



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiologia

VICTOR AUGUSTO TEIXEIRA LEOCÁDIO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E MECANISMO DE AÇÃO ANTIFÚNGICO DE  
DERIVADOS TIAZÓLICOS SOBRE *CRYPTOCOCCUS* SPP.**

Belo Horizonte,

2023

VICTOR AUGUSTO TEIXEIRA LEOCÁDIO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E MECANISMO DE AÇÃO ANTIFÚNGICO DE  
DERIVADOS TIAZÓLICOS SOBRE *CRYPTOCOCCUS* SPP.**

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

Orientação: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Co-orientador: Profa. Dra. Susana Johann

Belo Horizonte,

2023

043

Leocádio, Victor Augusto Teixeira.

Avaliação da atividade e mecanismo de ação antifúngico de derivados tiazólicos sobre *Cryptococcus* spp. [manuscrito] / Victor Augusto Teixeira Leocádio. – 2023.

129 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos. Co-orientador: Profa. Dra. Susana Johann.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. *Cryptococcus*. 3. Tiazóis. 4. Fatores de Transcrição. 5. Barreira Hematoencefálica. I. Santos, Daniel de Assis. II. Johann, Susana. 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 VICTOR AUGUSTO TEIXEIRA LEOCÁDIO

Nº REGISTRO: **2019751059**

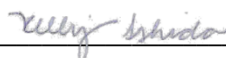
Às 14:00 horas do dia **21 de agosto de 2023**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Danielle Leticia da Silva (Pós-doutoranda do Departamento de Microbiologia/ICB /UFMG), Kelly Ishida (Departamento de Microbiologia/USP), Susana Frases Carvajal (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ), Julliana Ribeiro Alves dos Santos (Universidade de Pernambuco), Prof. Dr. Daniel de Assis Santos (Orientador) e a Profa. Dra. Susana Johann (Coorientadora), para julgar o trabalho final "**Avaliação da atividade e mecanismo de ação antifúngico de derivadostiazólicos sobre *Cryptococcus* spp.**" do aluno **Victor Augusto Teixeira Leocádio**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Daniel de Assis Santos, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato 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.

Membros da Banca:

 DANIELLE LETICIA DA SILVA  
Data: 17/10/2023 15:56:10-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Dra. Danielle Leticia da Silva



---

Profa. Dra. Kelly Ishida

 Documento assinado digitalmente  
SUSANA FRASES CARVAJAL  
Data: 18/10/2023 06:24:48-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Susana Frases Carvajal

Profa. Dra. Julliana Ribeiro Alves dos Santos

De acordo:



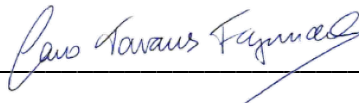
---

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos  
(Orientador)



---

Profa. Dra. Susana Johann  
(Coorientadora)



---

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes  
(Subcoordenador do Programa de Pós-graduação em Microbiologia)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, aos meus pais, Lili e Cacau, por terem me dado todo o alicerce para eu ser quem sou hoje. Também ao Gui, vó, Julie, Pretinho, Mimi, Gatinha-nova-sem-nome e todos da minha família por terem sempre acreditado em mim, terem me dado apoio se esforçado ao máximo para os tornarem reais. Amo vocês!

Ao professor Daniel, pela orientação, pela confiança depositada em mim, pela paciência, pelos conselhos e, sobretudo, pela amizade no decorrer destes 4 anos de orientação. Muito obrigado por tudo!

Agradeço também aos professores Susana, Nalu, José Eduardo, Renata, Cidinha e Ary pela colaboração imprescindível para a realização deste trabalho.

Agradeço à Marcela, por todo companheirismo desde antes do início deste trabalho, pela paciência, pelo apoio, por me aguentar sempre que necessário e por enfrentar de mãos dadas comigo os obstáculos desta vida. Obrigado por ser tanto pra mim. Te amo muito!

Agradeço também a todos que ainda estão ou que já passaram pelo LabMic nestes 4 anos que participei dele, me ajudando desde o meu começo até o final, Bela, Martha, Geise, Queila, Guga, Vanessa, Tamires, Lívia, Júlio, Bia, Lud, Junya, Júlia, Victoria, Bruna, Dani, Silvinha, Elúzia, Paulo, Bárbara, Marli e João Carlos.

Aos amigos da graduação, mestrado e doutorado, com quem pude aliviar um pouco do peso que é tudo isso. Em especial à Silvinha, Flávia e Débora, por me aguentarem até hoje.

Às instituições financiadoras, CNPq, CAPES e FAPEMIG, por fornecerem as bases para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A criptococose é uma micose invasiva distribuída por todo o mundo. Ela é causada principalmente por duas espécies de leveduras encapsuladas: *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. *C. neoformans* é adquirido principalmente no contato com fezes de aves (principalmente de pombos), inalando o fungo. Já *C. gattii* é mais comumente associado a árvores, como eucalipto e amendoeira. A infecção com a maior importância causada por estas espécies é a meningite criptocócica, em que o fungo atravessa a barreira hematoencefálica e causa infecções no sistema nervoso central. Atualmente, o tratamento para criptococose é feito a base de anfotericina B juntamente com a flucitosina e o fluconazol, mas para casos de meningite esse tratamento é mais complexo e com uma menor efetividade. Tendo em vista o limitado número de drogas para o tratamento desta meningite e sua expressiva importância clínica, a busca por novos derivados tiazóis com atividade contra *Cryptococcus* é o objetivo aqui proposto. Inicialmente foi determinada a concentração inibitória mínima frente a diversas linhagens de *C. gattii* e de *C. neoformans* e a toxicidade para a célula de trabalho, hCMEC/D3, uma linhagem originada de microvasos cerebrais. Seguindo, uma análise da curva de crescimento da levedura em contato com as drogas revelou-se a ação fungicida das mesmas. Em sequência, realizamos uma análise químico-genética com uma coleção de 322 linhagens de *C. neoformans* mutantes para diferentes fatores de transcrição para uma triagem inicial de possíveis genes importantes na ação destes derivados. Verificamos que linhagens mais tolerantes aos derivados apresentavam deleção de genes relacionados à adaptação a estresses e resistência a metais pesados e estresse do retículo endoplasmático. Com estes dados, avaliamos a influência causada pelos derivados em linhagens com exposição prévia a eles na produção de melanina e ergosterol além de diversos fatores de estresse celular. Esta exposição diminuiu a produção de ergosterol e melanina, além de promover uma maior tolerância a estressores osmóticos e de membrana celular. Posteriormente, ensaios de transmigração celular em modelo de barreira hematoencefálica revelaram que os derivados diminuíram a capacidade de *C. neoformans* em atravessar esta barreira. Por fim, ensaios *in vivo* em modelo murino mostraram uma extensão na sobrevivência dos animais com criptococose, além de uma diminuição da carga fúngica no cérebro e pulmão. Com tudo isso, concluímos, inicialmente, que os derivados aqui trabalhados são ótimos candidatos a terapia da meningite criptocócica e pulmonar.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus*, tiazol, fatores de transcrição, barreira hemato-encefálica.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is an invasive mycosis distributed throughout the world. It is mainly caused by two species of encapsulated yeast: *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *C. neoformans* is acquired mainly through contact with bird feces (mainly pigeons), inhaling the fungus. *C. gattii* is more commonly associated with trees, such as eucalyptus and almond trees. The most important infection caused by these species is cryptococcal meningitis, in which the fungus crosses the blood-brain barrier and causes infections in the central nervous system. Currently, the treatment for cryptococcosis is based on amphotericin B together with flucytosine and fluconazole, but for cases of meningitis this treatment is more complex and less effective. Considering the limited number of drugs for the treatment of this meningitis and its significant clinical importance, the search for new thiazole derivatives with activity against *Cryptococcus* is the objective proposed here. Initially, the minimum inhibitory concentration was determined against several strains of *C. gattii* and *C. neoformans* and the toxicity for the working cell, hCMEC/D3, a strain originating from cerebral microvessels. Next, an analysis of the growth curve of the yeast in contact with the drugs revealed their fungicidal action. Next, we performed a chemical-genetic analysis with a collection of 322 strains of *C. neoformans* mutants for different transcription factors for an initial screening of possible genes important in the action of these derivatives. We found that strains more tolerant to derivatives had deletions of genes related to adaptation to stress and resistance to heavy metals and endoplasmic reticulum stress. With these data, we evaluated the influence caused by derivatives in strains with previous exposure to them on the production of melanin and ergosterol in addition to various cellular stress factors. This exposure decreased the production of ergosterol and melanin, in addition to promoting greater tolerance to osmotic and cell membrane stressors. Subsequently, cell transmigration assays in a blood-brain barrier model revealed that the derivatives decreased the ability of *C. neoformans* to cross this barrier. Finally, in vivo tests in a murine model showed an extension in the survival of animals with cryptococcosis, in addition to a decrease in the fungal load in the brain and lung. With all this, we concluded, initially, that the derivatives worked here are excellent candidates for therapy of cryptococcal and pulmonary meningitis.

**Key words:** *Cryptococcus*, thiazole, transwell.



## LISTA DE ABREVIACOES:

5-FC (Fluocitosina)

AH (Ácido hialurônico)

AIDS (*Acquired immunodeficiency syndrome* - síndrome da imunodeficiência adquirida)

AmBd (Anfotericina B)

BHE (Barreira hematoencefálica)

CFU (*Colony forming units* – unidades formadoras de colônias)

CFU/mL (*Colony forming units* - unidades formadoras de colônias por mililitro)

cm<sup>2</sup> (Centímetro quadrado)

DMSO (Dimetilsulfóxido)

DO (Densidade ótica)

g/mL (Grama por mililitro)

GalXM (Galactoxilomanana)

GXM (Glicuronoxilomanana)

HBMEC (human brain microvascular endothelial cell – célula endotelial microvascular do cérebro humano)

HIV (*Human immunodeficiency viruses* – vírus da imunodeficiência humana)

IFN-γ (Interferon gama)

IL-2 (Interleucina 2)

IL-4 (Interleucina 4)

MIC (*minimum inhibitory concentration* – concentração mínima inibitória)

mM (Milimolar)

MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium])

°C (Graus Celsius)

PBS (*Phosphate-buffered saline* - tampão fosfato-salino)

PCR (*Polymerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase)

pH (Potencial Hidrogeniônico)

RPM (Rotações por minuto)

SDRA (Síndrome do desconforto respiratório agudo)

SFB (Soro fetal bovino)

SNC (Sistema nervoso central)

TCD4+ (*T cell, cluster of differentiation 4* – célula T de tipo de diferenciação 4)

TNF (*Tumor necrosis fator* – fator de necrose tumoral)

