

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

CRISTINA ALVES DE OLIVEIRA RAMOS

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE HETEROCÍCLICOS TIAZÓLICOS
CONTRA *Cryptococcus* spp.

Belo Horizonte

2021

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

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE HETEROCÍCLICOS TIAZÓLICOS
CONTRA *Cryptococcus* spp.

CRISTINA ALVES DE OLIVEIRA RAMOS

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de doutora em Microbiologia.

Orientador: Profa. Dra. Susana Johann.
Co-orientador: Dra. Nívea Pereira de Sá.

Belo Horizonte

2021

- 043 Ramos, Cristina Alves de Oliveira.
Potencial antifúngico de heterocíclicos tiazólicos contra *Cryptococcus* spp
[manuscrito] / Cristina Alves de Oliveira Ramos. – 2021.
105 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Profa. Dra. Susana Johann. Co-orientador: Dra. Nívea Pereira de Sá.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. *Cryptococcus*. 3. Antifúngicos. 4. Tenebrio. 5. Compostos Heterocíclicos. 6. Tiazóis. I. Johann, Susana. II. Sá, Nívea Pereira de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



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

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **CRISTINA ALVES DE OLIVEIRA RAMOS**

Nº REGISTRO: **2017712323**

Às 13:30 horas do dia **01 de dezembro de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Luiz Henrique Rosa (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Cleide Viviane Buzanello Martins (Unioeste- Paraná), Betania Barros Cota (Centro de Pesquisas René Rachou) e a Profa. Dra. Susana Johann – Orientadora, para julgar o trabalho final: “Potencial antifúngico de heterocíclicos tiazólicos contra *Cryptococcus* spp.”, da aluna **Cristina Alves de Oliveira Ramos**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Susana Johann, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 01 de dezembro de 2021.

Membros da Banca:

Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Dr. Luiz Henrique Rosa

Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins

Dra. Betânia Barros Cota

De acordo:

Profa. Dra. Susana Johann

(Orientadora)

Profa. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Susana Johann, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 02/12/2021, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 02/12/2021, às 15:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Betania Barros Cota, Usuário Externo**, em 02/12/2021, às 20:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Henrique Rosa, Professor do Magistério Superior**, em 03/12/2021, às 08:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 03/12/2021, às 11:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cleide Viviane Buzanello Martins, Usuário Externo**, em 05/12/2021, às 18:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1067163** e o código CRC **0009779E**.

“Quanto mais me aprofundo na ciência mais me aproximo de Deus”.

ALBERT EINSTEIN

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela dádiva da vida, pela proteção e tantos milagres realizados durante essa jornada. Agradeço a Deus por seus sonhos serem mais altos que os meus, e por me mostrar que há um propósito em tudo, até nos momentos que pensei não ser possível chegar ao fim.

A minha orientadora Profa. Dra. Susana Johann, por me aceitar em seu laboratório e em seu grupo de pesquisa, me dando a oportunidade de realizar este projeto. Agradeço pela sua sabedoria, paciência e cuidado. Sou grata pelo conhecimento e crescimento pessoal que me proporcionou, me mostrando que é possível agir com serenidade, ternura e sabedoria em todos os momentos, mesmo nos mais difíceis. Obrigada pela compreensão em todos os momentos, principalmente naqueles que tive mais limitações e dificuldades.

Aos colegas do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos e do Laboratório de Sistemática e Biodiversidade de Fungos que me receberam com acolhimento e carinho, em especial a Ana Raquel, Thais, Thelma e Flávia pelo acolhimento e apoio desde o primeiro momento. Obrigada por tornar mais leve este processo. Á Nívea Pereira, por me guiar e me ensinar nos meus primeiros passos na pesquisa, por compartilhar comigo sua experiência e seu grande conhecimento. Á Lana Barreto, pela doçura, carinho de sua amizade e ajuda em todos os momentos. Á todos os IC's e colegas do grupo antifúngicos que passaram por minha jornada, em especial a Samara, Larissa, Carol, Blenda, Aline e Viviane pelo apoio, amizade e por partilhar a caminhada e as experiências.

Aos colegas do Laboratório de Micologia, nas pessoas de Marliete, Dani, Gustavo e Elúzia, vocês são inspiração de acolhimento e dedicação! Obrigada pela contribuição e apoio nos experimentos e na jornada de biotério.

A minha mãe Maria Consolação por me apoiar e sustentar em oração durante todos esses anos, ao meu pai Vanderlei Alves pelo apoio e incentivo, a minha irmã Natália Alves pelo amor, compreensão, companheirismo, ajuda nos momentos difíceis e por sua presença mesmo estando distante. Ao meu esposo João Paulo, que foi uma das primeiras pessoas a sonhar, planejar e caminhar comigo neste projeto. Te agradeço por compreender a ausência, a distância e estar presente mesmo assim, por participar deste desafio juntos, acreditando e superando todas as dificuldades, sem faltar com seu amor, apoio e cuidado em todos os momentos.

A Dona Filó, não tenho palavras suficientes para tanta gratidão por seu acolhimento, cuidado, amor e apoio. Meu carinho e gratidão a Deus pela sua vida permanecerá para sempre!

A todos os colegas, amigos, professores, técnicos, mestres, avaliadores, servidores, e a todas as pessoas que passaram em minha vida durante esses anos, minha gratidão.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Avaliação do efeito na integridade do biofilme de <i>C. neoformans</i>	58
Figura 2 - Toxicidade de heterocíclicos tiazólicos em <i>Tenebrio molitor</i>	59
Figura 3 - Curva de sobrevivência em <i>T. molitor</i> infectado com <i>C. neoformans</i> H99 e tratado com as substâncias HTI-7 e HTI-14.....	60
Figura 4 - Curva de sobrevivência em modelo murino de criptococose e tratamento com a substância HTI-7.....	61
Figura 5 - Modelo murino de criptococose pulmonar e tratamento com a substância RN-104 complexada com ciclodextrina.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Antifúngicos contendo ciclodextrina disponíveis no mercado.....	37
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) de 23 substâncias sintéticas contra <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i>	52
Tabela 3 - Concentração inibitória mínima das substâncias HTI-12, HTI-13 e HTI-14 contra leveduras de importância médica	54
Tabela 4 - Concentração inibitória (CIM) e fungicida (CFM) mínima da substância HTI-14, anfotericina B (ANFB) e fluconazol (FLC) contra doze isolados de <i>Cryptococcus neoformans</i>	55
Tabela 5 - Índice de concentração inibitória fracional da substância HTI-14 em interação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B.....	56
Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) da substância HTI-14 contra isolados de <i>Cryptococcus neoformans</i> em meio RPMI acrescido de sorbitol 0,8M.....	57
Tabela 7 - Concentração inibitória mínima do complexo RN-104/CD contra <i>C. neoformans</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs - Absorbância
AMB - Anfotericina B
App1 – Proteína antifagocítica 1
ASD - Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC - *American Type Culture Collection*
°C - Grau Celsius
BHE – Barreira hemato-encefálica
CD - Ciclodextrina
CIM - Concentração inibitória mínima
CIF - Concentração inibitória fracional
CIFI - Índice de concentração inibitória fracional
CFM - Concentração fungicida mínima
ClogP - Coeficiente de partição
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CPTG – Protocolo Clínico do Ministério da Saúde
CR – Reação cruzada
DMSO - Dimetilsulfóxido
FLC - Fluconazol
HAT – Histina acetiltransferase
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
IDSA – Sociedade de Doenças Infecciosas da América
LCR – Líquido cefalorraquidiano
MS – Ministério da Saúde
NaCl - Cloreto de sódio
Na₂HPO₄ - Hidrogenofosfato dissódico
PAMPA - Ensaio de Permeabilidade de Membrana Artificial Paralela
PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato salina)
pH - Potencial hidrogeniônico
PLB – Fosfolipase B
PVHIV – Pessoas vivendo com HIV
p/v - Peso/volume
SNC- Sistema Nervoso Central

rpm - Rotação por minuto

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SDB - Caldo Sabouraud Dextrose

UFC - Unidade formadora de colônia

v/v - Volume/volume

µg/mg - Micrograma por miligrama

µg/mL - Micrograma por mililitro

µL - Microlitro

mL - Mililitro

LISTA DE ANEXO

ANEXO I - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais.

LISTA DE APÊNDICE

APÊNDICE I – Manuscrito: Thiazole derivative increases survival in invertebrate and murine models infected with *Cryptococcus neoformans*.

APÊNDICE II – Artigo publicado: Stability-indicating method for the novel antifungal compound RI76: Characterization and *in vitro* antifungal activity of its active degradation product.

RESUMO

A criptococose é uma infecção fúngica causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, sendo *Cryptococcus neoformans* a espécie mais frequentemente isolada e de grande importância clínica. O núcleo tiazolínico é uma estrutura química encontrada em diferentes substâncias sintéticas com ampla atividade biológica. O objetivo deste trabalho foi na primeira parte, avaliar por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, o potencial antifúngico de substâncias heterocíclicas tiazólicas contra *Cryptococcus* spp e os efeitos sobre fatores de virulência de *C. neoformans*. Na segunda parte deste trabalho, objetivou-se avaliar a atividade antifúngica *in vivo* da substância RN-104 em sua forma complexada com ciclodextrina no tratamento de um modelo experimental de criptococose murino. A atividade antifúngica de 23 substâncias sintéticas contra isolados de *C. neoformans* H99 e *C. neoformans* L27/01 foram avaliadas utilizando o teste de Concentração inibitória mínima (CIM). Observou-se que 12 substâncias apresentaram eficácia contra os isolados avaliados, com valores de CIM variando de 0,05 – 7,80 µg/mL. Além disso, observou-se que substância PD76, um produto de degradação tiazólico, apresentou valor de CIM de 0,05 µg/mL, inferior ao apresentado pelo seu precursor. As substâncias HTI-12, HTI-13 e HTI-14 foram avaliadas contra leveduras de importância médica do gênero *Candida* e o menor valor de CIM foi encontrado para a substância HTI-14, sendo a espécie *Candida albicans* SC5314 susceptível as 3 substâncias avaliadas. A toxicidade das substâncias HTI-7, HTI-12, HTI-13 e HTI-14 foi avaliada no modelo invertebrado *Tenebrio molitor* e encontrou-se LD50 >10 mg/kg. A substância HTI-14 foi selecionada e avaliada *in vitro* contra 12 isolados de *C. neoformans* e apresentou valores de CIM entre 0,12 – 0,48 µg/mL, e valor de CFM₅₀ igual a 0,17. A substância HTI-14 apresentou interação indiferente com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B no teste de concentração inibitória fracional. Quando avaliado o efeito da substância HTI-14 sobre alguns fatores de virulência de *C. neoformans*, observou-se redução da atividade metabólica em células sésseis de biofilme formado pelo isolado *C. neoformans* H99 após tratamento por 24 horas. Na avaliação da atividade antifúngica no modelo de invertebrado *Tenebrio molitor*, as substâncias HTI-7 e HTI-14 foram avaliadas e mostrou-se capazes de aumentar a sobrevivência das larvas com um desempenho comparado ao fluconazol. No modelo *in vivo* murino, verificou-se que a substância HTI-7 na concentração de 10mg/kg/dia mostrou-se eficiente, sendo capaz de manter 50% de sobrevivência dos animais tratados após 72 dias. Na avaliação da atividade antifúngica da substância RN-104 livre e complexada com ciclodextrina no modelo experimental de criptococose, verificou-se no o grupo de animais tratados com o complexo RN-104/ciclodextrina redução na carga fúngica recuperada do tecido cerebral. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram a potencial atividade

antifúngica de substâncias heterocíclicas tiazólicas contra *Cryptococcus* spp. *in vitro* e *in vivo*, além de amplo espectro de atividade em outras leveduras de importância médica. Os resultados encontrados neste presente trabalho podem representar potenciais protótipos para estudo e desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, afim de ampliar o arsenal de medicamentos para o tratamento da criptococose.

Palavras-chave: *Cryptococcus* spp., antifúngico, *Tenebrio molitor*, heterocíclico tiazólico.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a fungal infection caused by yeasts of the genus *Cryptococcus*, being the species *Cryptococcus neoformans* the most frequently isolated and of great clinical importance. The thiazoline nucleus is a chemical structure found in different synthetic substances with wide biological activity. The objective of this work was, in the first part, to evaluate, through *in vitro* and *in vivo* tests, the antifungal potential of thiazole heterocyclic substances against *Cryptococcus* spp and the effects on virulence factors of *C. neoformans*. In the second part of this work, the objective was to evaluate the *in vivo* antifungal activity of the substance RN-104 in its complexed form with cyclodextrin in the treatment of an experimental model of murine cryptococcosis. The antifungal activity of 23 synthetic substances against isolates of *C. neoformans* H99 and *C. neoformans* L27/01 were evaluated using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test. It was observed that 12 substances showed efficacy against the evaluated isolates, with MIC values ranging from 0.05 – 7.80 µg/mL. Furthermore, it was observed that substance PD76, a thiazole degradation product, presented a MIC value of 0.05 µg/mL, lower than that presented by its precursor. The substances HTI-12, HTI-13 and HTI-14 were evaluated against yeasts of medical importance of the genus *Candida* and the lowest MIC value was found for the substance HTI-14, with *Candida albicans* SC5314 being susceptible to the 3 substances evaluated. The toxicity of substances HTI-7, HTI-12, HTI-13 and HTI-14 was evaluated in the invertebrate model *Tenebrio molitor* and found LD₅₀ >10 mg/kg. The substance HTI-14 was selected and evaluated *in vitro* against 12 isolates of *C. neoformans* and presented MIC values between 0.12 – 0.48 µg/mL, and CFM₅₀ value equal to 0.17. The substance HTI-14 showed an indifferent interaction with the antifungals fluconazole and amphotericin B in the fractional inhibitory concentration test. When evaluating the effect of the substance HTI-14 on some virulence factors of *C. neoformans*, a reduction in metabolic activity was observed in sessile biofilm cells formed by the isolate *C. neoformans* H99 after treatment for 24 hours. In the evaluation of the antifungal activity in the invertebrate model *Tenebrio molitor*, the substances HTI-7 and HTI-14 were evaluated and showed to be able to increase the survival of the larvae with a performance compared to fluconazole. In the *in vivo* murine model, it was found that the substance HTI-7 at a concentration of 10mg/kg/day was efficient, being able to maintain 50% of survival of the treated animals after 72 days. In the evaluation of the antifungal activity of the substance RN-104 free and complexed with cyclodextrin in the experimental model of cryptococcosis, it was verified in the group of animals treated with the RN-104/cyclodextrin complex a reduction in the fungal load recovered from the brain tissue. The results presented in this work demonstrate the potential antifungal activity of heterocyclic

thiazole substances against *Cryptococcus* spp. in vitro and in vivo, as well as a broad spectrum of activity in other yeasts of medical importance. The results found in this present work may represent potential prototypes for the study and development of new antifungal drugs, in order to expand the arsenal of drugs for the treatment of cryptococcosis.

Keywords: *Cryptococcus* spp, antifungal, *Tenebrio molitor*, thiazole heterocyclic.

Sumário

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1 Criptococose: histórico e epidemiologia	20
1.2 Gênero <i>Cryptococcus</i>	22
1.3 Fatores de virulência.....	24
1.4 Infecção e patogênese.....	27
1.5 Antifúngicos	29
1.5.1 Terapêutica medicamentosa	29
1.5.2 Resistência aos antifúngicos	31
1.5.3 Alvos para o desenvolvimento de antifúngicos.....	32
1.5.4 Busca por novos antifúngicos.....	34
1.5.5 Heterocíclico tiazólico.....	35
1.5.6 Complexos de inclusão entre antifúngicos e ciclodextrina	36
1.6 Modelo alternativo invertebrado <i>Tenebrio molitor</i>	37
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos Específicos	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 PARTE I: Triagem de substâncias sintéticas e avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de heterocíclicos tiazólicos frente a <i>Cryptococcus</i> spp.	42
4.1.1 Substâncias experimentais.....	42
4.1.2 Fungos e preparo do inóculo	42
4.1.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	43
4.1.4 Teste de susceptibilidade antifúngica contra outras leveduras de importância médica.....	43
4.1.5 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	44
4.1.6 Avaliação da concentração inibitória fracional	44
4.1.7 Avaliação do efeito na parede celular.....	44
4.1.8 Atividade de fosfolipase	45
4.1.9 Atividade da proteinase	45
4.1.10 Avaliação do efeito na integridade do biofilme.....	46

4.1.11 Toxicidade em <i>Tenebrio molitor</i>	46
4.1.12 Curva de sobrevida em <i>Tenebrio molitor</i>	47
4.1.13 Curva de sobrevida em modelo murino.....	47
4.1.14 Análise estatística	48
4.2 PARTE II.....	49
4.2.1 Substâncias experimentais.....	49
4.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	49
4.2.3 Modelo murino de criptococose pulmonar	50
4.2.4 Análise estatística	51
5. RESULTADOS	52
5.1 PARTE I: Triagem de substâncias sintéticas e avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de heterocíclicos tiazólicos frente a <i>Cryptococcus</i> spp.	52
5.1.1 Triagem de substâncias sintéticas.....	52
5.1.2 Teste de susceptibilidade antifúngica contra outras leveduras de importância médica.....	53
5.1.3 Concentração inibitória (CIM) e fungicida (CFM) mínima da substância HTI-14 em <i>C. neoformans</i>	54
5.1.4 Interação da substância HTI-14 com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol 55	
5.1.5 Avaliação do efeito da substância HTI-14 na parede celular	57
5.1.6 Avaliação da inibição da atividade enzimática de fosfolipase e proteinase.....	57
5.1.7 Avaliação do efeito na integridade do biofilme.....	58
5.1.8 Toxicidade e sobrevida em <i>Tenebrio molitor</i>	58
5.1.9 Sobrevida em <i>Tenebrio molitor</i> infectados com <i>C. neoformans</i> H99 e tratados com HTI-7 e HTI-14	59
5.1.10 Curva de sobrevida em modelo murino com tratamento com a substância HTI-7.....	61
5.2 PARTE II: Avaliação da atividade antifúngica do complexo RN-104/ciclodextrina no tratamento da criptococose em modelo murino.....	62
5.2.1 Concentração inibitória mínima do complexo RN-104/ciclodextrina contra <i>Cryptococcus</i> spp.....	63
5.2.2 Avaliação do complexo RN-104 em modelo murino de criptococose.....	63
6. DISCUSSÃO	66

7. SÍNTESE DE RESULTADOS	73
8. CONCLUSÃO.....	74
9. REFERÊNCIAS	75

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Criptococose: histórico e epidemiologia

A criptococose é uma das micoses oportunistas que mais ameaçam a vida em todo o globo (SALAZAR *et al.*, 2020) e é causada pela levedura basidiomiceta do gênero *Cryptococcus*, podendo se manifestar de forma isolada ou sistêmica e acometer seres humanos e animais (XUE *et al.*, 2007; IDNURM, 2010). O primeiro relato de caso humano de criptococose foi descrito em 1894 pelo patologista Busse, onde uma levedura encapsulada foi isolada de uma lesão óssea tibial de uma paciente de 31 anos. Esse caso clínico continuou sendo estudado por Buschke e teve novos dados relatados em 1895. Apesar de não ter apresentado envolvimento com o sistema nervoso central (SNC) neste caso, é considerado então o registro mais antigo da doença (WILSON, 1956; MITCHELL & PERFECT, 1995).

O gênero *Cryptococcus* compreende mais de 30 espécies de leveduras, no entanto, a maioria das infecções humanas são causada por apenas dois complexos de espécies: *C. neoformans* e *C. gattii* (BEARDSLAY *et al.*, 2019). *Cryptococcus neoformans* se apresenta como o principal agente patológico isolado em infecções criptocócicas em indivíduos com sistema imunológico comprometido, enquanto as infecções por *C. gattii* ocorrem principalmente em indivíduos com sistema imune competente (GIBSON & JOHNSTON, 2015).

C. gattii é isolado principalmente em árvores de eucalipto em decomposição, no entanto, já foram relatados isolamentos em animais e em 54 espécies arbóreas diferentes, incluindo gimnospermas e angiospermas. A espécie é geralmente endêmica em regiões de clima tropical e subtropical (SPRINGER & CHATURVEDI, 2010). Em 1999 foi relatado um surto de *C. gattii* com casos clínicos humanos e veterinários na ilha de Vancouver, Canadá (KIDD *et al.*, 2004) e cepas altamente virulentas foram relatadas em regiões de clima temperado como na região da Columbia Britânica no Canadá e no noroeste dos Estados Unidos, indicando então uma mudança na distribuição geográfica da espécie (LIZARAZO *et al.*, 2014).

Na América Latina, assim como em todo mundo, dados moleculares disponíveis indicam *C. neoformans* tipo VNI como a causa mais comum de criptococose (76,01%) em pessoas infectadas pelo HIV, seguido por *C. gattii* tipo VGII (12,37%) que afeta principalmente hospedeiros saudáveis. Esses dois tipos moleculares também predominam no meio ambiente (68,60% para VNI e 20,70% para VGII) (FIRACATIVE *et al.*, 2021).

A distribuição de *C. gattii* nos países em desenvolvimento está relacionada aos países dos continentes da Ásia, África e América Latina. Na América do Sul, *C. gattii* tipo VGII é o mais comumente isolado (SORRELL *et al.*, 2014). No Brasil a espécie *C. gattii* é endêmica nas regiões Norte e Nordeste e está associada a infecções em adultos jovens e crianças. A infecção fúngica ocorre geralmente em indivíduos imunocompetentes e em faixas etárias distintas entre os jovens adultos que desenvolvem criptococose associada ao HIV. O tipo molecular predominante é o VGII, que apresenta alta variabilidade genética e representa cerca de 80% dos casos (JUNIOR *et al.*, 2017), e está relacionado a em casos de meningite, doenças cutâneas e infecção pulmonar em imunocompetentes e em infecções de imunossuprimidos (HERKERT *et al.*, 2017). O sorotipo B é prevaletente nessas regiões, com taxa de letalidade que varia de 40-56% para as infecções em adultos jovens e crianças, causando frequentemente incapacidades como deficiências visuais, cegueira e hidrocefalia (TRILLES *et al.*, 2008).

Nas regiões Sul e Sudeste predominam as infecções causadas pela espécie *C. neoformans*, com taxa de letalidade que pode chegar de 35 a 40%, representando aproximadamente 5% das infecções oportunistas nos casos de HIV no país (BRASIL, 2010). Conforme observado por Ribeiro & Ngamskulrungrroj (2008) o sorotipo A é o mais frequentemente isolado e relatado nas regiões Sul e Sudeste, já a frequência do sorotipo D é baixa, já sendo relatado por Horta e colaboradores (2005) ocorrências desses isolados na região Sul do país.

Os grupos de risco para infecção por *C. neoformans* incluem pacientes transplantados, pacientes com doenças reumáticas, indivíduos submetidos a terapias imunossupressoras, indivíduos com uso crônico de esteróides, portadores de diabetes mellitus, de distúrbios pulmonares e indivíduos vivendo com HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) (BANERJEE *et al.*, 2001; BEARDSLAY *et al.*, 2019). As infecções criptocócicas tem evoluído mundialmente principalmente entre pessoas vivendo com HIV (PVHIV), causando milhares de mortes por ano.

O processo infeccioso da criptococose pode se apresentar em casos isolados ou disseminados com comprometimento dos sistemas pulmonar, ósseo, cutâneo, sanguíneo e líquido cefalorraquidiano (LCR). A manifestação clínica mais comum da doença é a meningoencefalite criptocócica, que provoca mais de um milhão de casos e aproximadamente 600.000 mortes anuais (SLOAN & PARRIS, 2014; SACHT *et al.*, 2016).

Devido suas características patogênicas, a criptococose é considerada umas das doenças fúngicas mais invasivas do último século (PERFECT & BICANIC, 2015). A taxa de

mortalidade pode atingir até 30%, sendo incurável em indivíduos que apresentam imunossupressão grave, exigindo terapia antifúngica ao longo da vida (COELHO & CASADEVALL, 2016).

Anualmente são estimados 223.100 novos casos de meningite criptocócica globalmente, com 73% dos casos ocorrendo na África Subsaariana, e com segunda maior incidência ocorrendo na Ásia e Pacífico (19%). São estimadas 181.100 mortes anuais por meningite criptocócica em todo o mundo, com 135.900 mortes ocorrendo na África Subsaariana (RAJASINGHAM *et al.*, 2018).

Embora a terapia para criptococose no Brasil seja gratuita e disponível na rede pública pelo sistema único de saúde (SUS), a taxa de mortalidade por meningite causada por *C. neoformans* ainda é alta (FERREIRA-PAIM *et al.*, 2017). A taxa de letalidade da criptococose no Brasil varia de 45 a 65%, no entanto ainda permanece como doença não notificável. Estudos epidemiológicos indicam a criptococose como primeira causa de mortalidade entre todas as micoses sistêmicas associadas à AIDS e a segunda causa de mortalidade entre micoses sistêmicas em geral em todo país, reforçando que essa micose invasiva representa um importante problema de saúde pública (ALVES SOARES *et al.*, 2019).

1.2 Gênero *Cryptococcus*

Cryptococcus spp. pertencem ao filo Basidiomycota e durante várias décadas foram agrupados em duas variedades denominadas *C. neoformans* var. *neoformans* contendo os sorotipos A, D e AD e *C. neoformans* var. *gattii* com sorotipos B e C. Com a descoberta dos teleomorfos, estágios sexuais presentes nessas espécies, foram então classificados como *Filobasidiella neoformans* (sorotipos A e D) e *Filobasidiella bacillispora* (sorotipo B e C) (KWON-CHUNG *et al.*, 1982; 2014).

