ensaio de sobrevivência utilizou-se o isolado *C. neoformans* (KN99α) crescido em meio YPD líquido a 37°C por 48 horas, após esse período as células foram lavadas e centrifugadas com PBS para retirada do meio. O inóculo foi ajustado em hemocítmetro para  $1,0 \times 10^8$  células/larva. Para a infecção foram utilizadas seringas (Hamilton) estéreis de 10 µl. Quatorze larvas de *G. mellonella* com peso e tamanho similar (250 - 300 mg) e de cor clara foram utilizadas por grupo neste ensaio. Para a inoculação das larvas, foram injetados 10 µl

do inóculo na última pata esquerda da larva, em seguida as larvas foram tratadas com as substâncias em diferentes concentrações (5, 10 e 15 mg/kg) e com o fluconazol 16 mg/kg, sendo que as substâncias foram injetados na última pata direita. Dois grupos controles foram incluídos: um inoculado com PBS para observar a morte das larvas devido ao trauma físico, e o outro não recebeu injeção como um controle para a viabilidade geral. Após as injeções, as larvas foram transferidas para uma placa de Petri e incubadas no escuro a 37°C. A sobrevivência foi monitorada diariamente e as larvas mortas eram removidas da placa. Foi executado um experimento em duplicata.

#### **4.23. Análise estatística**

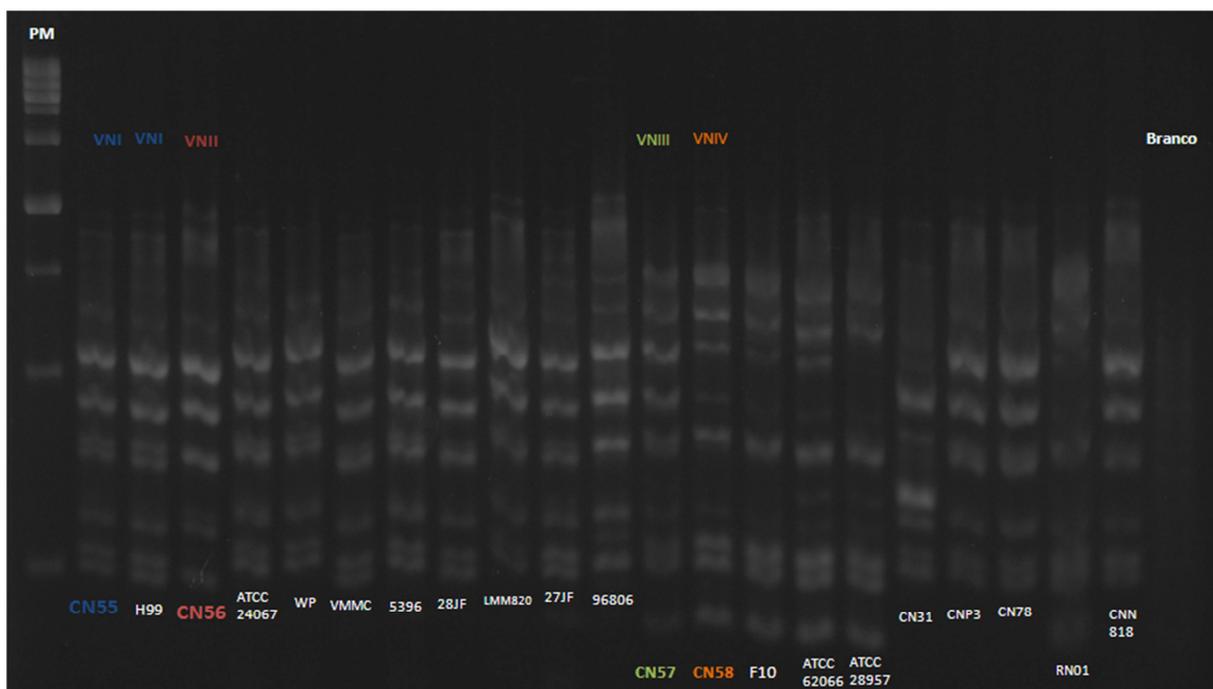
Todos os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). O teste de comparação múltipla Newman-Keuls foi empregado para comparação entre os grupos experimentais. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Identificação genotípica dos isolados de *Cryptococcus* spp.

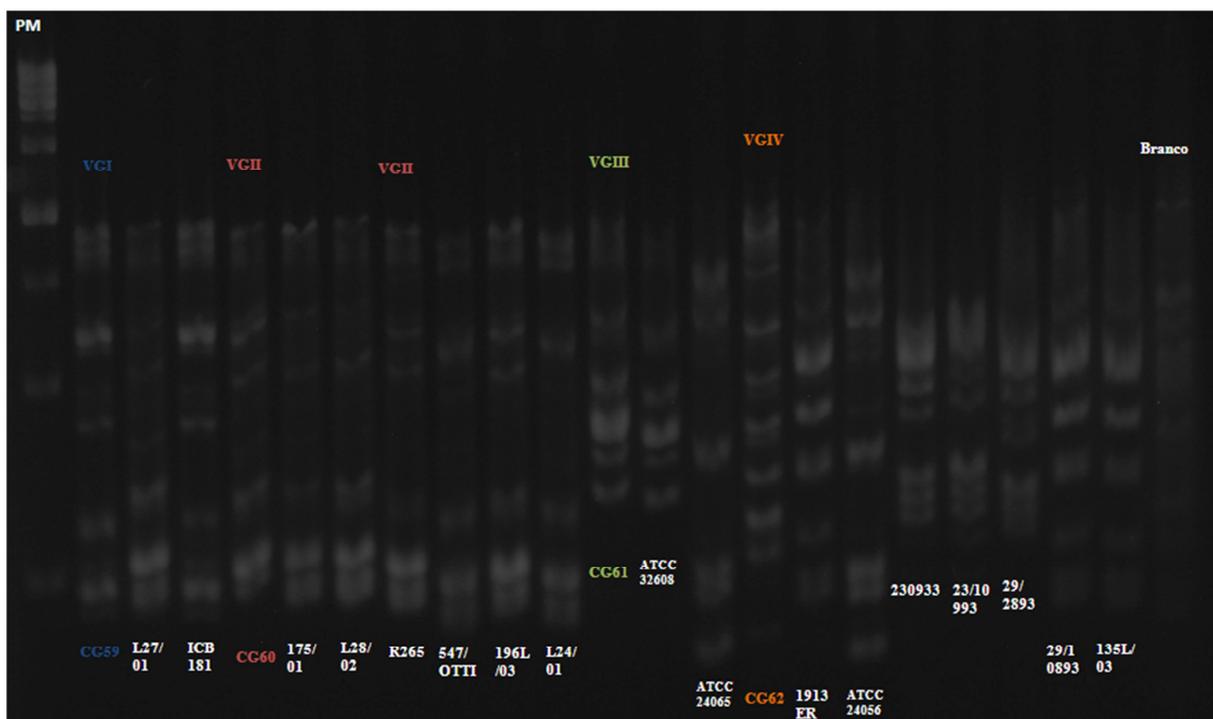
A identificação genotípica molecular dos isolados de *Cryptococcus* spp. foi feita utilizando o primer (GTG)<sub>5</sub>. Para a comparação de bandejamento, foram utilizados isolados controles sabidamente identificados como: VNI, VNII, VNIII e VNIV para *C. neoformans*, nomeados como CN55, CN56, CN57 e CN58, respectivamente e, VGI, VGII, VGIII e VGIV para *C. gattii*, nomeados como, CG59, CG60, CG61 e CG62, respectivamente. Também foi feita a identificação de outros isolados que entraram somente para identificação molecular e não fizeram parte dos outros experimentos, como o isolado R265 que é sabidamente identificado como VGII e outros isolados de *C. gattii* como o ATCC32608, 29/2893, 29/10893 e 135L/03 que não possuem a identificação genotípica. Para a espécie de *C. neoformans* utilizou-se ainda o isolado H99 que é identificado como VNI e outros isolados como o CNP3, CN78, RN01 e CNN818.

Na análise do perfil genotípico dos isolados de *C. neoformans* pelo PCR *fingerprinting* utilizando o primer (GTG)<sub>5</sub>, tivemos isolados que possivelmente fazem parte dos tipos moleculares: VNI, VNII, VNIII e VNIV. Destes isolados de *C. neoformans*, 70,58% (H99, ATCC 24067, WP, VM-MCMMPI, 5396, 28JF, LMM820, 27JF, 96806, CNP3, CN78 e CNN818) apresentaram um padrão de similar com os isolados de referência VNI e VNII sendo estes pertencentes ao *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, sorotipo A. 23,52% (F10, ATCC62066, ATCC28957 e RN01) dos isolados apresentaram um perfil de bandejamento semelhante aos padrões de referência VNIII e VNIV e não foi possível diferenciá-los quanto a variedade e genotipagem. 5,88% (CN31) apresentou um perfil de bandejamento distinto de todos os outros isolados de *C. neoformans* do presente estudo (figura 10). Portanto, utilizando o primer (GTG)<sub>5</sub> não foi possível separar os quatro grupos moleculares de *C. neoformans* com os isolados utilizados no presente trabalho. Já que os grupos VNI e VNII apresentaram o mesmo padrão de bandejamento, assim como os grupos VNIII e VNIV, separando, portanto, em apenas dois grupos moleculares.



**Figura 10** – Fotografia do gel de agarose dos isolados de *Cryptococcus neoformans* utilizando o primer (GTG)<sub>5</sub>.

A comparação do perfil filogenético dos isolados de *C. gattii* utilizando o primer (GTG)<sub>5</sub> está ilustrada na figura 11. Na análise e comparação do perfil filogenético dos isolados, foi observado que somente o isolado ICB 181 (5,88%) pareou com o padrão de referência de VGI, 41,17% (L27/01, 175/01, L28/02, R265, 547/OTTI/94-PI-10, 196L/03 e L24/01) dos isolados parearam com o isolado de referência VGII, o isolado ATCC32608 (5,88%) pareou com o isolado de referência VGIII e nenhum outro isolado de estudo pareou com o isolado de referência do genótipo VGIV. Dos demais, os isolados ATCC 24065 e ATCC 24056 mostraram um padrão de bandagem semelhante entre si, porém, diferente dos outros padrões genotípicos. Os isolados 1913ER, 29/10893 e o 135L/03 também parearam entre si e os outros 3 isolados: 230933, 23/10993 e 29/2893 também mostraram similaridade entre si, porém, não parearam com nenhum isolado de referência (figura 11). Pode-se observar desta forma que o primer (GTG)<sub>5</sub> foi capaz de diferenciar os 4 tipos moleculares de *C. gattii*, mas no entanto, observou-se isolados que não parearam com nenhum dos 4 tipos moleculares existentes.



**Figura 11** – Fotografia do gel de agarose dos isolados de *Cryptococcus gattii* utilizando o primer (GTG)<sub>5</sub>.

## 5.2. Triagem inicial das substâncias sintéticas

A triagem inicial para a busca das substâncias com as melhores atividades antifúngicas contra *C. neoformans* e *C. gattii* foi feita com 81 substâncias sintéticas e os resultados podem ser observados na tabela 4.

**Tabela 4** – Resultado da triagem realizada com 81 substâncias sintéticas contra *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*.

Substâncias	Concentração inibitória mínima (µg/ml)	
	<i>C. neoformans</i> (ATCC 24067)	<i>C. gattii</i> (L27/01)
PA 0	>250,0	>250,0
PA 1	>250,0	>250,0
PA1-Ms	>250,0	>250,0
PA1-Az	>250,0	>250,0
PA 2	>250,0	>250,0
PA 3	>250,0	>250,0
PA 4	>250,0	>250,0
PB 1	>250,0	>250,0

Substâncias	<i>C. neoformans</i> (ATCC 24067)		<i>C. gattii</i> (L27/01)	
	Concentração inibitória mínima (µg/ml)			
PB1-Ms	>250,0		>250,0	
PB1-Az	>250,0		>250,0	
PB 2	>250,0		>250,0	
PB 3	>250,0		>250,0	
PB 4	>250,0		>250,0	
PB 6	>250,0		>250,0	
PB 7	>250,0		>250,0	
PD 8	125,0		125,0	
PG 1	>250,0		>250,0	
Mpac-H	>250,0		>250,0	
Mpac-Cl	>250,0		>250,0	
Mpac-M	>250,0		>250,0	
Thac-H	>250,0		>250,0	
Thac-Cl	>250,0		>250,0	
Thac-M	>250,0		>250,0	
Moac-H	>250,0		>250,0	
Moac-Cl	>250,0		>250,0	
Moac-M	>250,0		>250,0	
3PMo	>250,0		>250,0	
PMp	>250,0		>250,0	
PTh	>250,0		>250,0	
P3Mo	>250,0		>250,0	
d3Mo	>250,0		>250,0	
MQN	>250,0		>250,0	
HFN	>250,0		>250,0	
MIN	>250,0		>250,0	
EDNOH	>250,0		>250,0	
MIDA	>250,0		>250,0	
PDC	>250,0		>250,0	
EDNC	>250,0		>250,0	
HNO	125,0		>250,0	
QNOH	>250,0		>250,0	
MT	>250,0		>250,0	
RI 06	<b>31,2</b>		<b>31,2</b>	
RI 15	>250,0		>250,0	
RS 17	>250,0		>250,0	
RI 31	>250,0		>250,0	
RI 70	>250,0		>250,0	
RI 57	>250,0		>250,0	
RS 11	>250,0		>250,0	
RI 58	>250,0		>250,0	

Substâncias	Concentração inibitória mínima (µg/ml)	
	<i>C. neoformans</i> (ATCC 24067)	<i>C. gattii</i> (L27/01)
RI 58A	>250,0	>250,0
RI 82	<b>3,9</b>	<b>1,9</b>
RI 33	>250,0	>250,0
HTI 1	>250,0	>250,0
HTI 2	<b>≤0,2</b>	<b>≤0,2</b>
HTI 3	<b>≤0,2</b>	<b>≤0,2</b>
HTI 4	>250,0	>250,0
HTI 5	>250,0	>250,0
HTI 7	<b>7,8</b>	<b>3,9</b>
HTI 8	<b>7,8</b>	<b>7,8</b>
HTI 9	>250,0	>250,0
HTI 10	>250,0	>250,0
HTI 11	>250,0	>250,0
HTI 12	>250,0	>250,0
HIN	>250,0	250,0
HTI 14	>250,0	>250,0
TSI 1	62,5	62,5
TSI 2	>250,0	>250,0
TSI 3	>250,0	>250,0
TSI 4	>250,0	>250,0
TSI 5	>250,0	>250,0
TSI 7	>250,0	>250,0
TSI 8	>250,0	>250,0
TSI 9	>250,0	>250,0
3Pmd	>250,0	>250,0
MPmd	>250,0	>250,0
ThPmd	>250,0	>250,0
i3Mo-H	>250,0	>250,0
i3Mo-Cl	>250,0	>250,0
iBn-H+	>250,0	>250,0
iBn-Cl+	>250,0	>250,0
iCh-H+	>250,0	>250,0
iCh-Cl+	>250,0	>250,0

Na tabela 4, pode-se observar que os menores valores da CIM foram os das substâncias **RI 06** com a CIM de 31, 2 µg/ml para os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, a substância **RI 82** com o valor de CIM de 3,9 µg/ml para *C. neoformans* e 1,9 µg/ml para *C.*

*gattii*. Os valores de CIM das substâncias **HTI 2** e **HTI 3** mostraram o valor de CIM  $\leq 0,2$   $\mu\text{g/ml}$  para as duas espécies de *Cryptococcus* spp., a substância **HTI 7** apresentou CIM de 7,8  $\mu\text{g/ml}$  para *C. neoformans* e 3,9  $\mu\text{g/ml}$  para *C. gattii* e por último, a substância **HTI 8** que apresentou valor de CIM de 7,8  $\mu\text{g/ml}$  para os dois isolados. Entretanto, quando foi feita uma revisão bibliográfica, verificou-se que as substâncias **HTI 2** e **HTI 3** já haviam sido descritas anteriormente, com atividade antifúngica contra isolados de *Candida albicans* (**HTI 3**) (CARRADORI et al., 2013) e possuía estudos com a utilização da substância **HTI 2** contra células cancerígenas (SECCI et al., 2014), portanto, optou-se por não dar continuidade aos testes com as substâncias **HTI 2** e **HTI 3**. Além disso, quando à estrutura química das substâncias **HTI 7** e **HTI 8** foram comparadas, percebeu-se que suas estruturas eram muito semelhantes e por isso, no presente trabalho optou-se por trabalhar apenas com a substância **HTI 7**. Então, os estudos foram iniciados com as substâncias **RI 06**, **RI 82** e **HTI 7**. Em contrapartida, as demais substâncias descritas na tabela apresentaram valores de CIM elevados quando comparadas as substâncias citadas acima.