U/mL (Unidade por mililitro)

μL (Microlitro)

UV (Ultravioleta)

## Lista de figuras e tabelas

- Figura 1:** Fluxograma da divisão clássica do complexo formado pelas leveduras *C. neoformans/gatti* (Kwon-Chung et al., 2014). .....16
- Figura 2:** Gráfico da porcentagem de distribuição dos subtipos de *Cryptococcus* em amostras isoladas de casos clínicos. VNI ao VNIV: *C. neoformans*; VGI ao VGIV: *C. gattii*. Adaptado de Meyer et al., 2011. ....17
- Figura 3:** Estrutura das células do gênero *Cryptococcus*. .....18
- Figura 4:** Representação esquemática dos nichos das espécies de *Cryptococcus* na natureza, percurso da levedura no homem e progressão da doença (Adaptado de Mitchell et al., 2011). .....20
- Figura 5:** Imagens de lesões provocadas pela criptococose. ....24
- Figura 6:** Modelo esquemático dos três mecanismos que os *Cryptococcus* utilizam para transpor a barreira hematoencefálica. ....25
- Figura 7:** A) Representação esquemática do funcionamento de um transwell (Adaptado de Santiago-Tirado, 2017). B) Célula hCMEC/D3 em cultivo celular de monocamada (Merck). .....27
- Figura 8:** Fórmula estrutural básica de um composto tiazol. (NIH, PubChem, 2022)31
- Figura 9:** Estrutura química básica dos 30 derivados tiazólicos utilizados neste trabalho. ....36
- Figura 10.** Esquema do protocolo experimental do teste de combinação. As setas (vertical e horizontal) indicam o aumento da concentração de cada agente individualmente e a seta em diagonal indica o aumento da concentração do antifúngico e composto em combinação. ....43
- Figura 11:** Gráfico de sobrevivência de *Tenebrio molitor* infectados com  $1 \times 10^5$  células de *Cryptococcus neoformans* H99 e tratados após 24 horas com os derivados tiazólicos. ....56

- Figura 12:** Gráficos da curva de crescimento em meio RPMI para as linhagens *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 frente ao tratamento com os derivados de tiazol em concentrações inibitórias (CIM) e subinibitórias (CIM/2) por um período de 72 horas. Valores gerados em leitura na absorvância de 600 nm. ....58
- Figura 13:** Análise de ontologia genética para mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RN86. Termos de ontologia genética (GO) para a análise de funções moleculares (em preto) e processos biológicos (em cinza) com valores de *p* estatisticamente significativos. ....60
- Figura 14:** Análise de ontologia genética para mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RN88. Termos de ontologia genética (GO) para a análise de funções moleculares (em preto) e processos biológicos (em cinza) com valores de *p* estatisticamente significativos. ....62
- Figura 15:** Análise de ontologia genética para mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RJ37. Termos de ontologia genética (GO) para a análise de funções moleculares (em preto) e processos biológicos (em cinza) com valores de *p* estatisticamente significativos. ....64
- Figura 16:** Análise de ontologia genética para mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RVJ42. Termos de ontologia genética (GO) para a análise de funções moleculares (em preto) e processos biológicos (em cinza) com valores de *p* estatisticamente significativos. ....66
- Figura 17:** Crescimento de linhagens de *C. neoformans* H99 sob estresse osmótico após exposição aos derivados tiazólicos com plaqueamento em diluição seriada de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^2$  células. ....67
- Figura 18:** Crescimento de linhagens de *C. neoformans* H99 sob estresse de membrana e parede celular após exposição aos derivados tiazólicos com plaqueamento em diluição seriada de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^2$  células. ....68
- Figura 19:** Crescimento de linhagens de *C. neoformans* H99 sob estresse de parede celular e produção de melanina após exposição aos derivados tiazólicos com plaqueamento em diluição seriada de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^2$  células. ....68

<b>Figura 20:</b> Gráficos da interação entre diferentes concentrações dos derivados tiazólicos e o fluconazol. ....	69
<b>Figura 21:</b> Gráficos da interação entre diferentes concentrações dos derivados tiazólicos e a anfotericina B.....	70
<b>Figura 22:</b> Gráfico da produção de ergosterol para as linhagens <i>C. neoformans</i> H99 e <i>C. gattii</i> R265 após tratamento com concentrações subinibitórias de fluconazol e dos derivados tiazólicos. ....	71
<b>Figura 23:</b> Carga fúngica obtida após ensaio de transcitose com a linhagem celular hCMEC/D3 e uso das linhagens <i>C. neoformans</i> H99 e <i>C. gattii</i> R265.....	73
<b>Figura 24:</b> Gráfico da carga fúngica obtida após ensaio de transcitose da linhagem <i>C. neoformans</i> H99 na linhagem celular hCMEC/D3 juntamente dos derivados RN86, RN88, RJ37 e RVJ42.....	73
<b>Figura 25:</b> Cromatograma gerado na análise dos compostos RN86 e RN88 a 20 µg/mL nas condições otimizadas do método cromatográfico.....	74
<b>Figura 26:</b> Cromatograma gerado na análise dos compostos RJ37 e RVJ42 a 20 µg/mL nas condições otimizadas do método cromatográfico.....	75
<b>Figura 27:</b> Cromatogramas de amostras biológicas após o contato de 24 horas com uma monocamada de hCMEC/D3 em sistema de <i>transwell</i> . ....	77
<b>Figura 28:</b> Curva de sobrevivência em modelo murino C57BL/6 após infecção intratraqueal com $1 \times 10^5$ partículas de <i>C. neoformans</i> H99 e tratamento com anfotericina B ou tiazóis. ....	79
<b>Figura 29:</b> Avaliação da carga fúngica obtida no cérebro após 5 dias de infecção intracranial com $1 \times 10^3$ células de <i>C. neoformans</i> H99 e tratamento diário com anfotericina B ou os derivados tiazólicos. ....	80
<b>Figura 30:</b> Avaliação da carga fúngica no cérebro e pulmão após 10 dias de infecção intratraqueal com $1 \times 10^5$ células de <i>C. neoformans</i> H99 e tratamento diário com anfotericina B ou derivados tiazólicos. ....	81

**.Figura 31:** Sumário dos resultados obtidos neste trabalho. A coloração vermelha indica uma alta eficiência para o resultado obtido no experimento listado para cada um dos compostos, enquanto que a azul indica um baixo valor de eficiência. ....82

**Tabela 1** – Parâmetros cromatográficos do método bioanalítico por CLAE/DAE desenvolvido para quantificar RJ37 e RVJ42 (Protocolo 1) e RN86 e RN88 (Protocolo 2) em tampão Hanks.....47

**Tabela 2:** Concentração inibitória mínima dos 30 compostos iniciais do estudo obtidas frente às linhagens *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265.....52

**Tabela 3:** Concentração inibitória mínima de 4 diferentes tiazóis e anfotericina B frente a 11 linhagens de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. ....53

**Tabela 4:** Valores de 50% de índice de citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) na linhagem celular hCMEC/D3 para 13 derivados tiazólicos.....54

**Tabela 5:** Índice de seletividade das 11 substâncias testadas e do fluconazol. ...55

**Tabela 6:** Tabela com mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RN86, genes deletados e produtos gênicos correspondentes. ....59

**Tabela 7:** Tabela com mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RN88, genes deletados e produtos gênicos correspondentes. ....61

**Tabela 8:** Tabela com mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RVJ37, genes deletados e produtos gênicos correspondentes.....63

**Tabela 9:** Tabela com mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RJ42, genes deletados e produtos gênicos correspondentes.....65

**Tabela 10:** Relações de concentrações adicionadas no sistema de transwell na parte apical e depois obtidas na parte basolateral na análise através de cromatografia.....76

## Sumário

1. Introdução .....	15
1.1 <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	15
1.1.1 Distribuição molecular .....	16
1.1.2 Estrutura e patogênese .....	18
1.2. Epidemiologia.....	21
1.3 Manifestações clínicas e colonização do SNC.....	23
1.4 Tratamento .....	28
1.5 Derivados tiazólicos .....	30
2. Justificativa.....	32
3. Objetivos .....	34
3.1 Objetivo geral .....	34
3.2 Objetivos específicos .....	34
4. Metodologia.....	35
4.1 Desenho experimental.....	35
4.2 Micro-organismos.....	35
4.3 Substâncias experimentais.....	36
4.4 Determinação da concentração mínima inibitória.....	37
4.5 Cultivo celular e ensaio de viabilidade e seletividade.....	38
4.5.1 Toxicidade <i>in vivo</i> em modelo invertebrado .....	40
4.6 Curva de crescimento.....	40
4.7 Triagem químico-genética .....	41
4.8 Quantificação do ergosterol.....	42
4.9 Ensaio de interação entre tiazólicos e antifúngicos clínicos.....	43
4.10 Ensaio de <i>spot</i> em diferentes estressores celulares .....	44
4.11 Avaliação da produção de melanina .....	44
4.12 Transmigração celular .....	45

4.12.1 Ensaio de transcitose em modelo de BHE .....	45
4.12.2 Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos por CLAE/DAD para quantificação de tiazóis .....	46
4.12.3 Estudo de permeabilidade <i>in vitro</i> em hCMEC/D3 .....	48
4.13 Ensaio <i>in vivo</i> em modelo murino.....	49
4.13.1 Avaliação da sobrevivência em modelo murino de infecção por <i>C. neoformans</i> .....	49
4.13.2 Avaliação da carga fúngica no cérebro e pulmão .....	50
4.14 Análise estatística .....	51
5. Resultados .....	52
5.1 Determinação da concentração inibitória mínima.....	52
5.1.1 Determinação da concentração fungicida mínima .....	54
5.2 Ensaio de viabilidade celular em HCMEC .....	54
5.2.1 Índice de seletividade.....	55
5.2.2 Toxicidade em modelo de animal invertebrado .....	55
5.2 Curva de crescimento.....	56
5.3 Triagem químico-genética .....	58
5.4 Avaliação do crescimento de linhagens de H99 previamente expostas aos derivados tiazólicos sob o efeito de diversos estresses.....	66
5.5 Sinergismo entre os derivados tiazólicos e anfotericina B ou fluconazol ...	69
5.6 Quantificação do ergosterol.....	71
5.7 Ensaio de transcitose .....	72
5.7.1 Avaliação da capacidade de transcitose das linhagens H99 e R26572 .....	72
5.7.2 Ensaio de transcitose utilizando os derivados.....	73
5.7.3 Quantificação dos derivados em amostras biológicas .....	74
5.8 Ensaio <i>in vivo</i> .....	78
5.8.1 Sobrevivência em modelo murino .....	78
5.8.2 Carga fúngica em modelo de infecção intracraniana .....	79