Posteriormente, utilizando o método *Multilocus Sequence Typing* (MLST), os tipos de sequência (ST) de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* foram classificados com base nas sequências genéticas de sete genes (CAP59, GPD1, IGS1, LAC1, PLB1, SOD1 e URA5) (MEYER *et al.*, 2019). Através destes estudos foi associado que os tipos de sequência tendem a se agrupar por localização geográfica, à capacidade de virulência criptocócica e a resultados clínicos (MONTROYA *et al.*, 2021).

As cepas do gênero *Cryptococcus* são diferenciadas por complexo de espécies, espécie, sorotipo, tipo molecular ou linhagem e tipo de sequência. De acordo com a classificação atual o complexo compreende duas espécies: *C. neoformans* composta por duas variedades (*C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii*) e *C. gattii*, classificado como uma espécie distinta. O complexo possui 4 sorotipos: sendo *C. neoformans* sorotipo A e *C. deneoformans* sorotipo D. O sorotipo AD é um híbrido de *C. neoformans* sorotipo A e *C. deneoformans* sorotipo D. O complexo de espécies *C. gattii* apresenta os sorotipos B ou C (MONTROYA *et al.*, 2021), distinção feita com base nas diferenças antigênicas expressas pela cápsula polissacarídea (ZHANG; PARK; WILLIAMSON, 2015). Estudos de genotipagem e análises filogenéticas que revelaram uma significativa diversidade genética no complexo *C. neoformans/C. gattii* resultaram em uma proposta para uma nova taxonomia do gênero, onde *C. neoformans* se divide em duas espécies (*C. neoformans* e *C. deneoformans*) e *C. gattii* em um total de cinco espécies (*C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*) (HAGEN *et al.*, 2015).

Apesar da nova proposta, Kwon-Chung e colaboradores (2017) recomendam a utilização dos termos “*Cryptococcus neoformans* complexo de espécies” e “*C. gattii* complexo de 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.

Aproximadamente 50 espécies de leveduras basidiomicetas do gênero *Cryptococcus* podem ser encontradas no ambiente, mas apenas as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são consideradas patógenos predominantes da criptococose humana (SABIITI & MAY, 2012). As espécies *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii*, *C. luteos*, *C. uniguttulatus* e *C. humicola* são classificadas na literatura como espécies não patogênicas, entretanto, na última década foram relatadas como patógenos de infecções criptocócicas. O surgimento de infecções causadas por essas espécies pode estar relacionado ao aumento de pacientes imunossuprimidos, e conseqüentemente, com a susceptibilidade desse grupo a infecções fúngicas oportunistas (BERNAL-MARTINEZ *et al.*, 2010; KHAWCHAROENPORN *et al.*, 2007).

C. neoformans é um fungo haploide e durante a infecção humana apresenta a forma de reprodução assexuada. As características de virulência do fungo durante a instalação da infecção crônica podem induzir pequenas evoluções genéticas nas populações clonais, afim de impedir a resposta imune do hospedeiro. As mudanças fenotípicas que ocorrem *in vivo* durante o processo infeccioso, estão associadas com a expressão diferencial de genes e a virulência da

espécie. Entre essas mudanças estão modificações na estrutura da cápsula polissacarídea e da parede celular fúngica, que afetam a resistência da levedura diante a fagocitose (GUERRERO *et al.*, 2006).

A reprodução sexual é uma contribuinte chave para a geração de diversidade tanto no genótipo quanto no fenótipo, tendo função adaptativa em resposta a variações ambientais. No gênero *Cryptococcus* a recombinação ocorre durante o cruzamento bissexual e unissexual (FU *et al.*, 2015). A reprodução unissexual envolve vias de transdução e facilita transições dimórficas e formação de hifas invasoras. A reprodução sexual de *C. neoformans* e *C. gattii* também pode contribuir para a virulência dos patógenos através da produção de esporos na forma de propágulos infecciosos (PHADKE *et al.*, 2014).

A morfologia celular das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são semelhantes, embora cepas de *C. gattii* tendem a produzir células leveduriformes mais ovoides e piriformes quando comparadas com as células de *C. neoformans*, que são geralmente globosas (KWON-CHUNG *et al.*, 1982). As células de *Cryptococcus* podem variar em tamanho e estrutura quando isolados de um hospedeiro. A morfologia atípica mais caracterizada é denominada célula “titãs”. Essas células possuem um tamanho de 5 a 10 vezes maior que as células normais da levedura, cápsula altamente reticulada, parede celular espessa que afetam a interação patógeno-hospedeiro reduzindo a fagocitose pelas células mononucleares do hospedeiro (OKAGAKI *et al.*, 2011).

1.3 Fatores de virulência

Os fatores de virulência permitem que o fungo sobreviva às mudanças ambientais por meio de uma variedade de vias de sinalização para iniciar seu crescimento e resistência. Muitos desses fatores de virulência demonstraram ser regulados com base no ambiente da célula fúngica, o que indica que a expressão dos fatores de virulência pode ser diferente no ambiente natural em comparação com o hospedeiro humano. Essas alterações na expressão dos diferentes fatores de virulência podem afetar a interação patógeno-hospedeiro, a consequentemente a resposta imune do hospedeiro e suscetibilidade antifúngica (MOMIN & WEBB, 2021).

Dentre as características que conferem virulência as espécies de *Cryptococcus* estão cápsula polissacarídea, formação de melanina, produção de enzimas extracelulares como urease e fosfolipase e a formação de biofilme e proteína antifagocítica 1 (App1) (ALMEIDA *et al.*, 2015; LUBERTO *et al.*, 2003).

A cápsula de *Cryptococcus* spp. é constituída principalmente de dois polissacarídeos de alto peso molecular: glucuronoxilomannogalactano (GXMGal) e glucuronoxilomanana (GXM), que representa cerca de 90% da massa polissacarídea da cápsula (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). A cápsula é primeira estrutura fúngica que interage com as células hospedeiras e a capacidade de múltiplas alterações no tamanho e na sua conformação torna está uma estrutura muito versátil. Essas alterações são características típicas entre as cepas de *C. neoformans* durante a infecção do hospedeiro, e são considerados uma resposta morfológica precoce contra a fagocitose. A expressão da cápsula é um importante fator de virulência para *C. neoformans* uma vez que está envolvida tanto na resistência a fagocitose como na modulação da resposta imune (ZARAGOZA *et al.*, 2009). A melanina é um pigmento hidrofóbico produzido pela oxidação de compostos fenólicos tais como a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) em dopaquinona. Essa conversão é feita pela enzima fenoxidase ou lacase, produzida por *C. neoformans* quando o fungo cresce em ambiente contendo substratos polifenólicos ou poliaminobenzeno (WILLIAMSON, 1997; BUCHANAN & MURPHY, 1998).

Propriedades conhecidas da melanina foram propostas para explicar o seu efeito patogênico e sua importância na virulência e incluem reticulação ou blindagem dos constituintes da membrana celular contra enzimas hidrolíticas, sequestro de proteínas hospedeiras defensivas, tampão redox e função na ligação osmótica, propostos como importantes mecanismos durante a infecção (JACOBSON, 2000). Na melanização das células de leveduras de *C. neoformans*, a melanina produzida é agregada e estabilizada na parede celular externa, formando uma proteção contra a hidrólise celular (NOSANCHUK *et al.*, 2015). Uma possível inibição das fenoxidases de *C. neoformans* consiste em uma potencial estratégia para o desenvolvimento de fármacos antifúngicos (CASADEVALL *et al.*, 1995).

A termotolerância é um fator fundamental nas infecções de *C. neoformans* e *C. gattii* em mamíferos, pois garantem a essas espécies a habilidade de crescer em temperaturas entre 37°C e 39°C e estabelecer infecção no hospedeiro (IDNURM *et al.*, 2005; MA & MAY, 2009). A termotolerância envolve a expressão de diferentes genes. O primeiro estudo molecular relacionado ao crescimento criptocócico à temperatura corporal de mamíferos identificou a calcineurina ativada por calmodulina, codificada por CNA1 altamente conservada como essencial para o crescimento a 37°C. Como consequência as cepas mutantes para CNA1 apresentaram ausência de virulência, propondo que a cascata de sinalização envolvendo a calcineurina é necessária para a patogênese de *Cryptococcus* spp (ODOM *et al.*, 1997, KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

A urease é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise de uréia á amônia e carbamato, resultando no aumento de pH no meio fisiológico. A urease produzida por *C. neoformans*, codificada pelo gene *Ure1*, é um importante fator de virulência, uma vez que o mutante nulo para este gene apresenta virulência atenuada (COX *et al.*, 2000). Os padrões de disseminação de *C. neoformans* H99 e estirpes mutantes foram observados no cérebro, baço e outros órgãos após a inoculação intravenosa e indicaram que embora a urease não seja obrigatória para o crescimento do fungo no cérebro, a enzima aumenta o alcance do fungo ao SNC através da barreira hemato-encefálica (OLSZEWSKI *et al.*, 2004). Shi e colaboradores (2010) em um estudo com modelo murino utilizando microscopia intravital demonstraram com uma cepa *knockout* de *C. neoformans*, que a capacidade da levedura transmigrar da microvasculatura para o parênquima cerebral é dependente de urease.

As fosfolipases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam uma ou mais ligações éster em glicerofosfolípidos, que são os principais componentes das membranas celulares e do surfactante pulmonar. As hidrólises desses fosfolipídios podem favorecer a penetração no tecido do hospedeiro. Através de silenciamento de genes em estudos moleculares foi estabelecida a importância da fosfolipase B (PLB) na virulência de *C. neoformans* e *C. gattii*, embora seu mecanismo de ação ainda não seja conhecido. É relevante a presença da enzima em fungos clinicamente importantes e o seu reconhecimento na patogênese das infecções fúngicas sugerem que inibidores da atividade enzimática possam ser promissores agentes antifúngicos (SHEA *et al.*, 2006; DJORDJEVIC, 2010).

Os macrófagos alveolares representam a primeira defesa do hospedeiro humano contra o fungo. Uma vez fagocitadas, as células fúngicas são mortas por um mecanismo combinado, envolvendo a resposta celular do hospedeiro. Se a resposta celular do hospedeiro for prejudicada, a fagocitose do fungo pode ser prejudicial, uma vez que *C. neoformans* pode crescer dentro de macrófagos. A Proteína Antifagocítica 1 (App1) é uma proteína citoplasmática criptocócica secretada extracelularmente e encontrada no soro de pacientes infectados. App1 não afeta a produção de melanina, formação de cápsula ou crescimento de *C. neoformans*. Luberto e colaboradores (2003) caracterizaram a via de App1 na regulação da fagocitose de *C. neoformans* e demonstraram que o tratamento com App1 recombinante inibiu a fagocitose de células fúngicas por meio de um mecanismo mediado pelo complemento, mostrando que o mutante de App1 foi prontamente fagocitado pelos macrófagos alveolares, identificando essa proteína antifagocítica como um novo regulador de virulência para *C. neoformans*.

Infecções microbianas em mamíferos onde há formação de biofilmes são mais resistentes aos mecanismos imunológicos do hospedeiro e também à terapia medicamentosa, o que constitui um grande problema (MARTINEZ & CASADEVALL, 2005). O biofilme nas infecções crônicas apresenta maior resistência aos antimicrobianos em comparação com suas contrapartes planctônicas, devido à sua fisiologia, densidade celular, habilidades de detecção de quórum, presença de matriz extracelular, regulação positiva de bombas de efluxo de drogas, mutação pontual e super expressão de genes de resistência, e presença de células persistentes. Os genes envolvidos e suas implicações na resistência antimicrobiana são bem definidos para biofilmes bacterianos, para biofilmes fúngicos ainda são necessários mais estudos (RAO *et al.*, 2021).

A comunicação célula-célula é crítica para a formação do biofilme de *C. neoformans*. A proteína Cfl1 responsável pela regulação da morfogênese, adesão celular, formação de biofilme e a virulência, funciona como uma adesina e uma molécula de sinalização que induz o desenvolvimento de hifas (WANG; ZHAI; LIN, 2012; WANG *et al.* 2013). Biofilme de *C. neoformans* formado em dispositivos médico mostrou-se dependente da presença da cápsula de polissacarídea e correlacionada com a capacidade do polissacarídeo capsular de se ligar ao suporte sólido de poliestireno (MARTINEZ & CASADEVALL, 2005), indicando que a glucuronoxilomanana (GXM), principal polissacarídeo da cápsula de *Cryptococcus* spp é fator crítico na virulência pela formação de biofilme (MARTINEZ *et al.*, 2008).

1.4 Infecção e patogênese

Os fungos do gênero *Cryptococcus* são intracelulares facultativos, no ambiente apresentam crescimento de forma independente e em hospedeiros de mamíferos são encontrados em tecidos, fluídos corporais ou também dentro de células fagocíticas (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001; SRIKANTA *et al.*, 2014). A infecção primária é adquirida pela inalação de leveduras dessecadas e basidiósporos de ambiente contaminado com excrementos de pombos ou outras aves geralmente para as infecções por *C. neoformans*, ou pela decomposição de madeiras e outras estruturas vegetais nas infecções por *C. gattii* (DEL POETA & CASADEVALL, 2012). A evolução e o desfecho clínico do paciente dependem da interação entre o patógeno e o hospedeiro. Embora seja conhecido que o genótipo de *C. neoformans* impacta o resultado do paciente, os mecanismos permanecem desconhecidos,

o que pode ser devido à heterogeneidade genética de *C. neoformans* e à extensa variação fenotípica observada entre e dentro dos isolados durante a infecção (NIELSEN *et al.*, 2020).

Os fungos patogênicos oportunistas colonizam diferentes ambientes, podendo ser encontrados em tecidos animais e humanos, plantas e madeira. Para os patógenos humanos, um grande desafio é a transição do habitat ambiental para o hospedeiro humano. Essa transição é enfrentada por *C. neoformans*, e exige a adaptação a diferentes condições como temperatura, osmolaridade, salinidade, pressão, disponibilidade de nutrientes, e o estresse oxidativo (MARTHO *et al.*, 2016). O primeiro sistema de defesa contra os patógenos pulmonares é realizado pelas células do sistema imune inato, tais como células dendríticas e macrófagos encontrados nas vias aéreas e nos pulmões. Embora essas células não eliminem completamente os patógenos, estão envolvidas na sua captação e degradação, que resultam na produção de antígenos fúngicos que irão desencadear diferentes tipos de resposta imune adaptativa (WOZNIAK; WORMLEY JR; OLSZEWSKI, 2012).

A competência da resposta imune do hospedeiro, a quantidade e virulência das células fúngicas determinam o estado de ativação ou latência da doença (MITCHELL & PERFECT, 1995). Em hospedeiros imunocompetentes as células fúngicas são eliminadas pelo sistema imunológico através da fagocitose ou podem permanecer em granulomas estabelecendo uma infecção latente assintomática (MAY *et al.*, 2016). Uma vez no espaço alveolar, as células criptocócicas podem disseminar para o sistema nervoso central (SNC) atravessando a barreira hemato-encefálica (BHE) causando assim processos inflamatórios na meninge que resultam na instalação da meningoencefalite criptocócica (KWON-CHUNG *et al.*, 2014).

As vias potenciais de entrada criptocócica no SNC propostas incluem (a) via paracelular onde o patógeno atravessa as células endoteliais por espaços danificados ou enfraquecidos possivelmente causados pelo fungo, (b) processo de transcitose, no qual as células fúngicas são internalizadas pelas células endoteliais microvasculares que revestem os vasos sanguíneos do cérebro e (c) pelo mecanismo “cavalo de tróia”, onde o patógeno atravessam a BHE no interior de macrófagos (SABIITI & MAY, 2012).

Em um estudo da via denominada “cavalo de tróia” realizado por Santiago-Tirado e colaboradores (2017) foi observado um mecanismo de transferência direta, onde fagócitos carregados com *Cryptococcus* transferem as células fúngicas diretamente para as células endoteliais cerebrais. Diferentes grupos acumularam fortes evidências apoiando a hipótese do cavalo de Tróia. A depleção de macrófagos resulta na redução da carga cerebral de fungos e a injeção de camundongos com macrófagos infectados *ex vivo* com *C. neoformans* aumenta o

número de células de levedura neste órgão (CHARLIE *et al.*, 2009). A patogênese intracelular de *C. neoformans* representa não apenas um mecanismo de evasão no sistema imunológico, mas também uma forma de disseminação do patógeno dentro das células fagocíticas infectadas (ZARAGOZA, 2019).

1.5 Antifúngicos

1.5.1 Terapêutica medicamentosa

O tratamento da criptococose é baseado em três classes de agentes antifúngicos (polienos, flucitosina e azóis). Dependendo da gravidade da infecção e do estado imunológico do hospedeiro, os fármacos dessas classes podem ser utilizados juntos em uma estratégia de tratamento que envolve as fases de indução, consolidação e manutenção (MOURAD & PERFECT, 2018). Outros compostos antifúngicos como nistatinas e alilaminas apresentam uso limitado nos casos de pneumonia ou meningite criptocócica devido a sua incompleta absorção e alta toxicidade (COELHO & CASADEVALL, 2016). Por mais de três décadas a anfotericina B, apontada por causar nefrotoxicidade significativa, foi o único fármaco disponível para tratamento das infecções fúngicas graves. Com o surgimento dos triazóis no início dos anos 90, foi possível avanços no tratamento das infecções fúngicas locais e sistêmicas, garantindo segurança e eficácia, principalmente com o uso do fluconazol, que devido ao uso generalizado, houve o surgimento de relatos de casos de resistência ao antifúngico (GHANNOUM & RICE, 1999).

A flucitosina é um análogo da pirimidina aprovado na década de 1960 e usado em circunstâncias limitadas, como em combinação com um polieno para casos de meningite criptocócica. A flucitosina raramente é usada sozinha devido ao rápido desenvolvimento de resistência aos medicamentos que ocorre durante a monoterapia. A flucitosina é convertida no composto tóxico 5-fluorouracil por uma citosina desaminase que não está presente no hospedeiro humano. Este composto tóxico 5-fluorouracil interfere no metabolismo do RNA e DNA (PERFECT, 2018).

Os primeiros derivados azólicos foram descobertos no final de 1960 e como são substâncias totalmente sintéticas é o grupo de antifúngicos que se expande mais rapidamente (LEWIES, 2011).

Os antifúngicos azólicos de uso clínico contém dois ou três nitrogênios no anel azólico e são subdivididos em imidazóis (como exemplo cetaconazol, imidazol e clotrimazol) e triazóis (como exemplo itraconazol e fluconazol). Com exceção do cetaconazol, a utilização dos imidazóis é limitada ao tratamento de micoses superficiais, enquanto os triazóis possuem uma ampla aplicação no tratamento de infecções fúngicas superficiais e sistêmicas (SHEEHAN *et al.*, 1999). Desde as últimas diretrizes da ISDA em 2000, no espectro dos azóis apenas posaconazol e voriconazol tornaram-se disponíveis como novos fármacos antifúngicos (PERFECT *et al.*, 2003). O paconazol é um antifúngico triazólico de maior espectro dentre os azóis (fluconazol, itraconazol e voriconazol), e tem sido uma opção nos tratamentos de pacientes que não respondem a terapia padrão tendo sido incluído nas diretrizes para tratamento da aspergilose, candidíase e criptococose pela Sociedade de Doenças Infecciosas da América (MOORE *et al.*, 2015).

O voriconazol, triazol de amplo espectro, é derivado sintético do fluconazol que atua na inibição da enzima 14- α -desmetilase alterando a membrana celular e interrompendo o crescimento fúngico. O novo azol apresenta baixa toxicidade e alta eficiência sendo considerado uma importante opção em tratamentos com resistência a outros antifúngicos (SCOTT & SIMPSON, 2007). Estudos clínicos realizado por Yao e outros (2015) em um hospital da China durante o período de janeiro de 1992 a dezembro de 2013 avaliaram o tratamento de 55 pacientes com diagnóstico de meningite criptocócica que foram distribuídos em três protocolos de tratamento: anfotericina combinada com flucitosina, anfotericina combinada com fluconazol e o terceiro grupo com tratamento apenas com voriconazol. Dos 55 pacientes avaliados, 8 foram curados, 33 apresentaram melhora clínica e 14 tiveram falha no tratamento, sendo a maioria desses pacientes do grupo que receberam o protocolo de anfotericina combinada com flucitosina. No entanto, nenhum dos pacientes que receberam apenas voriconazol apresentaram falha no tratamento. O voriconazol também já foi relatado apresentando sucesso no tratamento em hospedeiros imunocompetentes (YAO *et al.*, 2015).

O fluconazol é o principal antifúngicos da classe dos azóis utilizado no tratamento da criptococose por apresentar baixa toxicidade, alta eficácia, disponibilidade de administração via oral e parenteral, além de boa biodisponibilidade nos líquidos corpóreos (FICA *et al.*, 2004). Em pacientes imunocompetentes, as orientações clínicas recomendam o fluconazol oral para pacientes com sintomas moderado a grave, e o uso de anfotericina B associada ao fluconazol para manifestações grave da doença. As diretrizes para tratamento de casos de criptococose pulmonar em pacientes imunocompetentes preconiza o uso de fluconazol 400 mg/dia via oral

por 6 a 12 meses para sintomas moderados, e anfotericina B 0,7 – 1,0 mg/kg via intravenosa + flucitosina 100 mg/kg em 4 doses seguido de fluconazol 800 mg/dia por 8 semanas para sintomas graves incluindo meningite criptocócica. O itraconazol e voriconazol 200 mg duas vezes ao dia e posaconazol 400 mg duas vezes ao dia via oral são terapêuticas de alternativas em casos de contraindicação ou não disponibilidade de fluconazol para doença pulmonar (PERFECT *et al.*, 2010, FISHER *et al.*, 2016). Os triazóis itraconazol, posaconazol e isavuconazol são usados para tratar a meningite criptocócica (GANS *et al.*, 1992; PITISUTTITHUM *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2016), como componente chave do tratamento clínico de micoses invasivas atuando como agentes antifúngicos de amplo espectro para uso em estratégias profiláticas para prevenção de infecções e para prevenir manifestações de doenças (ALLEN *et al.*, 2015).

No Brasil, o esquema terapêutico para tratamento da meningite criptocócica e outras formas de criptococose que afetam o sistema nervoso central (SNC) em imunocompetentes consiste na terapia com anfotericina B na dose de 1,0 mg/kg/dia via intravenosa mais 5-fluocitocina 100 mg/kg/dia via oral, de 6 em 6 horas durante 14 dias para a fase de indução. A fase de consolidação é feita com fluconazol 400 mg/dia via oral por 6 a 10 semanas. Para pacientes imunossuprimidos (HIV ou outra imunossupressão), após a fase de consolidação é feito o tratamento para manutenção com fluconazol 200 ou 400 mg/dia via oral por 12 a 14 meses (BRASIL, 2010).

A maioria dos casos de resistência ou recaídas são atribuídos a uma terapêutica primária inadequada em função da dose e/ou manutenção da dose de fluconazol. Embora poucos dados clínicos sugerem que cepas criptocóccicas adquiram resistência aos fármacos na última década, a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (IDSA) através das Diretrizes Práticas para o Tratamento da Doença Criptocócica atualizado em 2010, apontam que o controle da imunidade do hospedeiro, o sítio da infecção e a toxicidade dos fármacos antifúngicos são fatores críticos no tratamento da doença (PERFECT *et al.*, 2010).

1.5.2 Resistência aos antifúngicos

A definição clássica para resistência clínica é a persistência ou progressão de uma infecção diante da administração do tratamento antifúngico. A resistência á antifúngicos pode ser primária, quando o fungo é intrinsecamente resistente ao fármaco ou secundária, quando a

resistência se desenvolve em resposta à exposição ao fármaco durante o tratamento (PEREA & PATTERSON, 2002).

A resistência antifúngica é um processo evolutivo no qual os microrganismos desenvolvem três principais mecanismos afim de combater os efeitos fungicidas ou fungistático dos medicamentos. Esses mecanismos são baseados na diminuição efetiva da concentração do fármaco, modificação no metabolismo para combater a toxicidade dos fármacos e alteração do alvo (CAMPOY & ADRIO, 2016).

A suscetibilidade de *C. neoformans* aos tratamentos atualmente disponíveis vem diminuindo, e é variável com base no ambiente e no perfil de expressão da célula fúngica (MOMIN & WEBB, 2021). Dentro os fatores ambientais, o aumento do uso de agroquímicos podem ser responsáveis pela diminuição da susceptibilidade de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos utilizados atualmente, uma vez que essas espécies são frequentemente isoladas de materiais vegetais. A exposição de *C. gattii* e *C. neoformans* ao pesticida tebuconazol causou resistência cruzada (CR) *in vitro* com os fármacos azólicos fluconazol, itraconazol e ravuconazol, além de alterações na morfologia, incluindo a formação de pseudo-hifas em *C. neoformans* H99 (BASTOS *et al.*, 2018).

Estudos apontam que resistências adquiridas e pontuais aos compostos azólicos podem estar relacionadas a diferentes mecanismos que inclui alterações na síntese do ergosterol, permeabilidade e efluxo celular (DENNING *et al.*, 1993). Isolados de *C. neoformans* resistentes a azóis demonstraram resistência secundária associada a alterações da afinidade da enzima 14- α -desmetilase e diminuição de concentração intracelular de azóis devido ao aumento da expressão das bombas de efluxo (JOSEPH-HORNE *et al.*, 1995). A melanina que tem capacidade oxidante importante na virulência de *C. neoformans*, pode contribuir para a resistência adquirida contra os antifúngicos anfotericina B e caspofungina, uma vez que as células criptocócicas não melanizadas são mais susceptíveis que as células melanizadas á esses dois antifúngicos (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002).