### **5.3. Avaliação da citotoxicidade das substâncias frente aos macrófagos murinos e avaliação da lipossolubilidade**

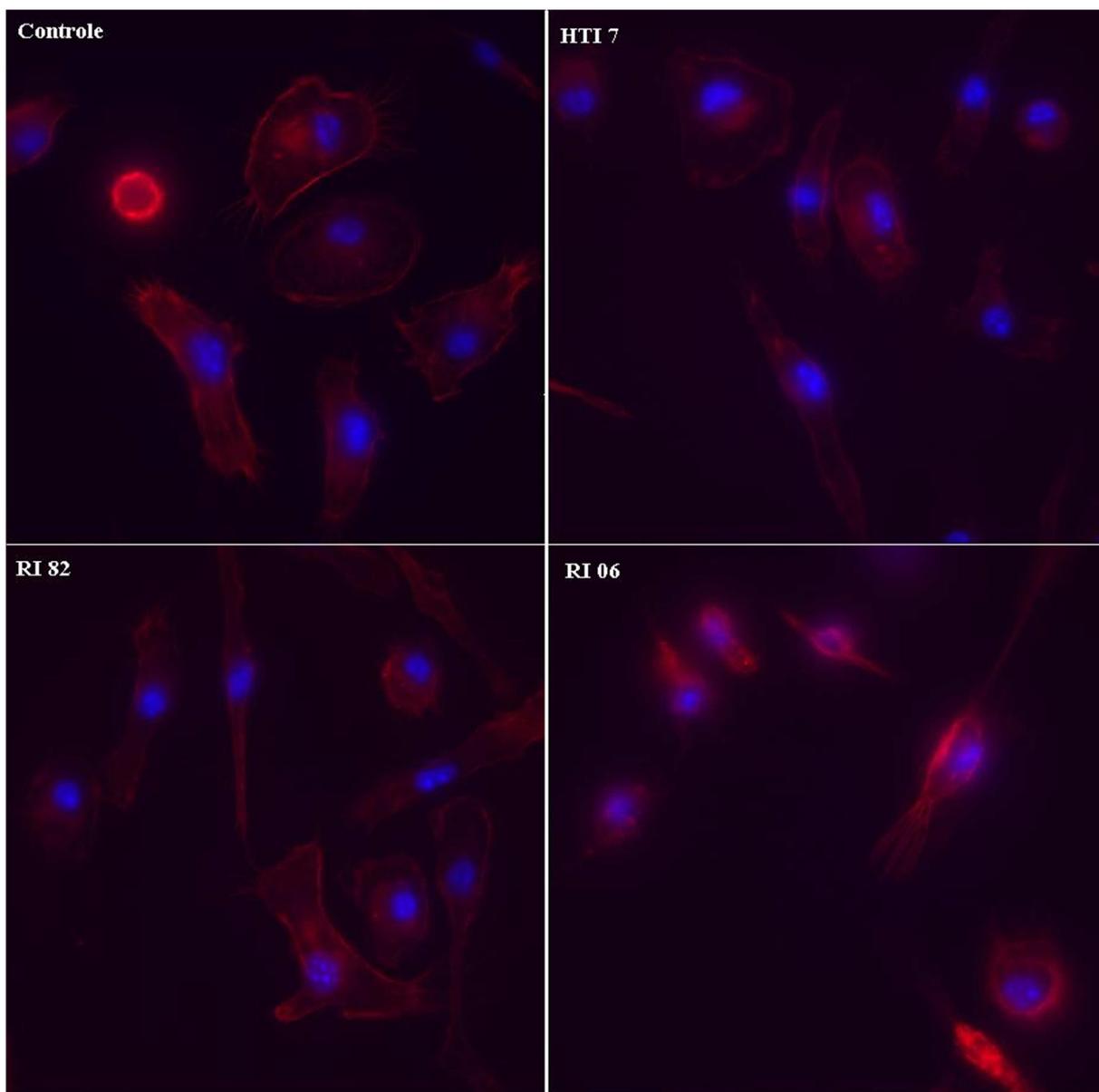
Para a continuação dos estudos, foi realizada a avaliação da citotoxicidade das substâncias que apresentaram os menores valores de CIM (**RI 06**, **HTI 7** e **RI 82**) frente aos macrófagos murinos. Neste ensaio as substâncias **HTI 7** e **RI 82** não foram tóxicas para os macrófagos murinos nas condições testadas ( $\text{IC}_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$ ). Já o  $\text{IC}_{50}$  da substância **RI 06** está entre 20 e 100  $\mu\text{g/ml}$  (Tabela 5). Como o valor da CIM da substância **RI 06** foi de 31,2  $\mu\text{g/ml}$  contra *C. neoformans* e *C. gattii*, valor este muito próximo a  $\text{IC}_{50}$  em macrófagos murinos, optou-se por não continuar os estudos com esta substância.

Na avaliação da lipossolubilidade onde o logaritmo do coeficiente de partição foi calculado observou-se que a substância **HTI 7** apresentou um  $\text{ClogP}$  de 6,2 e a substância **RI 82** de  $\text{ClogP} = 3,97$ .

**Tabela 5** – Resultado do ensaio de citotoxicidade em macrófagos murinos utilizando as substâncias **RI06**, **HTI 7** e **RI 82** e os antifúngicos fluconazol e itraconazol como controles.

<b>Inibição da viabilidade celular (%)</b>					
<b>Concentração (µg/ml)</b>	<b>RI06</b>	<b>HT17</b>	<b>R182</b>	<b>Fluconazol</b>	<b>Itraconazol</b>
	Média	Média	Média	Média	Média
<b>500</b>	56,5	38,0	30,3	Inativo	Inativo
<b>100</b>	54,4	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
<b>20</b>	12,5	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
<b>4</b>	24,8	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
<b>0,8</b>	17,9	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
<b>0,16</b>	27,6	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo
<b>0,032</b>	14,8	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo

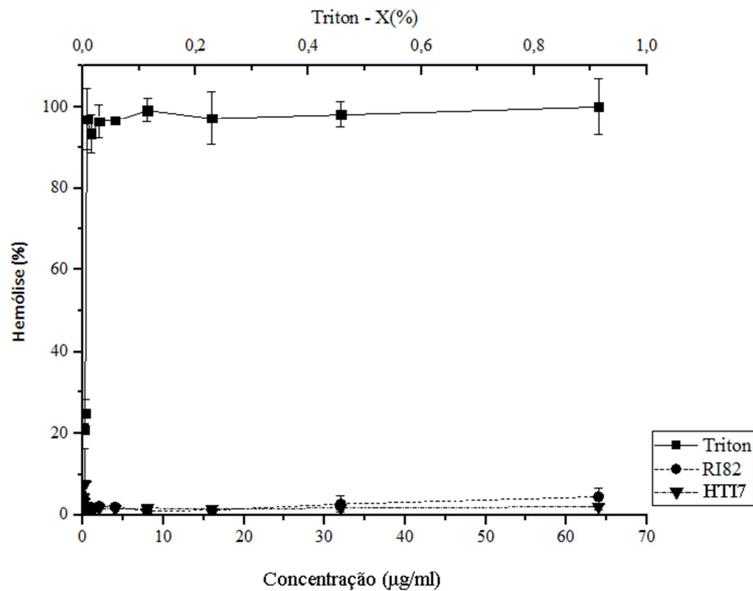
No ensaio utilizando macrófagos BMDM - de medula óssea também pôde ser observado através da análise de microscopia eletrônica de fluorescência a citotoxicidade da substância **RI 06** na concentração da CIM e a não toxicidade das substâncias **HTI 7** e **RI82** (Figura 12). Os macrófagos murinos BMDM tratados com as substâncias **HTI 7** e **RI 82** apresentaram-se intactos, onde, podemos observar a integridade do citoesqueleto e a formação de pseudópodes. Já quando os macrófagos são tratados com a **RI 06** é notório a destruição do citoesqueleto dos macrófagos, conferindo a toxicidade da substância.



**Figura 12** – Imagens de microscopia de fluorescência de macrófagos murinos BMDM- de medula óssea tratados com a CIM das substâncias **HTI 7**, **RI82** e **RI 06** e, na ausência de tratamento (controle). A coloração dos macrófagos foi feita com o corante Faloidina e DAPI que coram o citoesqueleto e o núcleo, respectivamente.

#### 5.4. Hemólise em eritrócitos humanos

No ensaio de hemólise em eritrócitos humanos observou-se que as substâncias **RI 82** e **HTI 7** apresentaram valores menores que 5% de hemólise dos eritrócitos humanos e o controle positivo utilizando o Triton-X apresentou hemólise superior a 95% (Figura 13).



**Figura 13** – Atividade hemolítica das substâncias **RI 82** e **HTI 7**.

### 5.5. Substâncias selecionadas

A partir dos resultados obtidos da atividade antifúngica, citotoxicidade em macrófagos murinos e de hemólise em eritrócitos humanos, as substâncias **RI 82** e **HTI 7** foram selecionadas para dar continuidade aos próximos testes. As duas substâncias são inéditas e pertencem à classe dos heterocíclicos tiazólicos.

### 5.6. Verificação da concentração inibitória mínima e Concentração Fungicida Mínima

O ensaio de CIM foi realizado com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol e com as substâncias **RI 82** e **HTI 7**. Os resultados disponibilizados são o maior valor da CIM encontrada nos três ensaios de CIM (Tabela 6).

**Tabela 6** – Concentração inibitória mínima das substâncias **RI 82** e **HTI 7** e dos antifúngicos anfotericina B e fluconazol contra isolados de *C. gattii* e *C. neoformans*.

	Antifúngicos				Substâncias				
	Anfotericina B		Fluconazol		RI82		HTI7		
	Concentração inibitória mínima (µg/ml)								
	(µg/ml)	(µM)	(µg/ml)	(µM)	(µg/ml)	(µM)	(µg/ml)	(µM)	
<i>Cryptococcus gattii</i>	ATCC24065	0,50	0,54	2,00	6,53	1,95	6,65	3,90	10,15
	1913ER	0,50	0,54	4,00	13,07	1,95	6,65	7,80	20,31
	230933	2,00	2,16	2,00	6,53	1,95	6,65	15,62	40,67
	ATCC24056	1,00	1,08	2,00	6,53	1,95	6,65	31,25	81,38
	196L/03	0,50	0,54	4,00	13,07	1,95	6,65	31,25	81,38
	23/10993	0,50	0,54	2,00	6,53	1,95	6,65	31,25	81,38
	175/01	0,50	0,54	1,00	3,26	1,95	6,65	15,62	40,67
	L28/02	1,00	1,08	4,00	13,07	3,90	13,31	15,62	40,67
	L24/01	0,50	0,54	2,00	6,53	1,95	6,65	7,80	20,31
	L27/01	0,50	0,54	4,00	13,07	1,95	6,65	3,90	10,15
	547/OTTI/94-PI-10	1,00	1,08	4,00	13,07	3,90	13,31	15,62	40,67
	ICB-181	0,50	0,54	4,00	13,07	0,97	13,31	3,90	10,15
	<b>Média</b>	<b>0,75</b>	<b>0,81</b>	<b>2,92</b>	<b>9,53</b>	<b>2,19</b>	<b>8,32</b>	<b>15,29</b>	<b>39,82</b>
	<b>CIM50</b>	<b>0,50</b>	<b>0,54</b>	<b>2,00</b>	<b>6,53</b>	<b>1,96</b>	<b>6,65</b>	<b>15,62</b>	<b>40,62</b>
	<b>CIM90</b>	<b>1,00</b>	<b>1,08</b>	<b>4,00</b>	<b>13,07</b>	<b>3,90</b>	<b>13,31</b>	<b>31,25</b>	<b>81,38</b>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC24067	0,50	0,54	2,00	6,53	3,90	13,31	7,80	20,31
	96806	0,50	0,54	8,00	26,14	3,90	13,31	15,62	40,67
	ATCC28957	0,50	0,54	1,00	3,26	3,90	13,31	15,62	40,67
	WP	1,00	1,08	4,00	13,07	3,90	13,31	15,62	40,67
	F10	0,50	0,54	2,00	6,53	1,95	6,65	7,80	20,31
	CN31	0,50	0,54	4,00	13,07	1,95	6,65	7,80	20,31
	VM-MCMMPI	0,50	0,54	1,00	3,26	3,90	13,31	15,62	40,67
	ATCC62066	0,50	0,54	2,00	6,53	1,95	6,65	15,62	40,67
	5396	0,50	0,54	4,00	13,07	1,95	6,65	7,80	20,31
	28JF	0,50	0,54	2,00	6,53	1,95	6,65	7,80	20,31
	LMM820	1,00	1,08	2,00	6,53	3,90	13,31	31,25	81,38
	27JF	0,50	0,54	4,00	13,07	3,90	13,31	15,62	40,67
	<b>Média</b>	<b>0,58</b>	<b>0,63</b>	<b>3,00</b>	<b>9,80</b>	<b>3,09</b>	<b>10,54</b>	<b>13,66</b>	<b>35,58</b>
	<b>CIM50</b>	<b>0,50</b>	<b>0,54</b>	<b>2,00</b>	<b>6,53</b>	<b>3,90</b>	<b>13,31</b>	<b>15,62</b>	<b>40,67</b>
	<b>CIM90</b>	<b>1,00</b>	<b>1,08</b>	<b>4,00</b>	<b>13,07</b>	<b>3,90</b>	<b>13,31</b>	<b>15,62</b>	<b>40,67</b>

No ensaio da CIM a substância **RI 82** apresentou valores de CIM similares aos valores encontrados para o antifúngico fluconazol, onde, a média geométrica de CIM para os isolados de *C. gattii* foi de 2,19 µg/ml (9,53 µM) para a substância RI 82 e 2,92 µg/ml (8,32 µM) para o fluconazol. Quando testada nos isolados de *C. neoformans* a CIM média geométrica da

substância **RI 82** foi 3,09 (9,08  $\mu\text{M}$ )  $\mu\text{g/ml}$  e do fluconazol foi de 3,00  $\mu\text{g/ml}$  (10,54  $\mu\text{M}$ ). A substância **HTI 7** apresentou os maiores valores de CIM, sendo que a média geométrica para os isolados de *C. gattii* foi de 15,29  $\mu\text{g/ml}$  (39,82  $\mu\text{M}$ ) e 13,66  $\mu\text{g/ml}$  (35,58  $\mu\text{M}$ ) para os isolados de *C. neoformans*. As médias da CIM da anfotericina B foram as menores, onde, a média da CIM para o *C. gattii* foi de 0,75  $\mu\text{g/ml}$  (0,81  $\mu\text{M}$ ) e a do *C. neoformans* foi de 0,58  $\mu\text{g/ml}$  (0,63  $\mu\text{M}$ ) (Tabela 6).