5.8.3 Carga fúngica em modelo de infecção intratraqueal .....	80
5.9 Síntese de resultados .....	81
6. Discussão .....	83
7. Conclusão .....	88
8. Referências .....	89
9. Artigos publicados em colaboração durante o doutorado .....	107
10. Material suplementar .....	108

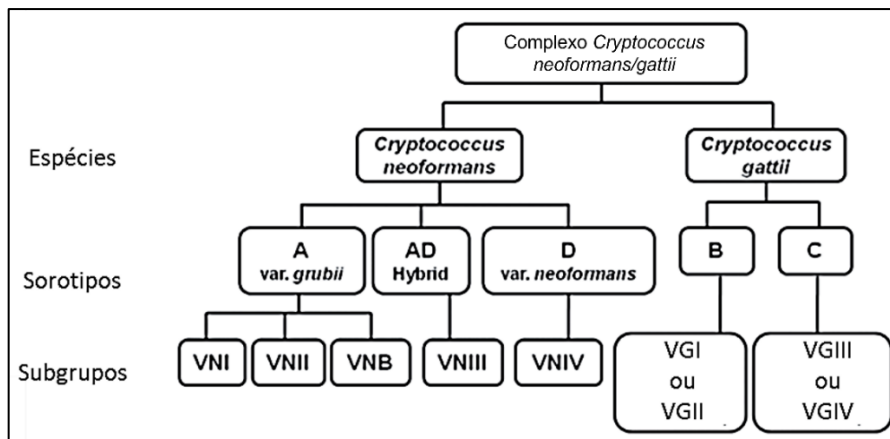
## 1. Introdução

### 1.1 *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*

*Cryptococcus* é um gênero de fungos ubíquos inserido dentro do filo Basidiomycota, classe Tremellomycetes, ordem Tremellales e família Tremellaceae (Taxonomy Browser/NCBI) e possui mais de 30 espécies distribuídas no meio ambiente, sendo encontradas em uma grande variedade de lugares como na Antártida (Vishniac et al., 1992) ou mesmo em ambientes extremos com altas concentrações de metano no fundo do oceano (Takishita et al., 2010). Dentre as espécies atualmente conhecidas, duas possuem grande relevância clínica em seres humanos, *C. neoformans* e *C. gattii*. (Maziarz et al., 2016).

É sabido que *C. neoformans* é causador de doenças tanto em hospedeiros imunocompetentes como em imunocomprometidos, como em pessoas vivendo com AIDS ou recém-transplantadas (Mirza et al., 2003; Singh et al., 2008). Já *C. gattii* é associado principalmente como um patógeno de hospedeiros imunocompetentes em regiões endêmicas ao redor do mundo, como Austrália e Oceania (Chen et al., 2000), a região de Vancouver (Hoang et al., 2004) e África do Sul (McCarthy et al., 2006).

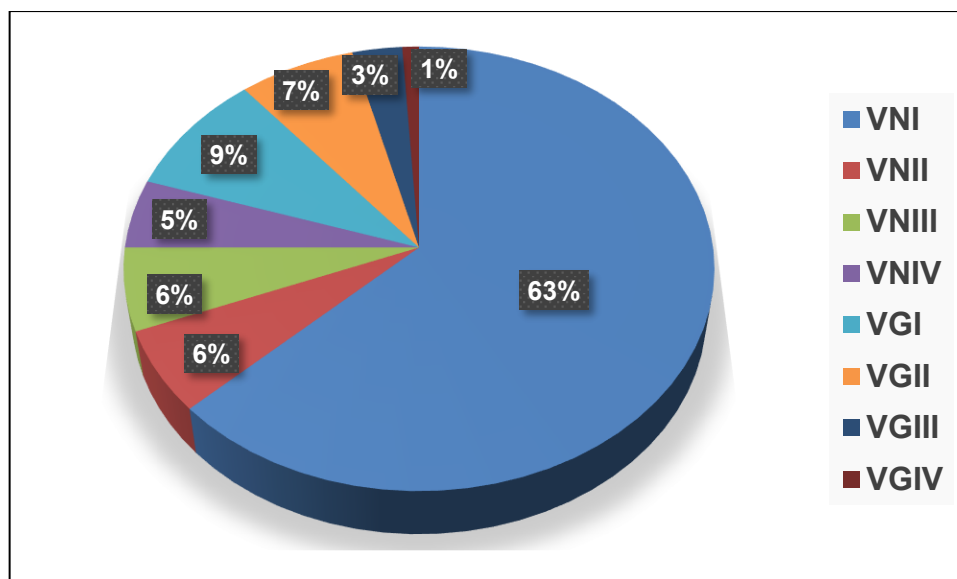
A classificação taxonômica é motivo de muito debate desde quando o conhecimento genético e bioquímico se tornou mais extenso, tendo sido diversos sistemas de classificação propostos em um curto período de tempo (Kwon-Chung & Varma, 2006; Bovers et al., 2008; Ngamskulrungraj et al., 2009). A divisão clássica para o complexo formado pelas duas leveduras é dividida em duas espécies, 5 sorotipos baseados nas diferentes estruturas da capsula polissacarídica e nas respostas antigênicas causadas por ela e em 8 tipos moleculares definidos por diversidade filogenética (Kwon-Chung et al., 2002) (Figura 1). Entretanto, em 2015, Hagen e colaboradores propuseram uma nova e polêmica divisão, na qual as linhagens mais distintas entre si dariam origem a novas espécies. Sendo assim, as duas espécies seriam substituídas por sete, *C. neoformans* seria dividido em duas espécies (*C. neoformans* e *C. deneoformans*) e *C. gattii* em cinco novas espécies (*C. gattii*, *C. deuterogattii*, *C. bacillisporus*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*).



**Figura 1:** Fluxograma da divisão clássica do complexo formado pelas leveduras *C. neoformans/gattii* (Kwon-Chung et al., 2014).

### 1.1.1 Distribuição molecular

Em 2011, Meyer realizou uma revisão que agrupou diversos estudos que utilizaram, ao todo, 2.046 amostras clínicas e 68 amostras de origem animal de cepas de *Cryptococcus* vindas de 48 países. A distribuição global destes tipos e sorotipos mostra uma grande prevalência da espécie *C. neoformans* tipo VNI (sorotipo A), sendo observada em cerca de 63% dos isolados clínicos (Figura 2) e veterinários e 41% dos isolados de origem ambiental. Ao se comparar a distribuição das espécies nas infecções humanas, observa-se que infecções causadas por *C. gattii* são bem menos frequentes do que as causadas por *C. neoformans*, com uma proporção de 20% contra 80%, respectivamente. Nos isolados de origem ambiental, *C. gattii* e *C. neoformans* se apresentam quase que em igualdade, com uma proporção de 52% e 48%, respectivamente.



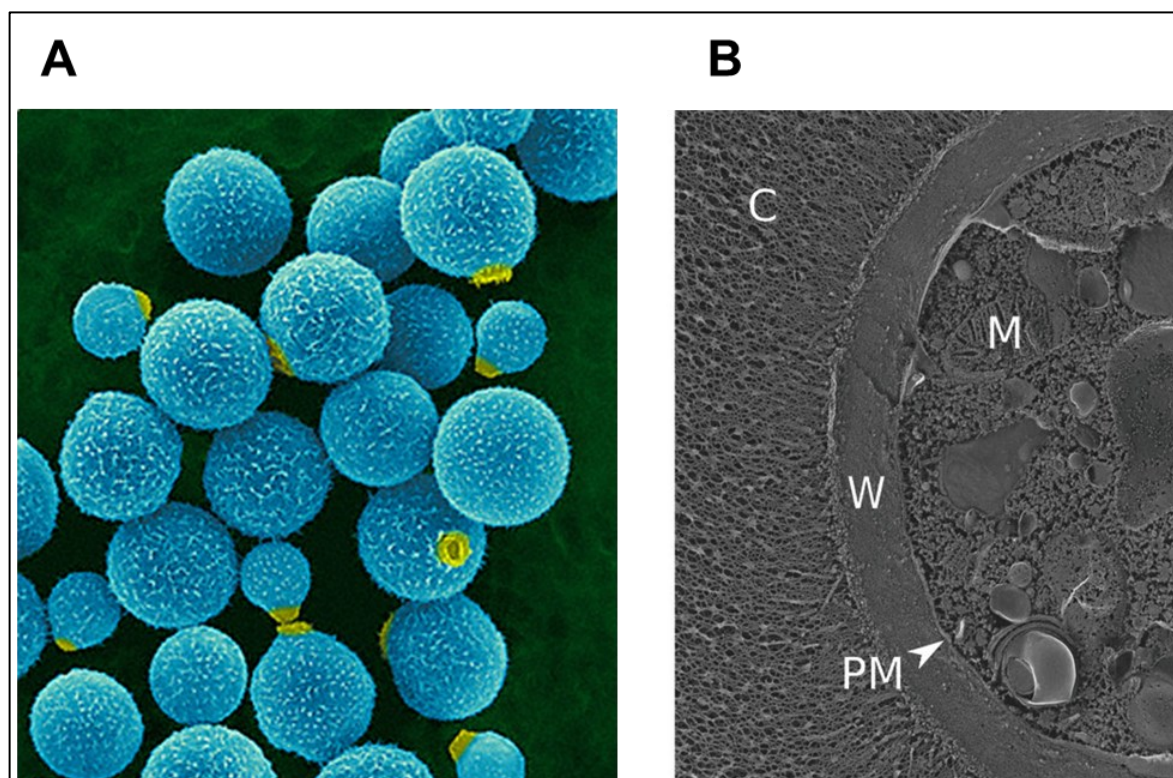
**Figura 2:** Gráfico da porcentagem de distribuição dos subtipos de *Cryptococcus* em amostras isoladas de casos clínicos. VNI ao VNIV: *C. neoformans*; VGI ao VGIV: *C. gattii*. Adaptado de Meyer et al., 2011.

A distribuição geográfica de *C. neoformans*, VNI, VNII e VNIII são observadas mundialmente; VNIV apresenta uma distribuição mais concentrada na Europa e África do Sul. Sobre a distribuição do *C. gattii*, do VGI ao VGIV é observada uma concentração em áreas tropicais, subtropicais e temperadas (Meyer et al., 2011). No Brasil, cerca de 62% dos isolados de *C. neoformans* são do tipo VNI e em *C. gattii* 30% do tipo VGII. Em casos clínicos, essa proporção também é observada, sendo 66% e 25% respectivamente para VNI e VGII (Firacative et al, 2018).