O uso generalizado do fluconazol no tratamento das infecções fúngicas se dá pela baixa toxicidade e grande eficácia do fármaco, ao passo que sua aplicação contribuiu para um aumento da resistência fúngica nos últimos anos. Os fármacos antifúngicos disponíveis para terapêutica são limitados e esse é um fator emergente da necessidade de pesquisas e caracterização de novos alvos de drogas antifúngicas (LIU *et al.*, 2015).

1.5.3 Alvos para o desenvolvimento de antifúngicos

Diversos estudos têm apontado novos e promissores alvos de agentes antifúngicos. Um exemplo destes alvos seria a melanina ou a enzima lacase, estudos já mostraram que a adição de partículas de melanina a anfotericina B ou cefalosporina reduz consideravelmente os níveis de toxicidade da anfotericina contra *C. neoformans*, o que indica a melanina e enzima lacase como alvos promissores para ação dos antifúngicos (ALMEIDA *et al.*, 2015).

A formação de biofilme, comunidade microbiana que confere resistência a maioria dos antifúngicos, é um dos fatores críticos no tratamento das infecções fúngicas. O estudo da busca por substâncias que diminuam ou inibam a formação do biofilme pode permitir a identificação de novos alvos terapêuticos (PIERCE *et al.*, 2013).

Outro alvo interessante é a calcineurina, que é uma proteína importante na regulação do estresse celular, diferenciação sexual e virulência em *C. neoformans*. A caracterização da via de ativação da calcineurina pode definir as redes de virulência responsivas a proteína e com isso ferramentas para seu controle nos processos infecciosos (HEITMAN *et al.*, 2016).

As enzimas desempenham atividades fundamentais no desenvolvimento das infecções fúngicas. A manipulação da atividade e expressão enzimática pode modificar de forma crítica o processo de infecção, sendo os perfis de expressão enzimática uma característica específica da doença. Os estudos da genômica, proteômica e transcriptômica permitem a identificação e caracterização de novas enzimas fúngicas que são alvos para uma melhor compreensão da patogênese e identificação de novos alvos para combate dos processos infecciosos (ALMEIDA *et al.*, 2015).

A descoberta de novos agentes antifúngicos é desafiadora, pois como patógenos eucariotos, os fungos compartilham semelhanças em seus mecanismos celulares aos do hospedeiro humano, reduzindo assim o número de alvos específicos do patógeno. Portanto, é essencial identificar os mecanismos bioquímicos exclusivos dos fungos como alvos de descoberta de drogas a fim de desenvolver as próximas gerações de fármacos antifúngicos com alta potência e baixa toxicidade para tratamento humano (MAZU *et al.*, 2016; PERFECT, 2017; RUTHERFORD *et al.*, 2019).

As vias metabólicas e de sinalização que são exclusivas dos fungos e / ou regulam fatores associados á virulência e que atualmente estão entre os principais alvos promissores para o desenvolvimento de medicamentos são: ciclo do glioxilato (rota anaplerótica do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), contornando as reações que geram CO₂), chaperona Hsp90 (que em fungos medeia as respostas ao estresse, virulência e resistência a drogas), via esfingolipídica

(junto com esteróis são os principais constituintes de lipídios fúngicos), vias responsivas ao estresse (em fungos incluem a via de sinalização do AMP cíclico, a via da proteína quinase C (PKC) / Mpk1 ativada por mitogênio da proteína quinase e a via do glicerol de alta osmolaridade), via da trealose (dissacarídeo de armazenamento de energia e fonte de carbono) (FERNANDES *et al.*, 2021).

1.5.4 Busca por novos antifúngicos

As infecções por *Cryptococcus* spp. representam uma ameaça contínua para a saúde pública, sendo iminente a necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos. A única nova classe de drogas antifúngicas desenvolvida em décadas, as equinocandinas, exibe ínfima atividade antifúngica contra *Cryptococcus* spp., e a eficácia da terapêutica restante é prejudicada pela toxicidade do hospedeiro e sua resistência intrínseca a droga (IYER *et al.*, 2021).

Um agente antifúngico ideal deve atender a critérios como possuir amplo espectro de atividade contra uma variedade de leveduras e fungos filamentosos, ser fungicida e não fungistático, ter mecanismo de ação direcionado para um alvo fúngico específico, apresentar diferentes vias de administração principalmente via oral, e ter níveis mínimos de toxicidade e efeitos secundários (MAZU *et al.*, 2016). Diferentes tipos de moléculas com atividade antifúngica estão em fase de desenvolvimento clínico através de empresas farmacêuticas (PERFECT, 2017).

O interesse da comunidade científica no estudo e desenvolvimento de novas estratégias para a busca de compostos antifúngicos incluindo o direcionamento de genes essenciais ou funções celulares, fatores de virulência, vias de sinalização de resposta ao estresse, associação de compostos e terapias imunomoduladoras representa um grande avanço e possibilidades de desenvolvimento de novos antifúngicos. Dentre os compostos em desenvolvimento e que apresentam atividade contra *Cryptococcus* spp estão em fase de ensaios clínicos a molécula APX001 (atua parede celular) e VT-1598 (inibe a enzima biossintética do ergosterol Erg11 para interromper a integridade da membrana). As moléculas APX879 (inibidor de calcineurina), Benzotioureias (inibe a via secretora pós-golgi tardia impedindo a integridade da parede celular), Clofazimine (alvos membranas fúngicas), Hidrazicinas (inibe a síntese do esfingolípido glucosilceramida), Ibomicina (como alvo as membranas fúngicas), o anticorpo monoclonal 18B7 (liga-se ao componente capsular glucuronoxilomanano) e o composto

Resorcilar aminopirazol (inibidor de Hsp90 seletivo para fungos) apresentaram resultados com eficácia exibida na pesquisa básica (IYER *et al.*, 2021),

Considerando o aumento da mortalidade causada por infecções fúngicas na última década, pequenos avanços na terapia antifúngica foram relatados durante esta década. Como apenas uma pequena fração de novos compostos submetidos a estudos serão aprovados e lançados no mercado para uso clínico, é imprescindível que mais compostos com atividade antifúngica sejam identificados e estudados continuamente nos próximos anos (FERNANDES *et al.*, 2021).

1.5.5 Heterocíclico tiazólico

Os compostos heterocíclicos tiazólicos apresentam um átomo de enxofre na primeira posição e um átomo de nitrogênio na terceira posição de um anel aromático de cinco membros (Figura 5). Esses compostos apresentam cor amarelo claro, ponto de ebulição de 116-118 °C, solubilidade em água e éter e são moderadamente solúveis em água. As substâncias tiazólicas são usadas como intermediário para fabricação de drogas, fungicidas e corantes, sendo o anel de tiazol encontrado naturalmente na vitamina B1 (SIDDIQUI *et al.*, 2009).

Os núcleos tiazólicos representam uma importante classe de compostos heterocíclicos com potente e amplo espectro atividade biológica, e diferentes aplicações sintéticas para produção de novos compostos, o que tem impulsionado a realização de muitos estudos dessas substâncias (DE SOUZA *et al.*, 2005). O núcleo tiazolínico é encontrado em muitos compostos biologicamente ativos e potentes, como sulfatiazol (antimicrobiano), ritonavir (antirretroviral), abafungina (antifúngico), bleomicina e tiazofurina (antineoplásico) (KASHYAP *et al.* 2012), o que torna interessante o estudo destes compostos.

O anel tiazólico está contido em mais de 18 medicamentos aprovados pelo FDA, entre eles o cefiderocol, antibiótico aprovado pelo FDA em 2019 sob a marca Fetroja®, ativo contra uma gama de bactérias gram-negativas multirresistente, incluindo *Pseudomonas aeruginosas*. Derivados híbridos de tiazol com diferentes anéis heterocíclicos são descritos com diferentes atividades biológicas, incluindo atividade antifúngica. Nos últimos cinco anos aproximadamente 124 estudos científicos foram realizados descrevendo a síntese e atividade dos compostos heterocíclicos tiazólicos (PETROU *et al.*, 2021). Esses dados reforçam a relevância dos estudos para triagem e avaliação da atividade antifúngica de compostos dessa classe.

Em nosso grupo de pesquisa, Pereira de Sá e colaboradores (2015) descreveram compostos sintéticos heterocíclicos tiazólicos com atividade *in vitro* contra *C. neoformans* e *C. gattii*, apresentando baixa toxicidade e significativa atividade antifúngica, com valores de CIM entre 0,45 e 15,6 μM , considerados promissores por se assemelharem aos valores de CIM da anfotericina B e fluconazol, representando assim como importantes protótipos para o desenvolvimento de novos antifúngicos para o tratamento da criptococose.

O anel tiazólico é uma importante estrutura na química medicinal, muitos compostos orgânicos contendo um ou mais anéis tiazólicos apresentando promissoras atividades incluindo antifúngica foram recentemente descritos na literatura. A facilidade de sintetização a partir de uma ampla variedade de compostos iniciais, associado ao grande potencial de atividade biológica demonstra que o estudo desses compostos heterocíclicos tiazólicos representa importante estratégia e contribuição no processo de busca e desenvolvimento de novas drogas (BORCEA *et al.*, 2021).

1.5.6 Complexos de inclusão entre antifúngicos e ciclodextrina

As ciclodextrinas (CDs) são compostos cíclicos formados a partir da degradação de amido pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase, as quais são produzidas por microrganismos e apresentam um grande potencial em aplicações industriais. Devido ao seu arranjo tridimensional, suas moléculas apresentam um espaço (cavidade) interno apolar. Esse espaço no interior da molécula permite que as CDs formem complexos de inclusão com uma grande variedade de compostos, modificando suas propriedades físicas e químicas, dentre essas a solubilidade de medicamentos. Resumidamente, as CDs funcionam como transportadores moleculares, carregando as moléculas hidrofóbicas hóspedes em solução até as membranas lipofílicas para qual apresentam maior afinidade (LIMA-GUEDES *et al.*, 2008).

As CDs conhecidas como naturais contém seis, sete e oito unidades de glicose, sendo denominadas de α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina. A estrutura espacial cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a estes açúcares cíclicos propriedades físico-químicas únicas que garantem a capacidade de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas (CUNHA-FILHO *et al.*, 2007).

Algumas propriedades apresentadas pelas ciclodextrinas naturais são inadequadas para aplicação de formulações de complexos medicamentosos, como baixa solubilidade em água e

maior toxicidade. Modificações químicas nas ciclodextrinas são empregadas afim de proporcionar melhora da solubilidade, menor toxicidade e aumento da capacidade de inclusão, sendo essas denominadas ciclodextrinas derivadas (CHORILLI *et al.*, 2007).

A hidroxipropil- β -CD (HP- β CD) é um derivado da β ciclodextrina e foi descrita por Duchêne & Wouessidjewe (1990) apresentando um aumento superior a 25 vezes na solubilidade em água a 25 °C. Baixa toxicidade aguda do derivado hidroxipropil- β -CD (HP- β CD) foi citado por Pitha & Pitha (1985) após sua administração via intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intracraniana e tópica.

A aplicação das CDs nas formulações farmacêuticas já é consolidada e está presente em diferentes classes de fármacos disponíveis no mercado e em diferentes apresentações, incluindo os antifúngicos (Tabela 1).

Tabela 1. Antifúngicos contendo ciclodextrina disponíveis no mercado.

Fármaco	Nome comercial	Indicação	Formulação	Fabricante/País
Voriconazol	VFEND	Antifúngico	Solução parenteral	Pfizer/EUA
Itraconazol	Sporanox Liquid	Antifúngico	Oral e intravenosa	Janssen/Bélgica

O interesse da complexação de medicamentos com ciclodextrinas (CD) pela indústria farmacêutica ocorreu a partir da complexação do princípio ativo β -lactamase com CDs, representados pelos antibióticos penicilina e amoxicilina (RAWAT *et al.*, 2004). As associações das CDs já foram estudadas em mais de 500 princípios ativos melhorando a sua biodisponibilidade, estabilidade e segurança através da formação de complexos de inclusão reversíveis em água (SZEJTLI, 2005).

A capacidade das ciclodextrinas melhorarem a solubilidade de compostos, atuar no transporte e entrega de substâncias de baixa solubilidade, como a maioria dos medicamentos, têm impulsionado na última década muitos estudos promissores no campo de formulações farmacêuticas (PETITJEAN *et al.*, 2021).

1.6 Modelo alternativo invertebrado *Tenebrio molitor*

O modelo animal murino é classicamente usado para estudos de patógenos humanos, envolvendo avaliação da atividade antifúngica de novos compostos, mecanismos de virulência e relação patógeno-hospedeiro. Questões bioéticas envolvendo experimentos com o modelo animal são discutidas na comunidade científica e envolvem a redução do uso de modelos animais vertebrados e o custo dos ensaios científicos (GARCIA-RODAS *et al.*, 2011). Para o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento para a criptococose, é necessário identificar os fatores fenotípicos e genotípicos da levedura durante a infecção do hospedeiro que contribuem para a evolução da doença (ALTAMIRO *et al.*, 2020).

O modelo de invertebrado amplamente utilizado é a larva da mariposa *Galleria mellonella*. Este inseto possui características semelhantes ao *T. molitor* como hospedeiro alternativo, pois pode ser incubado a 37 °C e o inóculo pode ser fornecido por injeção no entanto, sua criação em condições de laboratório é mais trabalhosa (DESALERMOS *et al.*, 2021). Um fator relevante é que a *G. mellonella* não é comercializada em alguns países, obrigando as instituições a manter o seu próprio abastecimento para sua utilização, demandando mão de obra técnica e o aumento dos custos dos experimentos. No Brasil, existem vários fornecedores comerciais de *T. molitor* (SOUZA *et al.*, 2018). Durante seu ciclo de vida, *G. mellonella* pode ser encontrada na forma de larva, pupa ou mariposa e é conhecida como a traça do favo de mel (TREVIANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2018), o que exige maior cuidado em sua manipulação em laboratório.

Tenebrio molitor (Coleoptera) é um besouro da larva da farinha, praga de grãos armazenados (SCHROECKENSTEIN *et al.*, 1990). Estudos demonstram o potencial das larvas de *T. molitor* como um modelo de hospedeiro que pode ser usado para estudar a virulência fúngica, as respostas imunes do hospedeiro à infecção fúngica e a ação de compostos antifúngicos (SOUZA *et al.*, 2015).

O curso da infecção microbiana em insetos é moldado por um processo de defesa em dois estágios. As defesas constitutivas, como engolfamento e melanização, agem imediatamente e são seguidas por defesas induzíveis, arquetipicamente a produção de peptídeos antimicrobianos, que eliminam ou suprimem os patógenos restantes (JOHNSTON *et al.*, 2014). Os fagócitos são análogos aos macrófagos humanos e reconhecem microrganismos usando receptores e opsoninas (CHERRY & SILVERMAN, 2006). Diferentes estudos realizados sobre mecanismos do sistema humoral, principalmente na síntese de peptídeos antimicrobianos, mostram que o modelo invertebrado *T. molitor* têm características semelhantes às dos vertebrados. Esses estudos demonstram o potencial das larvas de *T. molitor* como um

hospedeiro modelo que pode ser usado no estudo de virulência fúngica, micotoxinas, respostas imunes do hospedeiro à infecção fúngica e também na triagem e avaliação da atividade antifúngica de compostos (SOUZA *et al.*, 2018).

A publicação do transcriptoma de *T. molitor* (OPPERT *et al.*, 2012) proporcionou a possibilidade de realização de avanços e novos estudos deste modelo de invertebrado incluindo o sistema imunológico e a resposta a infecções de patógenos (SOUZA *et al.*, 2015). Diante disso, consideramos promissor o uso do *T. molitor* neste estudo na triagem e avaliação da toxicidade de compostos com atividade antifúngica e dos fatores de virulência. Este modelo apresenta outras vantagens importantes como a facilidade de manipulação das larvas, demanda de pouco espaço para manutenção em laboratório e a possibilidade de estudo de fatores de virulência em temperatura do hospedeiro a 37°C.

2. JUSTIFICATIVA

A criptococose é uma micose sistêmica, de distribuição global e negligenciada, que representa uma ameaça à saúde pública. A infecção por *C. neoformans* predomina em hospedeiros imunocomprometidos enquanto a criptococose por *C. gattii* ocorre principalmente em hospedeiros imunocompetentes. Em pacientes com imunossupressão severa, a terapia antifúngica pode ser necessária ao longo da vida, contudo, existem poucas opções terapêuticas, as quais apresentam restrições devido à toxicidade e surgimento de resistência. O fluconazol é o fármaco de escolha para manutenção do tratamento a longo prazo e um dos problemas de seu uso prolongado é a indução da resistência em *Cryptococcus* spp., por ser uma droga fungistática.

As altas taxas de morbidade e mortalidade causadas pelas infecções criptocócicas associadas ao limitado arsenal de antifúngicos disponíveis para aplicação clínica, torna o estudo de novas substâncias com ação antifúngica uma necessidade emergente para o desenvolvimento de novos fármacos que possam contribuir para redução do tempo de tratamento, controle de resistência antifúngica, aumento da tolerabilidade e qualidade terapêutica nas infecções

Neste contexto, o estudo e avaliação da atividade antifúngica de substâncias sintéticas da classe heterocíclicos tiazólicos contra *Cryptococcus* spp. pode contribuir na busca e o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos, com o intuito de no futuro, após todos os testes necessários, ampliar o arsenal de fármacos disponíveis no mercado para o tratamento da criptococose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica de substâncias da classe heterocíclicas tiazólicas e seus efeitos nos fatores de virulência de *Cryptococcus* spp.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar triagem da atividade antifúngica de diversas substâncias sintéticas contra isolados de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*.
- Determinar o espectro de ação das substâncias selecionadas contra outras leveduras de importância médica.
- Avaliar a concentração fungicida mínima da substância selecionada contra isolados de *C. neoformans*.
- Avaliar a interação das substâncias selecionadas com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol para isolados de *C. neoformans*.
- Verificar a atividade da substância selecionada sobre fatores de virulência de *Cryptococcus neoformans* H99.
- Avaliar a toxicidade das substâncias selecionadas no modelo invertebrado de *Tenebrio molitor*.
- Determinar a curva de sobrevivência em invertebrado *Tenebrio molitor* após infecção e tratamento com as substâncias selecionadas.
- Determinar a curva de sobrevivência em modelo murino de criptococose após o tratamento com a substância selecionada.
- Avaliar a eficácia da substância RN-104 complexada com ciclodextrina no tratamento experimental de criptococose em modelo murino.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PARTE I: Triagem de substâncias sintéticas e avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de heterocíclicos tiazólicos frente a *Cryptococcus* spp.

4.1.1 Substâncias experimentais

No presente trabalho foram testadas 23 substâncias sintéticas *in vitro* contra diversos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*. As substâncias triadas identificadas como RIA 16, RIA 17, RIA 18, RIA 19, RIA 20, RIA 25, RIA 26, RIY21, RIY 23, RIY 24, CAS 2, CAS 3, CAS 6, CAS 9, RPL1, RIF 5, RIF 7, PD76, 2BZ50-31#, HTI-7, HTI-12, HTI-13 e HTI-14 foram sintetizadas e cedidas pela professora Renata Barbosa de Oliveira do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O composto HTI-7 (E) -2 - [(2-benzilidenociclohexilideno) hidrazinil] -4 (cianofenil) foi sintetizado de acordo com a metodologia descrita por LINO *et al.*, 2018 (designada como 14 por esses autores), a síntese do composto HTI-14 1- cyclopentylidene-2-(4-(iodophenyl)thiazol-2-yl)hydrazine foi descrito anteriormente na literatura por Secci *et al.*, 2012, o composto PD76 (2-hydrazinyl-4-(4-methoxyphenyl)thiazole) foi sintetizado conforme FRANCO *et al.*, 2021.

4.1.2 Fungos e preparo do inóculo

Os microrganismos utilizados no presente estudo foram provenientes do acervo de culturas do Laboratório de Micologia / Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e gentilmente cedidos pelo Prof. Daniel Assis Santos. Todos os isolados de *C. gattii* e *C. neoformans* foram armazenados a -80°C em caldo Gymp com glicerol e sub-cultivados em placas Sabouraud Dextrose Agar (SDA) a 35 °C, conforme necessário. 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 foram então ajudados para 75-77% sob o comprimento de onda de 530 nm, o que corresponde a 1×10^6 a 5×10^6 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 1×10^3 células/ml, de acordo com o protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008).

4.1.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados seguindo as orientações prescritas no CLSI, protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008). A suscetibilidade foi determinada pelo método de microdiluição, o qual foi realizada em microplacas de 96 poços estéreis de fundo plano (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA). As substâncias foram diluídas em DMSO (Vetec, RJ, Brazil) e, em seguida, foram preparadas diluições seriadas das substâncias sintéticas em meio RPMI 1640. Posteriormente 100 μ L de cada diluição foram distribuídos nas microplacas. O controle de crescimento e esterilidade foi constituído de meio RPMI 1640. O fluconazol e a anfotericina B foram incluídos como controle positivo do antifúngico. O controle negativo foi composto por 200 μ L de meio de cultura. Após a preparação das placas, todos os poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo, receberam 100 μ L do inóculo fúngico. Foram realizados dois experimentos independentes feitos em duplicata. As placas foram incubadas a 35°C durante 48-72 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 faixas intervalares testadas neste experimento foram de 0,012 – 64 μ g/mL para fluconazol, 0,015 – 8 μ g/mL para anfotericina B e 0,24 a 125 μ g/mL para as substâncias experimentais.

4.1.4 Teste de susceptibilidade antifúngica contra outras leveduras de importância médica

Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados seguindo as orientações prescritas no CLSI, protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008) conforme descrito no item 4.1.3 e a CIM foi determinada visualmente por comparação com o poço controle de crescimento sem antifúngico. Para anfotericina B e substâncias experimentais foram considerados a CIM como a concentração que inibiu 100% do crescimento e para fluconazol a concentração que inibiu 80% de crescimento. Os ensaios foram realizados em duplicata em dois experimentos independentes.

4.1.5 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

O ensaio foi realizado de acordo com Regassini e colaboradores (2009) para os isolados clínicos de *C. neoformans* ATCC 24067, ATCC 28957, ATCC 62066, WP, F10, VM-MCMMPI, 96806, 5396, 28 JF, H99, 27JF e o isolado ambiental CN31. 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. 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 duas vezes e em duplicata.

4.1.6 Avaliação da concentração inibitória fracional

A substância experimental foi diluída oito vezes, as concentrações utilizadas foram escolhidas de acordo com os resultados encontrados no ensaio da CIM. 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 dos isolados de *C. neoformans* citados acima foram preparados de acordo com o item 4.1.2 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 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 para todos os isolados de *Cryptococcus neoformans*.

4.1.7 Avaliação do efeito na parede celular

O ensaio foi realizado com os isolados de *C. neoformans* ATCC24067 e H99 pelo procedimento de microdiluição em caldo descrito para o ensaio de CIM acima. Para isto foram preparadas placas em duplicata contendo as diluições seriadas dos compostos em meio RPMI e em meio RPMI acrescido de sorbitol 0,8 M como protetor osmótico. As CIMs foram lidas após 72 horas de incubação a 35 °C (FROST et al., 1995).

4.1.8 Atividade de fosfolipase

Para avaliação da atividade da substância HTI-14 sobre a produção da exoenzima fosfolipase nos isolados clínicos *C. neoformans* ATCC 24067, ATCC 28957, ATCC 62066, WP, F10, VM-MCMMPI, 96806, 5396, 28 JF, H99, 27JF e o isolado ambiental CN31 os inóculos foram preparados em PBS com 10^6 células/mL, e 1 mL de desta suspensão recebeu 4 mL de SDB com a substância HTI-14 na concentração de CIM. Os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora. Após, os tubos foram lavados 3 vezes com PBS e as células foram ressuspensas em 3 mL de PBS. Para verificar a inibição da fosfolipase, um meio de cultura meio base contendo 20g de glicose, 10g de peptona, 5g de extrato de levedura, 58,5 g de cloreto de sódio, 0,55g de cloreto de cálcio e 20g de ágar em 840mL de água destilada foi preparado. O meio foi autoclavado e, após o resfriamento, foram adicionados 160 ml de uma emulsão de gema de ovo (50% gema de ovo, 50% solução salina). O inóculo de 10µl de uma suspensão de 10^6 células/mL foi depositado sobre este meio. As placas foram incubadas a 37°C por quatro dias. A atividade enzimática (Pz) foi avaliada seguindo métodos descritos por Price *et al.*, 1982, que mediu em termos da razão do diâmetro da colônia para o diâmetro total da colônia mais a zona de precipitação. O ensaio foi realizado em triplicata para cada isolado.

4.1.9 Atividade da proteinase

A avaliação da inibição da produção de proteinase pela substância HTI-14 foi realizada com todos os isolados de *C. neoformans* citados acima. Para este ensaio foi preparado um meio contendo 11,7g de Yeast Carbon Base (YCB), 1,0g de extrato de levedura, e 2,0g de albumina de soro bovino (ASB) em 100ml de água destilada com pH ajustado para pH 5,0. O meio foi esterilizado por filtração e adicionada ao meio de ágar esterilizado em autoclave (18g de ágar em 900mL de água destilada). O inóculo composto por 10 µL de uma suspensão de 10^6

células/mL foi colocado na placa com o meio contendo ASB. As placas foram incubadas por sete dias a 28 °C e a proteólise foi visualizada como um halo branco após coloração com negro de amido (negro de amido, 1g, ácido acético glacial, 199mL, água destilada 100mL ao redor da colônia. O ensaio foi realizado em triplicata para cada isolado.