Os valores da CIM50 das substâncias testadas contra os isolados de *C. gattii* foram de 0,50  $\mu\text{g/ml}$  para a anfotericina B, 2,0  $\mu\text{g/ml}$  para o fluconazol, 1,96  $\mu\text{g/ml}$  para a **RI 82** e 15,29  $\mu\text{g/ml}$  para a **HTI 7**. Já os valores do CIM90 foram de 1,0  $\mu\text{g/ml}$  para a anfotericina B, 4,0  $\mu\text{g/ml}$  para o fluconazol, 3,9  $\mu\text{g/ml}$  para a substância **RI 82** e 32,25  $\mu\text{g/ml}$  para a substância **HTI 7**. Nos isolados de *C. neoformans* os valores de CIM50 e CIM90 para a anfotericina B e fluconazol são idênticos aos valores encontrados para *C. gattii*, já os valores da CIM50 e CIM90 dos isolados de *C. neoformans* frente a substância **RI 82** é de 3,90  $\mu\text{g/ml}$  e para a substância **HTI 7** é de 15,62  $\mu\text{g/ml}$  (Tabela 6). A partir da avaliação da concentração fungicida mínima das substâncias, verificou-se que as substâncias **RI 82** e **HTI 7** são fungistáticas.

A substância **HTI 7** apresentou uma maior variação nos valores de CIM nos diferentes isolados de *C. gattii* e *C. neoformans*, com a CIM variando de 3,9 – 31,25  $\mu\text{g/ml}$ . Para a substância **RI 82** a variação dos resultados para as duas espécies de *Cryptococcus* foi menor, de 0,97 – 3,9  $\mu\text{g/ml}$ .

As células tratadas com as substâncias que apresentaram 100% de inibição em meio RPMI, cresceram em todas as concentrações de tratamento quando plaqueadas em meio Sabouraud. Com isso, foi visto que ambas as substâncias apresentaram atividade fungistática.

## 5.7. Índice de seletividade

O resultado do cálculo do índice de seletividade das substâncias **RI 82** e **HTI 7** e do antifúngico fluconazol contra os isolados de *Cryptococcus* spp. foram todos maiores que 10, onde, os valores iguais ou superiores a 10 conferem a seletividade da substância para as células de *Cryptococcus* spp. em relação as células de macrófagos murinos avaliadas. A

substância **RI 82** mostrou similaridade no resultado da média quando comparada aos resultados do fluconazol, sendo que a média da substância **RI 82** é de 263,16 e do fluconazol é de 250,00. A substância **HTI 7**, mostrou uma média do índice de seletividade de 32,05, sendo esse valor inferior quando comparado aos valores da substância **RI 82** e do fluconazol (Tabela 7).

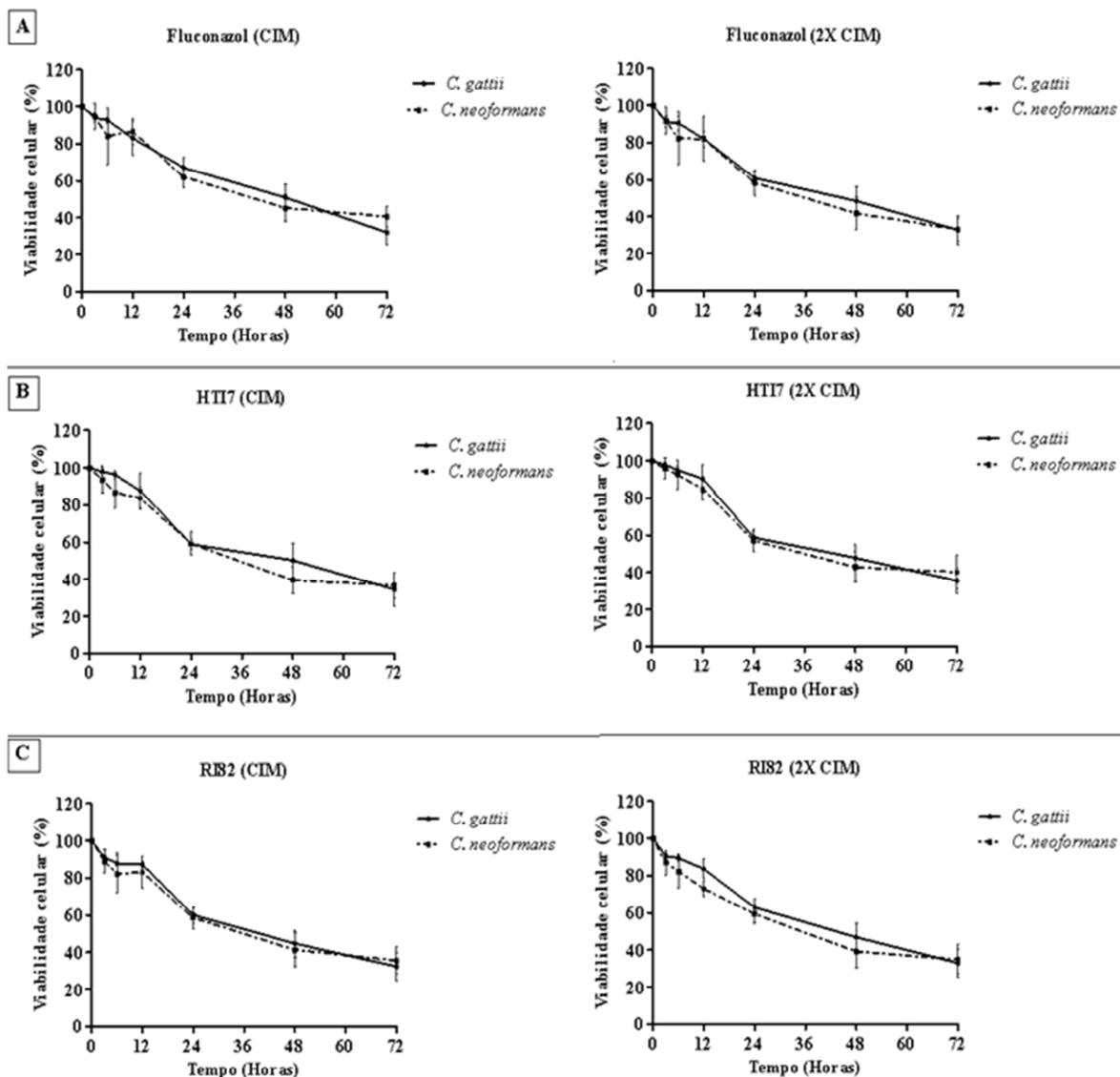
**Tabela 7** – Cálculo do índice de seletividade do fluconazol e das substâncias **RI 82** e **HTI 7**.

<b>Índice de seletividade</b>				
	<b>Isolados</b>	<b>Fluconazol</b>	<b>HTI7</b>	<b>RI82</b>
<i>Cryptococcus gattii</i>	<b>ATCC24065</b>	250,00	128,21	263,16
	<b>1913ER</b>	125,00	64,10	263,16
	<b>230933</b>	250,00	32,05	263,16
	<b>ATCC24056</b>	250,00	16,00	263,16
	<b>196L/03</b>	125,00	16,00	263,16
	<b>23/10993</b>	250,00	16,00	263,16
	<b>175/01</b>	500,00	32,05	263,16
	<b>L28/02</b>	125,00	32,05	128,21
	<b>L24/01</b>	250,00	64,10	263,16
	<b>L27/01</b>	125,00	128,21	263,16
	<b>547/OTTI/94-PI-10</b>	125,00	32,05	128,21
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<b>ICB-181</b>	125,00	128,21	515,46
	<b>ATCC24067</b>	250,00	64,10	128,21
	<b>96806,00</b>	62,50	32,05	64,10
	<b>ATCC28957</b>	500,00	32,05	128,21
	<b>WP</b>	125,00	32,05	128,21
	<b>F10</b>	250,00	64,10	263,16
	<b>CN31</b>	125,00	64,10	263,16
	<b>VM-MCMMPI</b>	500,00	32,05	128,21
	<b>ATCC62066</b>	250,00	32,05	263,16
	<b>5396,00</b>	125,00	64,10	263,16
	<b>28JF</b>	250,00	64,10	263,16
	<b>LMM820</b>	250,00	16,00	128,21
	<b>27JF</b>	125,00	32,05	128,21
	<b>MÉDIA</b>	250,00	32,05	263,16

Fórmula utilizada para calcular o índice de seletividade:  $IS=IC_{50}/CIM$

## 5.8. Análise da curva e morte

No ensaio da curva de morte foi possível observar o tempo em que o fluconazol e as substâncias **RI 82** e **HTI 7** iniciaram a inibição da multiplicação das células fúngicas e o declínio da viabilidade celular (Figura 14). A partir da análise dos gráficos da curva de morte, foi possível observar que o fluconazol e as substâncias **HTI 7** e **RI 82** apresentaram o início do declínio da viabilidade celular em 12 horas e, após esse período a diminuição da viabilidade celular foi progressiva até alcançar o tempo de 72 horas (Figura 14A, 14B e 14C) . Esses resultados são encontrados tanto nos valores de CIM, quanto nos valores de 2X a CIM. Nos três estudos, o declínio da viabilidade celular alcançou uma porcentagem de aproximadamente 20% no tempo de 72 horas. Os resultados com o fluconazol e as substâncias teste mostraram-se similares. A diminuição da viabilidade celular foi confirmada com o plaqueamento de 100 µl do inóculo em meios Sabouraud, onde, a contagem das UFCs foi declinando com o passar do tempo.



**Figura 14** – Gráficos do declínio da viabilidade celular de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* frente ao tratamento com o antifúngico fluconazol e as substâncias **HTI 7** e **RI 82**. **Legenda:** 14A: gráficos da curva de morte do antifúngico fluconazol no valor da CIM e 2X a CIM. 14B: gráficos da curva de morte da substância **HTI 7** no valor da CIM e 2X a CIM e 14C: gráficos da curva de morte da substância **RI 82** também nos valores da CIM e 2X a CIM.

### 5.9. Interação das substâncias HTI 7 e RI 82 com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol

Para verificação da interação das substâncias com os antifúngicos, foi feita a combinação das substâncias **HTI 7** e **RI 82** com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol, nos valores da CIM e em uma faixa intervalar inferior e superior aos valores de CIM. Os valores do índice de concentração inibitória fracional (ICIF) para as substâncias **RI 82** (Tabela 8) e **HTI 7** (Tabela 9) foram considerados indiferentes para todos os isolados de *C. gattii* e *C. neoformans*.

Na combinação utilizando a substância RI 82 com o a anfotericina B, é notório que o menor valor do ICIF para os isolados de *Cryptococcus* spp. foi visto para o isolado F10, que apresentou o valor de 0,73 µg/ml, e o maior valor foi de 3,80 µg/ml para o isolado 28JF. A interação para esses valores é considerada como indiferente. O valor de ICIF para o isolado 28JF quase alcançou o valor de 4 µg/ml, onde, seria considerado como uma interação de antagonismo. A substância **RI 82** em combinação com o fluconazol, apresentou o menor valor de ICIF para o isolado ICB 181 com 0,78 µg/ml e o maior valor foi visto para o isolado 28JF com o valor de ICIF de 2,20 µg/ml (Tabela 8).

**Tabela 8** – Resultados da concentração inibitória fracional da substância RI 82 em interação com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol contra os isolados de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*.

	Isolado	ICIF médio (µg/ml)	Interação	ICIF médio (µg/ml)	Interação
		RI82 Vs Anfotericina B		RI82 Vs Fluconazol	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 24067	0,88	Indiferente	1,40	Indiferente
	96806	0,98	Indiferente	1,40	Indiferente
	ATCC 28957	1,23	Indiferente	1,30	Indiferente
	WP	1,11	Indiferente	1,13	Indiferente
	F10	0,73	Indiferente	1,30	Indiferente
	CN31	1,30	Indiferente	1,40	Indiferente
	VM-MCMMPI	0,98	Indiferente	1,30	Indiferente
	ATCC 62066	1,30	Indiferente	1,27	Indiferente
	5396	0,86	Indiferente	1,30	Indiferente
	28 JF	3,80	Indiferente	2,20	Indiferente
	LMM820	0,86	Indiferente	1,30	Indiferente
	27JF	0,86	Indiferente	1,30	Indiferente
	<b>Média geométrica</b>	<b>1,11</b>		<b>1,36</b>	
<i>Cryptococcus gattii</i>	ATCC 24065	0,80	Indiferente	0,90	Indiferente
	1913ER	0,80	Indiferente	1,60	Indiferente
	230933	1,48	Indiferente	1,40	Indiferente

	ICIF médio ( $\mu\text{g/ml}$ )	Interação	ICIF médio ( $\mu\text{g/ml}$ )	Interação
Isolado	RI82 Vs Anfotericina B		RI82 Vs Fluconazol	
ATCC 24056	1,30	Indiferente	1,40	Indiferente
196L/03	1,23	Indiferente	1,40	Indiferente
23/10993	1,23	Indiferente	1,40	Indiferente
175/01	1,30	Indiferente	1,30	Indiferente
L28/02	1,30	Indiferente	1,40	Indiferente
L24/01	1,30	Indiferente	1,40	Indiferente
L27/01	1,40	Indiferente	1,40	Indiferente
547/OTTI/94-PI-10	1,30	Indiferente	1,40	Indiferente
ICB 181	1,40	Indiferente	0,78	Indiferente
<b>Média geométrica</b>	<b>1,21</b>		<b>1,29</b>	

Ao avaliar combinação da substância **HTI 7** com a anfotericina B, observou-se que o maior valor de ICIF visto nos isolados de *Cryptococcus* spp. foi de 1,29  $\mu\text{g/ml}$  para o isolado L28/02 e o menor valor foi 0,73  $\mu\text{g/ml}$  para o isolado LMM820. Quando avaliamos a combinação da substância **HTI 7** com o fluconazol, vimos que o maior valor de ICIF encontrado é de 3,86  $\mu\text{g/ml}$  para o isolado ICB 181 e o menor valor é de 0,79  $\mu\text{g/ml}$  para o isolado CN31. Todos os valores encontrados apresentam uma combinação indiferente. O valor do ICIF do isolado ICB 181 foi alto, quase alcançando um valor antagônico (Tabela 9).