Quanto a infecções em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos, a maioria novamente se dá pelo *C. neoformans* tipo VNI (sorotipo A). Dentro da tipagem de *C. neoformans*, todos os tipos causam mais infecções em imunocomprometidos do que em imunocompetentes e o oposto é observado para o *C. gattii*, onde os tipos causam mais infecções em hospedeiros imunocompetentes (Meyer et al., 2011).

### 1.1.2 Estrutura e patogênese

As espécies do gênero *Cryptococcus* são leveduras esféricas ou ovaladas e compostas por três camadas em sua estrutura: mais externamente a capsula polisacarídica, a membrana plasmática mais internamente e a parede celular entre elas (Figura 3).



**Figura 3:** Estrutura das células do gênero *Cryptococcus*. (A): Microscopia eletrônica de varredura colorida artificialmente de uma colônia de leveduras (Fonte: Dennis Kunkel Microscopy Inc.). (B): Micrografia eletrônica de transmissão de *Cryptococcus neoformans*. C: capsula; W: parede celular; PM: membrana plasmática; M: mitocôndria. (Fonte: Augustinho et al., 2018)

O polímero mais comumente encontrado (90%) na capsula polisacarídica é o glicuronoxilomanana (GXM), formado por ácido glicurônico, xilose e manose (Bhattacharjee et al., 1984). Além deste, também é encontrado em pequena quantidade o galactoxilomanana (GalXM), composto de galactose, xilose e manose. A estrutura das capsulas polissacarídicas pode variar entre os diferentes sorotipos e também entre os isolados de um mesmo sorotipo (Turner et al., 1992). Além dos

polissacídeos, também é observada a presença de manoproteínas na capsula de *Cryptococcus* (Cherniak et al., 1994). Estas agem como fortes moduladores imunes, induzindo grande quantidade de IL-2 por células TCD4+ e são observadas na superfície da capsula (Levitz et al., 2001).

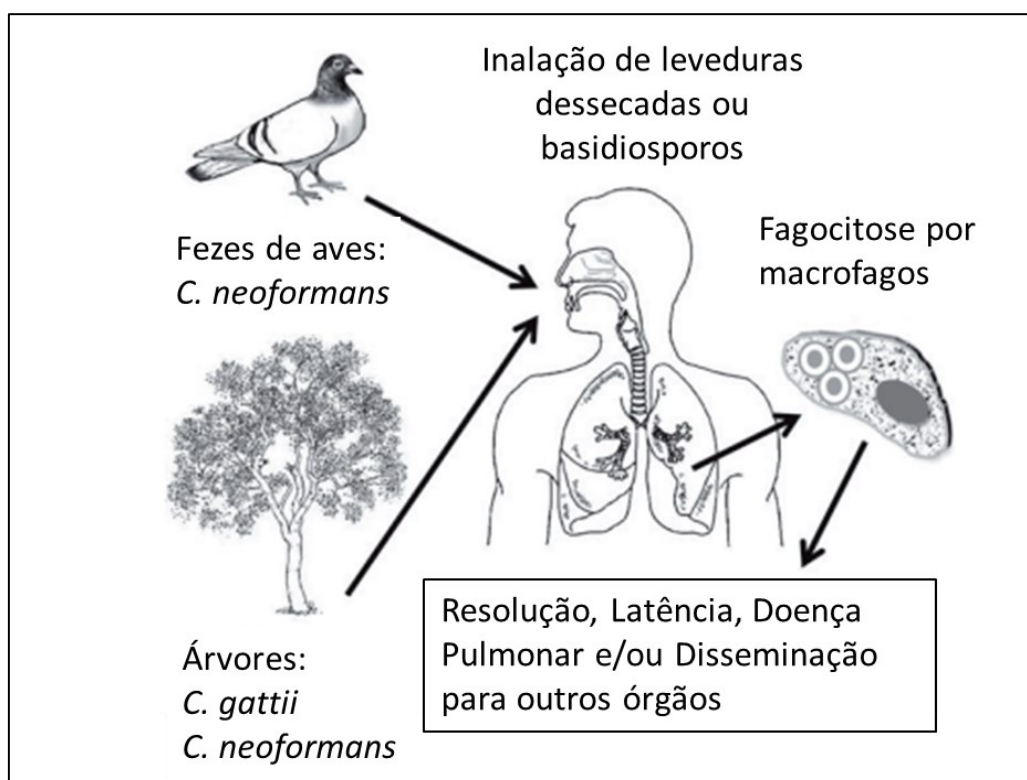
Já na parede celular, é observada a presença da melanina (Staib et al., 1962). Esta se apresenta como uma molécula escura, insolúvel em água ou solvente orgânico e resistente a agentes oxidantes, além de conferir uma aparência escura à levedura quando cultivada. No meio ambiente, a melanina ajuda a levedura a se proteger em condições de estresse, como degradação enzimática (Rosas et al., 2001), radiação UV, e até mesmo a temperatura (Rosas et al., 1997).

A melanina, além de ajudar em condições diversas, atua também como um importante fator de virulência, ajuda o fungo na resposta imune do hospedeiro (Casadevall et al., 2000) e também proporciona uma inibição à fagocitose (Martinez et al., 2006; de Souza et al., 2022). Além de conferir, também, uma resistência a agentes oxidantes (Jacobson et al., 1991; Jacobson et al., 1993). Assim como a capsula, a melanina também pode atuar como um modulador da imunidade, sendo associado a grandes níveis de expressão de IL-4 em locais apresentando infecções por *C. neoformans*, ajudando na patogenicidade de *Cryptococcus* (Mednick et al., 2005). Também já foi observado que a melanina possui a habilidade de se ligar em componentes do sistema do complemento, dificultando a fagocitose do fungo (Rosas et al., 2002).

Além de promover benefícios na patogênese, a melanina também pode beneficiar a levedura contra a ação de antifúngicos. Já foi observado que a melanina consegue se adsorver a certos peptídeos com ação microbida e de mesmo modo os antifúngicos anfotericina B e caspofungina, diminuindo suas ações nocivas contra as leveduras (Van Duin et al., 2002).

Normalmente, uma infecção por *Cryptococcus* spp. se inicia com o hospedeiro inalando basidiósporos ou leveduras dessecadas do ambiente e estas, devido ao seu pequeno tamanho (de 1 a 4  $\mu\text{m}$ ), se depositam rapidamente no alvéolo pulmonar, onde são reconhecidas por macrófagos (Gibson et al., 2015) (Figura 4). Esse processo pode levar a três fins: a resolução da doença, uma

infecção latente ou então uma disseminação no corpo, podendo provocar uma inflamação no sistema nervoso central (SNC) (Mitchell et al., 2011). Já foi observado que crianças em grandes centros urbanos apresentam reatividade sorológica, mostrando que a primeira infecção muitas vezes se mantém assintomática até sua resolução (Goldman et al., 2001).



**Figura 4:** Representação esquemática dos nichos das espécies de *Cryptococcus* na natureza, percurso da levedura no homem e progressão da doença (Adaptado de Mitchell et al., 2011).

Após a deposição alveolar do fungo, ou ele é combatido pelo sistema imune e ocorre o *clearance* ou prossegue seu curso. A resposta imune do hospedeiro pode provocar uma inflamação granulomatosa devido a altas expressões de TNF, IFN- $\gamma$  e IL-2 (Perfect et al., 2005). A infecção pode se tornar latente em linfonodos ou nos próprios granulomas pulmonares causados por ele e permanecer assintomática por anos. Após uma queda na imunidade, esta infecção pode sair da latência e voltar a se desenvolver (Sun et al., 2010).

Alguns dos fatores de virulência das espécies *Cryptococcus* incluem sua cápsula e a presença da melanina na parede celular além de sua termotolerância (Perfect et al., 2005). A cápsula confere proteção contra dessecação no meio ambiente, fagocitose e estresse oxidativo, além de conferir uma supressão do sistema imune (Zaragoza et al., 2008; Prates et al., 2013). A superexpressão do gene CAS1 (associado com a formação da capsula) foi associada a hipervirulência em modelo murino (Moyrand et al., 2004). A melanina apresenta funções de proteção do fungo a estresse oxidativo. A tolerância ao crescimento a 37 °C é uma característica observada em diferentes fungos que causam doenças em mamíferos. Já foi observado que, em leveduras crescendo a 37 °C, a taxa de crescimento era maior, além de uma maior produção de melanina e um aumento do tamanho da capsula (Ngamskulrungraj et al., 2011).

## 1.2. Epidemiologia

Estima-se cerca de 200 mil casos de criptococose por ano, além de um total de quase 150 mil mortes, (Rajasingham et al., 2022). A forma fatal mais comumente observada da doença é a meningite criptococócica como doença oportunista em indivíduos imunocomprometidos vivendo com HIV (Sloan et al., 2014), mas o número de mortes vem caindo consideravelmente após a implementação da terapia antirretroviral moderna (Hevey et al., 2019). A maioria dos casos de criptococose acontece em indivíduos imunocomprometidos, mas a imunocompetência, no entanto, não garante proteção à doença. Os homens são mais acometidos do que as mulheres e a doença quase não é observada em crianças (Abadi et al., 1999; Othman et al., 2004). Além de humanos, a doença também já foi observada em animais como cães e gatos (O'Brien et al., 1981).

*C. neoformans* pode ser encontrado tanto em diferentes espécies de árvores quanto em aves, especialmente pombos (Emmons et al., 1955; McDonough et al., 1966). O fato de o fungo apresentar os pombos como reservatórios contribui bastante para a incidência da criptococose em grandes cidades, sendo notado a proximidade de casos clínicos com locais de grande incidência destas aves (Currie et al., 1994; Delgado et al., 2005).



*C. gattii* apresenta uma ecologia e distribuição geográfica diferente do *C. neoformans*. Até hoje, este fungo só foi isolado em árvores, não apresentando um reservatório animal. Sua afinidade se dá por diferentes espécies de árvores de diferentes localizações, apresentando uma maior associação a eucaliptos, amendoeirias. Até o início do milênio, a espécie *C. gattii* só era encontrado em regiões tropicais, como América do Sul e Central, Ásia, África e Oceania. No entanto, a partir de 2004 passou a ser encontrado no sudoeste do Canadá (Kidd et al., 2004) e também no noroeste dos EUA (Dixit et al., 2009).

A incidência de criptococose começou a crescer bastante em meados da década de 80 em decorrência do aumento do número de pessoas imunodeficientes, como pessoas com a AIDS, além de um maior número de pessoas transplantadas ou passando por algum tratamento que debilita o sistema imune (Hajjeh et al., 1999). A maior incidência de criptococose/HIV é observada na África subsaariana, onde, no ano de 2017, era observado mais de 70% da incidência global dos casos (Rajasingham et al., 2017). Conseqüentemente, esta região apresenta a maior incidência de criptococose e de mortalidade (Park et al., 2009).