4.1.10 Avaliação do efeito na integridade do biofilme

A verificação do efeito na integridade do biofilme foi realizada como descrito anteriormente por Martinez e colaboradores (2016), com algumas modificações. Os isolados *C. neoformans* ATCC24067 e *C. neoformans* H99 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, adicionando - se 100 µl do inóculo em placas de 96 poços e estas foram incubadas a 35°C por 24 horas, para que ocorresse a formação do biofilme. Em seguida, adicionou-se 100 µl da substância HTI-14 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. e 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 PBS1X para remover as células criptocócicas não aderidas. Todos os ensaios foram realizados em 30 repetições. A quantificação do biofilme foi feita pela avaliação da redução celular utilizando o MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Posteriormente foi adicionado 100µl de MTT (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).

4.1.11 Toxicidade em *Tenebrio molitor*

As larvas de *Tenebrio molitor* foram obtidas da empresa Nutrinsecta localizada em Betim – Minas Gerais, Brasil. Para o ensaio de toxicidade em modelo de invertebrado foram utilizadas larvas de *T. molitor* com peso entre 100 e 200 mg apresentando cor clara uniforme e sem manchas escuras. Previamente, as larvas foram desinfetadas com álcool 70%. As larvas

foram inoculadas com 10 µL das concentrações de 5, 10 e 30 mg/kg/larva utilizando seringa Hamilton de calibre 26 com capacidade de 10 µL. As substâncias selecionadas foram injetadas na hemocele entre o segundo e terceiro segmento abdominal visível acima das pernas da larva, na porção ventral. Após a injeção, as larvas foram incubadas a 37°C e monitoradas diariamente por 15 dias para determinação da curva de morte. Foram realizados dois experimentos em duplicata com n=16 larvas por grupo. Foram utilizados dois grupos controle:

- Grupo de larvas não infectadas, para avaliar a viabilidade geral das larvas;
- Grupo de larvas com injeção de PBS, para avaliar a morte das larvas por trauma da injeção.

4.1.12 Curva de sobrevivência em *Tenebrio molitor*

Para o ensaio de sobrevivência no modelo *T. molitor* o inóculo do isolado *C. neoformans* H99 foi ajustado em hemocitômetro para a concentração final de $1,0 \times 10^6$ células/larva em meio PBS estéril. Antes da infecção, as larvas foram desinfetadas com swab em álcool 70% na porção ventral. Para inocular as larvas, 10µl do inóculo foram injetados na hemocele entre o segundo e o terceiro segmento abdominal visível acima das pernas da larva na porção ventral. Em seguida, as larvas foram tratadas com substâncias HTI-7 e HTI-14 nas concentrações de 5, 10 e 30 mg/kg e fluconazol 10 mg/kg como controle. As substâncias utilizadas foram previamente solubilizadas no veículo DMSO 0,05%, PBS 0,05% e Tween 0,05%. Os experimentos foram realizados em duplicata com n = 16 larvas por grupo. Dois grupos de controle foram usados:

- Grupo de larvas não infectadas, para avaliar a viabilidade geral das larvas;
- Grupo de larvas com injeção de PBS para avaliar a morte das larvas devido ao trauma da injeção.

Após a infecção e tratamento, as larvas foram incubadas a 37°C e monitoradas diariamente por 7 dias para determinar a curva de sobrevivência. As larvas foram monitoradas diariamente por inspeção visual para observar a ausência de movimento sob estimulação física leve.

4.1.13 Curva de sobrevivência em modelo murino

Para os experimentos da curva de sobrevida em modelo murino, foram utilizados camundongos C57BL/6 machos com aproximadamente 6 a 8 semanas e 25 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovado com Protocolo CEUA: 401/2017. Leveduras de *C. neoformans* H99 foram cultivadas em ágar sabouraud dextrose a 37 °C por 48 horas. As células foram transferidas para solução salina estéril e o inóculo quantificado hemocítmetro para concentração final de 1×10^5 células/animal.

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (IP) com solução de xilazina, cetamina e PBS estéril (80 mg/kg/10 mg/kg). Após a anestesia, os animais foram submetidos à infecção pela via intratraqueal (IT) através de uma incisão transversal de aproximadamente 1 cm feita na pele da região do pescoço para expor a traqueia. Usando uma seringa Hamilton, 30 µl do inóculo fúngico (1×10^5 células/animal) foram injetados. Imediatamente após a infecção, os animais foram suturados e mantidos aquecidos a 35 °C até a recuperação da anestesia. Os grupos experimentais utilizados foram:

- 1 - Grupo de animais não infectados (n=4);
- 2 - Grupo de animais infectados e não tratados (n=4);
- 3 - Grupo de animais infectados e tratados com veículo (n=6);
- 4 - Grupo de animais infectados e tratados com fluconazol 10 mg/kg/dia (n=6);
- 5 - Grupo de animais infectados e tratados com HTI-7 5mg/kg/dia (n=6);
- 6 - Grupo de animais infectados e tratados com HTI-7 10 mg/kg/dia (n=6).

O fluconazol foi solubilizado em água destilada estéril e a substância HTI-7 foi solubilizada no veículo contendo DMSO, Twin 80, PEG 400 e PBS. O tratamento foi iniciado 24 horas após a infecção. A substância experimental nas doses de 5 e 10 mg/kg/dia, o fluconazol 10 mg/kg/dia e o veículo foram administrados diariamente por via intraperitoneal durante 15 dias. Após a realização dos procedimentos, os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas separadas e receberam água e ração *ad libitum*. Os animais foram monitorados diariamente para a construção da curva de sobrevivência no período de 72 dias. Durante todo o experimento os animais foram pesados e monitorados para avaliação da perda de peso.

4.1.14 Análise estatística

As curvas de sobrevivência de *T. molitor* e modelo murino foram plotadas e a análise estatística foi realizada pelo teste de Kaplan-Meier usando o software estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Califórnia, CA, EUA). Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. Para a análise estatística dos resultados dos testes de virulência e de atividade antifúngica em modelo murino utilizou-se o teste de comparação múltipla Newman-Keuls utilizando software GraphPad Prism, valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo e os resultados expressos como média \pm erro padrão da variável.

4.2 PARTE II

Avaliação da atividade antifúngica do complexo RN-104/ciclodextrina no tratamento da criptococose em modelo murino

4.2.1 Substâncias experimentais

O composto RN-104 ((E)-2-[2-(ciclohexilmetileno)hidrazinil]-4-feniltiazol) foi sintetizado conforme metodologia descrita por SÁ *et al.*, 2015 (identificado como 1d pelos autores). A ciclodextrina utilizada neste trabalho é a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (2-HP- β -CD) e foi adquirida comercialmente na Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil). O complexo RN-104/ciclodextrina foi preparado conforme descrito por Silva *et al.*, 2021.

4.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os testes de concentração inibitória mínima (CIM) foram realizados seguindo as orientações prescritas no CLSI, protocolo M-27-A3 (CLSI, 2008) conforme descrito no item 4.1.3. A substância RN-104 livre foi solubilizada em DMSO e meio RPMI, a ciclodextrina livre e o complexo RN-104/ciclodextrina liofilizado foram solubilizados em PBS. As faixas intervalares testadas foram de 0,25 – 128 $\mu\text{g/mL}$ para RN-104 livre, 6,50 – 3,333 $\mu\text{g/mL}$ para ciclodextrina livre e 6,7 – 3,453 $\mu\text{g/mL}$ para o complexo RN-104/ciclodextrina. A CIM da substância RN-104 no complexo foi calculada a partir da concentração conhecida da substância presente em 1 mg do complexo liofilizado.

4.2.3 Modelo murino de criptococose pulmonar

Os animais utilizados neste experimento foram camundongos C57BL/6 machos com aproximadamente 6 a 8 semanas e 25 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovado com Protocolo CEUA: 401/2017. Para este experimento foram utilizadas leveduras de *C. gattii* L27/01 previamente cultivadas em ágar Sabouraud dextrose a 37 °C por 48 horas. As células foram transferidas para solução salina estéril e o inóculo quantificado e ajustado em hemocítômetro para concentração final de 1×10^5 leveduras/animal. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (IP) com solução de xilazina, cetamina e PBS estéril (80 mg/kg /10 mg/kg). Após a anestesia, os animais foram infectados pela via intratraqueal (IT) através de uma incisão transversal de aproximadamente 1 cm feita na pele da região do pescoço para expor a traqueia. Com o auxílio de uma seringa Hamilton, foram injetados 30 µl do inóculo fúngico (1×10^5 leveduras/animal). Imediatamente após a infecção, os animais foram suturados e mantidos em aquecimento a 35 °C até a recuperação da temperatura corporal. Os grupos experimentais (n=6) utilizados foram:

- 1- Grupo de animais não infectados;
- 2- Grupo de animais infectados e não tratados;
- 3- Grupo de animais não infectados e tratados somente com veículo (soluções utilizadas para diluição dos compostos experimentais);
- 4- Grupo de animais infectados e tratados com composto RN-104 livre 10 mg/kg/dia;
- 5- Grupo de animais infectados e tratados com ciclodextrina livre;
- 6- Grupo de animais infectados e tratados com complexo RN-104/ciclodextrina;
- 7- Grupo de animais infectados e tratados com fluconazol 10mg/kg/ dia.

Após a realização dos procedimentos, os grupos experimentais foram colocados em gaiolas separadas e receberam água e ração *ad libitum*. O tratamento foi iniciado após 24 horas da infecção. As substâncias RN-104 livre e RN-104 com ciclodextrina na concentração de 10 mg/kg/dia, ciclodextrina livre, fluconazol 10 mg/kg/dia foram administrados diariamente por via intraperitoneal durante 15 dias. Os animais foram pesados e monitorados diariamente para avaliar a perda de peso.

Após o período de tratamento, os animais foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical. O cérebro e os pulmões foram removidos e pesados, e após a pesagem os fragmentos desses órgãos foram triturados e homogeneizados em 1mL de tampão fosfato estéril. Alíquotas de 50 mL dessa suspensão foram semeadas, em triplicata, com o auxílio de pérolas de vidro, em placas de Petri contendo SDA. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 35 °C. As colônias foram contadas após 48 horas de crescimento. O resultado foi expresso pelo número de UFC por grama de órgão conforme descrito Santos *et al.*, 2014.

4.2.4 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados dos testes de virulência e de atividade antifúngica em modelo murino utilizou-se o teste de comparação múltipla Newman-Keuls utilizando software GraphPad Prism, valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo e os resultados expressos como média \pm erro padrão da variável.

5. RESULTADOS

5.1 PARTE I: Triagem de substâncias sintéticas e avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de heterocíclicos tiazólicos frente a *Cryptococcus* spp.

5.1.1 Triagem de substâncias sintéticas

Vinte e três substâncias sintéticas foram inicialmente testadas para avaliação da atividade antifúngica pelo método de CIM contra as espécies de *C. neoformans* H99 e *C. gattii* L27/01 e os resultados podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) de 23 substâncias sintéticas contra *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*.

Substâncias	<i>C. neoformans</i> H99	<i>C. gattii</i> L27/01
	CIM (µg/mL)	
RIA16	0,28	0,14
RIA17	1,06	0,26
RIA18	0,14	0,14
RIA19	4,98	1,24
RIA20	1,08	0,13
RIA25	1,17	0,29
RIA26	0,59	0,29
RIY 21	> 59,5	> 59,5
RIY23	> 51,0	> 51,0
RIY24	> 44,5	> 44,5
CAS2	> 51,0	> 51,0
CAS3	> 52,0	> 52,0
CAS6	> 51,5	> 51,5
CAS9	> 51,5	> 51,5
RPL1	> 78,5	> 78,5
RIF5	> 71,5	> 71,5

RIF7	37,9	> 75,8
PD76	0,05	0,05
2BZ50-31#	> 53,5	> 53,50
HTI-7	7,8	3,9
HTI-12	0,97	0,97
HTI-13	3,90	1,97
HTI-14	0,24	0,48
Fluconazol	2,00	16,0
Anfotericina B	0,50	0,50

Entre as vinte e três substâncias testadas na triagem inicial, doze destas apresentaram melhores atividade antifúngicas contra os isolados de *Cryptococcus* testados. A substância PD76 apresentou a menor CIM (0,05 µg/mL) para os isolados testados. As substâncias identificadas com código RIA apresentaram valores de CIM promissores, variando entre 0,13 e 0,40 µg/mL. As substâncias identificadas como HTI-12, HTI-13 e HTI-14 também apresentaram valores de CIM baixos, de 0,24 – 3,90 µg/mL. A substância nomeada de HTI-7 apresentou valores de CIM um pouco mais elevados, de 3,90 e 7,80 µg/mL para os isolados testados. Já as substâncias RIY 21, RIY 23, RIY 24, CAS 2, CAS 3, CAS 6, RPLI, RIF 5, RIF 7 e 2BZ50-31# apresentaram valores de CIM superior ao de fluconazol e anfotericina para os isolados testados.

5.1.2 Teste de susceptibilidade antifúngica contra outras leveduras de importância médica

Uma vez que as substâncias HTI-12, HTI-13 e HTI-14 apresentaram atividade antifúngica importante contra os isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* na triagem inicial, essas substâncias foram selecionadas para avaliação do seu espectro de ação contra outras leveduras de importância médica (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias HTI-12, HTI-13 e HTI-14 contra leveduras de importância médica.

Espécie	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	Fluconazol	Tiazóis		
		HTI-12	HTI-13	HTI-14
<i>Candida albicans</i> SC5314	0,5	0,97	0,97	0,97
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	4,0	>250,0	>250,0	>250,0
<i>Pichia kudriavzevii</i> ATCC 20298*	64,0	7,81	15,62	3,90
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	8,0	15,62	62,5	15,62
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	> 64,0	31,25	>250,0	7,81

*Formalmente chamada de *Candida krusei*

Com base nos resultados obtidos (tabela 3) verificou-se que o isolado *C. albicans* SC5314 foi o mais sensível para as três substâncias avaliadas sendo os valores de CIM próximos ao encontrado para o antifúngico fluconazol. Já o isolado de *C. glabrata* ATCC 2001 não foi sensível as substâncias nas concentrações testadas. Entre as três substâncias avaliadas verificou-se que a substância HTI-14 apresentou os menores valores de CIM (variando de 0,97 – 15,62 $\mu\text{g/mL}$) para as leveduras testadas, com exceção da *C. glabrata*.

A partir dos resultados obtidos até o momento, facilidade em obtenção e síntese da substância e com base em dados da literatura, a substância HTI-14 foi selecionada para avaliação da atividade antifúngica e dos efeitos sobre os fatores de virulência em *C. neoformans*.

5.1.3 Concentração inibitória (CIM) e fungicida (CFM) mínima da substância HTI-14 em *C. neoformans*

Pode-se observar na tabela 4 que a substância HTI-14 apresentou atividade antifúngica contra todos os isolados de *C. neoformans* testados, com valores de CIM variando entre 0,12 e 0,48 $\mu\text{g/mL}$. Além disto, a substância em estudo apresentou a relação média da CFM_{50} (0,48 $\mu\text{g/mL}$)/CIM₅₀ de 0,24 $\mu\text{g/mL}$ igual à 0,17 indicando ação fungicida.

Tabela 4. Concentração inibitória (CIM) e fungicida (CFM) mínima da substância HTI-14, anfotericina B (ANFB) e fluconazol (FLC) contra doze isolados de *Cryptococcus neoformans*.

	ANFB		FLUC		HTI-14	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
	(µg/mL)					
<i>Cryptococcus neoformans</i>						
ATCC 24067	0,25	0,50	2,0	8,00	0,12	<0,007
ATCC 28957	0,25	0,50	2,0	64,00	0,24	0,48
ATCC 62066	0,25	<0,015	2,0	8,00	0,24	0,48
WP	0,25	0,50	2,0	16,00	0,24	0,48
F10	0,25	<0,015	4,0	64,00	0,24	0,48
CN31	0,25	0,50	2,0	4,00	0,24	<0,007
VM-MCMMPI	0,25	0,50	2,0	4,00	0,24	0,97
96806	0,06	<0,015	8,0	>64,00	0,24	0,48
5396	0,25	0,50	4,0	32,00	0,12	0,24
28 JF	0,25	0,50	2,0	16,00	0,24	0,007
H99	0,50	<0,015	2,0	32,00	0,24	0,48
27JF	0,50	1,0	4,0	>64,00	0,48	0,97
Média	0,27	0,38	3,0	31,33	0,24	0,42
CIM₅₀ / CFM₅₀	0,25	0,50	2,0	16,0	0,24	0,48
CIM₉₀ / CFM₉₀	0,25	0,50	4,0	64,0	0,24	0,97

5.1.4 Interação da substância HTI-14 com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol

Para verificar a interação da substância HTI-14 com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol (Tabela 5) foi realizado o ensaio de combinação da substância com concentrações iguais, superiores e inferiores aos valores de CIM para determinação do índice de concentração inibitória fracional.

Ao avaliar a interação da substância HTI-14 com o antifúngico fluconazol, observou-se que o maior valor de ICIF visto nos isolados de *C. neoformans* foi de 2,00 e o menor valor foi 1,50. Quando avaliamos a combinação da substância com a anfotericina B, observou-se que o maior valor de ICIF encontrado é de 3,02 para os isolados clínicos ATCC 28957 e 28 JF e o menor valor é de 1,25 µg/ml para o isolado clínico 27JF. Todos os valores encontrados de ICIF para fluconazol e anfotericina B apresentam interação indiferente com a substância HTI-14.

Tabela 5. Índice de concentração inibitória fracional da substância HTI-14 em interação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B para isolados de *Cryptococcus neoformans*.

Isolados	ICIF médio ($\mu\text{g/ml}$)	Interação	ICIF médio ($\mu\text{g/ml}$)	Interação
	HTI-14 Fluconazol		HTI-14 Anfotericina	
ATCC 24067	1,50	Indiferente	2,00	Indiferente
ATCC 28957	2,00	Indiferente	3,02	Indiferente
ATCC 62066	1,50	Indiferente	1,50	Indiferente
WP	1,50	Indiferente	1,49	Indiferente
F10	2,00	Indiferente	1,50	Indiferente
CN31	2,00	Indiferente	2,00	Indiferente
VM-MCMMPI	1,50	Indiferente	1,50	Indiferente
96806	2,00	Indiferente	2,52	Indiferente
5396	2,00	Indiferente	2,00	Indiferente
28 JF	2,00	Indiferente	3,02	Indiferente
H99	2,00	Indiferente	2,00	Indiferente
27JF	2,00	Indiferente	1,25	Indiferente
Média geométrica	1,81		1,90	

Cryptococcus neoformans

5.1.5 Avaliação do efeito da substância HTI-14 na parede celular

O efeito da substância HTI-14 no comprometimento da parede celular de *C. neoformans* ATCC 24067 e H99 foi avaliado pela verificação dos valores de CIM após o tratamento dos isolados com a substância juntamente com sorbitol 0,8M como protetor osmótico (Tabela 6).

Tabela 6 – Concentração inibitória mínima (CIM) da substância **HTI-14** contra isolados de *Cryptococcus neoformans* em meio RPMI acrescido de sorbitol 0,8 M.

Isolados	Meio RPMI	Meio RPMI
	Sorbitol 0,8M	HTI-14
	Concentração inibitória mínima (µg/ml)	
	72 horas	
<i>C. neoformans</i> ATCC 24067	0,12	0,12
<i>C. neoformans</i> H99	0,97	0,24

Neste ensaio não foi observada diferença significativa no aumento dos resultados da CIM da substância isolada e acrescida com sorbitol para o isolado *C. neoformans* ATCC 24067. Para o isolado *C. neoformans* H99 observamos um pequeno aumento no valor de CIM de 0,24 µg/ml para 0,97 µg/mL. Diante desses resultados observamos que a parede celular possivelmente não representa um alvo de ação primário para substância HTI-14 nos isolados testados.

5.1.6 Avaliação da inibição da atividade enzimática de fosfolipase e proteinase

Para avaliação da inibição da atividade enzimática de fosfolipase e proteinase nos isolados de *C. neoformans* H99 e ATCC 24067, as leveduras foram tratadas com a substância HTI-14 na concentração de CIM. Após a leitura dos resultados para ambas exoenzimas avaliadas pode-se observar que as leveduras tratadas com a substância HTI-14 apresentaram pouca redução do halo formado ao redor das colônias quando comparadas com o diâmetro do halo formado no grupo controle (leveduras sem tratamento). Na comparação da relação do diâmetro dos halos das colônias sem tratamento e após tratamento com a substância não se verificou diferença significativa nos valores de Pz (atividade enzimática), indicando assim que a substância HTI-14 não interfere na atividade das exoenzimas avaliadas.

5.1.7 Avaliação do efeito na integridade do biofilme

Neste ensaio, o biofilme dos isolados de *C. neoformans* H99 e ATCC 24067 formados após 24 horas foram tratados com a substância HTI-14 na concentração de CIM como apresentado na figura 8. Observou-se que na concentração testada a substância HTI-14 apresentou redução metabólica das leveduras em biofilme formado pelo isolado *C. neoformans* H99 após tratamento por 24 horas, apresentando redução superior a 60%. Para o biofilme formado pelo isolado *C. neoformans* ATCC 24067 observamos uma pequena redução da viabilidade celular, porém sem diferença significativa.

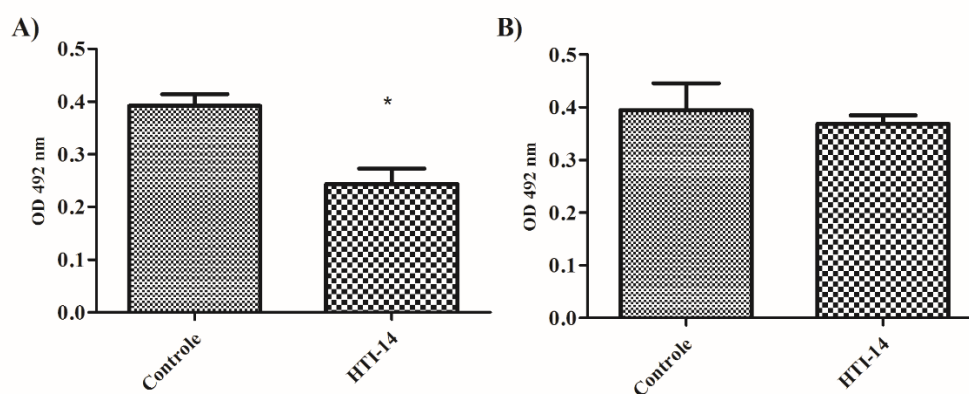


Figura 1. Avaliação do efeito da substância HTI-14 (CIM) na integridade do biofilme de *Cryptococcus neoformans* H99 ($p=0,0283$) e ATCC 24067 ($p=0,3340$). As análises estatísticas foram realizadas por comparação múltipla Newman-Keuls e valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

5.1.8 Toxicidade e sobrevida em *Tenebrio molitor*

Diante dos resultados da triagem inicial e determinação da CIM, as substâncias HTI-12, HTI-13 e HTI-14 foram selecionadas e avaliadas quanto a toxicidade no modelo do invertebrado *Tenebrio molitor*. Além dessas, a substância HTI-7 foi incluída nesse estudo devido a resultados promissores de atividade *in vitro* e *in vivo* em modelo de invertebrado *Galleria mellonella* apresentados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (MATOS, 2017). Como pode-se observar na figura 9, as substâncias não apresentaram toxicidade nas três concentrações avaliadas. As substâncias HTI-12 e HTI-14 apresentaram 100% de sobrevida das larvas nas três concentrações avaliadas. A substância HTI-7 apresentou 100% de sobrevivência

das larvas na concentração de 3 mg/kg e de 94% para as concentrações de 5 e 10 mg/kg. Para a substância HTI-13 foi verificado 100% de sobrevivência na concentração de 3 mg/kg e 95% nas concentrações de 5 e 10 mg/kg. Todas as substâncias avaliadas apresentaram LD50 >10 mg/kg no modelo invertebrado avaliado.