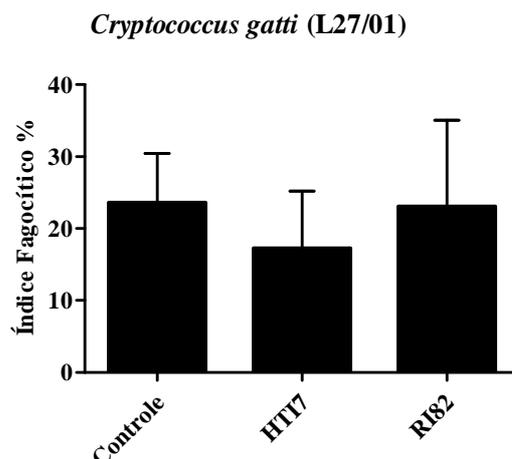
**Tabela 9** – Resultados da concentração inibitória fracional da substância HTI 7 em interação com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol contra os isolados de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*.

	ICIF médio ( $\mu\text{g/ml}$ )	Interação	ICIF médio ( $\mu\text{g/ml}$ )	Interação
Isolado	HTI7 Vs Anfotericina B		HTI7 Vs Fluconazol	

<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 24067	1,23	Indiferente	1,12	Indiferente
	96806	1,23	Indiferente	1,12	Indiferente
	ATCC 28957	1,23	Indiferente	1,94	Indiferente
	WP	1,23	Indiferente	1,11	Indiferente
	F10	1,23	Indiferente	1,29	Indiferente
	CN31	1,23	Indiferente	0,79	Indiferente
	VM-MCMMPI	1,23	Indiferente	1,29	Indiferente
	ATCC 62066	1,23	Indiferente	1,37	Indiferente
	5396	1,23	Indiferente	1,23	Indiferente
	28 JF	1,23	Indiferente	1,29	Indiferente
	LMM820	0,73	Indiferente	1,11	Indiferente
	27JF	0,98	Indiferente	1,05	Indiferente
	<b>Média geométrica</b>	<b>1,16</b>		<b>1,20</b>	
<i>Cryptococcus gattii</i>	ATCC 24065	1,23	Indiferente	2,94	Indiferente
	1913ER	1,23	Indiferente	1,37	Indiferente
	230933	1,23	Indiferente	1,22	Indiferente
	ATCC 24056	1,23	Indiferente	1,37	Indiferente
	196L/03	1,23	Indiferente	1,37	Indiferente
	23/10993	1,23	Indiferente	1,04	Indiferente
	175/01	1,23	Indiferente	1,29	Indiferente
	L28/02	1,29	Indiferente	1,16	Indiferente
	L24/01	1,23	Indiferente	1,09	Indiferente
	L27/01	1,23	Indiferente	1,23	Indiferente
	547/OTTI/94-PI-10	1,23	Indiferente	1,09	Indiferente
	ICB 181	1,20	Indiferente	3,86	Indiferente
	<b>Média geométrica</b>	<b>1,24</b>		<b>1,45</b>	

### 5.10. Determinação do índice fagocítico

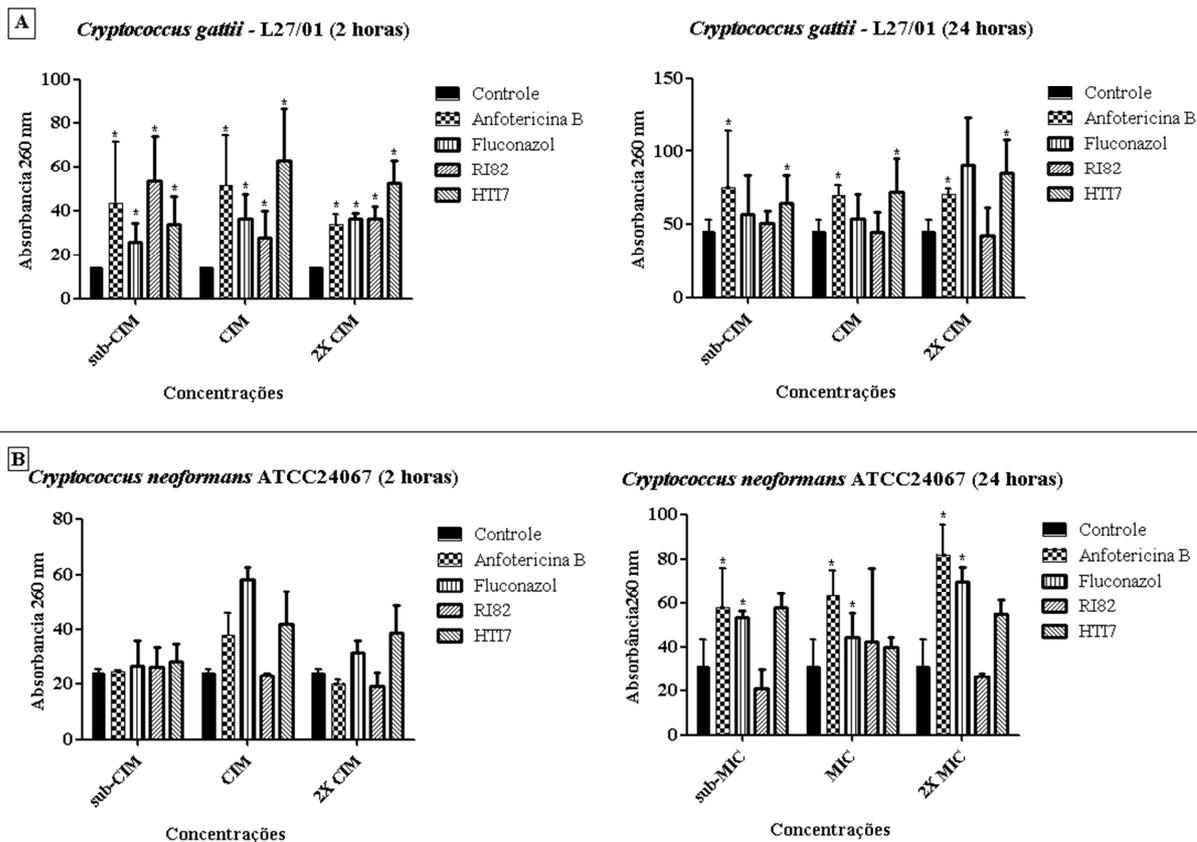
Os macrófagos murinos tratados por duas horas com as substâncias **HTI 7** e **RI 82** não mostraram diferença significativa na avaliação do índice fagocítico, quando, posteriormente, entraram em contato com as células de *C. gattii* (L27/10) comparadas com os macrófagos murinos que não receberam o tratamento (Figura 15). Mostrando que o tratamento prévio por duas horas com as substâncias não interferiram na fagocitose das células criptocócicas pelos macrófagos murinos.



**Figura 15** – Porcentagem do índice fagocítico de macrófagos murinos tratados com as substâncias **HTI 7** e **RI 82** em contato com *Cryptococcus gattii* (L27/10).

### 5.11. Avaliação da integridade da membrana celular

Com o intuito de observar se as substâncias em teste apresentavam atividade na membrana celular fúngica foi realizado o ensaio de extravasamento do material celular fúngico. Neste experimento foi possível observar que em um período de 2 horas, *C. gattii* apresentou significativo extravasamento do material celular em relação ao controle, quando tratado com a anfotericina B, fluconazol e com as duas substâncias **RI 82** e **HTI 7** nos valores de CIM e 2X a CIM (Figura 16A). Porém, o mesmo não ocorreu, no período de duas horas, com *C. neoformans*, tratado com a anfotericina B, fluconazol e as substâncias **RI 82** e **HTI 7** (Figura 16B). Na análise do período de 24 horas de tratamento, somente a anfotericina B e o composto **HTI 7** apresentaram diferença significativa do extravasamento celular em *C. gattii* em comparação com o controle de crescimento sem tratamento (Figura 16A). Com relação ao *C. neoformans*, a diferença em relação ao controle foi vista somente frente à anfotericina B e o fluconazol no período de 24 horas (Figura 16B). Os mesmos resultados foram vistos nos valores de CIM e 2X a CIM pra os isolados de *C. gattii* e *C. neoformans*.



**Figura 16** – Verificação do extravasamento celular de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* frente aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol e as substâncias RI 82 e HTI 7. **Legenda:** Utilizou-se o teste de comparação múltipla Newman-Keuls e valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 5.12. Avaliação de dano na parede celular fúngica

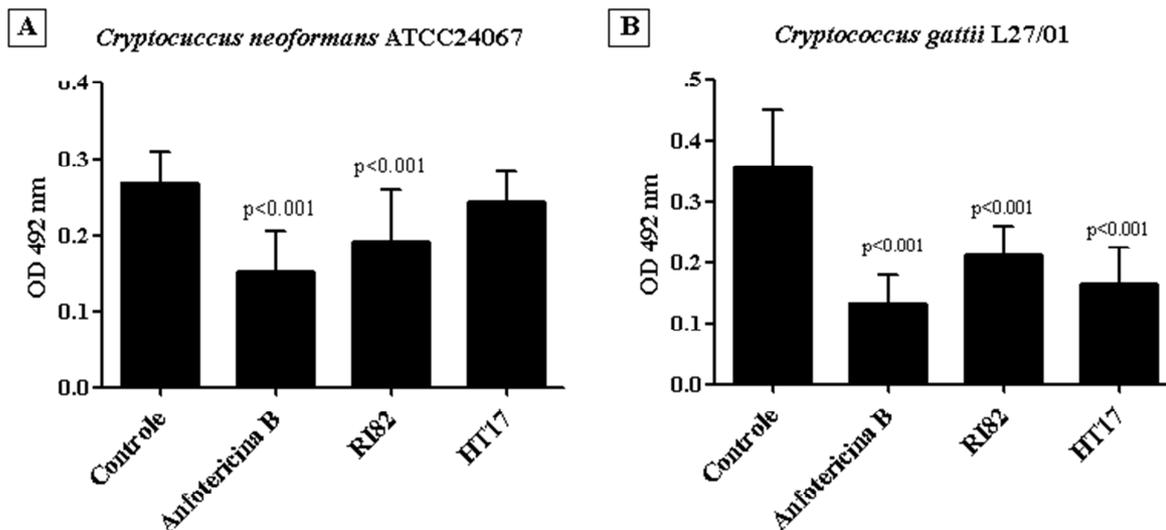
Para investigar a presença de dano na parede celular de *Cryptococcus* spp. após o tratamento com as substâncias **HTI 7** e **RI 82** foi realizado o ensaio de microdiluição em caldo utilizando o meio RPMI acrescido do sorbitol com protetor osmótico. No entanto, neste ensaio não foi possível observar diferença nos resultados da CIM com ou sem sorbitol, (Tabela 10). Portanto, podemos aferir que possivelmente o alvo de ação das substâncias não está localizado na parede celular da levedura.

**Tabela 10** – Resultado da concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias **RI 82** e **HTI 7** contra isolados de *Cryptococcus* spp. em meio RPMI com e sem sorbitol.

		Meio RPMI com sorbitol		Meio RPMI	
		RI82	HTI7	RI82	HTI7
Isolados		Concentração inibitória mínima (µg/ml)			
<b>72 horas</b>					
<i>C. gattii</i>	ATCC24065	1,9	1,9	1,9	3,9
<i>C. gattii</i>	L27/01	1,9	3,9	1,9	3,9
<i>C. neoformans</i>	ATCC24067	1,9	7,8	1,9	7,8
<i>C. neoformans</i>	CN31	1,9	7,8	1,9	7,8
<b>10 dias</b>					
<i>C. gattii</i>	ATCC24065	1,9	3,9	1,9	3,9
<i>C. gattii</i>	L27/01	1,9	3,9	1,9	3,9
<i>C. neoformans</i>	ATCC24067	1,9	15,6	1,9	15,6
<i>C. neoformans</i>	CN31	1,9	15,6	1,9	15,6

### 5.13. Avaliação da viabilidade do biofilme

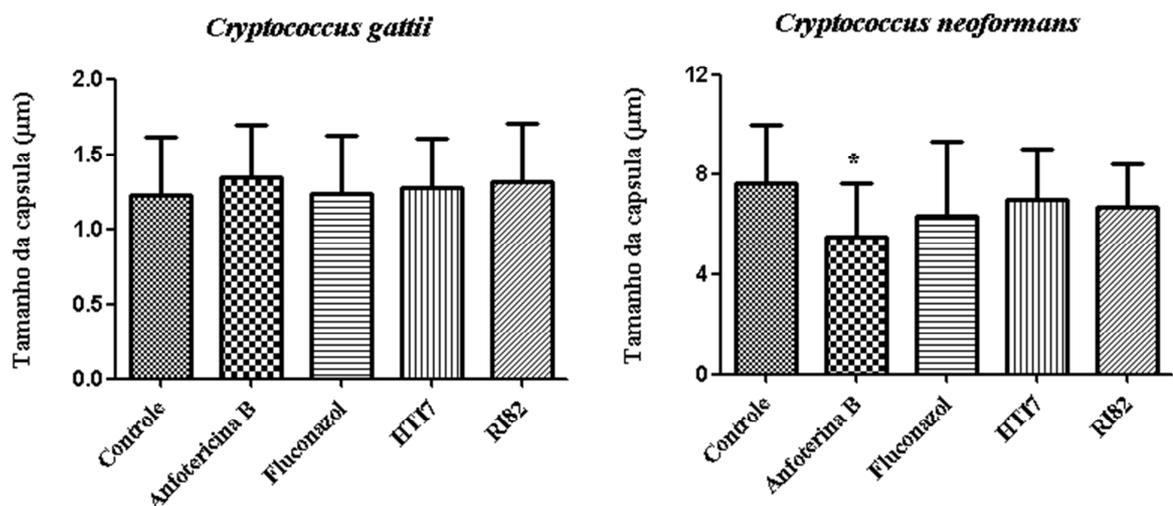
A integridade do biofilme de *C. neoformans* (ATCC24067) frente à anfotericina B e a substância **RI 82** mostrou diferença significativa em relação ao controle de crescimento, porém, a substância **HTI 7** não apresentou diferença significativa em relação ao controle positivo de crescimento do *C. neoformans*. A avaliação da integridade do biofilme para o isolado de *C. gattii* (L27/01) mostrou diferença significativa em relação ao controle de crescimento frente à anfotericina B e as substâncias **RI 82** e **HTI 7** (Figura 17).