A maior incidência de *C. gattii* acontece na Austrália e Papua Nova Guiné, Sudeste Asiático, Sudoeste do Canadá e Noroeste dos EUA e alguns países da América do Sul, como Brasil e Colômbia. Já a incidência de *C. neoformans* apresenta uma distribuição mais consistente e global, sendo encontrada em praticamente quase todos os países (Kwon-Chung et al., 2011).

Em 2017, estimou-se cerca de 220.000 casos de meningite criptocócica em pacientes que vivem com HIV, sendo que mais de 70% destes são encontrados na África subsaariana e 20% na Ásia e Pacífico. Na América do Sul, estima-se cerca de 5.000 novos casos anuais, com o Brasil apresentando uma alta incidência, com cerca de 1.000 a 2.500 casos (Rajasingham et al., 2017). E essa alta incidência vem acompanhada de uma alta mortalidade de 0,47 por milhão de habitantes, a 13ª causa de morte em 2015 (Soares et al., 2015).

No Brasil, a criptococose é a micose sistêmica que registra o maior número de mortes em pacientes HIV-positivos (Firacative et al., 2018). A criptococose entrou na Lista Nacional de Notificação Compulsória em fevereiro de 2020 (PORTARIA Nº

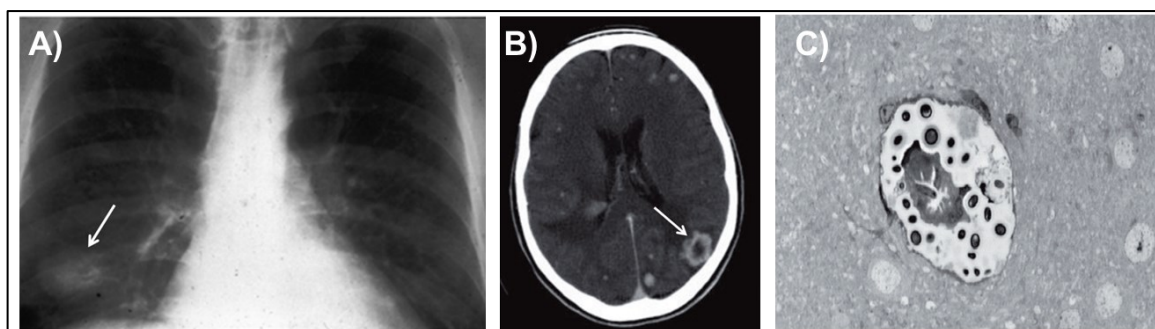
264, de 17 de fevereiro de 2020), mas a mesma foi revogada poucos meses depois (PORTARIA Nº 1.061, de 18 de maio de 2020. Em um boletim epidemiológico do Ministério da Saúde emitido no ano de 2012, um compilado de dados sobre internação devida a criptococose foi feito entre o período de 2000 a 2007, apresentando uma média de 550 internações anuais em decorrência do desenvolvimento da doença (Vigilância e Epidemiológica Da Criptococose, 2012).

### 1.3 Manifestações clínicas e colonização do SNC

O SNC e os pulmões são os órgãos mais afetados pelas infecções criptocócicas. Ocasionalmente, *Cryptococcus* pode causar infecções em lugares menos frequentes, como na pele, próstata, olhos, ossos e articulações (Maziarz et al., 2016).

A infecção no pulmão pode se manifestar como uma colonização assintomática ou como um nódulo não-calcificado e infiltrações pulmonares (Figura 5) (Brizendine et al., 2011). Em indivíduos imunocomprometidos, o mais observado neste tipo de infecção é um tipo de pneumonia que pode evoluir rapidamente para uma síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), doença em que a mortalidade pode chegar em 60% dos seus portadores (Dromer, et al., 2011). Infecções pulmonares foram predominantes nos surtos ocorridos nos EUA e Canadá, apresentando um contraste do que é observado mundialmente, em que doenças envolvendo o SNC são observadas em maior frequência (Galanis et al., 2009; Harris et al., 2011).

As infecções no SNC se manifestam com o paciente apresentando febre, dores de cabeça e até mesmo convulsões (Papas et al., 2001). A doença é caracterizada por lesões no cérebro (Figura 5 B), hidrocefalia (Park et al., 1994) e um aumento da pressão intracranial, que pode levar a um papiledema (Lalloo et al., 1994). Muitas vezes, esta pode deixar sequelas como redução da acuidade visual e perda do campo de visão (Fan-Havard et al., 1992).



**Figura 5:** Imagens de lesões provocadas pela criptococose. A) Nódulo pulmonar provocado por uma infecção por *Cryptococcus* sp. Nesta figura é possível observar a lesão no canto inferior esquerdo da imagem (seta). (Fonte: Sorrell et al., 2011). B) Tomografia computadorizada de contraste de um paciente imunocompetente. Na imagem é possível observar lesões em formato de anel na parte inferior direita da imagem (seta). Fonte: Sorrell et al., 2011. C) Aspecto típico de um espaço de Virchow-Robin dilatado durante meningoencefalite criptocócica mostrando os pseudocistos centrados por um capilar cerebral e preenchidos com numerosas leveduras livres ou dentro de fagócitos. (Fonte: Charlier et al., 2009).

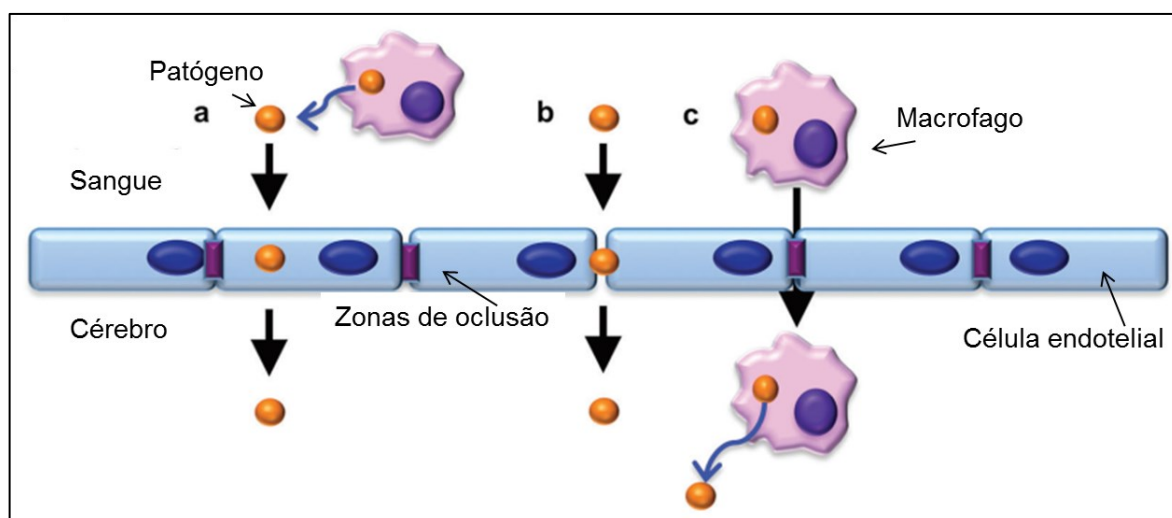
Tanto em indivíduos imunocompetentes quanto nos imunocomprometidos, infecções no SNC são as mais frequentes, apesar de que diferentes espécies e cepas de *Cryptococcus* de determinados locais apresentam diferentes manifestações clínicas. As manifestações clínicas provocados pelo *C. gattii* variam de acordo com a região analisada, como é visto ao se comparar os casos dos EUA (com maioria de infecções pulmonares) (Galanis et al., 2009) com os casos da Austrália (maioria dos casos leva a infecções no SNC) (Chen et al., 2012).

Um dos percursos naturais da infecção por *Cryptococcus* é a invasão do cérebro através da barreira hematoencefálica, seguindo de uma infecção no SNC. O termo “barreira hematoencefálica” (BHE) é utilizado para definir os microvasos presentes no SNC que tem como finalidade a regulação da homeostase, levando a um funcionamento apropriado do sistema ao agir como uma barreira física do mesmo (Daneman et al., 2015).

A BHE é composta por células endoteliais (CE) que apresentam a função de seletividade de íons, biomoléculas e células entre o sangue e o cérebro. Comparadas com outras CE, as da BHE são mais finas (Coomber & Stewart 1985). A resistência elétrica transendotelial (*Transendothelial electrical resistance* - TEER) é

utilizada para medir a integridade na zona de oclusão e as dinâmicas em cultivo celular. As zonas de oclusão, no SNC, apresentam resistência elétrica transendotelial (*Transendothelial electrical resistance* - TEER) com valores superiores a  $1.000 \Omega/\text{cm}^2$ , sendo que as junções de células epiteliais em outros tecidos conferem TEER de aproximadamente  $2-20 \Omega/\text{cm}^2$ , ou seja, uma resistência bem maior (Butt et al., 1990). Essa forte resistência é causada principalmente pelas moléculas presentes nessa zona, como ocludinas e claudinas e as proteínas ZO1, ZO2, ZO3, que criam uma forte barreira (Daneman & Prat, 2015).

A invasão do SNC por *Cryptococcus* através das células da BHE pode acontecer de três maneiras: atravessar através da célula, chamado de transcelular (Figura 7-A); entre as junções das células endoteliais, chamado de paracelular (Figura 7-B); ou atravessar no interior de um macrófago, chamado de “cavalo de Troia” (Figura 7-C) (Liu et al., 2012).



**Figura 6:** Modelo esquemático dos três mecanismos que os *Cryptococcus* utilizam para transpor a barreira hematoencefálica. Modelo de passagem transcelular (a), patógenos através da barreira por endocitose direta de células endoteliais. Modelo de travessia paracelular (b), os patógenos penetram entre as células de barreira através da zona de oclusão. O mecanismo "cavalo de Tróia" (c) envolve a penetração microbiana fagocítica das células a usando a transmigração dentro dos fagócitos infectados. As células do patógeno são liberadas dos macrófagos após a penetração. (Adaptado de Liu et al., 2012).

O primeiro método de travessia pela BHE se dá pela passagem da levedura por dentro da célula, transcitose (Figura 6 A). Um dos mecanismos para a entrada

da levedura é pelo gene *CPS1*, responsável pela formação da capsula. Ele produz a enzima ácido hialurônico sintase, produtor do ácido hialurônico (AH). Este ácido é superexpresso quando a levedura utiliza o inositol como fonte de carbono, o que é observado no cérebro pelo fato desta substância ser abundante neste local (Liu et al., 2013). O AH interage com o receptor celular CD44 do hospedeiro, promovendo um rearranjo nas moléculas de actina ao redor das balsas lipídicas da membrana celular, possibilitando a entrada do fungo (Jong et al., 2008).