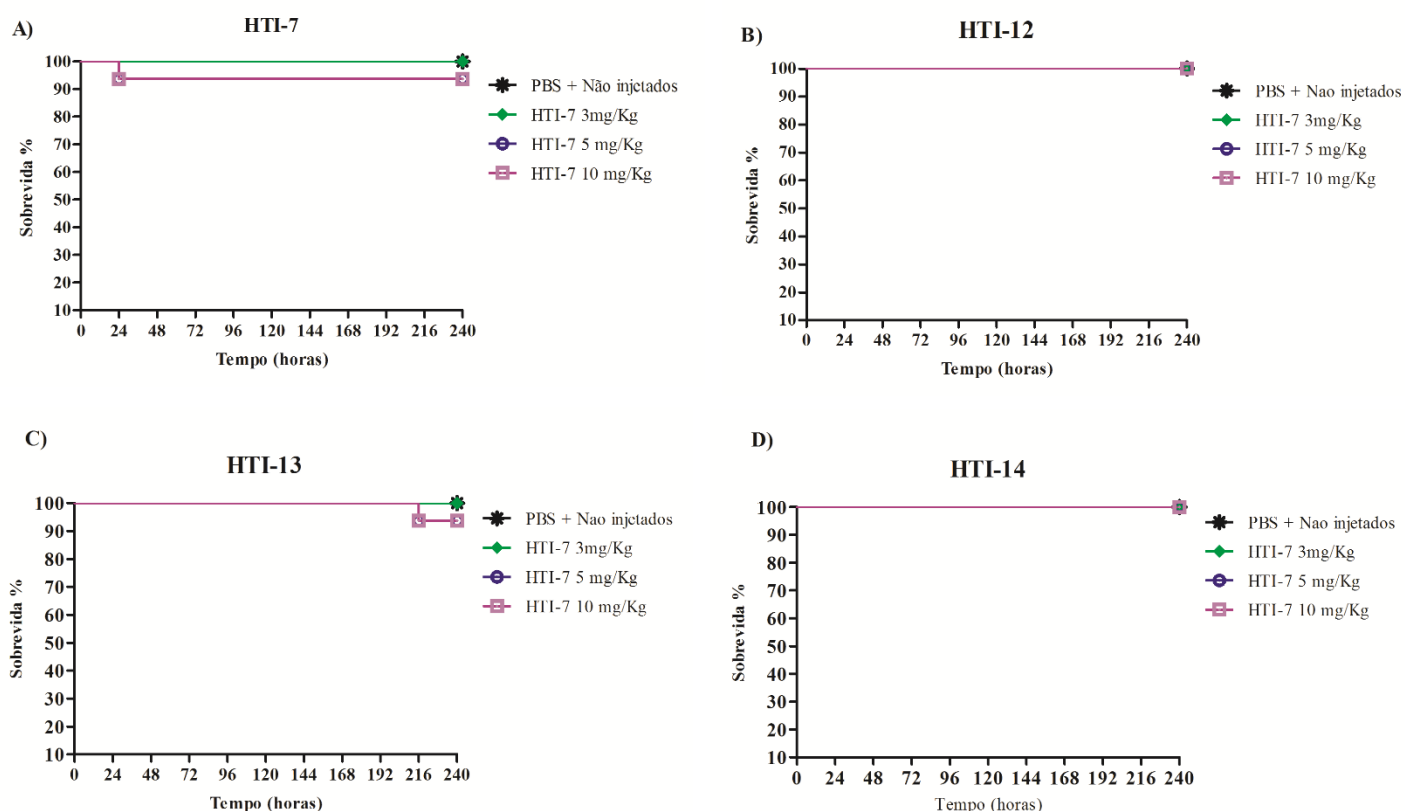


Figura 2: Toxicidade de heterocíclicos tiazólicos em *Tenebrio molitor*. Não houve diferença significativa entre as dosagens testadas para as substâncias HTI-7, HTI-12, HTI-13 E HTI-14. O ensaio foi realizado em triplicata, com n=16 larvas por grupo. A substância HTI-7 (A) apresentou 100% de sobrevivência na concentração de 3 mg/kg e de 94% para as concentrações de 5 e 10 mg/kg. As substâncias HTI-12 (B) e HTI-14 (D) apresentaram 100% de sobrevivência das larvas nas três concentrações avaliadas. A substância HTI-13 (C) apresentou 100% na concentração de 3 mg/kg e 94% nas concentrações de 5 e 10 mg/kg. As análises estatísticas foram realizadas por Kaplan-Meier.

5.1.9 Sobrevida em *Tenebrio molitor* infectados com *C. neoformans* H99 e tratados com HTI-7 e HTI-14

Diante dos resultados da substância HTI-7 no aumento da sobrevivência em modelo invertebrado *G. mellonella* observados por Matos (2017), associados ao resultado de ausência de

toxicidade no modelo *T. molitor* apresentado acima, essa substância foi selecionada para avaliação do seu efeito na sobrevivência das larvas após a infecção por *C. neoformans* no modelo de invertebrado proposto no presente estudo. A substância HTI-14 foi selecionada para continuarmos os estudos por apresentar resultados promissores nos ensaios *in vitro* e de toxicidade em modelo de *T. molitor*, realizados no presente trabalho.

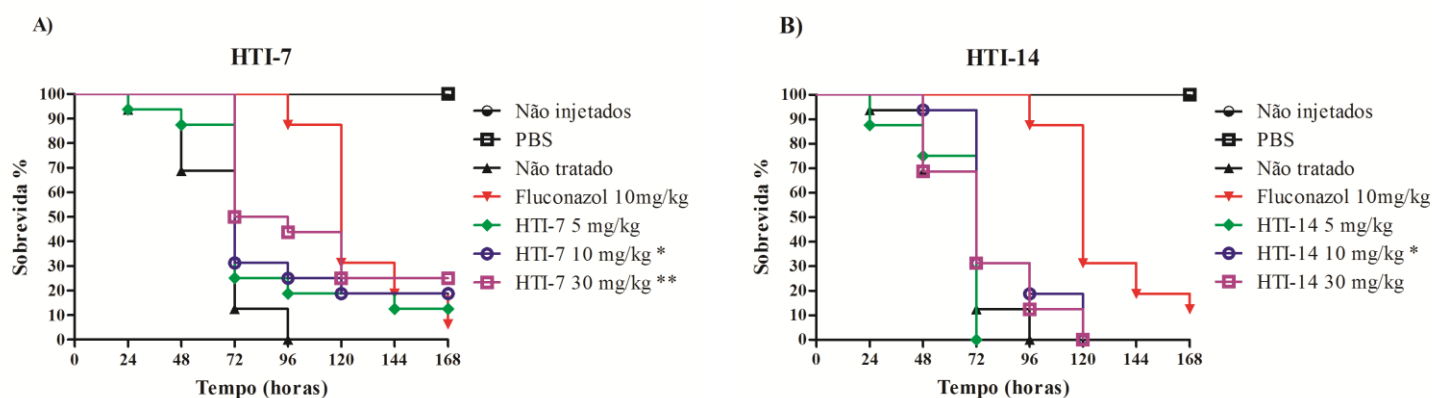


Figura 3. Curva de sobrevivência no modelo de invertebrado *Tenebrio molitor* infectado com *C. neoformans* H99 e tratado com as substâncias HTI-7 e HTI-14. A) *T. molitor* infectado com *C. neoformans* H99 ($1,0 \times 10^6$ leveduras) e tratado com fluconazol 10 mg /kg ($p < 0,0001^{***}$), HTI-7 5 mg/kg ($p = 0,0760$), 10 mg/kg ($p = 0,0070^{**}$) e 30 mg/kg ($p = 0,0006^{***}$). B) *T. molitor* infectado com *C. neoformans* H99 ($1,0 \times 10^6$ leveduras) e tratado com fluconazol 10 mg /kg ($p < 0,0001^{***}$), HTI-14 5 mg/kg ($p = 0,6738$), HTI-14 10 mg/kg ($p = 0,0253^*$) e HTI-14 30 mg/kg ($p = 0,2353$). As análises estatísticas foram realizadas por Kaplan-Meier.

Como pode ser observado na figura 10, a substância HTI-7 apresentou aumento significativo na sobrevivência das larvas infectadas com *C. neoformans* e tratadas com as doses de 10 mg/kg ($p = 0,0070$) e 30 mg/kg ($p = 0,0006$) quando comparado ao grupo controle de larvas infectadas e não tratadas. As doses de 10 e 30 mg/kg da substância HTI-7 foram eficazes no tratamento das larvas e não apresentaram diferença significativa entre elas. O fluconazol na concentração de 10 mg/kg foi utilizado como controle antifúngico e apresentou valor de $p < 0,0001$ em relação ao grupo de larvas que não receberam tratamento.

Quando comparados os grupos tratados com o controle antifúngico fluconazol e a substância HTI-7 nas concentrações de 10 e 30 mg/kg não foi observado diferença significativa entre esses grupos. Observou-se que após 96 horas da infecção para a substância HTI-7 o grupo de larvas tratados com a dose de 30 mg/kg da substância HTI-7 apresentou maior eficácia na sobrevivência (44%), para o grupo tratado com fluconazol foi observado 87% de sobrevivência das larvas após esse tempo.

Na avaliação da substância HTI-14 observamos eficácia no aumento da sobrevivência das larvas infectadas somente para o tratamento na concentração de 10 mg/kg ($p = 0,0253$). O fluconazol na concentração de 10 mg/kg foi utilizado como controle antifúngico e apresentou valor de $p < 0,0001$ em relação ao grupo de larvas que não receberam tratamento.

5.1.10 Curva de sobrevivência em modelo murino com tratamento com a substância HTI-7

Diante dos resultados de baixa toxicidade e aumento da sobrevivência apresentados pela substância HTI-7 no invertebrado *T. molitor*, avaliamos a eficácia da substância em modelo vertebrado através da construção da curva de sobrevivência em modelo murino (figura 13). Os animais foram infectados via intratraqueal para modelo de criptococose pulmonar e realizado o tratamento com a substância experimental e fluconazol durante 15 dias por administração via intraperitoneal. Após o período de tratamento os animais foram monitorados diariamente para construção da curva de sobrevivência.

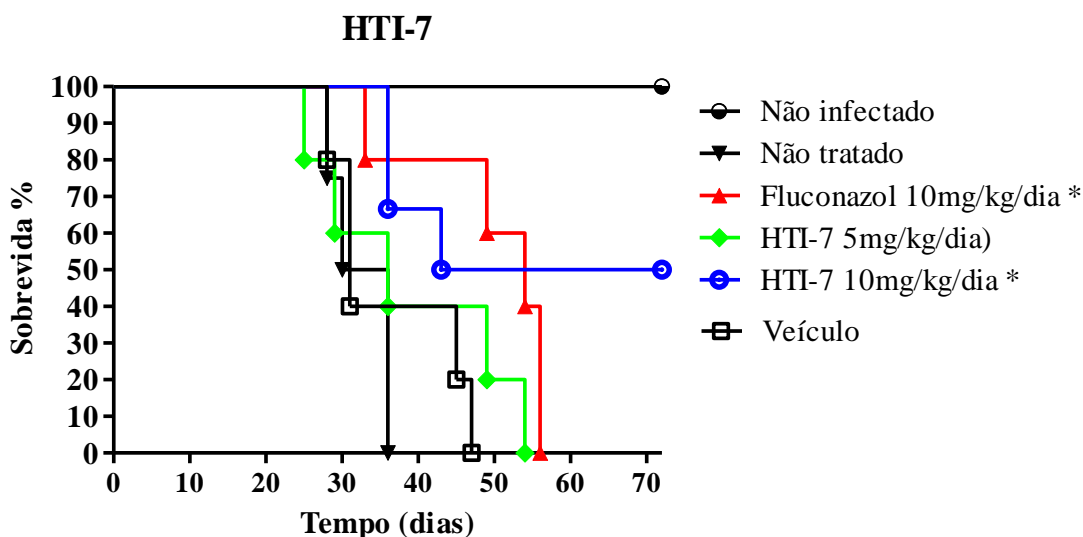


Figura 4. Curva de sobrevivência em modelo murino de criptococose pulmonar com tratamento da substância HTI-7. O tratamento foi iniciado após 24 horas da infecção e realizado durante 15 dias. Os animais foram monitorados durante 72 dias para construção da curva de sobrevivência. Grupos experimentais: animais não infectados ($n=4$), não tratados ($n=4$), fluconazol 10 mg/kg/dia ($n=6$), veículo ($n=6$), HTI-5 5mg/kg/dia ($n=6$) e HTI-7 10 mg/kg/dia ($n=6$). Os grupos tratados com fluconazol ($p=0,0290^*$) e HTI-7 10 mg/kg/dia ($p=0,0163^*$) apresentaram diferença estatística. Os grupos HTI-7 5 mg/kg/dia ($p=0,4253$) e o grupo veículo ($p = 0,3847$) não apresentaram diferença significativa no aumento da sobrevivência. As análises estatísticas foram realizadas por Kaplan-Meier.

O fluconazol, na concentração de 10 mg/kg/dia, foi utilizado como controle antifúngico de tratamento e apresentou eficácia no aumento na sobrevida dos animais ($p=0,0290^*$) quando comparado com o grupo controle de animais infectados e não tratados. O grupo denominado veículo, tratado somente com os diluentes da substância em estudo, apresentou média de sobrevida de 31 dias. O grupo de animais infectados e que não receberam tratamento verificou-se uma média de sobrevida de 33 dias. Esses resultados mostram que os diluentes utilizados na solubilização da substância não apresentaram interferência no aumento da sobrevida dos animais.

A substância HTI-7 na concentração de 10 mg/kg/dia ($p=0,0163$) demonstrou eficácia no aumento da sobrevida dos animais, com média de sobrevida de 58% frente a 54% apresentada pelo grupo tratado com fluconazol 10 mg/kg/dia. Além disso, pode-se observar ao final do experimento que a substância HTI-7 na dose de 10 mg/kg/dia foi capaz de manter 50% de sobrevida nos animais deste grupo. O veículo utilizado para solubilização da substância HTI-7 não apresentou aumento na sobrevida dos animais ($p=0,3847$) comparado como grupo infectado e sem tratamento. A substância, na dosagem de 5 mg/kg/dia, não apresentou eficácia no aumento da sobrevida dos animais ($p=0,4253$).

5.2 PARTE II: Avaliação da atividade antifúngica do complexo RN-104/ciclodextrina no tratamento da criptococose em modelo murino

A substância RN-104 (identificada como 1d) foi previamente avaliada em ensaios *in vitro* por Sá *et al.*, 2015 e apresentou resultados interessantes contra *Cryptococcus* spp. Esses autores demonstraram em outro estudo a eficácia dessa substância (identificada como CHT) no aumento da sobrevida em modelo murino, no entanto, observou-se que as concentrações de 10 e 50 mg/kg/dia embora eficazes, não apresentaram diferença significativa no aumento de sobrevida dos animais entre elas (Sá *et al.*, 2018). A substância RN-104 apresenta baixa solubilidade em meio aquoso. Silva *et al.*, 2020 demonstraram que o complexo de inclusão formado pela substância RN-104 com ciclodextrina promoveu aumento importante da solubilidade da substância em meio aquoso.

Diante dos resultados apresentados acima, propusemos no presente trabalho, avaliar a eficácia do complexo RN-104/ciclodextrina no tratamento da criptococose pulmonar em

modelo murino através da recuperação de UFC dos animais infectados após tratamento com as substâncias experimentais.

5.2.1 Concentração inibitória mínima do complexo RN-104/ciclodextrina contra *Cryptococcus* spp.

Antes do estudo em modelo murino, a atividade antifúngica *in vitro* das substâncias RN-104 livre, complexo RN-104/ciclodextrina e ciclodextrina livre foram avaliadas pelo teste de microdiluição. As concentrações inibitórias mínimas determinadas estão apresentadas na tabela 7.

Os testes de suscetibilidade *in vitro* para os isolados de *Cryptococcus* spp. resultaram em valores de CIM maiores de 3,300 µg/mL para ciclodextrina livre contra todos os isolados testados. Para o composto RN-104 livre os valores de CIM variaram de 4 a 8 µg/mL. O complexo liofilizado RN-104/CD apresentou maiores valores de CIM, sendo 863,41 µg / mL para *C. neoformans* H99 e 431,8 µg/mL para *C. neoformans* ATCC 24067. Avaliamos o valor de CIM da substância RN-104 quando complexada com a ciclodextrina através do cálculo baseado na concentração conhecida da substância RN-104 por mg de complexo liofilizado, e observamos que houve um aumento de 4x no valor de CIM para os isolados avaliados.

Tabela 7. Concentração inibitória mínima do complexo RN-104 CD contra *C. neoformans*.

Isolados	Concentração inibitória mínima (CIM) (µg/mL)			
	RN-104 livre	RN-104 Ciclodextrina	RN-104 no complexo	Ciclodextrina livre
<i>C. neoformans</i> H99	8,00	836,41	31,92	>3,300
<i>C. neoformans</i> L27/01	4,00	215,90	7,80	>3,300

5.2.2 Avaliação do complexo RN-104 em modelo murino de criptococose

Para a avaliação da eficácia do complexo RN-104/ciclodextrina no tratamento do modelo murino de criptococose experimental proposto neste estudo, os animais foram infectados via intratraqueal e o tratamento foi durante 15 dias, com início 24 horas após a infecção. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e recuperados e avaliados os resultados de recuperação de UFC/g do pulmão e do cérebro conforme apresentado na figura 5.

Na avaliação da carga fúngica recuperada do tecido pulmonar, observamos que somente o grupo tratado com fluconazol 10 mg/kg/dia apresentou redução significativa ($p=0,0014^{**}$) em relação ao grupo de animais infectados e não tratados. No tratamento com a substância RN-104 livre ($p=0,3743$) e com a ciclodextrina livre ($p=0,1118$) observamos uma pequena redução da carga fúngica, porém sem diferença significativa em relação ao grupo de animais sem tratamento. Quando avaliamos os tratamentos com a substância RN-104 livre e complexada com ciclodextrina, não observamos diferença significativa na redução da carga fúngica do tecido pulmonar entre esses grupos ($p=0,4514$).

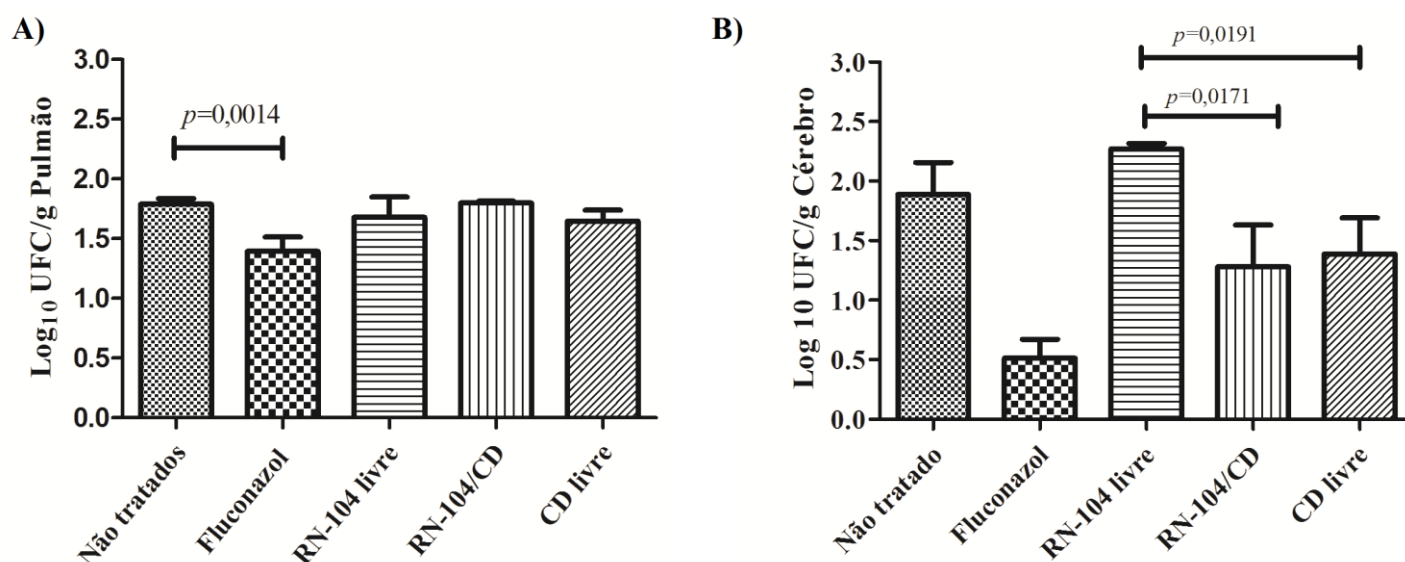


Figura 5. Modelo murino de criptococose pulmonar. Recuperação de unidades formadoras de colônias por grama de órgão (UFC/g) do pulmão e cérebro de camundongos machos C57BL/6 infectados com *Cryptococcus gattii* L27/01 (1×10^5 levedura) e tratados por 15 dias. Grupos experimentais (n=4): animais infectados e não tratados, animais infectados e tratados com fluconazol 10 mg/kg/dia, substância RN-104 livre 10 mg/kg/dia, RN-104/ciclodextrina e ciclodextrina livre (CD). (A) UFC/g do pulmão: fluconazol ($p=0,0014$), RN-104 livre ($p=0,3743$), RN-104/CD ($p=0,8189$) e ciclodextrina livre ($p=0,1118$). (B) UFC/g do cérebro: os grupos de animais tratados com fluconazol ($p=0,1216$), RN-104 livre ($p=0,1547$), RN-104/CD ($p=0,3584$) e ciclodextrina livre ($p=0,3974$) não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo de animais não tratados. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Comparação Múltipla de Newman-Keuls e valores $< 0,05$ foram considerados significativos.

Quando avaliado os resultados da UFC/g recuperada do cérebro, verificamos que os grupos de animais infectados e tratados com fluconazol 10 mg/kg/dia ($p=0,1216$), RN-104 livre ($p=0,1547$), complexo RN-104/CD ($p=0,3584$) e com ciclodextrina livre ($p=0,3974$) não apresentaram redução da carga fúngica significativa quando comparado com o grupo de animais infectados e não tratados.

Ao avaliarmos então se a substância em estudo complexada ciclodextrina apresentaria maior eficácia na redução da carga fúngica comparada a substância livre, verificamos que o tratamento com o complexo RN-104/CD apresentou maior capacidade na redução fúngica recuperada do cérebro dos animais ($p=0,0171$) frente ao tratamento com a substância livre. Outro resultado observado nesse estudo foi para o grupo tratado somente com ciclodextrina livre, que apesar de não ter apresentado diferença significativa em relação ao grupo de animais sem tratamento como citado acima, apresentou redução significativa da carga fúngica em relação ao grupo de animais tratados com a substância RN-104 livre ($p= 0,0191$).

6. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, avaliamos inicialmente a atividade antifúngica de vinte e três substâncias sintéticas contra isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*. Dentre as substâncias triadas, doze substâncias tiazólicas apresentaram importante atividade antifúngica contra os isolados avaliados. Entre os importantes resultados encontrados nesse trabalho, estão os valores de CIM apresentados pela substância PD76, que é um produto de degradação do composto tiazólico RI-76, descrito anteriormente por Lino e colaboradores (2018). A substância PD76 apresentou, no presente trabalho, valor de CIM quatro vezes menor a CIM do seu precursor RI-76, conforme apresentado no trabalho que publicamos juntamente com Franco (2021). Diante desses resultados, associados a ausência de toxicidade em células humanas de rim embrionário e da atividade antifúngica *in vivo*, apresentadas anteriormente pelo precursor RI-76 (CRUZ *et al.*, 2018), consideramos a substância PD76 um interessante alvo para futuros estudos e avaliação da atividade antifúngica *in vivo*.

As substâncias HTI-12, HTI-13 e HTI-14 apresentaram baixos valores de CIM para isolados os *Cryptococcus* avaliados, e diante disso, expandimos a avaliação da atividade antifúngica dessas substâncias para outras leveduras de importância médica. O isolado *Candida albicans* SC 5314 apresentou maior sensibilidade frente as três substâncias avaliadas, com valor de CIM muito próximo ao encontrado para o antifúngico fluconazol. Esse resultado é interessante, visto que, um dos principais critérios necessários para um fármaco ser considerado um bom antifúngico para uso clínico, é o seu amplo espectro de ação contra diferentes espécies fúngicas (MAZU *et al.*, 2016). Observamos nesse trabalho que o isolado *Pichia Kudriavzevii* ATCC 20298 (formalmente chamado de *C. Krusei*) foi sensível frente as três substâncias tiazólicas avaliadas. Esse resultado é interessante, uma vez que é conhecida a resistência intrínseca do isolado *Pichia Kudriavzevii* ATCC 20298 (*C. Krusei*) para o antifúngico fluconazol (WHALEY *et al.*, 2017), e por ser uma das principais espécies não-albicans causadoras de candidemia em pacientes imunossuprimidos (JAMIU *et al.*, 2021). A resistência ao fluconazol é impulsionada pela epidemiologia das espécies, como é observado nos países com um grande número de casos de candidemia relacionada a *C. glabrata* e *C. krusei*, onde altas taxas de resistência são observadas para esses isolados (Díaz-García *et al.*, 2021). A substância HTI-14 apresentou os menores valores de CIM para os isolados de *Candida* spp. avaliados, com exceção da *C. glabrata*. As infecções fúngicas invasivas, principalmente as causadas por *Candida* spp., são frequentes em pacientes hospitalizados e apresentam alta taxa

de morbidade e mortalidade. De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) americano, a mortalidade atribuída à candidíase sistêmica é em torno de 40% -70% em todo o mundo, mesmo com o uso de terapias antifúngicas disponíveis (CALANDRA *et al.*, 2016; SHUKLA *et al.*, 2021). Esses dados reforçam a importância da busca por substâncias ativas que apresentem espectro de atividade para diferentes leveduras de importância médica, incluindo os isolados de *Candida* spp. A atividade antifúngica de derivados tiazólicos contra isolados de *Candida* spp. também foi descrita recentemente por Biernasiuk *et al.*, 2021. Esses autores apresentam valores de CIM semelhantes ao encontrados no presente trabalho, o que confirmam o potencial antifúngico e amplo espectro de atividade das substâncias tiazólicas estudadas nesse trabalho.

Durante a realização de revisão de literatura, verificamos que a substância HTI-14 havia sido sintetizada e descrita anteriormente com atividade antifúngica para isolados de *Candida* spp., no entanto, sem resultados avaliados para *Cryptococcus* spp. (SECCI *et al.*, 2012). No presente estudo, portanto, avaliamos a atividade antifúngica da substância HTI-14 contra doze isolados de *C. neoformans*. Nossos resultados apresentam efetiva atividade antifúngica da substância HTI-14 contra todos os isolados avaliados, com média de CIM próxima ao encontrado para o antifúngico anfotericina B, e inferior à média de CIM apresentada pelo antifúngico fluconazol. Na avaliação da interação da substância HTI-14 com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol, observamos valores de índice de concentração inibitória fracional (ICIF) médios para todos os isolados avaliados. Esses resultados demonstram efeito indiferente à combinação da substância HTI-14 com os dois antifúngicos testados. Conforme descrito na literatura, valores médios de ICIF, de forma semelhantes aos encontrados em nosso trabalho, são descritos como indiferente a combinação entre os compostos avaliados (CUENCA-ESTRELLA, 2004). A interação indiferente entre os fármacos, indica que uma combinação entre esses não apresenta efeitos adversos sobre a resposta terapêutica (JOHNSON *et al.*, 2004). Interação indiferente de combinação de compostos tiazólicos com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B também foram descritos por Sá *et al.*, 2015.