**Figura 17** – Integridade do biofilme de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* frente as substâncias **HTI 7** e **RI 82** legenda de figura é embaixo. **Legenda:** Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Neste estudo os valores foram significativos em valores de  $p < 0.001$ .

#### 5.14. Determinação da interferência dos antifúngicos e substâncias em relação ao tamanho da cápsula

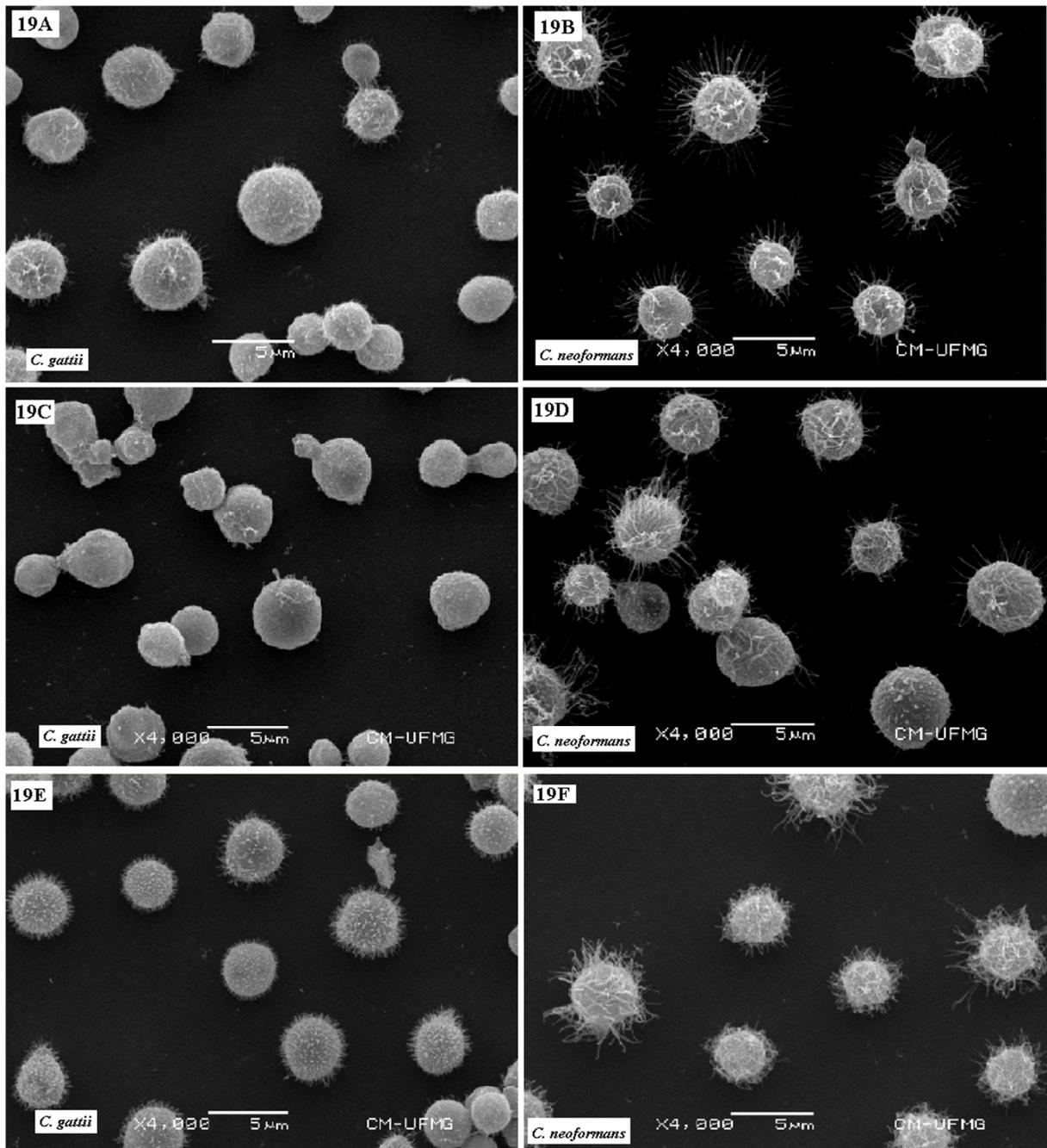
Na avaliação do tamanho da cápsula dos isolados L27/01 e ATCC24065 de *C. gattii* e ATCC24067 e CN31 de *C. neoformans* tratados com a anfotericina B, fluconazol e com as substâncias **RI 82** e **HTI 7**, foi observado que não ocorreu diferença significativa do tamanho da cápsula, quando tratados com o fluconazol e as substâncias RI 82 e HTI 7 em relação aos controles que não receberam tratamento (Figura 18). Em contrapartida, observou-se uma diferença significativa quando observado o tamanho da cápsula de *C. neoformans* tratado com a anfotericina B. Esse resultado pode ser um indicio que as substâncias de estudo não possuem seu alvo de ação na cápsula ou em sua via de biossíntese das células criptocócicas.



**Figura 18** – Avaliação do tamanho da cápsula de dois isolados de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* tratados com a anfoterina B, fluconazol e com as substâncias HTI 7 e RI 82.  $p < 0.001$ .

### 5.15. Microscopia eletrônica de Varredura

Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que as células de *C. gattii* (L27/01) e *C. neoformans* (ATCC 24067) tratadas com a concentração de CIM da substância **RI82**, não apresentaram visualmente muitas diferenças morfológicas em relação a cápsula quando se compara com as células de *Cryptococcus* que não receberam o tratamento com a substância (Figura 19C e 19D). Entretanto, as células de *C. gattii* (L27/01) e de *C. neoformans* (ATCC 24067) que receberam o tratamento com a substância **HTI 7** na concentração de CIM (Figura 19E,19F), apresentaram, visualmente, as fibras capsulares mais alongadas em comparação com o controle que não recebeu o tratamento.



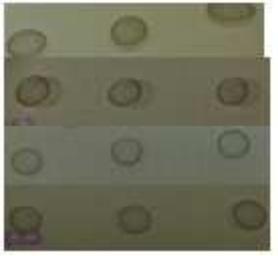
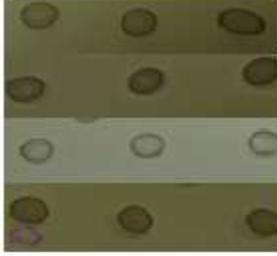
**Figura 19** – Microscopia eletrônica de Varredura. 19A) Controle de crescimento de *C. gattii* (L27/01). 19B) Controle de crescimento de *C. neoformans* (ATCC 24067). 19C) Células de *C. gattii* tratadas com a CIM da substância RI 82. 19D) Células de *C. neoformans* tratadas com a CIM da substância RI 82. 19E) Células de *C. gattii* tratadas com a CIM da substância HTI 7. 19F) Células de *C. neoformans* tratadas com a CIM da substância HTI 7.

### 5.16. Verificação da interferência na produção de melanina por *Cryptococcus* spp. quando tratado com as substâncias teste

A avaliação da produção de melanina foi feita visualmente. O *C. gattii* (L27/01) foi plaqueado em meio L-dopa com as concentrações sub-inibitórias, CIM e 2X a CIM das substâncias **RI 82** e **HTI 7**. Na avaliação da produção de melanina após o tratamento com a substância **RI 82**, em 48 horas foi observado que ocorreu uma diminuição da multiplicação celular da levedura, principalmente nas maiores concentrações das substâncias no meio. Interessantemente, na concentração de 3,9 µg/ml da substância **RI 82**, é possível notar visualmente uma diminuição no crescimento fúngico e um possível atraso na produção de melanina de *C. gattii* em 48 horas. Somente em 72 horas é que as colônias de *C. gattii* tratadas com a **RI 82** apresentam um início de melanização. Na concentração de 2X a CIM (7,8 µg/ml), *C. gattii* não apresentou crescimento. Quando o *C. gattii* foi plaqueado em meio L-dopa contendo a substância **HTI 7**, a levedura não mostrou diferença visual em relação à quantidade de massa celular e produção de melanina em comparação com o controle em 48 e 72 horas (quadro 1).

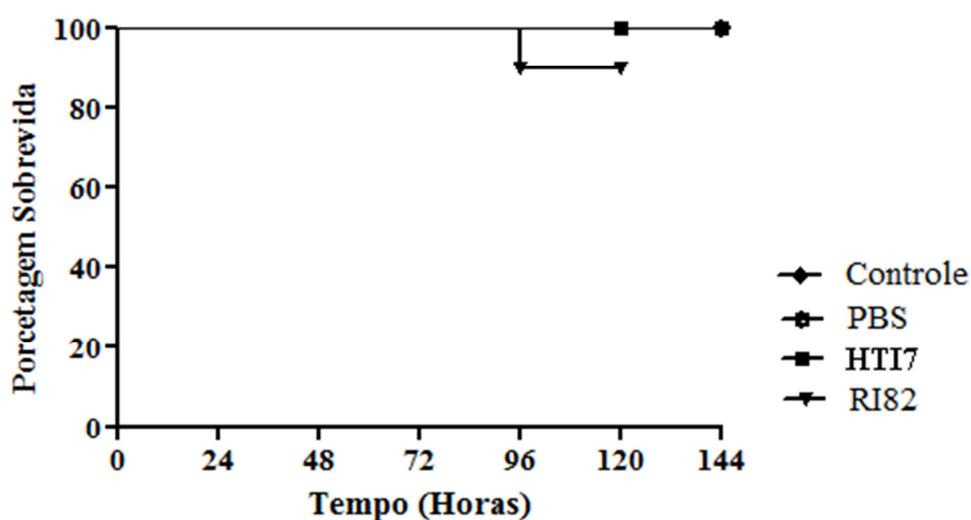
Para *C. neoformans*, não foram observadas diferenças visuais na produção de melanina quando tratada com as duas substâncias teste. Quando as células de *C. neoformans* foram plaqueadas em meio L-dopa com a presença da substância **RI 82**, observou-se uma diminuição da colônia fúngica quando a concentração da substância foi aumentando no meio L-dopa em ambos os tempos testados. Na concentração de 3,9 µg/ml, a produção de melanina foi proporcional à quantidade de massa celular. Também não houve crescimento na concentração de 7,8 µg/ml. Quando plaqueadas em contato com a substância **HTI 7** ocorreu a diminuição da massa celular da levedura e a produção da melanina foi proporcional à quantidade de massa celular nos tempos de 48 e 72 horas (quadro 1).

**Quadro 1** – Avaliação da produção de melanina de isolados de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* após tratamento com as substâncias RI 82 e HTI 7.

<i>Cryptococcus gattii</i> (L27/01)	
48 horas	72 horas
 <p>Controle de crescimento 1,9µg/ml (RI82) 3,9µg/ml (RI82) 7,8µg/ml (RI82)</p>  <p>Controle de crescimento 3,9µg/ml (HTI7) 7,8µg/ml (HTI7) 15,6µg/ml (HTI7)</p>	 <p>Controle de crescimento 1,9µg/ml (RI82) 3,9µg/ml (RI82) 7,8µg/ml (RI82)</p>  <p>Controle de crescimento 3,9µg/ml (HTI7) 7,8µg/ml (HTI7) 15,6µg/ml (HTI7)</p>
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC24067)	
48 horas	72 horas
 <p>Controle de crescimento 1,9µg/ml (RI82) 3,9µg/ml (RI82) 7,8µg/ml (RI82)</p>  <p>Controle de crescimento 3,9µg/ml (HTI7) 7,8µg/ml (HTI7) 15,6µg/ml (HTI7)</p>	 <p>Controle de crescimento 1,9µg/ml (RI82) 3,9µg/ml (RI82) 7,8µg/ml (RI82)</p>  <p>Controle de crescimento 3,9µg/ml (HTI7) 7,8µg/ml (HTI7) 15,6µg/ml (HTI7)</p>

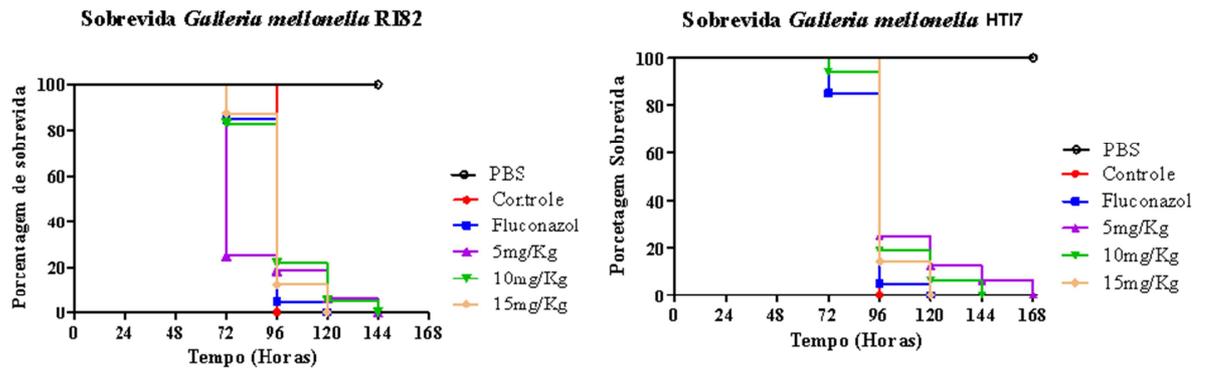
### 5.17. Avaliação da toxicidade das substâncias e sobrevida em *Galleria mellonella*

No ensaio de toxicidade, foi visto que a *Galleria mellonella* apresentou 100% de sobrevivência quando tratadas com a substância **HTI 7** (10 mg/kg) por 6 dias, resultado igual a utilização de somente o PBS e ao controle sem manipulação das larvas. Para a substância **RI 82** (10 mg/kg) a porcentagem de sobrevivência de *Galleria mellonella* foi de 90% (Figura 20).



**Figura 20** – Porcentagem de sobrevivência de *Galleria mellonella* tratadas com as substâncias **RI 82** e **HTI7** (10 mg/kg) .

No ensaio de sobrevida de *G. mellonella* infectada com *C. neoformans* (KN99 $\alpha$ ) e tratada com o fluconazol, não foi possível observar diferença significativa em relação ao controle de infecção que não recebeu o tratamento. Em contrapartida, o tratamento com a dose de 5 mg/kg com a substância **HTI 7** apresentou diferença significativa em relação ao controle de infecção (Figura 21). Portanto, infere-se, que a dose de 5 mg/kg prolongou a sobrevida de *Galleria mellonella*. Além disso, o tratamento de 5 mg/kg com a substância **HTI 7** apresentou diferença significativa em relação ao tratamento com o fluconazol. Também foi notório que os tratamentos com 10 e 15 mg/kg com as substâncias, prolongaram em até dois dias a sobrevida das larvas, porém, não foram diferentes estatisticamente em relação ao controle.



**Figura 21** – Porcentagem de sobrevida da *Galleria mellonella* tratada com o fluconazol e com as substâncias RI 82 e HTI 7.