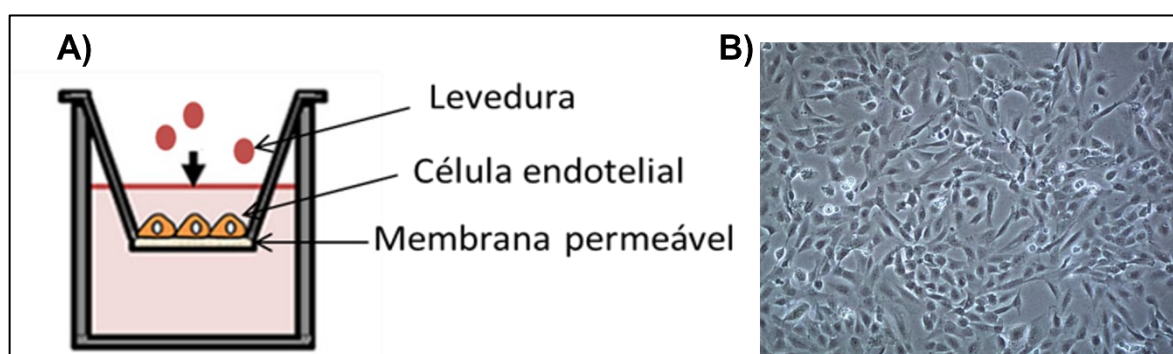
Além do AH, a entrada do fungo através da célula é possível pela produção da fosfolipase B1 pelo gene *PLB1*. As fosfolipases são enzimas que conseguem hidrolisar compostos lipídicos, causando uma desordem na membrana celular, possibilitando a entrada da levedura nas células do cérebro (Cox et al., 2001; Maruvada et al., 2012). Além disso, já foi visto que a metalloproteínase Mpr1 secretada pela levedura era essencial para a invasão cerebral, esta interage com uma proteína associada ao citoesqueleto da célula endotelial, a AnxA2 (Na Pombeira et al., 2017).

A travessia da levedura por entre as células endoteliais (paracelularmente) se dá por entre células danificadas ou por entre perturbações das zonas de inclusão pelo uso de proteases (Strickland et al., 2021) (Figura 6 B). O fungo consegue se ligar e ativar o plasminogênio do hospedeiro, levando a produção da plasmina, uma protease sérica que degrada fibrina e o colágeno, proteínas estruturais presentes nas zonas de oclusão (Stie et al., 2012). Além do uso da plasmina, a levedura também utiliza da amônia para causar danos nas zonas de oclusão e conseguir atravessar paracelularmente. O gene *URE1* de *Cryptococcus* produz a uréase, esta consegue converter ureia em amônia, uma molécula tóxica à zona de oclusão, tornando possível a travessia entre as células (Cox et al., 2000); Olszewski et al., 2004).

Além destes dois métodos, a entrada transcelular também já foi associada recentemente a outra proteína dos *Cryptococcus*, a metaloprotease. O efeito desta proteína foi observado ao inserir seu gene (*MPR1*) em um *Saccharomyces cerevisiae* (fungo sem a capacidade de invadir a BHE) e este conseguir transpor esta barreira. O efeito desta proteína está relacionado em sua ação em diversas proteínas relacionadas ao citoesqueleto e a endocitose (Na Pombeira et al., 2017).

O terceiro e último mecanismo para entrada na BHE é pelo “cavalo de Troia” (Figura 6 C). Neste método, a levedura atravessa a barreira dentro de um macrófago do hospedeiro. Como é sabido, *Cryptococcus* pode ser parasita intracelular e viver dentro de fagócitos (Feldmesser et al., 2000; Tucker et al., 2002). Como demonstrado recentemente, o fagócito consegue transpor a barreira através de um buraco nas células endoteliais, sem danificar a mesma. Uma vez o fungo estando presente dentro deste fagócito, ele consegue sair sem causar uma lise na célula. Neste mesmo estudo foi mostrado que células que não possuem a capacidade de invadir a BHE (mutantes não virulentos) conseguiam invadir quando estavam dentro de um monócito, demonstrando que estas facilitam a invasão ao SNC (Sorrell et al., 2016; Santiago-Triado et al., 2017).

Uma das maneiras de conseguir entender melhor a criptococose é desvendar mecanismos de passagem pela barreira hematoencefalica (BHE), com isso é possível buscar substâncias e mecanismos que possam impedir isso de acontecer. Uma metodologia recente que vem auxiliando em ambos os aspectos é o uso de *transwells* em cultivo celular com as células hCMEC/D3 (célula endotelial microvascular do cérebro humano) (Figura 7 A). Estas células foram originadas do tecido de microvasos do lobo temporal do cérebro e conseguem simular as condições observadas na BHE (Weksler et al., 2005).



**Figura 7:** A) Representação esquemática do funcionamento de um transwell (Adaptado de Santiago-Tirado, 2017). B) Célula hCMEC/D3 em cultivo celular de monocamada (Merck).

Um ensaio utilizando o *transwell* (também chamado de “câmara de Boyden”) é um teste feito para analisar a resposta migratória em células endoteliais causadas por certas substâncias. Nesta metodologia, células endoteliais são colocadas na camada superior de um dispositivo com uma membrana permeável abaixo (normalmente, poros de 8  $\mu\text{m}$ ), o que permite avaliar a migração das leveduras ou de substâncias através da camada celular (Santiago-Tirado et al., 2019).

Por estas razões, os *transwell* vêm sendo utilizados em ensaios com *Cryptococcus* spp. simulando a BHE, onde na camada superior seria o sangue e na camada inferior o cérebro. Com essa técnica, vários mecanismos de invasão da BHE já foram descobertos, como a necessidade da levedura em liberar certas proteases para a invasão no SNC (Vu et al., 2014), a importância de diferentes fatores de transcrição presentes em *C. neoformans* que auxiliam na adesão e passagem da BHE (Lee et al., 2020) e também de que macrófagos do hospedeiro auxiliam na passagem do fungo para o SNC (Santiago-Tirado et al., 2017).

#### 1.4 Tratamento

A estratégia para o tratamento da criptococose está diretamente ligada ao local e gravidade da infecção no hospedeiro e seu estado imunológico (Coelho & Casadevall., 2016). A base preconizada para o tratamento da criptococose é a anfotericina B (AmB) juntamente com a flucitosina (5-FC) e fluconazol. Quando usadas corretamente, apresentam uma forte ação e diminuem bastante a mortalidade dos hospedeiros em função da doença (Dismukes et al., 1987; Day et al., 2013; Bratton et al., 2013).

A anfotericina B é um polieno e tem como principal ação a ligação a moléculas de ergosterol presentes na membrana da levedura, formando poros na mesma, o que leva a uma desregulação osmótica, seguida de estresse celular (Kontoyiannis et al., 2002; Loeffler et al., 2003). Além desse aumento de permeabilidade, a AmB também causa danos por estresse oxidativo e nitrosativo (Ferreira et al., 2013). Apesar de seu amplo espectro e alta eficiência, a AmB apresenta grande toxicidade renal e hepática. O fluconazol pertence a família dos azólicos e atua na biossíntese do ergosterol, inativando a enzima lanosterol 14- $\alpha$ -

demetilase, impedindo a conversão do lanosterol em ergosterol. Esta redução na síntese de causa uma instabilidade na membrana plasmática, alterando a permeabilidade da célula fúngica, resultando na interrupção do crescimento (Richardson, 1990; Kartalija et al., 1996). A 5-Flucitosina é um análogo de pirimidinas, atuando na síntese de ácidos nucleicos e, conseqüentemente, na síntese proteica (Bennett et al., 1979).

O tratamento se dá com o uso de AmB lipossomal 10 mg/kg/dia e 5-FC 100 mg/kg/dia por duas semanas. Juntamente com esses dois, o fluconazol é administrado como uma manutenção do tratamento com 1200 mg/dia por cerca de 12 meses (WHO, 2022). O itraconazol é utilizado na terapia contra a criptococose pulmonar com o uso de 200 mg/dia por 4 meses, mas não para a meningite criptococócica. Isso ocorre porque a molécula apresenta dificuldades em transpor a barreira hematoencefálica (Denning et al., 1989). É importante citar que a anfotericina e a flucitosina não estão disponíveis em todos os países para o tratamento, sendo somente o fluconazol utilizado (Loyse et al., 2013).

A resistência às drogas em *Cryptococcus* pode ocorrer devido a vários fatores, como o local onde a infecção se dá, a virulência da levedura, falha farmacocinética ou de dosagem e também ao desenvolvimento de resistência primário ou secundário do organismo à droga prescrita (Perfect et al., 1999). Neste último, diversos mecanismos de resistência já foram descritos, como para o fluconazol, no qual existem bombas de efluxo contra a droga (Joseph-Horne et al., 1995) e é observada uma crescente dificuldade no tratamento da meningite criptococócica (especialmente em HIV-positivos) devido a isso (Mpoza et al., 2017). Outro mecanismo de resistência a azoles é observado em leveduras mutantes para o gene *ERG11*. Estes mutantes apresentam uma resistência a altas concentrações de fluconazol e voriconazol (Sioney et al., 2012). A resistência à AmB é rara, mas existe. Usualmente ela é relacionada a produção de diferentes tipos de ergosterol pela levedura, diminuindo a afinidade da droga por este composto (Kelly et al., 1994). O entendimento de como esses mecanismos funcionam permitem uma rápida reação contra essas emergentes resistências.

Para o tratamento da meningoencefalite, o acometimento mais grave causado pelos *Cryptococcus*, dados apontam que a concentração de fluconazol observada no



sistema nervoso central (SNC) é dose dependente e pode variar de 50 a 100% da concentração observada no plasma (Brammer et al., 1990; Manosuthi et al., 2010). Em contraste, a concentração do itraconazol observada no SNC é de no máximo 10% da observada no plasma, não sendo utilizado nestes casos (Heykants et al., 1987). Por último, a concentração de flucitosina e anfotericina B observada no SNC é quase a mesma observada no plasma, sendo ambas tratadas como linha de frente no combate a esses casos de criptococose (Vogelsinger et al., 2006; Perfect et al., 2010).

A busca por novos agentes antifúngicos é um campo muito amplo, mas poucas drogas chegam a ser aprovadas por órgãos regulatórios e usadas de fato no tratamento de doenças (McCarty & Pappas, 2021). Nos últimos anos, a maioria das novas drogas são formulações diferentes das já existentes e utilizadas e, as drogas inéditas, não são efetivas no tratamento da criptococose (Hoy, 2022; Phillips et al., 2023), sendo poucas chegando em fases finais de teste e com ação na levedura deste trabalho (Hodges et al., 2023).