A partir dos resultados anteriormente descritos, associado a facilidade de síntese e obtenção, a substância HTI-14 foi selecionada para avaliação do seu efeito sobre alguns fatores de virulência de *C. neoformans*. Na avaliação do efeito da substância HTI-14 sobre a integridade da parede celular fúngica, não foram encontradas evidências de ação da substância nos isolados avaliados, uma vez que não observamos aumento nos valores de CIM após exposição das leveduras à substância HTI-14 acrescida de sorbitol 0,8 M. O sorbitol atua como

protetor osmótico, estabilizando a parede celular fúngica e dificultando a ação dos compostos antifúngicos fúngica, resultando assim no aumento dos valores de CIM encontrados na presença de sorbitol (FROST, 1995). A estrutura da parede celular é exclusiva dos fungos e, por estar ausente em humanos, é um alvo promissor para drogas antifúngicas. Uma das principais funções da parede celular fúngica é fornecer proteção contra fatores de estresses ambientais, incluindo o estresse osmótico, que pode resultar em lise celular favorecendo a entrada de macromoléculas potencialmente prejudiciais (BOWMAN & FREE, 2006; HASIM & COLEMAN, 2019).

Dentre os fatores de virulência de *Cryptococcus* spp., as exoenzimas fosfolipases e proteinases têm sido diretamente relacionadas aos processos de invasão ou evasão fúngica no sistema imune do hospedeiro (SANTANGELO *et al.*, 1999). Nas infecções criptocócicas, as fosfolipases têm sido descritas como necessária para o início da infecção pulmonar, bem como para a disseminação fúngica do pulmão para a corrente sanguínea, e por fim, favorecendo a disseminação das leveduras para sistema nervoso central (GERSTEIN & NIELSEN, 2017; SANTANGELO *et al.*, 2004). No presente estudo a substância HTI-14 não apresentou inibição significativa sobre a atividade enzimática de fosfolipases e proteinases dos isolados de *C. neoformans* avaliados.

A produção da matriz extracelular em *Cryptococcus* spp. constitui um dos mecanismos de proteção do fungo contra ação de fármacos (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006). O desenvolvimento do biofilme por *C. neoformans* segue um padrão de processos, que inclui a fixação da superfície fúngica, a formação de microcolônias e então a produção de matriz. É um processo bem organizado, e que depende das características da superfície, do meio e propriedades da célula fúngica. A capacidade de formação de biofilme é considerada um fator importante na determinação de estratégias terapêuticas, incluindo as infecções fúngicas por *Cryptococcus* spp. (MARTINEZ & CASADEVALL, 2007). No presente trabalho avaliamos o efeito da substância HTI-14 sobre biofilme formado por *C. neoformans*. A substância em estudo apresentou significativa redução de atividade metabólica do biofilme formado por *C. neoformans* H99. Derivados tiazólicos têm sido descritos na literatura com capacidade de redução atividade metabólica e efeito sobre a integridade de biofilme fúngico como os derivados 2-[2-(cyclohexylmethylene)hydrazinyl]-4- phenylthiazole (CHT) e 4-phenyl-1, 3-thiazol-2-yl hydrazine (31c) (LV *et al.*, 2020; MOHAMMAD *et al.*, 2019; Sá *et al.*, 2018). As células microbianas dentro de um biofilme apresentam características fisiologicamente distintas das células planctônicas do mesmo organismo, e como consequência, são causa prevalente de

falha de tratamento terapêutico e da recorrência de infecções (RAMAGE *et al.*, 2012; TITS *et al.*, 2020), justificando assim a importância do desenvolvimento de antifúngicos com atividade em biofilmes (VAN DIJCK *et al.*, 2018).

A avaliação da citotoxicidade de um composto demonstra seus possíveis danos biológicos, sendo desta forma uma etapa essencial para estudos de substâncias com atividade biológica (PAGANO & FAGGIO, 2015). O estudo da citotoxicidade em modelo murino é um pré-requisito importantes para que então, um composto possa ser avaliado e utilizado na fase clínica em seres humanos. No entanto, o alto custo na utilização de roedores, e das questões éticas envolvendo o uso desses modelos, tornam necessários estudos e padronização de novos modelos que sejam alternativos ao modelo vertebrado (IGNASIAK & MAXWELL, 2017). O modelo invertebrado *Galleria mellonella* tem sido usado de forma abrangente em estudos da patogênese de doenças fúngicas, como também na avaliação de citotoxicidade (ALVES *et al.*, 2021; REIS *et al.*, 2021; TREVIJANO-CONTADOR & ZARAGOZA, 2019;). No entanto, esse modelo não é comercializado em muitos países, incluindo o Brasil, onde a oferta dessas larvas é baixa. Diante desse cenário, propomos em nosso trabalho a avaliação da toxicidade dos compostos heterocíclicos tiazólicos no modelo invertebrado *Tenebrio molitor*.

A próxima etapa foi avaliar a toxicidade das substâncias HTI-7, HTI-12, HTI-13 e HTI-14 no modelo invertebrado *Tenebrio molitor*. Nenhuma das quatro substâncias avaliadas apresentaram toxicidade neste modelo em estudo. *T. molitor* foi descrito como um modelo invertebrado potencial para estudos de avaliação de virulência fúngica, resposta imune do hospedeiro à infecção fúngica, e também para avaliação da ação de compostos antifúngicos (SOUZA *et al.*, 2015). Resultados de MATOS (2017) apresentam ausência de toxicidade da substância HTI-7 em modelo invertebrado *G. mellonella*, como também em linhagem de macrófagos murinos. Além desses resultados citados, a substância HTI-7 também apresentou ausência de citotoxicidade em células humanas de rim embrionário HEK (LINO *et al.*, 2018). Desta forma, consideramos importantes os nossos resultados, uma vez que a ausência de toxicidade da substância HTI-7 no modelo *T. molitor*, associada a ausência de toxicidade apresentadas pelos estudos acima citados, confirma o potencial uso desse modelo para avaliação de toxicidade de substâncias sintéticas.

Uma vez que as substâncias HTI-7 e HTI-14 não apresentaram toxicidade no modelo invertebrado estudado, avaliamos sua eficácia *in vivo* no tratamento de larvas de *T. molitor* infectados com *C. neoformans*. Ambas as substâncias avaliadas apresentaram aumento na sobrevivência das larvas de *T. molitor*, e além disso, as substâncias apresentaram desempenho

comparável com o antifúngico de referência fluconazol. Diante da efetiva atividade antifúngica *in vitro*, ausência de citotoxicidade em modelo invertebrado e em células humanas, associado aos resultados promissores apresentados em *T. molitor*, expandimos a avaliação da eficácia da substância HTI-7 em modelo murino de criptococose pulmonar.

Apesar dos avanços nos estudos em modelo invertebrado, algumas limitações importantes apresentadas por esse modelo, como a ausência de sistema imunológico adaptativo, tornam necessário o estudo da atividade antifúngica em modelos vertebrados. Uma característica muito importante nos animais utilizados do modelo vertebrado, é o tamanho corporal, que permite o procedimento de infecção via intratraqueal. Essa via de infecção se assemelha a infecção pulmonar que ocorre em humanos, com a posterior disseminação fúngica para sistema nervoso central (NORMILE *et al.*, 2020). Avaliamos a eficácia da substância HTI-7 através da construção de uma curva de sobrevida em um modelo de criptococose pulmonar com infecção via intratraqueal. A substância em estudo mostrou efetiva atividade antifúngica no aumento da sobrevida dos animais, com desempenho superior ao antifúngico fluconazol. No presente estudo, observou-se ainda, que a substância HTI-7 foi capaz de manter 50% de sobrevivência dos animais ao final de 72 dias do experimento, com uma média de sobrevida de 58%, frente a 54% apresentado pelo grupo tratado com fluconazol. Muitos compostos tiazólicos têm sido descritos na literatura apresentando atividade biológica equivalente ou até mesmo superior aos medicamentos de referência, sendo assim, considerados bons candidatos para o desenvolvimento de novos medicamentos ativos e seguros para tratamento clínico (PETROU *et al.*, 2021).

Na segunda parte do presente trabalho, avaliamos a eficácia *in vivo* da substância tiazólica RN-104 em um complexo de inclusão com ciclodextrina, em modelo murino de criptococose pulmonar. Parâmetros farmacológicos como solubilidade, biodisponibilidade e taxa de dissolução são importantes para atingir a eficiência terapêutica *in vivo* (DIZAJ *et al.*, 2015). Estudos envolvendo complexos com ciclodextrina vem aumentando ao longo do tempo, principalmente para seu uso no desenvolvimento de fármacos. No período de 2001 a 2009, foram realizados 39 estudos sobre a atividade biológica *in vivo* de substâncias ativas em complexo com a ciclodextrina (CARNEIRO *et al.*, 2019).

A substância RN-104 apresenta difícil solubilidade em meio aquoso. Em estudos anteriores de Sá e colaboradores (2015), verificou-se valor de ClogP de 5,24 para a substância citada (identificada como 1d). Valores de ClogP inferiores a 5, são considerados ideais para um composto com boa solubilidade, o que sugere que seja capaz de passar passivamente pelas

membranas lipídicas biológicas (LINPISKI *et al.*, 2017). Em avaliação de atividade *in vivo* da substância RN-104 em modelo murino, observou-se que os tratamentos com as doses de 10 e 50 mg apesar de eficazes, não mostraram diferença significativa no aumento de sobrevivência dos animais, o que nos sugere uma baixa distribuição da substância *in vivo*. O complexo de inclusão utilizado no presente trabalho é constituído pela substância RN-104 e 2-HP- β -CD, que promoveu um aumento de 18 vezes na solubilidade aquosa de RN-104 (SILVA *et al.*, 2021).

Diante disso, propomos em nosso trabalho avaliar a eficácia *in vivo* do complexo RN-104/CD no tratamento de criptococose pulmonar em modelo murino. A atividade antifúngica das substâncias experimentais, foram primeiramente, avaliadas *in vitro*. A substância RN-104 isolada e presente no complexo mostrou-se ativa contra os isolados de *Cryptococcus* avaliados. A ciclodextrina livre não apresentou atividade antifúngica contra os isolados avaliados, não sendo possível determinar a sua CIM. No ensaio *in vivo*, ao compararmos os tratamentos com o complexo RN-104/CD e com a substância RN-104 livre, observamos que o complexo mostrou maior redução da carga fúngica no cérebro dos animais. No estudo de Sá *et al.* (2018) observamos também que a substância RN-104 isolada (identificada como CHT) não apresentou eficácia na redução da carga fúngica no cérebro dos animais avaliados. A complexação de substâncias ativas com ciclodextrina, melhora a solubilidade e aumenta a permeabilidade em membranas biológicas, tais como membrana gastrointestinal (GIT) e a barreira hematoencefálica (BBB), conforme demonstrado em estudo *in vitro* utilizando o Ensaio de Permeabilidade de Membrana Artificial Paralela (PAMPA), descrito por STASIŁOWICZ *et al.*, 2020. Nossos resultados indicam a melhora da solubilidade e distribuição da substância *in vivo*, com aumento da permeabilidade na barreira-hematoencefálica dos animais. Uma redução da carga fúngica foi também observada no grupo de animais tratados somente com ciclodextrina. As ciclodextrinas são reconhecidas como excipientes não tóxicos e farmacologicamente inativos que podem ser empregados em produtos farmacêuticos (JANSOOK *et al.*, 2018; KURKOV e LOFTSSON, 2013). Durante revisão de literatura não foram encontrados dados de atividade biológica da ciclodextrina utilizada nesse trabalho, sendo necessários futuros estudos para confirmação e esclarecimento dos resultados encontrados no presente trabalho.

Dados da literatura apresentam que nos últimos 5 anos, aproximadamente 124 estudos científicos foram realizados descrevendo a síntese e atividade dos compostos heterocíclicos tiazólicos (PETROU *et al.*, 2021). No presente trabalho apresentamos o potencial antifúngico *in vitro* e *in vivo* de substâncias heterocíclicas tiazólicas contra isolados de *Cryptococcus* spp.,

o que contribui com dados da literatura, onde compostos heterocíclicos tiazólicos são considerados fortes candidatos a protótipos de novos fármacos.

7. SÍNTESE DE RESULTADOS

Doze substâncias sintéticas apresentaram eficácia contra os isolados *C. neoformans* H99 e *C. gattii* L27/01. Os compostos heterocíclicos tiazólicos HTI-12, HTI-13 e HTI-14 apresentaram atividade antifúngica *in vitro* contra outras leveduras de importância médica com valores de CIM similares ao do fluconazol. A substância HTI-14 apresentou interação indiferente quando combinada com os antifúngicos anfotericina B e fluconazol. Além disso, a substância apresentou efeito na integridade do biofilme no isolado *C. neoformans* H99, com redução da atividade metabólica celular. A substância HTI-14 não apresentou atividade sobre as exoenzimas fosfolipase e proteinase de *C. neoformans*. As substâncias HTI-7, HTI-12, HTI-13 e HTI-14 não apresentaram toxicidade no modelo invertebrado *T. molitor*, além disso demonstraram eficácia no aumento da sobrevivência das larvas, com desempenho comparável com o fluconazol. Na curva de sobrevivência em modelo murino, a substância HTI-7 apresentou capacidade de manter 50% de sobrevivência dos animais ao final do experimento, superior ao resultado observado para o antifúngico fluconazol. No modelo murino de criptococose pulmonar com tratamento do complexo RN-104/ciclodextrina, a substância RN-104 complexada com ciclodextrina, apresentou maior capacidade de redução da carga fúngica no cérebro dos animais, quando comparado ao tratamento com a substância em forma livre. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram a atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* dos compostos heterocíclicos tiazólicos contra *Cryptococcus* spp.

8. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou compostos heterocíclicos tiazólicos com potencial atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* para isolados de *Cryptococcus* spp. As substâncias tiazólicas avaliadas apresentaram também amplo espectro de ação, com atividade antifúngica importante contra leveduras de importância médica do gênero *Candida* spp. O produto de degradação PD76 de um composto tiazólico apresentou atividade antifúngica superior ao seu precursor, e foi considerada uma substância promissora para futuros estudos de atividade antifúngica *in vivo*. Os isolados de *C. neoformans* avaliados apresentaram importante sensibilidade frente ao tiazol HTI-14, e um efeito significativo foi observado sobre a formação de biofilme, um importante fator de virulência alvo para o desenvolvimento de novos antifúngicos. Neste trabalho apresentamos importantes resultados de testes de toxicidade e atividade antifúngica *in vivo* no modelo invertebrado *Tenebrio molitor*, que associado a estudos anteriores, consideramos ser um modelo potencial para a triagem e estudo de compostos sintéticos com atividade antifúngica. A substância HTI-7 desempenhou excelente atividade antifúngica *in vivo*, com desempenho superior ao antifúngico de referência fluconazol. Apesar de serem necessários novos estudos, observamos nesse trabalho que a substância heterocíclica tiazólicas em estudo, complexada com ciclodextrina, apresentou maior permeabilidade na barreira hemato-encefálica e maior capacidade na redução de carga fúngica recuperadas dos animais em um modelo experimental murino de criptococose pulmonar. Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram a potencial atividade antifúngica de substâncias sintéticas da classe dos heterocíclicos tiazólicos, como também o seu potencial para novos protótipos de fármacos que possam ser desenvolvidos e disponibilizados no mercado para a terapêutica antifúngica.

9. REFERÊNCIAS

ALLEN, David et al. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Rev Anti Infect Ther*, v. 13, n. 6, p. 787–798, 2015.

ALMEIDA, Fausto; WOLF, Julie, M.; CASADEVALL, Arturo. Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*, v. 14, n. 12, p. 1173-1185, 2015.

ALTAMIRANO, Sophie et al. The interplay of phenotype and genotype in *Cryptococcus neoformans* disease. *Bioscience reports* v. 40, n. 10, BSR20190337, 2020.

ÁLVAREZ, Guzmán et al. Identification of a new amide-containing thiazole as a drug candidate for treatment of Chagas' disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 59, n. 3, p. 1398-1404, 2015.

ALVES, Danielle da Nóbrega et al. Toxicological Parameters of a Formulation Containing Cinnamaldehyde for Use in Treatment of Oral Fungal Infections: An In Vivo Study. *BioMed Research International*, v. 2021, 2021.

ALVES SOARES, Emmanuel et al. Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 7, p. e0007569, 2019.

BANERJEE, U. et al. Cryptococcosis in India: the awakening of a giant?. *Medical mycology*, v. 39, n. 1, p. 51-67, 2001.

BASTOS, Rafael Wesley et al. Environmental triazole induces crossresistance to clinical drugs and affects morphophysiology and virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 62, e01179-17, 2018.

BEARDSLEY, Justin et al. Central Nervous System Cryptococcal Infections in Non-HIV Infected Patients. *Journal of Fungi*, v. 5, n. 3, p. 71, 2019.

BERNAL-MARTINEZ, Leticia et al. Susceptibility profile of clinical isolates of non-Cryptococcus neoformans/non-Cryptococcus gattii Cryptococcus species and literature review. *Medical mycology*, v. 48, n. 1, p. 90-96, 2010.

BICANIC, Tihana et al. Toxicity of amphotericin B deoxycholate-based induction therapy in patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 59, n. 12, p. 7224-7231, 2015.

BIERNASIUK, Anna et al. The newly synthesized thiazole derivatives as potential antifungal compounds against *Candida albicans*. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 105, n. 16, p. 6355-6367, 2021.

BORCEA, Anca-Maria et al. An overview of the synthesis and antimicrobial, antiprotozoal, and antitumor activity of thiazole and bithiazole derivatives. *Molecules*, v. 26, n. 3, p. 624, 2021.

BOWMAN, Shaun M.; FREE, Stephen J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Coordenação geral de doenças transmissíveis unidade de vigilância das doenças de transmissão respiratória e imunopreveníveis vigilância e epidemiológica da criptococose. Brasília: 2010.

BUCHANAN, Kent L et al. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?. *Emerging infectious diseases*, v. 4, n. 1, p. 71, 1998.

CALANDRA, Thierry et al. Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: an updated approach to an old enemy. *Critical Care*, v. 20, n. 1, p. 1-6, 2016.

CAMPOY, Sonia; ADRIO, José L. Antifungals. *Biochemical pharmacology*, v. 133, p. 86-96, 2017.

Carneiro, S. B., Costa Duarte, F. Í., Heimfarth, L., Siqueira Quintans, J. S., Quintans-Júnior, L. J., Veiga Júnior, V., & Neves de Lima, Á. A. (2019). Cyclodextrin-Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 642.

CARRADORI, Simone et al. Evaluation of a large library of (thiazol-2-yl) hydrazones and analogues as histone acetyltransferase inhibitors: enzyme and cellular studies. *European journal of medicinal chemistry*, v. 80, p. 569-578, 2014.

CHARLIER, C et al. Evidence for a role of monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 77:120–127, 2009.

CHERRY, S & N. SILVERMAN. Host-pathogen interactions in drosophila: new tricks from an old friend. *Nat. Immunol.*, v. 7, p. 911–917, 2006.

CHORILLI, Marlus et al. Efeitos de complexos moleculares com β -ciclodextrina e hidroxipropil- β -ciclodextrina na solubilidade da cafeína. *Rev. Bras. Farm*, v. 88, n. 3, p. 141-1, 2007.

COELHO, Carolina; CASADEVALL, Arturo. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. *Cellular microbiology*, v. 18, n. 6, p. 792-799, 2016.

COX, Gary M. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infection and immunity*, v. 68, n. 2, p. 443-448, 2000.

CRUZ, Lana Ivone Barreto et al. Anti-*Candida albicans* activity of thiazolylhydrazone derivatives in invertebrate and murine models. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 4, p. 134, 2018.

CUNHA-FILHO, Marcílio Sérgio S.; SÁ-BARRETO, Livia C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.

DE GANS J.; Portegies, P.; Tiessens, G. et al. Itraconazole compared with amphotericin B plus flucytosine in AIDS patients with cryptococcal meningitis. *AIDS*, v.6, n.2, p. 185–190, 1992.

DEL POETA, Maurizio; CASADEVALL, Arturo. Ten challenges on *Cryptococcus* and cryptococcosis. *Mycopathologia*, v. 173, n. 5-6, p. 303-310, 2012.

DE LOGU, Alessandro et al. In vitro activity of 2-cyclohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 55, n. 5, p. 692-698, 2005.

DENNING, David W. et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 41, n. 6, p. 1364-1368, 1997.

DESALERMOS, A.; FUCHS, B.B.; MYLONAKIS, E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog*, v. 8, n.2, e1002451, 2012.

DE SOUZA, Marcus Vinícius Nora et al. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. *Química nova*, v. 28, n. 1, p. 78-83, 2005.

DÍAZ-GARCÍA, Judith et al. Monitoring the Epidemiology and Antifungal Resistance of Yeasts Causing Fungemia in a Tertiary Care Hospital in Madrid, Spain: Any Relevant Changes in the Last 13 Years?. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 65, n. 4, p. e01827-20, 2021.

DJORDJEVIC, Julianne. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development—lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in microbiology*, v. 1, p. 125, 2010.

DUCHÍNE, D.; WOUESSIDJEWÉ, D. Physicochemical characteristics and pharmaceutical uses of cyclodextrin derivatives. Part I. Pharm. Tech. 1990 (6): 26-34.

ELIOPOULOS, George M.; PEREA, Sofia; PATTERSON, Thomas F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clinical Infectious Diseases*, v. 35, n. 9, p. 1073-1080, 2002.

FERNANDES, Caroline Mota, et al. The future of antifungal drug therapy: novel compounds and targets. *Antimicrob Agents Chemother*, 65:e01719-20.

FERREIRA-PAIM, Kennio et al. MLST-based population genetic analysis in a global context reveals clonality amongst *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI isolates from HIV patients in Southeastern Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 11, n. 1, p. e0005223, 2017.

FICA C., ALBERTO. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Rev. chil. infectol.*, Santiago , v. 21, n. 1, p. 26-38, 2004 .

FIRACATIVE, C.; Meyer, W.; Castañeda, E. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Species Complexes in Latin America: A Map of Molecular Types, Genotypic Diversity, and Antifungal Susceptibility as Reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. *J. Fungi*, v. 7, p. 282, 2021.

FISHER, John F.; VALENCIA-REY, Paula A.; DAVIS, William B. Pulmonary Cryptococcosis in the Immunocompetent Patient—Many Questions, Some Answers. In: *Open Forum Infectious Diseases*. Oxford University Press, 2016. p. ofw167.

FRANCO, Pedro Henrique Cavalcanti et al. Stability-indicating method for the novel antifungal compound RI76: Characterization and in vitro antifungal activity of its active degradation product. *Biomedical Chromatography*, v. 35, n. 3, p. e5014, 2021.

FROST DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *The Journal of Antibiotics*, 48(4):306-10, 1995.

FU, Ci et al. Unisexual versus bisexual mating in *Cryptococcus neoformans*: consequences and biological impacts. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 65-75, 2015.

GARCÍA-RODAS, Rocío et al. *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement and Cellular Gigantism during *Galleria mellonella* Infection. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e24485, 2011.

GERSTEIN, Aleeza C, and Kirsten Nielsen. "It's not all about us: evolution and maintenance of *Cryptococcus* virulence requires selection outside the human host." *Yeast (Chichester, England)* vol. 34,4 (2017): 143-154.

GHANNOUM, Mahmoud A.; RICE, Louis B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GIBSON, Josie F.; JOHNSTON, Simon A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 76-86, 2015.

GUERRERO, A. et al. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, v. 152, n. 1, p. 3-9, 2006.

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

HASIM, Sahar; COLEMAN, Jeffrey J. Targeting the fungal cell wall: current therapies and implications for development of alternative antifungal agents. *Future medicinal chemistry*, v. 11, n. 08, p. 869-883, 2019.

HERKERT, P. F., HAGEN, F., PINHEIRO, R. L., et al. Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in Developing Countries. *Journal of fungi*, v. 3, n. 4, p. 62, 2017. <https://doi.org/10.3390/jof3040062>.

HORTA, Jorge A. et al. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Microbiology* v. 36, p. 1-6, 2005.

IDNURM, Alexander. A tetrad analysis of the basidiomycete fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*, v. 185, n. 1, p. 153-163, 2010.

IDNURM, Alexander et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 10, p. 753-764, 2005.

IGNASIAK, Katarzyna; MAXWELL, Anthony. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC research notes*, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2017.

IYER, K.R.; REVIE, N.M.; FU, C. *et al.* Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. *Nat Rev Microbiol*, v. 19, p. 454–466, 2021.

JACOBSON, Eric S. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical microbiology reviews*, v. 13, n. 4, p. 708-717, 2000.

JANSOOK, P., Ogawa, N., Loftsson, T., 2018. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 535, 272–284

JAMIU, A. T. et al. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Medical mycology*, v. 59, n. 1, p. 14-30, 2021.

JOHNSON MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Mar;48(3):693-715

JOHNSTON, P.R.; MAKAROVA, O.; ROLFF, J. Inducible defenses stay up late: temporal patterns of immune gene expression in *Tenebrio molitor*. *G3 (Bethesda)*, v.4, n. 6, p. 947-955, 2013.

JUNIOR, Joaquim Lucas et al. Distribuição de tipos moleculares de *Cryptococcus gattii* no Brasil: uma revisão bibliográfica. *Comunicação em Ciências da Saúde*, v. 27, n. 02, p. 159-166, 2017.

KASHYAP, Shiv Jee et al. Thiazoles: having diverse biological activities. *Medicinal Chemistry Research*, v. 21, n. 8, p. 2123-2132, 2012.

KHAWCHAROENPORN, Thana; APISARNTHANARAK, Anucha; MUNDY, Linda 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.