## 6. DISCUSSÃO

As doenças fúngicas estão dispersas mundialmente e estima-se que cerca de 1,2 bilhões de pessoas irão sofrer com alguma doença fúngica (BROWN et al., 2012; VOS et al., 2012). Em 1990 ocorreram grandes avanços na produção dos antifúngicos, como, o surgimento dos agentes azólicos de segunda geração, o surgimento das equinocandinas e as formulações lipídicas da anfotericina B, porém, desde então, o desenvolvimento dos fármacos tem praticamente paralisado (GAFFI, 2016). Desse modo, é crucial a busca por novos antifúngicos que tenham seletividade por células fúngicas, que apresentem baixa toxicidade para células de mamíferos, que busquem por alvos distintos aos alvos existentes e que o paciente tenha uma melhora rápida e satisfatória da doença.

No presente estudo foram triadas 81 substâncias sintéticas para verificação de uma substância com promissora atividade anticriptocócica. Dentre as 81 substâncias utilizadas, foram selecionadas apenas duas da classe dos heterociclos tiazólicos, nomeadas como **RI 82** e **HTI 7**. As substâncias são inéditas e a descrição de suas atividades antimicrobianas estão descritas no presente trabalho. Pereira de Sá e colaboradores (2015), já haviam mostrado anteriormente que a classe dos heterociclos tiazólicos são substâncias com baixa toxicidade e que possuem ação contra *C. neoformans* e *C. gattii*, o que corroborou com os resultados encontrados no estudo. Os heterociclos tiazólicos são agentes que já foram comprovados quanto a sua ação anti-inflamatória, anticonvulsivante, hipoglicemiante, antimicrobiana, anti-inflamatória e analgésica (GORCZYNSKI et al., 2004; HOLLA et al., 2003; KUMAR et al. 2007; LESYK et al., 2006) e, portanto são substâncias com promissora atividade biológica.

### 6.1. Identificação genotípica dos isolados de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* do presente estudo

Em 1993, Meyer e colaboradores propuseram a utilização do primer (GTG)<sub>5</sub> para a diferenciação da sorotipagem de *Cryptococcus* spp. e mostraram que tal primer era capaz de diferenciar as espécies de *C. neoformans* (sorotipos A e D) e *C. gattii* (sorotipos B e C) e

indagaram a possibilidade de futuramente cada sorotipo ser classificado como espécies distintas de *Cryptococcus* ssp. Entretanto, somente em 2015, Hagen e colaboradores propuseram a divisão de *C. gattii* em 7 espécies distintas e *C. neoformans* em 2 espécie mais um híbrido. *C. neoformans* possui os genótipos VNI, VNII, VNIII e VNIV e o *C. gattii* os genótipos VGI, VGII, VGIII e VGIV (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; KIDD et al., 2004).

No presente estudo, 70,58% dos isolados de *C. neoformans* foram classificados como *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, sorotipo A, utilizando o primer GTG<sub>5</sub>, corroborando com Lin (2009), que aponta o *C. neoformans* var. *grubii* como a causa de aproximadamente 95% das infecções criptocócicas mundiais. 23,52% dos isolados parearam com os genótipos VNIII e VNIV que ficaram similares entre si e os demais isolados, não parearam com nenhum isolado de referência. Já a análise molecular dos isolados *C. gattii*, foi observado que 41,17% dos isolados parearam com o controle de referência VGII, assim como foi visto em um estudo de levantamento de Martins e colaboradores (2011), que verificaram o genótipo VGII como prevalente no Brasil.

Nogueira e colaboradores (2015) utilizaram o iniciador (GTG)<sub>5</sub> para identificar 41 isolados de *C. neoformans* causando infecção em pacientes. Dentre os 41 isolados, foi possível diferenciá-los quanto ao genótipo VNI e VNII, onde, 97,4% (38 isolados) foram identificados como VNI e 2,6% (3 isolados) foram identificados como VNII. Em contrapartida, esse fato não foi visto no presente estudo, onde não foi possível diferenciar os genótipos VNI e VNII, porém, conseguimos identifica-los como *C. neoformans* variedade *grubii*. O iniciador (GTG)<sub>5</sub>, é muito utilizado para a identificação genotípica do complexo *C. neoformans* / *C. gattii* (ESCADÓN; MONTILLA; 2010; NOGUERA; ESCANDÓN; CASTAÑEDA, 2015; VÉLEZ; ESCANDÓN, 2016). Vélez e Escandón (2016), fizeram a identificação genotípica utilizando os iniciadores (GTG)<sub>5</sub> e URA5 e, obtiveram o mesmo resultado dos genótipos nos dois testes. Mas no entanto, estes mesmos autores relataram que é mais a comparação do bandejamento dos isolados utilizando o iniciador URA5 é melhor em relação ao iniciador (GTG)<sub>5</sub>, pois, a quantidade de bandas é menor e existe uma maior especificidade para cada isolado. Portanto, é de interesse fazer a cofirmação dos resultados utilizando o iniciador URA5.

## 6.2. Triagem das substâncias com potencial antifúngico e teste de análise citotóxica

Antes de investigar os possíveis danos de uma substância promissora como agente antimicrobiano, é importante realizar ensaios de citotoxicidade, que são de extrema importância quando se trata da busca por novos fármacos (PAGANO; FAGGIO, 2015). Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* demonstram se uma determinada substância é tóxica para as células de mamíferos, determinando o número de células viáveis restantes após um período de incubação com a substância de estudo. Essa abordagem consiste em utilizar um método conveniente que prevê a toxicidade *in vivo* das substâncias através da medição do número de células viáveis em comparação com os controles que não receberam o tratamento das substâncias (RISS; MORAVEC; NILES, et al.,2011).

A avaliação da citotoxicidade das substâncias utilizadas no presente trabalho foi realizada frente a macrófagos peritoneais murinos, e frente a macrófagos BMDM (do inglês: *Bone Marrow-derived Macrophage* ). A viabilidade celular dos macrófagos peritoneais foi avaliada a partir do valor de IC50 que representa a concentração da substância que foi capaz de inibir 50% da viabilidade celular dos macrófagos. O IC50 das substâncias **RI 82** e **HTI 7** não foi encontrado, ou seja, as substâncias testadas não apresentaram toxicidade para os macrófagos na maior concentração testada. No entanto, o IC50 da substância **RI06** ficou entre 20 e 100 µg/ml. A citotoxicidade, utilizando os macrófagos BMDM - de medula óssea, foi realizada através da visualização em microscópio eletrônico de fluorescência. Desta forma pode-se observar o local de um possível dano na célula de mamífero a partir da exposição à determinada substância. A toxicidade da substância **RI 06** no valor da CIM (31,25 µg/ml) foi confirmada quando visto em microscópio eletrônico de fluorescência que a estrutura celular dos macrófagos apresentavam o citoesqueleto danificado, ao contrário de quando observou a estrutura dos macrófagos na presença das substâncias **RI 82** e **HTI 7**, onde, a estrutura celular dos macrófagos estava intacta, semelhante ao controle sem tratamento. Portanto, utilizando tanto os macrófagos peritoneais como os macrófagos BMDM foi observado que as substâncias **RI 82** e **HTI 7** não apresentaram toxicidade nas condições testadas do presente trabalho.

O ensaio de citotoxicidade para avaliar a taxa de hemólise dos eritrócitos foi executado também, pois, uma das principais funções dos eritrócitos é carrear o oxigênio pelo sistema

circulatório, qualquer alteração nessa função pode ser fatal ao indivíduo (PAGANO; FAGGIO, 2015). A taxa de hemólise dos eritrócitos humanos frente às substâncias **RI 82** e **HTI 7** foram menores que 5%. De acordo com Ralph e colaboradores (2009), a porcentagem de hemólise dos eritrócitos para uma substância não ser considerada tóxica é de 0 a 9%, com isso, as substâncias em estudo não são consideradas tóxicas contra os eritrócitos humanos.

Outro fator importante a ser avaliado em uma substância com o potencial de um possível fármaco é a sua lipossolubilidade. A finalidade dessa análise é avaliar de forma quantitativa, a influência da hidrofobicidade sobre a atividade antimicrobiana. A lipossolubilidade das substâncias nos indica a biodisponibilidade da substância nos órgãos e tecidos do indivíduo (LIPINSKI et al., 2001). A substância **HTI 7** apresentou  $ClogP = 6,2$  e a substância **RI 82**  $ClogP = 3,97$ . Segundo Lipinski (2001), para uma substância ser considerada boa para atravessar passivamente membranas biológicas, tem que apresentar um  $ClogP$  menor que 5, o que foi visto somente no composto **RI 82**. A influência da hidrofobicidade, denotada pelo descritor  $ClogP$ , sobre a potência antimicrobiana, está primordialmente relacionada à necessidade de um balanço lipofílico-hidrofílico, a fim de possibilitar a ocorrência de processos de difusão através de membranas biológicas para posterior desencadeamento da referida atividade.

No presente trabalho também foi calculado os valores de índice de seletividade das substâncias selecionada. Segundo Protopopova e colaboradores (2005), valores do índice de seletividade iguais ou maiores que 10, conferem a seletividade da substância por células microbianas em relação à célula normal do hospedeiro. No presente trabalho, a média do índice de seletividade para as células fúngicas foi de 263,16 para a substância **RI 82**, valor 26 vezes maior que o mínimo aceitável e 32,05 para a substância **HTI 7**. Quanto maior o valor do índice de seletividade, mais segura será a substância e indica como bons candidatos para estudo *in vivo* (MAGALHÃES et al., 2013).

Para avaliação da citotoxicidade das substâncias **RI 82** e **HTI 7** em modelo *in vivo*, foi utilizada a *G. mellonella*. A *G. mellonella* é um ótimo modelo para investigar a toxicidade de compostos e toxinas (CHAMPION; WAGLEY; TITBALL, 2016). A sobrevivência de *G. mellonella* foi de 100% quando tratada com a substância **HTI 7** e 90% quando tratadas com a substância **RI 82**, indicando que as substâncias em estudo não foram tóxicas para a larva. Quando comparado a sobrevivência de *G. mellonella* infectada com *C. neoformans* (KN99a) e tratada com 5 mg/kg das substâncias, foi visto que a taxa de sobrevivência aumentou em relação

ao controle de infecção que não recebeu o tratamento com as substâncias. A partir disso, ensaios *in vivo* utilizando modelo murino seriam adequados para uma melhor investigação da substância. A *G. mellonella* tem sido usada como um modelo de infecção alternativo desde o ano de 1980 e sua utilização em estudo de doenças bacterianas e fúngicas e, descoberta de novos antimicrobianos tem sido utilizada de forma abrangente (CHAMPION; WAGLEY; TITBALL, 2016). Mylonakis e colaboradores (2005) investigaram e padronizaram o uso de *G. mellonella* para o estudo da infecção por *C. neoformans* e concluíram que esse modelo é ideal para execução de tal investigação. Esta larva apresenta vantagens em relação aos experimentos que utilizam modelos animais, pois, as larvas são mais baratas e fáceis de manter, não necessita de laboratórios especializados e não requer aprovação no conselho de ética (TSAI; LOH; PROFT, 2016).

### **6.3. Avaliação da susceptibilidade de diversos isolados de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* e ensaios de viabilidade celular**

Com o aumento da incidência de infecções sistêmicas por fungos e a busca por novos agentes antifúngicos, surgiu a padronização de ensaios laboratoriais para orientar a seleção da terapia antifúngica e verificar possíveis novos agentes antifúngicos (CLSI, 2008). O ensaio de microdiluição em caldo para a verificação da concentração inibitória mínima é importante e vantajosa para a triagem inicial da busca de um novo fármaco com atividade antimicrobiana.

Utilizando os ensaios de microdiluição em caldo no presente trabalho pode-se observar que todos os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* estudados são suscetíveis ao fluconazol, onde o maior valor de CIM encontrado foi para o isolado 96806 de *C. neoformans* com CIM de 8 µg/ml. Valores  $\leq 8$  µg/ml de CIM caracterizam a sensibilidade ao fluconazol. Para anfotericina B os isolados são sensíveis quando sua CIM é  $\leq 1,0$  µg/ml e resistentes quando a CIM é  $\geq 2,0$  µg/ml (CLSI, 2008). No presente trabalho foi observado também que o isolado 230933 de *C. gattii* apresentou valor de CIM de 2,0 µg/ml para a anfotericina B. O maior valor de CIM encontrado para a substância **RI 82** foi de 3,9 µg/ml para diversos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*. A substância **HTI 7** apresentou o maior valor de CIM de 31,25 µg/ml para uma série de isolados de *Cryptococcus* spp.

Frequentemente, a resistência antifúngica surge durante o curso do tratamento clínico, entretanto, muitos isolados patogênicos podem ter resistência intrínseca a drogas antes mesmo de entrarem em contato com elas. O fenômeno conhecido como regra dos “90-60”, informa que, os isolados microbiológicos que mostram como sensíveis em ensaios *in vitro* respondem apropriadamente a terapia antifúngica em aproximadamente 90% dos casos, já os isolados que se mostram resistentes respondem 60% ao tratamento, apesar da sua resistência *in vitro* à droga. Esta regra é aplicável desde a década de 1960 para a maioria dos micro-organismos e continua sendo usada até os dias atuais (ZAVREL; WHITE, 2015). Mesmo tendo o fenômeno como base, a interação entre drogas e infecção fúngica depende de diversos fatores, incluindo, a espécie do patógeno clínico, sua linhagem, a susceptibilidade, forma de crescimento, dose da droga administrada, o sítio da infecção e o sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, os antifúngicos são mais eficazes contra as células microbianas em crescimento ativo do que células quiescentes, com baixo potencial proliferativo (REX; PFALLER, 2002).

No presente estudo, observou-se que as substâncias tiazolínicas foram capazes de inibir a viabilidade celular da levedura, mostrando uma promissora atividade *in vitro* contra isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*. As curvas de morte das substâncias foram comparadas com a curva de morte do fluconazol na concentração de CIM e 2X a CIM, onde, a cinética da ação antifúngica das substâncias e do fluconazol foram acompanhadas. Na concentração de CIM e 2X a CIM, o fluconazol e as substâncias **RI 82** e **HTI 7** apresentaram um declínio da viabilidade celular no tempo de 12 horas, e esse declínio foi percebido até o tempo de 72 horas alcançando a porcentagem de 20% de células viáveis de *C. neoformans* e *C. gattii*. Em um ensaio *in vitro* com *C. gattii*, Santos e colaboradores (2012) também observaram um declínio de células viáveis no período de 12 horas, porém, alcançou um percentual de sobrevivência de 20% das células criptocócias no tempo de 48 horas para a concentração de CIM utilizando o fluconazol. Esse tempo caiu para 36 horas quando utilizaram a concentração de 2X a CIM, o que não foi visto em nosso estudo para os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Ao testar as interações *in vitro* entre as substâncias **RI 82** e **HTI 7** com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol, verificou-se que os valores médios de ICIF foram indiferentes à combinação. De acordo com Cuenca-Estrella (2004), quando os valores de ICIF são indiferentes indica que os fármacos em combinação não possuem efeitos adversos sobre a resposta terapêutica.