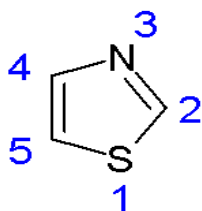
Novos tratamentos para a criptococose além do uso de drogas são pesquisados continuamente. Na década de 90, três indivíduos com uma meningite aguda decorrente de *Cryptococcus* foram tratados com uma combinação de AmBd e anticorpos contra *C. neoformans* vindos de coelho e dois deles conseguiram se recuperar (Gordon et al, 1995). Visando uma maior gama de tratamentos contra a criptococose, um teste clínico foi realizado tratando pacientes HIV-positivos e com meningite criptocócica com o uso de anticorpos monoclonais contra a capsula de *C. neoformans* (Larsen et al., 2005). Mais recentemente, pesquisas envolvendo anticorpos monoclonais para a parede celular da levedura se mostraram promissoras e estes até controlaram a doença quando combinado com doses subinibitórias de anfotericina B em modelo murino (Figueiredo et al., 2021).

## 1.5 Derivados tiazólicos

A busca por novas substâncias para o tratamento das criptococoses é uma causa bastante ativa, uma vez que seu tratamento tem se limitado basicamente a três compostos: anfotericina B, fluconazol e flucitosina. Sendo assim, se torna

necessário encontrar novos compostos que sejam eficientes, seletivos e com pouca toxicidade contra o hospedeiro (Maziarz et al., 2016).

Os azóis são uma classe de compostos químicos heterocíclicos que contem um átomo de nitrogênio e pelo menos outro átomo não-carbono como parte do anel (Eicher et al., 2003). Os tiazóis ou (1,3-tiazol) possuem, como o outro átomo não-carbono, um átomo de enxofre e outro de nitrogênio, tendo fórmula molecular  $C_3H_3NS$  (Figura 8). Tiazóis sintéticos apresentam atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas bastante promissoras, resultando em um grande interesse sob o ponto de vista farmacêutico (Gaikwad et al., 2013; Lino et al., 2018; Sinha et al., 2018; Althagafi et al., 2019; Aaghaz et al., 2023).



**Figura 8:** Fórmula estrutural básica de um composto tiazol. (NIH, PubChem, 2022)

Recentemente, Sá e colaboradores (2017) realizaram experimentos com derivados de tiazóis com a tentativa de observar seus efeitos sobre *Cryptococcus* spp. Os autores observaram ação antifúngica ao interferirem no sistema antioxidante da levedura, aumentando o estresse oxidativo intracelular (Sá et al., 2017). Em outro estudo, foi observado que estes derivados influenciam na virulência dos fungos, causando uma redução no biofilme formado por eles e também na espessura capsular (Sá et al., 2018). Portanto os derivados tiazóis apresentam atividade antifúngica promissora e podem ser estudados quanto a capacidade de ultrapassar e interferir na BHE.

## 2. Justificativa

A criptococose é uma doença infecciosa causada principalmente por duas espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus*: *C. neoformans* e *C. gattii*. É sabido que *C. neoformans* é causador de doenças tanto em hospedeiros imunocompetentes e imunocomprometidos, como nos portadores da AIDS ou recém-transplantados. Somente na América Latina, 5.000 pessoas são diagnosticadas todo ano com criptococose e a doença é responsável por aproximadamente 2.400 mortes. A meningite criptocócica causa cerca de 180.000 mortes por ano, a maioria acontecendo na África subsaariana, onde o diagnóstico e tratamento são mais escassos.

Normalmente, uma infecção por *Cryptococcus* se inicia com o hospedeiro inalando esporos ou leveduras dessecadas do ambiente e estas se depositando nos alvéolos pulmonares. Esse processo pode levar a uma inflamação no sistema nervoso central após a disseminação do fungo pelo hospedeiro, levando a uma meningite. Esse processo se dá após o fungo transpor a barreira hematoencefálica seja por entre as células endoteliais, ou através das células ou carregado no interior de um macrófago.

O tratamento para a criptococose inclui os antifúngicos anfotericina B e flucitosina, além do fluconazol. A flucitosina, recentemente aprovada pela ANVISA, é um fármaco de alto custo e não costuma ser utilizada no tratamento em países em desenvolvimento, sendo somente a anfotericina e fluconazol utilizados. Além disso, existe uma grande limitação para drogas que conseguem penetrar no SNC durante tratamento da meningococose, como é o caso do itraconazol, que apresenta atividade contra estas leveduras, porém, não consegue transpor a BHE. Outro problema é que a resistência da levedura a azóis utilizados no tratamento vem aumentando, o que pode se tornar um grande problema clínico com o passar dos anos.

Tendo em vista a relevância clínica da meningite criptocócica e também a importância da descoberta de novos fármacos antifúngicos, este trabalho objetiva a descoberta de derivados de tiazol com a habilidade de interferir na passagem do

fungo pela barreira hematoencefálica ou penetrar a mesma e atuar na meningoencefalite.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica e o mecanismo de ação de tiazóis sobre *Cryptococcus* spp.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar uma triagem com 30 derivados tiazólicos para avaliar a atividade anticriptocócica e a ação em fenótipos de virulência do fungo.
- Avaliar a toxicidade dos tiazóis sobre células HCMEC e que possam ser utilizadas nos ensaios de transmigração em BHE;
- Realizar uma triagem químico-genética com derivados tiazólicos em mutantes de *Cryptococcus neoformans* deletados para fatores de transcrição;
- Selecionar tiazóis que reduzam a passagem do *Cryptococcus* pela BHE por meio de ensaio de transcitose;
- Realizar ensaios *in vivo* para observar a sobrevivência e carga fúngica nos órgãos em camundongos tratados com tiazóis

## 4. Metodologia

### 4.1 Desenho experimental

Para avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de diferentes derivados tiazólicos frente a *Cryptococcus* spp., 30 substâncias foram testadas, inicialmente, frente à duas linhagens *C. gatti* e *C. neoformans*.

Inicialmente foi realizada uma triagem com todos compostos para avaliar a concentração mínima inibitória (CIM) e a concentração fungicida mínima deles. Em seguida, um corte nos que apresentaram as ações menos eficazes foi realizado e 13 compostos seguiram para uma avaliação do índice de seletividade. Os compostos que apresentaram uma melhor atividade e seletividade seguiram para um experimento de curva de crescimento, além da avaliação da produção de ergosterol pelas leveduras após entrarem em contato com as substâncias.

Com base nos resultados obtidos, quatro substâncias foram selecionadas (RN86, RN88, RJ37 e RVJ42) e com estas foram realizadas o restante dos experimentos: uma triagem químico-genética utilizando uma coleção de mutantes de fatores de transcrição de *C. neoformans*, um ensaio de combinação de fármacos com o uso de anfotericina B e fluconazol, a avaliação da influência dos derivados na resistência ou susceptibilidade da linhagem H99 na presença de estressores celulares, além de ensaios de transwell para avaliar a capacidade das substâncias em cruzar a BHE.

Por fim, ensaios com modelo murino foram realizados para avaliar a probabilidade de estender a sobrevivência de animais tratados com os tiazóis, além de avaliar a carga fúngica no cérebro e pulmão de animais.

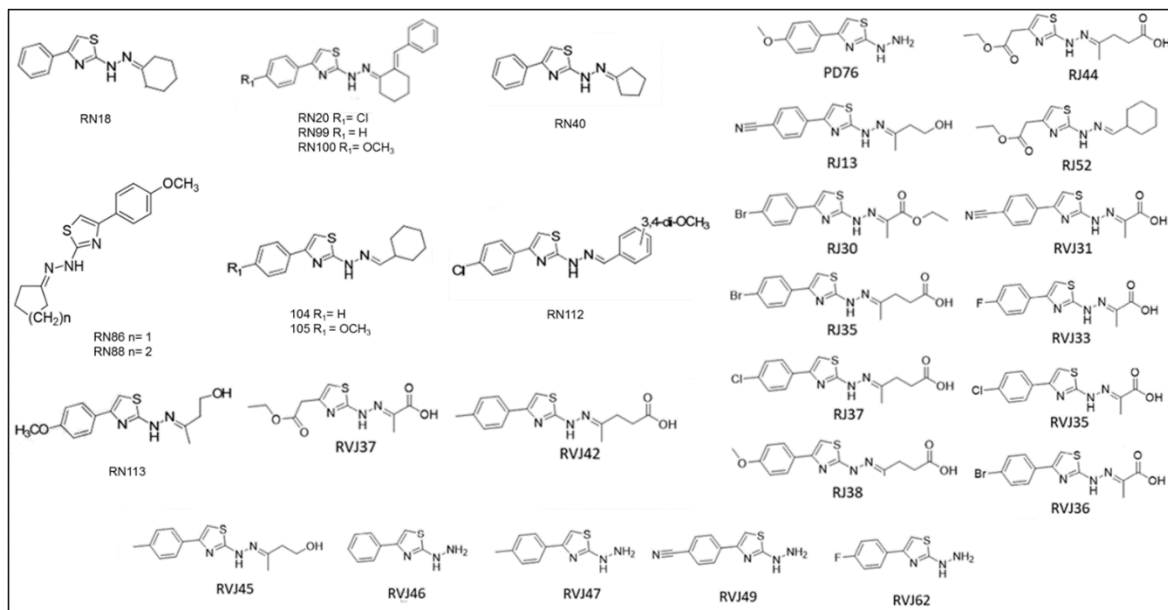
### 4.2 Micro-organismos

Neste trabalho, os micro-organismos utilizados foram os isolados, *C. neoformans* H99 (ATCC 208821), ATCC® 24067, WM 629 (ATCC® MYA-4567™), WM 626 (ATCC® MYA-4565™), WM 628 (ATCC® MYA-4566™) e o ATCC 28957 e os *C. gatti* R265 (ATCC MYA-4093), L27/01, 29/0893, 547/OTTI, 96806, 28/0893 e

1962. Todos isolados possuem um estoque armazenado em glicerol 20% e, sempre quando utilizados, estes foram descongelados e cultivados em ágar Sabouraud dextrose (ASD) por 48 horas a 37 °C. Além destas linhagens, também utilizamos mutantes de *C. neoformans* H99 para diversos fatores de transcrição produzidos no laboratório do Dr. Yong-Sun Bahn, na *Yonsei University* na Coreia do Sul (Jung et al., 2015). Esta coleção conta com 322 linhagens mutantes para 155 fatores de transcrições diferentes.

### 4.3 Substâncias experimentais

Neste trabalho, foi realizada uma triagem com 30 substâncias sintéticas (Figura 9), pertencentes ao banco de substâncias sintéticas da Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Como controles positivos, foram utilizados o fluconazol (Sigma-Aldrich) e anfotericina B (Sigma-Aldrich).