KURKOV SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharm.* 2013;453(1):167-180.

KWON-CHUNG, KYUNG J.; POLACHECK, ITZHACK; BENNETT, JOHN E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 15, n. 3, p. 535-537, 1982.

KWON-CHUNG, Kyung J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

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.

LEWIS, Russell E. Current concepts in antifungal pharmacology. In: *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, p. 805-817, 2011.

LINO CI, Gonçalves de Souza I, Borelli BM, et al. Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. *Eur J Med Chem*. 2018;151:248-260.

LIMA GUEDES, Francimary et al. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. *Rev. Bras. Farm*, v. 89, p. 3, 2008.

LIPINSKI, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1-3), 3–25.

LIZARAZO, Jairo et al. Retrospective study of the epidemiology and clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infections in Colombia from 1997–2011. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 11, p. e3272, 2014.

LUBERTO, C.; MARTINEZ-MARIÑO, B.; TARASKIEWICZ, D. et al. Identification of *App1* as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Investig.* v. 112, p. 1080–1094, 2003.

LV, Quan-Zhen et al. A New Antifungal Agent (4-phenyl-1, 3-thiazol-2-yl) Hydrazine Induces Oxidative Damage in *Candida albicans*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 10, p. 557, 2020.

MA, Hansong; MAY, Robin C. Virulence in *Cryptococcus* species. *Advances in applied microbiology*, v. 67, p. 131-190, 2009.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infection and immunity*, v. 73, n.10, p. 6350–6362, 2005.

MARTINEZ, Luis R.; CASADEVALL, Arturo. *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., IBOM, D. C., CASADEVALL, A., & FRIES, B. C. Characterization of phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Mycopathologia*, 166(4), 175–180, 2008.

MARTHO, Kevin Felipe Cruz et al. Amino Acid Permeases and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. *PloS one*, v. 11, n. 10, p. e0163919, 2016.

MATOS, THELMA TIRONE SILVÉRIO. Atividade antifúngica de heterociclos tiazólicos contra *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. Universidade Federal de Minas Gerais.

MAY, Robin C. et al. “*Cryptococcus*: From Environmental Saprophyte to Global Pathogen.” *Nature reviews Microbiology*, v. 14, n. 2, p. 106–117, 2017.

MAZU, Tryphon et al. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. *Mini reviews in medicinal chemistry*, v. 16, n. 7, p. 555-578, 2016.

MEYER, W.; AANENSEN, D.M.; BOEKHOUT, T. et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med. Mycol.* v. 47, p. 561–570, 2009.

MITCHELL, Thomas G.; PERFECT, John R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical microbiology reviews*, v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995.

MOMIN, M.; WEBB, G. The Environmental Effects on Virulence Factors and the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, v. 22, p. 6302, 2021.

MONTOYA, M.C.; MAGWENE, P.M.; PERFECT, J.R. Associations between *Cryptococcus* Genotypes, Phenotypes, and Clinical Parameters of Human Disease: A Review. *J Fungi (Basel)*. v. 7, n. 4, p. 260, 2021.

MOORE, Jason N.; HEALY, Jason R.; KRAFT, Walter K. Pharmacologic and clinical evaluation of posaconazole. *Expert review of clinical pharmacology*, v. 8, n. 3, p. 321-334, 2015.

MOTA FERNANDES, Caroline et al. The future of antifungal drug therapy: novel compounds and targets. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 65, n. 2, p. e01719-20, 2021.

MOURAD, A.; PERFECT, J.R. Present and Future Therapy of *Cryptococcus* Infections. *J Fungi (Basel)* v. 4, n. 3, p. 79, 2018.

NOSANCHUK, Joshua D.; STARK, Ruth E.; CASADEVALL, Arturo. Fungal melanin: what do we know about structure?. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 1463, 2015.

MOHAMMED, Noorullah Naqvi et al. Clotrimazole–cyclodextrin based approach for the management and treatment of Candidiasis–A formulation and chemistry-based evaluation. *Pharmaceutical development and technology*, v. 21, n. 5, p. 619-629, 2016.

MOHAMMAD, Haroon et al. Identification of a phenylthiazole small molecule with dual antifungal and antibiofilm activity against *Candida albicans* and *Candida auris*. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

NORMILE, Tyler G.; BRYAN, Arielle M.; DEL POETA, Maurizio. Animal models of *Cryptococcus neoformans* in identifying immune parameters associated with primary infection and reactivation of latent infection. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 2197, 2020.

ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; TOFFALETTI, D.L.; PERFECT, J.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* v. 16, p. 2576–2589, 1997.

OKAGAKI, Laura H. et al. Cryptococcal titan cell formation is regulated by G-protein signaling in response to multiple stimuli. *Eukaryotic cell*, v. 10, n. 10, p. 1306-1316, 2011.

OLSZEWSKI, Michal A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *The American journal of pathology*, v. 164, n. 5, p. 1761-1771, 2004.

PAGANO, M.; Faggio, C. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell Biochemistry and Function*. v. 33, p. 351–355, 2015.

OPPERT B, Dowd SE, Bouffard P, et al. Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin. *PLoS One*, v. 7 (4), n. 34624, 2012.

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

PERFECT, John R. et al. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clinical Infectious Diseases*, v. 36, n. 9, p. 1122-1131, 2003.

PERFECT, John R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.

PERFECT, John R.; BICANIC, Tihana. Cryptococcosis diagnosis and treatment: what do we know now. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 49-54, 2015.

PETROU, Anthi et al. Thiazole Ring—A Biologically Active Scaffold. *Molecules*, v. 26, n. 11, p. 3166, 2021.

PHADKE, S.S.; FERETZAKI, M.; CLANCEY, S.A, MUELLER, O.; HEITMAN, J. Unisexual Reproduction of *Cryptococcus gattii*. *PLoS ONE* v. 9, n. 10 p. e111089, 2014.

PIERCE, Christopher G. et al. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Current opinion in pharmacology*, v. 13, n. 5, p. 726-730, 2013.

PITHA, J.; PITHA, J. Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic dissolution enhancing excipients. *J. Pharm. Sci.* v. 74, n.9, p. 987-90, 1985.

PITISUTTITHUM, P.; NEGRONI, R.; GRAYBILL, J.R. et al. Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:745–755, 2005.

POLA, Someshwar. Significance of thiazole-based heterocycles for bioactive systems. *Scope of Selective Heterocycles from Organic and Pharmaceutical Perspective*, v. 1, p. 13-62, 2016.

PRICE, Michael S. et al. *Cryptococcus neoformans* requires a functional glycolytic pathway for disease but not persistence in the host. *MBio*, v. 2, n. 3, p. e00103-11, 2011.

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

RAMAGE, Gordon et al. Fungal biofilm resistance. *International journal of microbiology*, v. 2012, 2012.

RAO, H.; CHOO, S.; RAJESWARI MAHALINGAM, S.R. et al. Approaches for Mitigating Microbial Biofilm-Related Drug Resistance: A Focus on Micro- and Nanotechnologies. *Molecules*, v. 26, p. 1870, 2021.

RAWAT, S.; JAIN, S. K. Solubility enhancement of celecoxib using β cyclodextrin inclusion complexes. *European. J. Pharm. Biopharm.*, v. 57, p. 263-267, 2004.

REGASINI, Luis Octávio et al. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 12, 2009.

REIS, Flavia CG et al. Small molecule analysis of extracellular vesicles produced by *Cryptococcus gattii*: identification of a tripeptide controlling cryptococcal infection in an invertebrate host model. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 652, 2021.

RIBEIRO, M. A., & NGAMSKULRUNGROJ, P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*, v. 50, n. 6, p. 315-320, 2008.

RUTHERFORD JC, Bahn Y-S, van den Berg B, Heitman J and Xue C. Nutrient and Stress Sensing in Pathogenic Yeasts. *Front. Microbiol*, v. 10, p. 442, 2019.

SÁ, Nívea Pereira 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.

SÁ, Nívea P. et al. A phenylthiazole derivative demonstrates efficacy on treatment of the cryptococcosis & candidiasis in animal models. *Future science OA*, v. 4, n. 6, p. FSO305, 2018.

SABIITI, Wilber; MAY, Robin C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Future microbiology*, v. 7, n. 11, p. 1297-1313, 2012.

SACHT, Gabriely Lessa et al. Disseminated cryptococcosis with cutaneous involvement in an immunocompetent patient. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 91, n. 6, p. 832-834, 2016.

SALAZAR, Ana S et al. Potential missed opportunities for diagnosis of cryptococcosis and the association with mortality: A cohort study. *E Clinical Medicine*. 27:100563. Oct 7, 2020.

SANTANGELO, Rosemary T. et al. Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. *Journal of medical microbiology*, v. 48, n. 8, p. 731-740, 1999.

SANTANGELO, Rosemary et al. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. *Infection and immunity*, v. 72, n. 4, p. 2229-2239, 2004.

SANTIAGO-TIRADO, Felipe H. et al. Trojan Horse Transit Contributes to Blood-Brain Barrier Crossing of a Eukaryotic Pathogen. *mBio*, v. 8, n. 1, p. e02183-16, 2017.

SANTOS, Julliana Ribeiro Alves et al. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine cryptococcosis. *PLoS One*, v. 9, n. 11, p. e112669, 2014.

SECCI, Daniela et al. Synthesis, anti-*Candida* activity, and cytotoxicity of new (4-(4-iodophenyl) thiazol-2-yl) hydrazine derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, v. 53, p. 246-253, 2012.

SETIANINGRUM, F, RAUTEMAA-RICHARDSON R, DENNING, DW. A review of pathobiology and clinical aspects. *Med Mycol*, v 2, p 133-150, 2019.

SCHROECKENSTEIN, D.C.; MEIER-DAVIS, S.; BUSH, R.K. Occupational sensitivity to *Tenebrio molitor* Linnaeus (yellow mealworm). *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 86, p. 182-188.

SCOTT, Lesley J.; SIMPSON, Dene. Voriconazole. *Drugs*, v. 67, n. 2, p. 269-298, 2007.

SHEA, John M.; HENRY, Jennifer L.; DEL POETA, Maurizio. Lipid metabolism in *Cryptococcus neoformans*. *FEMS yeast research*, v. 6, n. 4, p. 469-479, 2006.

SHEEHAN, Daniel J.; HITCHCOCK, Christopher A.; SIBLEY, Carol M. Current and emerging azole antifungal agents. *Clinical microbiology reviews*, v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999.

SHI, M., LI, S. S., ZHENG, C., 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.

SHUKLA, Manisha; CHANDLEY, Pankaj; ROHATGI, Soma. The Role of B-Cells and Antibodies against Candida Vaccine Antigens in Invasive Candidiasis. *Vaccines*, v. 9, n. 10, p. 1159, 2021.

SILVA, Iara R. et al. Improving the solubility of an antifungal thiazolyl hydrazone derivative by cyclodextrin complexation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 156, p. 105575, 2021.

SLOAN, Derek J; PARRIS Victoria. “Cryptococcal Meningitis: Epidemiology and Therapeutic Options.” *Clinical Epidemiology*, v. 6, p. 169–182, mar 2014.

SORRELL, Tania C. et al. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 5, p. 1253-1260, 1996.

SOUZA, An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*. *J Fungi (Basel)*, v. 4, n. 4, p.125. 2018

SPRINGER, Deborah J.; CHATURVEDI, Vishnu. Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerging Infectious Disease journal-CDC*, v. 16, n. 1, Jan 2010.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H & DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. *Yeast (Chichester, England)*, v. 31, n. 2, p. 47–60, 2014.

STASIŁOWICZ, Anna et al. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin as an effective carrier of curcumin–piperine nutraceutical system with improved enzyme inhibition properties. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, v. 35, n. 1, p. 1811-1821, 2020.

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*, v. 98, n. 26, p. 15245-15250, 2001.

SZEJTLI, József. Cyclodextrin and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem Rev*, v. 98, n.5, p. 1743-53, 1998.

THOMPSON G.R. 3rd, RENDON, A.; RIBEIRO DOS SANTOS R, et al. Isavuconazole Treatment of Cryptococcosis and Dimorphic Mycoses. *Clin Infect Dis*. v. 63, n. 3, p. 356-362, 2016.

TITS, Jana; CAMMUE, Bruno; THEVISSSEN, Karin. Combination therapy to treat fungal biofilm-based infections. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 22, p. 8873, 2020.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens. *J Fungi*, v 5, n. 1, p. 3, 2018.

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

VAN DIJCK, Patrick et al. Methodologies for in vitro and in vivo evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilm agents and surface coatings against fungal biofilms. *Microbial Cell*, v. 5, n. 7, p. 300, 2018.

VAN DUIN, David; CASADEVALL, Arturo; NOSANCHUK, Joshua D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 46, n. 11, p. 3394-3400, 2002.

WANG, Linqi et al. Fungal adhesion protein guides community behaviors and autoinduction in a paracrine manner. *Proc Natl Acad Sci*, 110: 11571– 11576, 2013.

WANG, L.; ZHAI, B.; LIN, X. The link between morphotype transition and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog*, 8: e1002765, 2012.

WANG, Yulin; AISEN, Philip; CASADEVALL, Arturo. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infection and immunity*, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, 1995.

WHALEY, Sarah G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* species. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 2173, 2017.

WILSON, J. Walter. Cryptococcosis: (Torulosis, European blastomycosis, Busse-Buschke's disease). *Journal of chronic diseases*, v. 5, n. 4, p. 445-459, 1957.

WILLIAMSON, Peter R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front Biosci*, v. 2, n. 19, p. e99-e107, 1997.

WOZNIAK, Karen L.; WORMLEY JR, Floyd L.; OLSZEWSKI, Michal. Host immune responses against pulmonary fungal pathogens. INTECH Open Access Publisher, 2012. DOI: 10.5772/30280. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/32004>

XUE, Chaoyang et al. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell host & microbe*, v. 1, n. 4, p. 263-273, 2007.

YAO, Yan et al. Voriconazole: a novel treatment option for cryptococcal meningitis. *Infectious Diseases*, v. 47, n. 10, p. 694-700, 2015.

ZARAGOZA, Oscar. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence*, v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019.

ZARAGOZA, Oscar et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in applied microbiology*, v. 68, p. 133-216, 2009.

ZHANG, Nannan; PARK, Yoon-Dong; WILLIAMSON, Peter R. New technology and resources for cryptococcal research. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 99-107, 2015.

ANEXO I – Certificado do Comitê de ética em pesquisa com uso de animais.

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 207/2017 Título do projeto: Estudo da atividade antifúngica de compostos sintéticos e própolis em modelo de candidíase experimental Finalidade: Pesquisa Pesquisador responsável: Susana Johann Unidade: Instituto de Ciências Biológicas Departamento: Departamento de Microbiologia	
Situação atual: Decisão Final - Aprovado	
Aprovado na reunião do dia 30/10/2017. Validade: 30/10/2017 à 29/10/2022 Belo Horizonte, 31/10/2017.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/	Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br


ANEXO II – Artigo: Stability-indicating method for the novel antifungal compound RI76: Characterization and *in vitro* antifungal activity of its active degradation product.

Received: 13 June 2020 | Revised: 14 October 2020 | Accepted: 20 October 2020
DOI: 10.1002/bmc.5014

RESEARCH ARTICLE

Biomedical
Chromatography WILEY

Stability-indicating method for the novel antifungal compound RI76: Characterization and *in vitro* antifungal activity of its active degradation product

Pedro Henrique Cavalcanti Franco¹ | Júlia Geraldi Vieira¹ |
Cristina Alves de Oliveira Ramos² | Susana Johann² | Renata Barbosa de Oliveira¹ |
Isabela Costa César¹ 

¹Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence

Isabela Costa César, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil
Email: isacesar@gmail.com;
isabelacesar@ufmg.br

Funding Information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

Abstract

RI76 is a novel 2-thiazolylhydrazone compound with reported antifungal activity. In preclinical drug development, it is fundamental to know the impurity profile and to understand degradation mechanisms of the molecule. In our study, RI76 was subjected to forced degradation conditions, and a stability-indicating HPLC-DAD method was developed and validated. Separation was carried out on a C18 column (150 × 4.6 mm i.d., 5 μm) maintained at 40°C using a 1 mL/min flow rate of 2 mM ammonium acetate with 0.1% formic acid (pH 3.0) and acetonitrile in gradient mode. The method was linear in the range of 0.7–91 μg/mL for RI76 and 0.7–25 μg/mL for its degradation product PD76. The formation of a major degradation product was quickly observed when RI76 was in aqueous solution. The chemical structure of this product, named PD76, was proposed based on LC-UV-MS experiments, synthesized in-house, and confirmed by NMR spectroscopy and chromatographic analysis. *In vitro* antifungal activity assays demonstrated that this resultant product shows a promising activity against clinically important *Candida* and *Cryptococcus* strains, matching or surpassing the activity of its precursor and of well-established antifungal drugs.

KEYWORDS

antifungal, drug development, forced degradation, HPLC, stability-indicating method

ANEXO III – Thiazole derivative increases survival in invertebrate and murine models infected with *Cryptococcus neoformans*.

Artigo: Thiazole derivative increases survival in invertebrate and murine models infected with *Cryptococcus neoformans*.

Cristina Alves de Oliveira Ramos¹, Nívea Pereira de Sá^{1,3}, Samara Cristina Alves¹,
Renata Barbosa de Oliveira², Carlos Augusto Rosa¹, Susana Johann^{1*}.

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

²Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brazil.

³Department of Microbiology and Immunology, Stony Brook University, Stony Brook, NY, USA.

Corresponding author:

Susana Johann, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas,

Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, PO Box 486, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. Tel.: +55 3349 7700; Fax: +55 31 3295 3115; E-mail: sjohann@icb.ufmg.br

ABSTRACT: Cryptococcosis is a systemic mycosis caused mainly by two species of encapsulated basidiomycete yeast, with *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* responsible for the infection in immunocompromised and immunocompetent individuals, respectively. The antifungal therapy available presents a series of limitations such as resistance to fluconazole, nephrotoxicity caused by amphotericin B, and flucytosine high cost and limited availability worldwide. Given this situation, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of compound HTI-7 against *C. neoformans* H99 infection in *Tenebrio molitor* larvae and mice. The MIC values was 3.9-7.8 µg/mL for *C. gattii* and 7.80 µg/mL for *C. neoformans* strains. The substance HTI-7 showed a significant difference in the larval survival of *Tenebrio molitor* at concentrations of 10 mg/kg ($p = 0.0070$) and 30 mg/kg ($p = 0.0006$). In the murine model, the substance HTI-7 at a concentration of 10 mg/kg/day showed excellent results in increasing animal survival, with a mean survival of

58% compared to 54% presented by the group treated with fluconazole 10 mg/kg/day, thus demonstrating promising antifungal activity *in vivo* in increasing survival in the studied models.

KEYWORDS: antifungal, *Cryptococcus*, thiazoles, *Tenebrio molitor*.

1. INTRODUCTION

Cryptococcosis is an infectious disease affecting more than one million people per year worldwide. This disease occurs primarily by inhalation of the infectious propagules from environmental reservoirs and deposition into pulmonary alveoli. *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* are considered the predominant pathogens of human cryptococcosis and are capable of causing severe and fatal meningoencephalitis and the infection may involve several organs (1-4).

The patient's susceptibility and the progression of cryptococcal disease depend on the genotypes and phenotypes of the host and the fungus (5), thus, patients with cryptococcosis can present several symptoms in a wide spectrum of severity due to the interaction between yeast and the host (6).

In Latin America, cryptococcal meningitis is still an important health threat. As molecular data from worldwide, *C. neoformans* molecular type NIV is the most common cause of cryptococcosis in HIV-infected people, followed by *C. gattii* molecular type VGII, affecting mostly otherwise healthy host (7).

In Brazil, an epidemiological study carried out between 2000 and 2012 showed 5,755 registered deaths in which cryptococcosis was cited as the cause. Of these, 1121 cases (19.5%) the cryptococcosis was recorded as the basic cause of death representing a mean mortality rate of 6.09/million inhabitants. In remaining 4634 (80.5%) cryptococcosis were recorded as associated cause (8).

Currently available antifungal therapy for cryptococcosis is limited. Treatment is based on the antifungals amphotericin B and fluconazole, since the antifungals of the echinocandin class do not show activity against *C. neoformans*. Amphotericin B has broad antifungal activity, however, its use is limited due to its nephrotoxicity. The available liposomal formulations reduce the negative effects of amphotericin B, but its high cost makes its application difficult in developing countries (9).

The murine animal model is classically used to study the antifungal activity of new compounds and the virulence mechanisms of human pathogens. Reducing the use of vertebrate animal models and the cost of scientific trials are part of emerging bioethical issues discussed in the scientific community (10). For the development of new treatment alternatives for cryptococcosis, it is necessary to identify the phenotypic and genotypic factors of the yeast during host infection that contribute to the evolution of the disease (11). For this, it is necessary to develop studies to evaluate the antifungal activity and establish host-pathogen interactions in alternative invertebrate models (10).

As alternative model invertebrate, insect host on the rise is *Tenebrio molitor* (Coleoptera), a mealworm beetle, stored-grain plague (12). Studies demonstrate the potential of *T. molitor* larvae as a model host that can be used to study fungal virulence, host immune responses to fungal infection and the action of antifungal compounds (13).

Therefore, in this work, the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of the heterocyclic compound thiazole HTI-7 was evaluated in a murine model and in the alternative invertebrate model *Tenebrio molitor*. We also investigated phenotypic changes in the fungus cell and capsule after infection in *Tenebrio molitor*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Compound

Thiazole compound (E)-2-[(2-benzylidenecyclohexylidene) hydrazinyl]-4 (cyanophenyl) thiazole identified as HTI-7 in this work was synthesized according to methodology previously described by (14), designated as 14 by these authors.

2.2 Fungal strains and inoculum preparation

Cryptococcus neoformans H99 was obtained from the culture collection of the Division of Infectious Diseases at Brown University (Providence, USA). *C. gattii* ATCC 24065 and *C. neoformans* ATCC 24067 were obtained from the Culture Collection of the University of Georgia (Atlanta, GA, USA). The isolate L27/01 was from the collection of cultures of the Laboratory of Mycology / Institute of Biological Sciences at UFMG. All yeasts was stored at - 80°C in glycerol.

2.3 *In vitro* susceptibility of *Cryptococcus spp.*

Broth microdilution testing was performed in accordance with the guidelines in the CLSI document M27-A3 (15). Susceptibility provided by the microdilution method, which was performed in sterile 96-well flat-bottomed microplates (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). The isolates were grown on Sabouraud dextrose agar (SDA, Himedia, Mumbai, India) for 48 h at 35 °C. The thiazole compound HTI-7 was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) and diluted in RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine and buffered to pH 7.0 with 0.165 M morpholine propanesulfonic acid ([MOPS] Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Compound was tested at concentrations ranging from 0.06 to 32 µg/ml. Growth and sterility controls were also performed. Fluconazole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and amphotericin B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were included as the positive antifungal controls and were tested from 0.125 to 64 µg/ml. The plates were incubated at 35 °C for 48-72 hours and the reading was performed visually, with the MIC being considered as a total inhibition of growth when compared to the growth of the control. The value of the minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest compound concentration (µg/mL) at which the well was optically clear. Two independent experiments were carried out in duplicate.

2.4 Survival curve in murine model of cryptococcosis

For the survival curve experiments, C57BL/6 male mice with approximately 6 to 8 weeks and 25 grams, provided by the Centro de Bioterismo, Universidade Federal de Minas Gerais were used. This project was submitted to the Animal Experimentation Ethics Committee (CETEA) of the Federal University of Minas Gerais and approved with CEUA Protocol: 401/2017. Yeasts of *C. neoformans* isolated H99 were cultivated in sabouraud dextrose agar at 37 °C for 48 hours. Cells were transferred to sterile saline and the inoculum quantified in a Neubauer chamber adjusted to 1×10^5 cells/ml.

The animals were anesthetized intraperitoneally (IP) with a solution of xylazine, ketamine and sterile PBS (80 mg/kg/10 mg / kg). After anesthesia, the animals were submitted to infection via the intratracheal (IT) route through a transverse incision of approximately 1 cm made in the skin of the neck region to expose the trachea. Using a Hamilton syringe, 30 µl

of the fungal inoculum (1×10^5 cell / animal) was injected. Immediately after infection, the animals were sutured and kept warm at 35°C until recovery from anesthesia. The experimental groups were used: negative control with vehicle used to dilute HTI-7 substances (5 and 10 mg/kg/day), control of infected animals without treatment and control of infected animals with treatment with fluconazole (10 mg/day). kg/day) with n=6. The negative control animals received only 30 µl of sterile PBS solution by the same route.

Fluconazole was solubilized and sterile distilled water. The HTI-7 substance was solubilized in the vehicle composed of DMSO. After performing the procedures, the experimental groups were kept in separate cages and received water and food ad libitum. The animals were monitored daily to build a survival curve. Treatment was started after 24 hours of infection. The experimental drug at concentrations of 5 and 10 mg/kg/day, fluconazole (10 mg/kg/day) and the vehicle were administered daily intraperitoneally for 15 days. The animals were weighed and monitored to assess weight loss.

2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism statistical software 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The survival curve was provided by the Kaplan-Meier method and the results obtained by the log test, with $p < 0.05$ statistical significance. For distribution of total cell size, cell body and capsule, scatter plot and statistical analysis by the T test were used.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Antifungal Susceptibility Tests

The synthesis of the HTI-7 compounds in our study was described previously (14). MICs were determined for the thiazole compound under study and for the antifungal agents fluconazole and amphotericin B to confirm the *in vitro* activity and further study in the *in vivo* model (Table 1).