#### 6.4. Inibição de possíveis fatores de virulência e danos na estrutura celular de *Cryptococcus* spp. frente ao tratamento com as substâncias RI 82 e HTI 7

Os macrófagos são as principais células do sistema imunológico a interagirem com o *Cryptococcus* e a possível aceleração da fagocitose das células microbianas auxilia o sistema imunológico a reconhecer os micro-organismos invasores (MANSOUR et al., 2014). Em contrapartida, as espécies de *Cryptococcus* são organismos intracelulares facultativos com a capacidade de persistir durante anos em indivíduos colonizados, desde modo, a latência do micro-organismo no hospedeiro pode evoluir para um infecção caso ocorra um distúrbio imunológico (ALANIO; DESNOS-OLLIVIER; DROMERA, 2011). Porém no presente trabalho na avaliação do índice fagocítico, observou-se que não houve diferença significativa em relação ao controle, quando os macrófagos murinos foram tratados com as substâncias **HTI 7** e **RI 82** por duas horas e posteriormente entraram em contato com as células de *C. gattii* (L27/01).

A produção da matriz extracelular em *Cryptococcus* spp. é uma das estratégias dos fungos para se protegerem contra os antifúngicos (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006a). A partir disso, a avaliação da integridade e a possível desordem que um fármaco pode causar no biofilme é importante, pois, a desordem da matriz polimérica do biofilme fará com que o antifúngico atinja o maior número de células fúngicas planctônicas. No presente estudo, o biofilme foi previamente formado em placas de 96 poços por 24 horas e em seguida tratado com as substâncias **RI82** e **HTI 7**. Diante disso, notamos que as duas substâncias causaram uma desintegridade do biofilme de *C. gattii*, porém, somente a substância **RI 82** desintegrou o biofilme de *C. neoformans*. Esse processo mostrou que as substâncias foram capazes de desintegrar a matriz polimérica de *Cryptococcus* spp. quando avaliado a transmitância das amostras tratadas com as que não receberam o tratamento. O biofilme do *C. neoformans* exibe níveis mais altos de resistência antifúngica em comparação com células planctônicas (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006a) e também são mais resistentes às moléculas antimicrobianas produzidas pelas células do sistema imunológico (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006b).

A cápsula é um importante fator de virulência para *Cryptococcus* spp. pois pode interferir na fagocitose pelos macrófagos, esgota componentes do complemento, inibe a resposta imunológica do hospedeiro e a atividade de agentes antifúngicos. Já foi relado que

*Cryptococcus* spp. acápsulares não são virulentos (BOSE et al., 2003; MCFADDEN; CASADEVALL, 2001; ZARAGOZA et al., 2008). Porém, foi visto no presente estudo através da microscopia óptica, que as substâncias **RI 82** e **HTI 7** não foram capazes de interferir no tamanho da cápsula da levedura em relação ao controle de crescimento sem tratamento. Através da microscopia eletrônica de varredura, foi observado que o isolado de *C. gattii* (L27/01) tratado com a concentração de CIM da substância **HTI 7** apresentou uma maior quantidade de fibras capsulares em relação com o controle sem tratamento, indicando que possivelmente a célula da levedura detectou a substância como um sinal de perigo ou sinal de alerta de fagócito (CHRISMAN et al., 2011). Diante disso, é interessante fazer outros estudos para avaliar a atuação da substância na cápsula de *Cryptococcus* spp. como, medir o tamanho das fibras capsulares com o programa Image J e fazer a comparação das células tratadas com as não tratadas.

O extravasamento do material genético informa que possivelmente ocorreu a ruptura na membrana celular do micro-organismo. Em um estudo com utilizando timol realizado por Bennis e colaboradores (2004), foi visto que a ação do timol na membrana plasmática ocorreu no momento de multiplicação celular da *Saccharomyces cerevisiae*. No presente estudo possivelmente ocorreu o mesmo, pois no período de 2 horas observamos um aumento no extravasamento celular de *C. gattii* quando tratado com o fluconazol, anfotericina B e com as substâncias **RI 82** e **HTI 7**. Neste período, a multiplicação celular da levedura é elevada.

A parede celular do *Cryptococcus* é uma organela essencial que confere estrutura e integridade celular (BAKER, 2011). O sorbitol é um protetor osmótico, se a parede celular da levedura apresentar algum dano, o sorbitol irá proteger a célula da perda da homeostasia (FROST et al. 1995), a partir disso, foi feito o ensaio de microdiluição em caldo utilizando o meio de cultura RPMI acrescido de sorbitol e verificamos que o sorbitol não conferiu alterações nos resultados da CIM, levando a acreditar que as substâncias estudadas não estão ocasionando danos na parede celular fúngica.

Nos ensaios para avaliação da produção da melanina foi observado que a substância **RI 82** possivelmente levou a um retardo retardou da produção da melanina em *C. gattii*, sendo que o L3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-dopa) estava presente em abundância no meio de cultura. A produção da melanina depende da enzima lacase e de compostos exógenos (BOSE et al., 2003; GRANGER; PERFECT; DURACK, 1985), como as catecolaminas, que estão presentes no sistema nervoso central (SNC) do hospedeiro, sendo esse fato associado ao tropismo do

fungo pelo SNC. Como a substância **RI 82** diminuiu visualmente a produção de melanina e possivelmente retardou a levedura em usar o L-dopa para a produção da melanina no ensaio *in vitro*, um ensaio de comparação *in vivo* seria interessante para avaliar se a substância retardaria a disseminação da levedura para o SNC. A melanina e a via de biossíntese da melanina são de fato, potenciais alvos de ação para novos fármacos antimicrobianos (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015).

## 7. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que as novas substâncias que foram descritas e estudadas no presente trabalho, **RI 82** e **HTI 7**, mostraram baixos valores de CIM contra isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, baixa toxicidade frente as células de mamíferos e seletividade para as células criptocócicas em comparação com as células de mamíferos.

As características das duas substâncias selecionadas no presente trabalho as apontaram como um potente antifúngico para futuros ensaios *in vivo* utilizando modelo murino de infecção. Observou-se também que a substância **RI 82** apresentou  $ClogP = 3,97$ , onde mostra que a substância atravessa membranas biológicas com facilidade, sendo um bom indicador para o tratamento da neurocriptococose.

A substância **RI 82** retardou a produção da melanina em *C. gattii*. Sendo assim, interessante para o estudo *in vivo* utilizando mamíferos de pequeno porte para avaliar se a substância também retardaria a disseminação da levedura para o sistema nervoso central, pois é no SNC que o *Cryptococcus* consegue a catecolamina para a produção da melanina no hospedeiro.

Este estudo também mostrou uma diversidade genotípica entre os isolados do complexo *C. neoformans* / *C. gattii* em estudo e, que o iniciador (GTG)<sub>5</sub> é um bom diferenciador filogenético para esses isolados, porém, sendo necessário a confirmação utilizando outros iniciadores como o URA5 que é muito utilizado para este fim.

Portanto, a triagem de substâncias em classes sabidamente identificadas como bons antimicrobianos direciona para uma busca mais certa de um potencial fármaco. Diante disso, foi possível selecionar utilizando testes de citotoxicidade, ensaios de microdiluição em caldo e busca por um possível alvo de ação ou inibição de fatores de virulência as substâncias **RI 82** e **HTI 7** como promissoras para estudos futuros que comprovem a sua atividade também em modelos *in vivo* utilizando modelo murino de infecção.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEGG, M. A. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. **Mycopathologia**, v. 161, n. 2, p. 83–91, 2006.
- AIRES, E. M. Dor em pacientes HIV-positivos hospitalizados: aspectos clínicos e terapêuticos. São Paulo. (Dissertação de Mestrado - Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo). 2002.
- ALANIO, A.; DESNOS-OLLIVIER, M.; DROMERA, F. Dynamics of *Cryptococcus neoformans*-macrophage interactions reveal that fungal background influences outcome during cryptococcal meningoencephalitis in humans. **mBio**, v. 2, n. 4, p. 1–10, 2011.
- ALLEN, D. et al. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 13, n. 6, p. 787–98, 2015.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. v. 14, n. 12, p. 1173–1185, 2015.
- ALSPAUGH, J. A. et al. RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 352–365, 2000.
- ALVAREZ, M.; SAYLOR, C.; CASADEVALL, A.; Antibody action after phagocytosis promotes *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* macrophage exocytosis with biofilm-like microcolony formation. **Cell Microbiology**. v. 10, n.8, p.1622–1633, 2008.
- ALVES, S. H. et al. In vitro susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Southern of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 5, p. 267–70, 2001.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A et al. Quantitation of Ergosterol Content : Novel Method for Determination of Fluconazole Susceptibility of *Candida albicans* Quantitation of Ergosterol Content : Novel Method for Determination of Fluconazole Susceptibility of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3332–3337, 1999.
- BAKER, L. G.; SPECHT, C. A.; LODGE, J.K. Cell wall chitosan is necessary for virulence in the opportunistic pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1264–1268, 2011.
- BENNIS, S. et al. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 454–458, 2004.
- BERGOLD, A. .; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão new antifungic drugs: A review. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 5, n. 2, p. 159–172, 2004.
- BICANIC, T. et al. Fungal Burden, Early Fungicidal Activity, and Outcome in Cryptococcal Meningitis in Antiretroviral-Naive or Antiretroviral-Experienced Patients Treated with Amphotericin B or Fluconazole. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. 76–80, 2007.

BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin**, v. 72, p. 99–118, 2004.

BOSE, I. et al. A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. **MINIREVIEW A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 4, p. 655–663, 2003.

BOTTS, M. R. et al. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 4, p. 595–605, 2009.

BRIZENDINE, K. D.; PAPPAS, P. G. Cryptococcal meningitis: Current approaches to management in patients with and without AIDS. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 4, p. 299–305, 2010.

BROWN, G. D. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165rv13, p. 1–9, 2012.

CAO, X. et al. Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of novel thienopyrrolidone derivatives with strong antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 471–476, 2015.

CARRADORI, S. et al. Synthesis and cytotoxicity of novel (thiazol-2-yl)hydrazine derivatives as promising anti-*Candida* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, p. 102–111, 2013.

CASADEVALL, A. et al. Characterization of a Murine Monoclonal Antibody to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide That Is a Candidate for Human Therapeutic Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 1437–46, 1998.

CASADEVALL, A.; PERFECT J. R. *Cryptococcus neoformans*. **ASM Press**, Washington DC, 1998.

CASADEVALL, A; PIROFSKI, L. Insights into mechanisms of antibody-mediated immunity from studies with *Cryptococcus neoformans*. **Current molecular medicine**, v. 5, n. 4, p. 421–33, 2005.

CASTAÑÓN-OLIVARES, L.R et al. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin American countries. **Revista Latina Americana de Microbiologia**, v. 42, p. 35-40, 2000.

CHAI, L. Y. A. et al. *Aspergillus fumigatus* cell wall components differentially modulate host TLR2 and TLR4 responses. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 2, p. 151–159, 2011.

CHAMPION, O. L.; WAGLEY, S.; TITBALL, R. W. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. **[Http://Dx.Doi.Org/10.1080/21505594.2016.1203486](http://Dx.Doi.Org/10.1080/21505594.2016.1203486)**, v. 5594, n. July, 2016.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends Microbiol.** 19:564–571, 2011.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 507–544, 2006.

CHEN, S. et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31, n. 2, p. 499–508, 2000.

CHEN, S. C. et al. Antifungal therapy and management of complications of cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 57, n. 4, p. 543–51, 2013.

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

CHEN, S. C. A.; PLAYFORD, E. G.; SORRELL, T. C. Antifungal therapy in invasive fungal infections. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 5, p. 522–530, 2010.

CHRÉTIEN, F. et al. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 4, p. 522–530, 2002.

CHRISMAN, C. J. et al. Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, 2011.

CHRISTIANSON, J.; ENGBER, W.; ANDES, D. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. **Medical Mycology**. v. 41, n. 3, p. 177-188, 2003.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. CLSI document M27-A3, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. **The Tools for Virulence of Cryptococcus neoformans**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 87

COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 792–799, 2016.

CORRÊA, M. DO P. S. C. et al. Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 505–508, 1999.

COSTERTON, J. W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 1999, p. 1318–1322, 1999.

COWEN, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nat.Rev.Microbiol.**, v. 6, n. 1740–1534 (Electronic), p. 187–198, 2008.

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

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy - What value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 854–869, 2004.

DADACHOVA, E. et al. The radioprotective properties of fungal melanin are a function of its chemical composition, stable radical presence and spatial arrangement. **Pigment Cell and**

**Melanoma Research**, v. 21, n. 2, p. 192–199, 2008.

DEL VALLE, L.; PIÑA-OVIEDO, S. HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. **Front Biosci**, v.11, p. 718-732, 2006.

DE SOUZA, M. V. N. et al. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 77–84, 2005.

DENNING, D. W.; BROMLEY, M. J. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1414–1416, 2015.

DO PSE COSTA, S. et al. First isolation of *Cryptococcus gattii* molecular type VGII and *Cryptococcus neoformans* molecular type VNI from environmental sources in the city of Belém, Pará, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 662–664, 2009.

DOERING, T. L. How Sweet it is! Cell Wall Biogenesis and Polysaccharide Capsule Formation in *Cryptococcus neoformans*. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 223–247, 2009.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 33, n. 8, p. 1387–1392, 2001.

DROMER, F. et al. Major role for amphotericin B-flucytosine combination in severe cryptococcosis. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, 2008.

DUIN, D. VAN; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of. **Society**, v. 46, n. 11, p. 3394–3400, 2002.

EISENMAN, H. C. et al. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3683–3693, 2005.

EISENMAN, H. C. et al. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. **Microbiology**, v. 153, n. 12, p. 3954–3962, 2007.

EMMONS, E. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **American journal of hygiene**. v. 62, p. 227-232, 1955.

ESCANDÓN, Patricia; MONTILLA, Andrés. Tipificación molecular de aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. **Infectio**, v. 14, p. 127-130, 2010.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Multicenter study of isavuconazole mic distributions and epidemiological cutoff values for the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex using the clsi m27-a3 broth microdilution method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 666–668, 2015.

FELDMESSER, M. et al. The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 6, p. 1791–1795, 2000.

FROST, D. J. et al. Whole-Cell *Candida albicans* Assay for the Detection of Inhibitors Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. **The Journal of Antibiotics**, p. 306–310, 1995.

GAFFI. Global Action Fund for Fungal Infections. disponível em: <<http://www.gaffi.org/>>. Acesso em: 10 de novembro de 2016.

GHANNOUM, M. 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, 1999.

GILES, S. S. et al. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3491–3500, 2009.

GILMAN, A. G. et al. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. **New York: Pergamon Press**. ed.8, p. 1047-1057, 1990.

GLAUBER, G. R. et al. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides form branched and complex filamentous networks viewed by high-resolution microscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 193, n. 1, p. 75–82, 2016.

GOMEZ-LOPEZ, A. et al. In vitro susceptibility of *Cryptococcus gattii* clinical isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 7, p. 727–730, 2008.

GORCZYNSKI, M. J. et al. Synthesis and evaluation of substituted 4-aryloxy- and 4-arylsulfanyl-phenyl-2-aminothiazoles as inhibitors of human breast cancer cell proliferation. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 5, p. 1029–36, 2004.

GRANGER, D. L.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. T. Virulence of *Cryptococcus neoformans*: Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 2, p. 508–516, 1985.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. **Modelagem molecular de fármacos**. Revista Processos Químicos, v.2, n.4, p.24-26, 2008.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

GUIMARÃES, A. J. et al. *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size *in vitro* and *in vivo*. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 740–753, 2011.

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

HARRIS, J. R. et al. *Cryptococcus gattii* in the united states: Clinical aspects of infection with an emerging pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 12, p. 1188–1195, 2011.

HOANG, L. M. N. et al. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): Epidemiology, microbiology and histopathology. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 935–940, 2004.

HOLLA, B. S. et al. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 313–318, 2003.

IDNURM, A. et al. Deciphering the Model Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753–764, 2005.

IKEDA, R. et al. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiology and immunology**, v. 47, n. 4, p. 271–277, 2003.

JAMES, P. G. et al. Cell-wall glucans of *Cryptococcus neoformans* CAP 67. **Carbohydrate Research**, v. 198, n. 1, p. 23–38, 1990.

KAPLAN, J. E. et al. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); National Institutes of Health; **HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America**. **MMWR**. v. 58, p. 48–49, 2009.

KELLY, S. L. et al. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol delta 8-->7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. **FEMS microbiology letters**, v. 122, p. 39–42, 1994.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non-neoformans cryptococcal infections: A systematic review. **Infection**, v. 35, n. 2, p. 51–58, 2007.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17258–17263, 2004.

KLEEMANN, A.; ENGEL, J.; Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents and Applications. **Thieme Stuttgart**. ed.4, 2001.

KON, A. S. et al. Consenso em criptococose - 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524–544, 2008.

KRONSTAD, J. W.; HU, G.; JUNG, W. H. An encápsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 9, p. 457–465, 2013.

KRONSTAD, J.W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews Microbiology**. v. 9, p.193–203, 2011

KUMAR, B. R. P. Serum glucose and triglyceride lowering activity of some novel glitazones against dexamethazone-induced hiperlipidemia and insulin resistance. **Indian Journal of pharmacology**, v 39, p 299-302, 2007.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. The yeasts, a taxonomic study. 5th ed. **Elsevier**; Amsterdam: 2011.

KWON-CHUNG, K. J. et al. (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v. 51, n. 4, p. 804–806, 2002.

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

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; POPKIN, T. J. Melanin-lacking mutants of

*Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. **Journal of Bacteriology**, v. 150, n. 3, p. 1414–1421, 1982.

LACAZ, C.S. et al. Tratado de Micologia médica Lacaz; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

LAZÉRA, M. S. et al. Criptococose. In: Coura, J. F. (ed.), Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1223-1236, 2005.

LAZERA, M. S. et al. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 31, n. 6, p. 449-454, 1993.

LAZERA, M. S. et al. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 34, n.2, p. 127 - 131, 1996.

LESTER, S. J. et al. Clinicopathologic features of an unusual outbreak of cryptococcosis in dogs, cats, ferrets, and a bird: 38 cases (January to July 2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, n. 11, p. 1716–1722, 2004.

LESYK, R. et al. Anticancer thiopyrano[2,3-d][1,3]thiazol-2-ones with norbornane moiety. Synthesis, cytotoxicity, physico-chemical properties, and computational studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 15, p. 5230–5240, 2006.

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

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3–25, 2001.

LIU, X. Z. et al. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in Mycology**, v. 81, p. 85–147, 2015.

MAGALHÃES, T. F. F. et al. Hydroxyaldimines as potent in vitro anticryptococcal agents, **Letters in Applied Microbiology**. v. 57, p. 137 - 143, 2013.

MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: Assignment of diglucan. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 202–212, 2005.

MALIGIE, M. A.; SELITRENNIKOFF, C. P. *Cryptococcus neoformans* Resistance to Echinocandins : ( 1 , 3 ) beta -Glucan Synthase Activity Is Sensitive to Echinocandins. v. 49, n. 7, p. 2851–2856, 2005.

MANSOUR, M. K. et al. Macrophage–Cryptococcus Interactions: An Update. **Current Fungal Infection Reports**. v. 8, p.109 – 115, 2014.

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

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

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

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

MARTINS, L. M. S. et al. Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piau?? (northeastern Brazil). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 725–730, 2011.

MASUNARI, A.; TAVARES, L. C. Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente ( MRSA ). v. 42, 2006.

MATTEI, A. S. et al. Susceptibility of *Candida albicans* blood isolates to 3 antifungal drugs: Retrospective study in rio grande do sul, brazil, 1999-2009. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 30, n. 4, p. 243–247, 2013.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.

MCFADDEN, D. C. et al. Capsule structural heterogeneity and antigenic variation in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 8, p. 1464–1473, 2007.

MCFADDEN, D. C.; CASADEVALL, A. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. **Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 39 Suppl 1, n. 718, p. 19–30, 2001.

METZGER, J. V. The Chemistry of Heterocyclis Compounds – Thiazoles and its derivatives. **John Wiley & Sons, Inc.** v. 34, p 116 – 117, 1979.

MEYER, W. et al. Hybridization Probes for Conventional DNA-Fingerprinting Used as Single Primers in the Polymerase Chain-Reaction to Distinguish Strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2274–2280, 1993.

MEYER, W. et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - A pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiol. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1790–1799, 1999.

MEYER, W. et al. Capítulo 24. Molecular Typing of the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. In: **Cryptococcus: from human pathogen to model yeast**. HEITMAN, J. et al. 1ª edição. ASM Press, p. 327-357, 2011.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142–151, 2011.

MYLONAKIS, Eleftherios et al. *Galleria mellonella* as a model system to study

*Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, 2005.

Mitchell, T. G. et al. Capítulo 18. Environmental niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: **Cryptococcus: from human pathogen to model yeast**. HEITMAN, J. et al. 1ª edição. ASM Press, p. 237 - 257, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MSEDDI, F. et al. First Environmental Isolations of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Tunisia and Review of Published Studies on Environmental Isolations in Africa. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 355-360, 2011.

MUSIOL, R. et al. Quinoline-Based Antifungals. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 18, p. 1960-1973, 2010.

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

NETO, M. M.; FER, J.; CASTRO, D. Terapêutica das micoses profundas em pacientes transplantados renais. v. 18, n. 4, p. 369-374, 1996.

NETSKI, D.; KOZEL, T. R. Fc-dependent and Fc-independent opsonization of *Cryptococcus neoformans* by anticapsular monoclonal antibodies: Importance of epitope specificity. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2812-2819, 2002.

NISHIKAWA, M. M. et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Brazil: Analysis of Host and Regional Patterns Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Brazil: Analysis o. v. 41, n. 1, p. 73-77, 2003.

NOGUERA, M. C.; ESCANDÓN, P.; CASTAÑEDA, E. Cryptococcosis in Atlántico, Colombia: An approximation of the prevalence of this mycosis and the distribution of the etiological agent in the environment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 5, p. 580-586, 2015.

NOSANCHUK, J. et al. Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue. **The Lancet**, v. 355, p. 2049-2050, 2000.

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. 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.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal melanin: What do we know about structure? **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1-7, 2015.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

- O'MEARA, T. R.; ANDREW ALSPAUGH, J. The *Cryptococcus neoformans* capsule: A sword and a shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, 2012.
- ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: Mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.
- PAGANO, M.; FAGGIO, C. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. **Cell Biochemistry and Function**, v. 33, p. 351–355, 2015.
- PAPPALARDO, M.C.S.M. Criptococose em Aids: estudo clínico e microbiológico em 35 pacientes acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, entre 1995 a 1997. São Paulo. (Dissertação de Mestrado – Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria da Saúde de São Paulo), 2002.
- PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: A review of the Brazilian experience for the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 45, n. 6, p. 299–305, 2003.
- PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525–30, 2009.
- PEREIRA DE SÁ, N. et al. Thiazole compounds with activity against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 233–242, 2015.
- PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 2010.
- PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal Genetics and Biology**, v. 8, n. 5, p. 583–592, 2015.
- PERICOLINI, E. et al. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 267–275, 2006.
- PEETERMANS, W. et al. Fluconazole resistant *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an AIDS patient. **Acta clinica Belgica**, v.48, n.6, p. 405 – 409, 1993.
- PETTER, R. et al. A survey of heterobasidiomycetous yeasts for the presence of the genes homologous to virulence factors of *Filobasidiella neoformans*, CNLAC1 and CAP59. **Microbiology**, v. 147, n. 8, p. 2029–2036, 2001.
- PHILLIPS, P. et al. Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1368–1376, 2015.
- PINTO, V. L. et al. Criptococose associada à AIDS. A importância do cultivo da urina no seu diagnóstico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 230–232, 2006.
- PINTO JUNIOR, V. L. et al. *Cryptococcus gattii* molecular type VGII as agent of meningitis in a healthy child in Rio de Janeiro, Brazil: report of an autochthonous case. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 746–748, 2010.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: A review from 1996 to 2006. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513–521, 2009.

PRICE, M. S. et al. *Cryptococcus neoformans* requires a functional glycolytic pathway for disease but not persistence in the host. **mBio**, v. 2, n. 3, p. 1–10, 2011.

PROTOPOPOVA, M. et al. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 968–974, 2005.

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. 35, n. 4, p. 421–427, 2015.

RALPH, A. et al. Avaliação da citotoxicidade de naftoquinonas sintéticas em modelo de *Artemia franciscana* e eritrócitos. Resumo apresentado na 61ª Reunião Anual da SBPC, 2009.

REGASSINI, L. O. et al. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. *African Journal of Biotechnology*. v.8, n.12, p. 2866 - 2870, 2009.

REIS-FILHO, J. B. et. al. O líquido cefalorraquiano inicial nas meningoencefalites por *Cryptococcus neoformans*. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**. v. 27, p. 173 - 178, 1985.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has Antifungal Susceptibility Testing Come of Age? DEGREE OF CORRELATION BETWEEN IN VITRO AND IN. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 982–989, 2002.

RISS, T. L., MORAVEC, R. A., NILES, A. L. Cytotoxicity Testing: Measuring Viable Cells, Dead Cells, and Detecting Mechanism of Cell Death. In: Martin J. S. (ed.), *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 740, © Springer Science Business Media, LLC, 2011.

RODRIGUES, M. L. et al. Fungal polysaccharides: Biological activity beyond the usual structural properties. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. AUG, p. 1–4, 2011.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. SUPPL. 1, p. 7–11, 2006.

ROSCH, J. W. et al. Statins protect against fulminant pneumococcal infection and cytolysin toxicity in a mouse model of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 2, p. 627–635, 2010.

SAAG, M. S. et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 30, n. 4, p. 710–718, 2000.

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

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

457–467, 2011.

SANTANGELO, R. et al. Role of Extracellular Phospholipases and Mononuclear Phagocytes in Dissemination of Cryptococcosis in a Murine Model Role of Extracellular Phospholipases and Mononuclear Phagocytes in Dissemination of Cryptococcosis in a Murine Model. **American Society for Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2229–2239, 2004.

SANTOS, J. R. A. et al. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2553–2558, 2012.

SCOTT, L. J.; SIMPSON, D. Voriconazole: a review of its use in the management of invasive fungal infections. **Drugs**. v.67, n. 2, p. 269 - 298, 2007.

SECCI, D. et al. Synthesis of a novel series of thiazole-based histone acetyltransferase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1680–1689, 2014.

SEOANE, P. I.; SCHNEIDER, R.; MAY, R. C. From peaches to patients: the many faces of cryptococci. **Microbiology Today**. v. 43, n.1, p. 22 – 25, 2016.

SEVRIUKOVA, I. F.; POULOS, T. L. Structure and mechanism of the complex between cytochrome P450A4 and ritonavir. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 43, p. 18422–18427, 2010.

SHI, M. et al. Real-time imaging of trapping and urease- dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1683–1693, 2010.

SIDDIQUI, N. et al. Thiazoles: A Valuable Insight into the Recent Advances and Biological Activities. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 1, n. 3, p. 136–143, 2009.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: Emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 5127–5130, 2013.

SNELDERS, E. et al. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

SOUZA, L. B. S. D. E. Características gerais da ação , do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, p. 189–197, 2005.

STANO, P. et al. App1: an antiphagocytic protein that binds to complement receptors 3 and 2. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 1, p. 84–91, 2009.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, p. 15245–50, 2001.

SUBRAMANIAN, S.; MATHAI, D. Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. **Journal of Postgraduate Medicine**. v. 51, n.5, p. 21 - 26, 2005.

- SUKROONGREUNG, S. et al. Pathogenicity of basidiospores of *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*. **Medical Mycology**, v. 36, n. 6, p. 419–24, 1998.
- THOMPSON, G. R. et al. Isavuconazole Treatment of Cryptococcosis and Dimorphic Mycoses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 3, p. 356–362, 2016.
- TONOMURA, Y. et al. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: characterization of blood and urinary biochemistry and renal morphology in mice. **Human & experimental toxicology**, v. 28, n. 5, p. 293–300, 2009.
- TRILLES, L. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4815–4817, 2004.
- TSAI, C.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 5594, n. January, p. 00–00, 2016.
- VAN DER HORST, C. M. et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immune deficiency syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 337, n. 1, p. 15–21, 1997.
- VARTIVARIAN, S. E. et al. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. **Journal of Infectious Diseases**. v. 167, p. 186–190, 1993.
- VELAGAPUDI, R. et al. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4345–4355, 2009.
- VÉLEZ, Norida; ESCANDÓN, Patricia. Distribution and association between environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Bogotá-Colombia, 2012-2015. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. AHEAD, p. 0-0, 2016.
- VOS, T. et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2163–2196, 2012.
- WANG, C.-Y.; WU, H.-D.; HSUEH, P.-R. Nosocomial transmission of cryptococcosis. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 12, p. 1271–2, 2005.
- WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of neoformans: identification as a laccase . Biochemical and Molecular Characterization of the Diphenol Oxidase of *Cryptococcus neoformans* : Identification as a Laccase. v. 176, n. 3, p. 656–664, 1994.
- WILSON, L. S. et al. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. **Value in Health**, v. 5, n. 1, p. 26–34, 2002.
- XU, J.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1471–1481, 2000.
- YOO, J. IL et al. Purification and Characterization of a 43-Kilodalton Extracellular Serine Proteinase from *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 722–726, 2004.

ZACCHINO, A. S.; GUPTA, M. P. Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos. **Corpus Editorial y Distribuidora: Rosario**, vol. 85. 2007.

ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043–2057, 2008.

ZARAGOZA, O. et al. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 6, 2010.

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.

ZAVREL, M.; WHITE, T. C. Medically important fungi respond to azole drugs: an update. **Future microbiology**, v. 10, p. 1355–73, 2015.

ZHU, X. et al. Laccase of *Cryptococcus neoformans* Is a Cell Wall-Associated Virulence Factor Laccase of *Cryptococcus neoformans* Is a Cell Wall-Associated Virulence Factor. **Society**, v. 69, n. 9, p. 5589–5596, 2001.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P. R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2004.