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the heterocyclic thiazole HTI-7, fluconazole (FLZ) and amphotericin B (AMB) antifungals against *Cryptococcus spp.*

Strains	Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		
	Antifungals		Thiazole Heterocyclic
	AMB	FLZ	HTI-7
<i>C. neoformans</i> H99	0.50	2.0	7.80
<i>C. neoformans</i> ATCC 24067	0.25	2.0	7.80
<i>C. gattii</i> L27/01	0.12	16.0	7.80
<i>C. gattii</i> ATCC 24065	0.25	2.0	3.90

The susceptibility test showed MIC values ranging from 3.90 to 7.80 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for two *C. gattii* isolates and 7.80 $\mu\text{g/mL}$ for two *C. neoformans* isolates. FLC and AMB showed MIC values lower than those found for test compounds and according to CLSI M27-S4 (15), all isolates were sensitive to the compound under study. Thiazole heterocyclic compounds described by Sá et al, presented low cytotoxicity and important antifungal activity, being compounds considered promising prototypes for the development of new antifungal agents (16).

4. COMPOUND TOXICITY AND SURVIVAL CURVE IN *Tenebrio molitor*

In this work we propose to carry out the study and evaluation of the effectiveness of antifungal agents in the murine model and in *T. molitor*. Given the absence of toxicity of the compound in *T. molitor*, we evaluated its effectiveness in increasing the survival of larvae infected with *C. neoformans* H99 and treated with the compound and antifungal agents (Figure 2).

The group of unhandled larvae and the group of larvae that received only PBS showed no difference in survival. These two groups were used to control the viability of the larvae used in this study and control the effect of injection on survival, respectively. The group of untreated *C. neoformans* H99 infected larvae had a mean survival of 72 hours, while the group treated with fluconazole had an increase in survival with a median of 120 hours, validating this antifungal as a positive control of larvae survival.

The evaluation of the toxicity of the compound in the alternative model of invertebrate *Tenebrio mollitor* (Figure 1) showed that the three concentrations evaluated did not show

toxicity, showing 100% survival at the concentration of 5mg/kg and 94% at the concentrations of 10 and 30 mg/kg of the larva. MATOS (17) evaluated the toxicity of the compound HTI-7 at a concentration of 10 mg/kg/larva in the invertebrate model *Galleria mellonella* for 7 days and at this concentration, the compound did not show toxicity in the model studied. The substance HTI-7 presents a close difference in the survival of larvae but should be 10 mg / kg ($p = 0.0070$) and 30 mg/kg ($p = 0.0006$). Fluconazole 10 mg/kg was used as control and presentation p value <0.0001 . The cytotoxicity of the compound was previously evaluated in human embryonic kidney cells (HEK-293) and exhibited low cytotoxicity to human cells with IC50 values greater than 50 mM. This result demonstrates the enormous potential of this heterocyclic thiazole compound with respect to antifungal activity and selectivity (14).

The study of the efficacy of antifungal agents and the interaction of fungal pathogens in non-vertebrate hosts is important to evaluate and propose that new non-vertebrate animal models can be used and obtained results similar to those of mammal models (18).

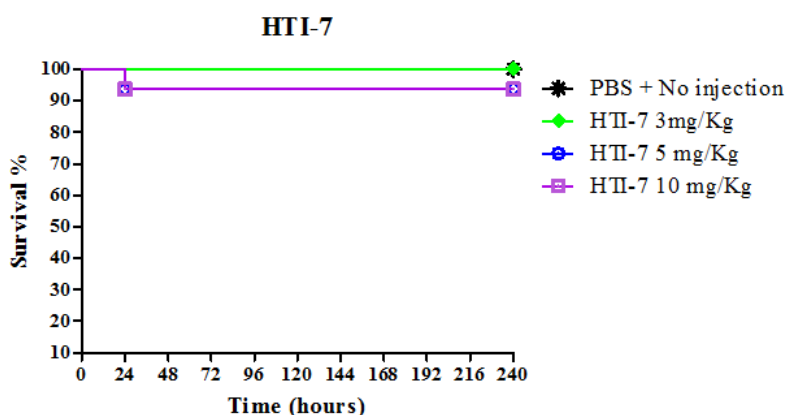


Figure 1. Evaluation of the toxicity of the substance HTI-7 in the invertebrate model *Tenebrio molitor*. The test was performed in triplicate, with $n=16$ larvae per group. No toxicity was observed between the evaluated dosages. There was no significant difference between the tested dosages, presenting $p >0.05$ for 5 mg/kg/day and $p = 0.3173$ for 10 and 30 mg/kg/day. Statistical analyses were performed by Kaplan-Meier.

These results are interesting as they show *Tenebrio molitor* as a promising alternative invertebrate model for evaluating the toxicities of compounds with antifungal activity, with results similar to *G. mellonella*, which is widely used today. Although few studies with *T.*

molitor have been described to assess the microbial pathogenesis in this invertebrate (13,19, 20, 21) model, studies are still needed to assess the efficacy of antifungal agents in the proposed model.

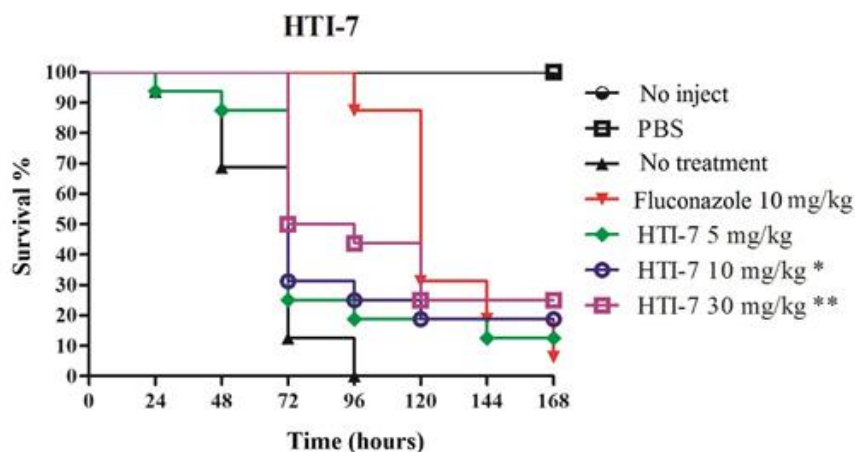


Figure 2. Survival curve in an invertebrate model of *Tenebrio molitor* infected with *C. neoformans* H99 and treated with compound HTI-7 at appropriate 5, 10 and 30 mg/kg and fluconazole 10 mg/kg. The compound HTI-7 presents a significant difference in the options of 10 and 30 mg/kg with p value of 0.0338 and 0.0069 respectively, as well as the control antifungal fluconazole p value of 0.0002. There was no significant difference between fluconazole 10 mg/kg and an HTI-7 substance in the appropriate 10 mg/kg (p value 0.1578) and 30 mg/kg (p value 0.6365). Statistical analysis were performed by Kaplan-Meier.

3.4 Survival curve in murine model

The survival curve in a murine model of pulmonary cryptococcosis was performed to verify whether experimental treatments with the compound HTI-7 at different concentrations were able to increase the survival of animals infected with *C. neoformans* H99 comparable to treatment with the control antifungal fluconazole (Figure 3).

The average survival was 33 days for the group of infected animals without treatment and 31 days for the group treated with only the vehicle. There was no significant difference between these groups (p value 0.3847) necessarily, that the diluents of the compound HTI-7 have no effect on increasing survival in animals under study. As a positive treatment control,

fluconazole at a concentration of 10 mg/kg/day was used, which showed an increase in the mean survival of the animals in 54 days.

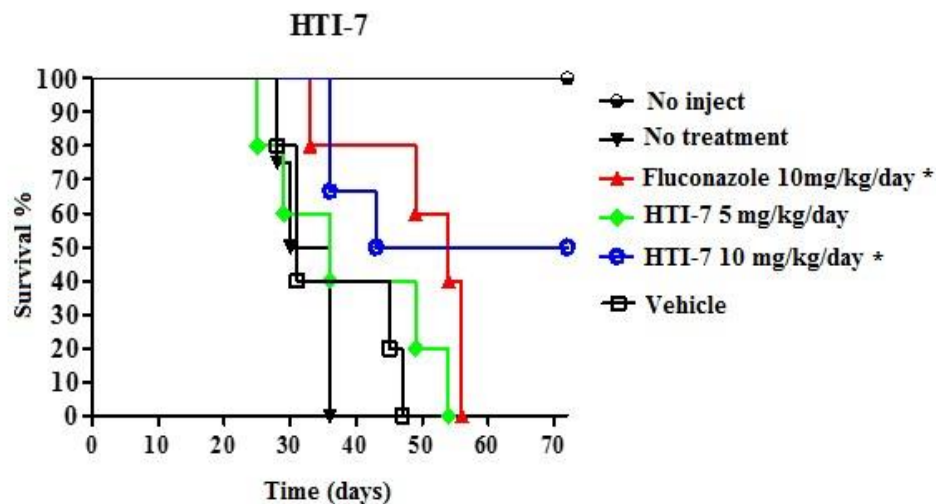


Figure 3. Survival curve in a murine model of pulmonary cryptococcosis with treatment for 15 days and monitoring of animals for 72 days. Experimental groups: uninfected animals (n=4), untreated (n=4), fluconazole 10 mg/kg/day (n=6), vehicle (n=6), HTI-5 5mg/kg/day (n =6) and HTI-7 10 mg/kg/day (n=6). Treatments with HTI-7 (10 mg/kg/day) with $p = 0.1663$, fluconazole (10 mg/kg/day) with $p = 0.0290$ increased animal survival. The vehicle group does not differ when compared to the group of untreated animals with $p = 0.3847$. Statistical analysis were performed by Kaplan-Meier.

For the best of HTI-7 compound evaluated, only the concentration of 10 mg/kg/day presented a difference in relation to the group of untreated animals (p value 0.1663) with the mean survival of the animals in 58 days. There is no difference between the group treated with fluconazole 10 mg/kg/day and the group treated with HTI-7 10/mg/kg/day (p value 0.3030). Given the demonstrated efficacy of the compound HTI-7 in increasing the survival of the alternative model of the *Tenebrio molitor*.

4. Conclusion

The compound HTI-7 presented antifungal activity against *Cryptococcus* *in vitro* e *in vivo*. Our results indicate *T. molitor* as a promising invertebrate model to study the toxicity and antifungal activity of antifungal compounds in *C. neoformans* infection. The similarity in the efficacy of the compound HTI-7 in the survival curve in murine models and in *T. molitor* represents an alternative in using this invertebrate as a model for screening concentrations of substances to be tested in vertebrate models, contributing to cost reduction and extensive use of animals in experimental testing steps.

Funding: Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Schmiedel Y, Zimmerli S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia*. *Swiss Med Wkly*. 2016 Feb 22;146:w14281. doi: 10.4414/smw.2016.14281. PMID: 26901377.
2. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. 2009 Feb 20;23(4):525-30.
3. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, Falk R, Parmen S, Lumbsch HT, Boekhout T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*. 2015 May; 78:16
4. Sabiiti W, May RC. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol*. 2012 Nov;7(11):1297-313. doi: 10.2217/fmb.12.102. PMID: 23075448.
5. Montoya, M.C.; Magwene, P.M.; Perfect, J.R. Associations between *Cryptococcus* Genotypes, Phenotypes, and Clinical Parameters of Human Disease: A Review. *J. Fungi* 2021, 7, 260. <https://doi.org/10.3390/jof7040260>.
6. Gibson JF, Johnston SA. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genet Biol*. 2015;78:76-86. doi:10.1016/j.fgb.2014.11.006
7. Firacative, C.; Meyer, W.; Castañeda, E. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Species Complexes in Latin America: A Map of Molecular Types, Genotypic Diversity, and Antifungal Susceptibility as Reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. *J. Fungi* 2021, 7, 282. .

8. Alves Soares E, Lazera MdS, Wanke B, Faria Ferreira Md, Carvalhaes de Oliveira RV, Oliveira AG, et al. (2019) Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study. *PLoS Negl Trop Dis* 13(7): e0007569. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007569>
9. Zaragoza O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence*. 2019 Dec 10 (1):490-501. PMID: 31119976; PMCID: PMC6550552. doi: 10.1080/21505594.2019.1614383.
10. Garcia-Rodas R, Casadevall A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O (2011) *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement and Cellular Gigantism during *Galleria mellonella* Infection. *PLoS ONE* 6(9): e24485. doi:10.1371/journal.pone.0024485
11. Altamirano S, Jackson KM, Nielsen K. The interplay of phenotype and genotype in *Cryptococcus neoformans* disease. *Biosci Rep*. 2020;40(10):BSR20190337. doi:10.1042/BSR20190337
12. Schroeckenstein, D.C., Meier-Davis, S., Bush, R.K., 1990. Occupational sensitivity to *Tenebrio molitor* Linnaeus (yellow mealworm). *J. Allergy Clin. Immunol.* 86, 182– 188. [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749\(05\)80064-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749(05)80064-8).
13. de Souza PC, Morey AT, Castanheira GM, et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *J Microbiol Methods*. 2015;118:182-186. doi:10.1016/j.mimet.2015.10.004
14. Lino CI, Gonçalves de Souza I, Borelli BM, et al. Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. *Eur J Med Chem*. 2018;151:248-260. doi:10.1016/j.ejmech.2018.03.083
15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard-Third Ed. CLSI Document M27-a3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2008.

16. Pereira de Sá N, Lino CI, Fonseca NC, et al. Thiazole compounds with activity against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in vitro. *Eur J Med Chem.* 2015;102:233-242. doi:10.1016/j.ejmech.2015.07.032
17. Aividade antifúngica de heterociclos tiazólicos contra *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*; 2017; Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Orientador: Susana Johann.
18. Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun.* 2005;73(7):3842-3850.
19. Keshavarz M, Jo YH, Patnaik BB, et al. TmRelish is required for regulating the antimicrobial responses to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in *Tenebrio molitor* [published correction appears in *Sci Rep.* 2020 Apr 21;10(1):7013]. *Sci Rep.* 2020;10(1):4258. Published 2020 Mar 6. doi:10.1038/s41598-020-61157-1
20. Edosa TT, Jo YH, Keshavarz M, Kim IS, Han YS. Biosurfactants Induce Antimicrobial Peptide Production through the Activation of TmSpatzles in *Tenebrio molitor*. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6090. Published 2020 Aug 24. doi:10.3390/ijms21176090
21. Krams I, Daukste J, Kivleniece I, Krama T, Rantala MJ. Previous encapsulation response enhances within individual protection against fungal parasite in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *Insect Sci.* 2013;20(6):771-777. doi:10.1111/j.17447917.2012.01574.x
22. Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology (Reading).* 2001;147(Pt 8):2355-2365. doi:10.1099/00221287-147-8-2355
23. Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol.* 2009;68:133-216. doi:10.1016/S0065-2164(09)01204-0

ANEXO IV – Estudo da Morfogênese de *Cryptococcus neoformans* H99 durante infecção em *Tenebrio molitor*.

INTRODUÇÃO

O estudo da interação patógeno-hospedeiro e dos fatores de virulência de patógenos humanos tem sido classicamente descrito em modelos de mamíferos, sendo os camundongos os modelos mais utilizados. Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente no uso de outros modelos de estudo, em vista das preocupações com os custos financeiro e questões bioéticas envolvidas na experimentação com animais vertebrados (HU *et al.*, 2008; NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012; HOHL, 2014; MYLONAKIS, 2005).

Cryptococcus neoformans é uma levedura patogênica que acometer pacientes imunossuprimidos, mas também pode infectar uma grande variedade de hospedeiros ambientais como amebas, insetos, nematoides, mamíferos e plantas. Estudos indicam que os mecanismos de virulência são conservados independentemente do hospedeiro. Por esta razão, o uso de modelos alternativos aos mamíferos tem despertado o interesse da comunidade científica (TREVIJANO-CONTADOR *et al.*, 2015).

O estudo de modelos invertebrados nas pesquisas em microbiologia está atualmente consolidado, sendo as larvas de *Galleria mellonella* amplamente utilizadas para estudar os mecanismos de interação patógeno-hospedeiro e também a eficácia de novos compostos antimicrobianos (PEREIRA *et al.*, 2018). Um fator relevante para o cenário da pesquisa em nosso país é que o modelo *G. mellonella* não é comercializado em alguns países, incluindo o Brasil. E diante disso, as instituições precisam manter o seu próprio abastecimento para utilização desse modelo, demandando mão de obra técnica e o aumento dos custos dos experimentos. No Brasil, existem vários fornecedores comerciais de *T. molitor* (SOUZA *et al.*, 2018) e associado ao pouco espaço demandado para armazenamento e manipulação das larvas, torna esse modelo interessante para os estudos.

METODOLOGIA

O isolado *C. neoformans* H99 foi cultivado por 48 h a 35 °C em ágar sabouraud e posteriormente as células foram ressuspensas em tubos contendo solução salina (0,9%) estéril

e o inóculo ajustado para $1,0 \times 10^6$ células/larva em hemocitômetro. As larvas de *Tenebrio molitor* foram obtidas da empresa Nutrinsecta localizada em Betim – Minas Gerais, Brasil. Para a infecção foram utilizadas larvas de *T. molitor* com peso entre 100 e 200 mg apresentando cor clara uniforme e sem manchas escuras. Previamente a infecção as larvas foram desinfetadas com álcool 70% e o inóculo injetado na hemocele entre o segundo e terceiro segmento abdominal visível acima das pernas da larva, na porção ventral. Após a infecção, as larvas foram incubadas a 37°C durante 4 dias. Para recuperação da levedura após infecção, as larvas foram desinfetadas conforme descrito acima e aspiradas a hemolinfa com seringa estéril de 1mm. As células foram suspensas em tinta nanquim e fotografadas no microscópio Leica DM 750 durante o trabalho experimental. O tamanho da célula foi determinado pelo programa ImageJ, sendo o tamanho total da célula definido como o diâmetro da célula completa incluindo a cápsula e o tamanho da cápsula calculado como a diferença entre o diâmetro total da célula e o diâmetro do corpo celular (definido pela parede celular).

DISCUSSÃO E RESULTADOS

Uma vez que é conhecido que *C. neoformans* manifesta transições morfológicas durante infecção em mamíferos que envolvem alterações na cápsula e total tamanho da célula, propomos investigar de forma inédita e com principal interesse a resposta morfológica da levedura após a infecção no modelo invertebrado *T. molitor*. Para isso, foi realizada a fotografia das células cultivadas em meio sabouraud antes da infecção (consideradas como tempo zero) e após recuperadas das larvas de *T. molitor* após 4 dias da infecção, conforme apresentado na figura 1.

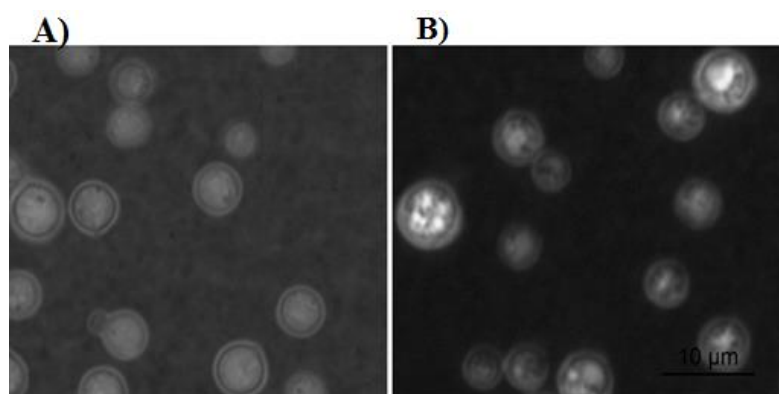


Figura1. Morfologia celular de *Cryptococcus neoformans* H99 antes e após 4 dias de infecção em *Tenebrio molitor*. A) Morfologia das células de *C. neoformans* H99 cultivadas em ágar Sabouraud por 48 horas a 35°C antes

da infecção. B) Morfologia das células de *C. neoformans* H99 recuperadas de larvas de *T. molitor* após 4 dias de infecção de 1×10^6 células/larva.

As células de *C. neoformans* H99 após passagem em *T. molitor* após 4 dias de infecção mostrou aumento no tamanho total da célula e também no tamanho do corpo celular (figura 2). O tamanho total das células (cápsula incluída) antes da infecção apresentou média de 0,3407 μm , enquanto as células após 4 dias de infecção apresentaram média de 0,4165 μm . O tamanho do corpo celular (delimitado pela parede celular) no tempo zero foi de 0,2691 μm frente a 0,3492 observados após 4 dias de infecção.

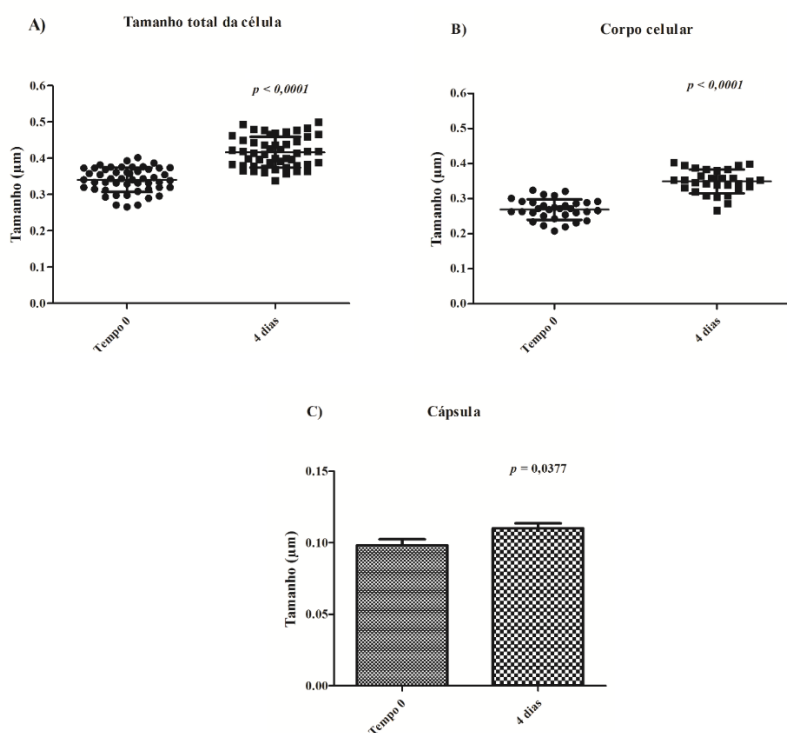


Figura 2. Distribuição de tamanho total de células cultivadas em ágar Sabouraud (Tempo zero) e recuperadas de larvas de *Tenebrio molitor* após 4 dias de inoculação com 10^4 levedura/larva de 50 células analisadas. O tamanho total da célula foi definido como o diâmetro da célula completa, incluindo a cápsula. A barra denota a média da distribuição. O tamanho total da célula e o tamanho do corpo celular apresentaram valor $p < 0,0001$, tamanho da cápsula valor $p = 0,0377$. O teste T e os gráficos de dispersão foram obtidos usando Graph Pad Prism 5. Diferença significativa foi considerada como valor de $p \leq 0,05$.

O tamanho da cápsula foi avaliado como a diferença entre o tamanho total da célula e o tamanho do corpo celular, definido pela parede celular. Também foi observada diferença significativa entre o tamanho da cápsula no tempo zero e após 4 dias de infecção, com média de 0,1012 μm para o tempo zero e 0,1101 μm para 4 dias.

Garcias-Rodas e colaboradores avaliaram a resposta morfológica das células de *C. neoformans* em lagartas no invertebrado *Galleria mellonella* e observaram aumento no tamanho do corpo celular e da cápsula durante 6 horas após infecção.

Firacative e colaboradores 2014 avaliaram alterações no tamanho da cápsula antes após infecção em *Galleria mellonella* no estudo de cepas altamente virulentas de *C. gattii* e identificaram a aumento acentuado nas células durante a infecção correlacionando com a virulência.

Em um estudo de Rossi e colaboradores (2016), células de *C. neoformans* apresentaram aumento progressivo no tamanho da cápsula e tamanho total da célula em 24, 48 e 72 horas após infecção em *G. mellonella*. Além disso, esses autores observaram que um isolado susceptível ao fluconazol foi mais virulento em *G. mellonella*,

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

É conhecido que alterações morfológicas de células de *C. neoformans* são encontradas em modelos de camundongos durante a infecção pulmonar. Entre essas alterações estão o aumento da cápsula e a formação de células gigantes, que relacionadas a persistência das leveduras no hospedeiro.

Nesse experimento observamos que mudanças morfológicas no tamanho total da célula como na cápsula das leveduras ocorrem durante a infecção no modelo invertebrado *T. molitor*.

Esses resultados corroboram para o potencial de futuros estudos do modelo *T. molitor* nos processos de patogênese da infecção criptocócica como a necessidade de investigação dos efeitos de compostos sintéticos sobre os fatores de virulência de *C. neoformans* durante a infecção *in vivo* nesse modelo invertebrado, extrapolando assim o uso de modelos mamíferos convencionais utilizados.

REFERÊNCIAS

FIRACATIVE, Carolina; DUAN, Shuyao; MEYER, Wieland. *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS One*, v. 9, n. 8, p. e105076, 2014.

GARCÍA-RODAS, Rocío et al. *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PloS one*, v. 6, n. 9, p. e24485, 2011.

HOHL, Tobias M. Overview of vertebrate animal models of fungal infection. *Journal of immunological methods*, v. 410, p. 100-112, 2014.

HU, Guanggan et al. Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection. *Molecular microbiology*, v. 69, n. 6, p. 1456-1475, 2008.

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.

NGAMSKULRUNGROJ, Popchai et al. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *MBio*, v. 3, n. 3, p. e00103-12, 2012.

TREVIJANO-CONTADOR, Nuria et al. *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. *Virulence*, v. 6, n. 1, p. 66-74, 2015.

PEREIRA, Thais Cristine et al. Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 4, p. 128, 2018.