**Figura 9:** Estrutura química básica dos 30 derivados tiazólicos utilizados neste trabalho.

#### 4.4 Determinação da concentração mínima inibitória

Inicialmente, para uma triagem inicial dos compostos, foi feito o ensaio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de cada derivado frente a *Cryptococcus* spp., em que foi utilizada a metodologia de microdiluição em caldo (CLSI - M27-A2). Para isto, uma alçada de uma colônia de até 48 horas de crescimento em ASD foi recolhida e adicionada em 2 mL de salina (NaCl 0,9%). A transmitância dos inóculos foi então ajustada para 75-77% sob o comprimento de onda de 530 nm, o que corresponde a  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL. Posteriormente, este inóculo inicial foi diluído em RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) acrescido de MOPS 0,165 M, numa proporção de 1:50 e, em seguida, novamente diluído numa proporção de 1:20, de maneira a atingir uma suspensão com  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  células/mL. Para as drogas, foi preparada uma diluição seriada das substâncias (de 250 a 0,098  $\mu\text{g/mL}$ ), além do uso de fluconazol (de 0,125 a 64  $\mu\text{g/mL}$ ) como controle positivo.

O ensaio foi realizado em placas de microdiluição estéreis e com 96 poços de fundo chato. Nas colunas de 1 a 10 foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$  das drogas nas 10 diferentes diluições e, também nestes poços, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  da solução contendo as leveduras. Ao final dessa diluição 1:1, a quantidade de células foi em torno de  $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  células/mL. Em todas as placas foi realizado um controle de crescimento do fungo que consistia de 100  $\mu\text{L}$  do inóculo acrescido de 100  $\mu\text{L}$  de RPMI e, também, um controle de esterilidade que consistia de 200  $\mu\text{L}$  de RPMI.

As placas de microdiluição foram incubadas em câmara úmida a 37 °C por 72 horas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos três vezes. A leitura foi realizada visualmente, sendo que o CIM foi considerado como a inibição total do crescimento quando comparado ao crescimento do controle. Para a leitura do fluconazol, foi considerada a inibição de 80% do crescimento quando comparado ao crescimento do controle.



#### **4.4.1 Determinação da concentração fungicida mínima**

Para se obter o valor da concentração fungicida mínima (CFM), do poço no qual foi observada a menor concentração de inibição da droga é aspirado um volume de 10  $\mu$ L e plaqueado em ASD como uma microgota. As concentrações 2xCIM e 4xCIM também são plaqueadas e esta é incubada a 37 °C por 48 horas (Hafidh et al., 2011). Após este período, a placa segue para análise do crescimento para avaliar o perfil de ação do antifúngico.

#### **4.5 Cultivo celular e ensaio de viabilidade e seletividade**

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi a hCMEC/D3 (Merk-Millipore #SCC066), uma linhagem derivada de microvasos do lobo temporal humano. Esta linhagem representa um modelo da BHE que pode ser facilmente cultivada e é passível de estudos celulares e moleculares sobre mecanismos patológicos e de transporte de drogas com relevância para o SNC (Weksler et al., 2013). O meio utilizado foi o EBM-2 (Lonza – Catálogo N° CC3156) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 5%, penicilina-estreptomicina 1%, hidrocortisona 1,4 mM (Sigma Aldrich, Catálogo N°H0888-1G), ácido ascórbico 5  $\mu$ g/ml (Sigma Aldrich, Catálogo N°A4403), concentrado lipídico quimicamente definido 1% (Gibco, Catálogo N°11905-031), HEPES 10 mM (Sigma-Aldrich, Catálogo N° H0887) e fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) 1 ng/ml (Gibco, Catálogo N° PHG0266) (Santiago-Tirado et al., 2019).

Ao serem descongeladas, as células foram, primeiramente, cultivadas em frascos para cultura de tecidos de área de 25 cm<sup>2</sup>. Após atingirem uma confluência de 90%, foi feito um repique celular e estas foram transferidas em sua totalidade para um frasco para cultura de tecidos de área de 75 cm<sup>2</sup>, onde foram mantidas e conservadas sempre realizando seu repique celular depois de alcançada a confluência de 90%. Para o repique celular, as garrafas foram lavadas com solução de PBS 1X (1,5 mM NaCl; 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2) e tratadas por 5 minutos com tripsina 0,2% + EDTA 0,02% para dissociação enzimática das células, desfazendo a monocamada. Para a neutralização da enzima, a garrafa foi lavada com o meio citado acima e as células em suspensão foram centrifugadas a

3500 rpm, a 25 °C por 5 minutos. O sedimento celular formado foi suspenso em 1 mL de meio e 250 µL deste foi transferido novamente para a garrafa, onde um novo meio de cultivo celular também foi adicionado.

Para avaliar a toxicidade dos compostos em estudo sobre as células hCMEC/D3, um teste de viabilidade celular foi realizado utilizando a metodologia do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} (ThermoFisher, #M6494). As células hCMEC/D3 foram cultivadas conforme condições descritas anteriormente em placas de fundo chato de 96 poços até atingirem uma confluência de 90%. Depois de atingida, as células foram incubadas por 48 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> atmosférico juntamente com uma diluição seriada dos derivados de tiazol diluídos em DMSO. Para controle negativo, foi adicionado somente DMSO 0.5% nas células e como controle positivo de toxicidade, foi utilizado fluconazol. Como controle de *background*, foram utilizados poços somente com os compostos diluídos e o meio de cultivo celular, sem células.

A viabilidade foi medida ao adicionar 10 µL/poço do MTT (5 mg/mL) e incubar como descrito anteriormente por 4 horas. Após o período de incubação, o meio MTT foi cuidadosamente removido de todos os poços e adicionados 100 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram então suavemente agitadas e incubadas a temperatura ambiente por 5 min e lidas na absorbância de 590 nm em espectrofotômetro. A avaliação da toxicidade foi feita da seguinte maneira: a porcentagem viável de células em cada concentração foi calculada [(média da D.O. das células tratadas/média da D.O. do controle de crescimento) x 100] e a concentração que mais se aproximou do valor de 50% (CI<sub>50</sub>, concentração inibitória média) foi selecionada para calcular a toxicidade como mostrado mais adiante (item 5.6).

Dados do IC<sub>50</sub> em hCMEC/D3 e de concentração inibitória mínima foram utilizados para calcular o índice de seletividade (IS) de cada substância. O IS foi determinado pela razão do valor do IC<sub>50</sub> dividido pelo valor do CIM. Onde foi calculado  $IS = IC_{50}/CIM$ . Valores maiores que 10 foram considerados indicativos de ausência de toxicidade, enquanto substâncias com valores abaixo de 10 foram consideradas tóxicas (Protopopova et al., 2005).

#### 4.5.1 Toxicidade *in vivo* em modelo invertebrado

Para se avaliar a possível toxicidade dos compostos deste trabalho, também foi realizado um ensaio utilizando larvas do besouro *Tenebrio molitor* e diferentes concentrações das drogas.

Para o estudo de sobrevivência, larvas de tenébrio, pesando entre 100 e 200 mg e sem manchas escuras foram divididas em grupos de 12 animais e infectadas com a linhagem *C. neoformans* H99 (ATCC® 208821™). A infecção foi realizada usando uma seringa Hamilton (701 N, calibre 26s, comprimento da agulha 51 mm, capacidade de 10 µL). Cada larva recebeu 5 µL de suspensão fúngica contendo  $1 \times 10^5$  células na hemocele, na região do abdômen, logo abaixo das patas, na porção ventral. Foi utilizado um grupo como controle, inoculando apenas PBS estéril. Após 24 horas, os grupos de larvas infectadas foram tratados com 5 µL dos derivados RJ37, RVJ42, RN86 e RN88 nas concentrações de 100 vezes o CIM e de 1000 vezes o CIM. As larvas foram incubadas a 37 °C em placas de Petri e o número de larvas mortas foi registrado em intervalos de 24 horas. Para a morte das larvas, foi verificado visualmente o aparecimento de manchas escuras (melanização) e resposta a estímulos físicos. Ao final, traçou-se uma curva de sobrevivência.

#### 4.6 Curva de crescimento

Após a determinação do CIM dos derivados tiazólicos, um ensaio de curva de crescimento foi realizado para avaliar a influência dos compostos sobre o desenvolvimento das leveduras. Aqui, as substâncias utilizadas foram as RN40, RN86, RN88, RN104, RN105, RN112, RJ37 e RVJ42.

Inicialmente, foram preparadas placas contendo diluições das substâncias alvo em concentração igual ao valor do CIM, metade de seu valor e  $\frac{1}{4}$  de seu valor, além de um controle negativo contendo apenas com RPMI e um controle positivo de crescimento com meio RPMI acrescido do inóculo fúngico. Após a preparação das placas, todos os poços das diluições e controles, com exceção do controle negativo,

receberam 100 µL do inóculo fúngico preparado como anteriormente. Essas placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas e, durante esse período, foram realizadas leituras em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm em diferentes intervalos de tempo, começando com o momento da inoculação (tempo zero) e seguindo com leituras em 24, 48 e 72 horas.

#### 4.7 Triagem químico-genética

Para obter informações sobre o papel de diferentes fatores de transcrição (FT) na susceptibilidade aos derivados tiazólicos, foi realizada uma triagem químico-genética usando uma coleção de mutantes de (FT). A biblioteca consiste em 322 diferentes linhagens com deleções em 155 FTs (Jung et al., 2015).

Antes dos testes, os mutantes, que estavam refrigerados a -80 °C em placas de 96 poços de fundo chato, foram descongelados a temperatura ambiente e 15 µL de cada linhagem foi cultivado em meio ASD a 28 °C por 48 horas para verificação da viabilidade de cada. Após o cultivo, um inóculo com cerca de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  células/mL de cada mutante foi preparado e adicionado em placas de 96 poços de fundo chato contendo concentrações que variavam de 4 vezes o valor da CIM até um quarto do valor da CIM dos derivados tiazólicos RN86, RN88, RJ37 e RVJ42, além do uso do fluconazol como controle. Poços sem nenhuma droga também foram utilizados como controle de crescimento das leveduras. Estas placas foram incubadas em câmara úmida a 28°C por 72 horas e depois seguiram para avaliação visual do crescimento.

Informações sobre as linhagens que apresentarem resistência (valor de CIM igual ou maior a 4x a CIM da linhagem selvagem) ou sensibilidade (valor de CIM igual ou menor a 4x a CIM da linhagem selvagem) foram utilizadas para uma abordagem *in silico*. Nesta, foi feita a identificação de qual gene havia sido deletado neste mutante e sua função por meio do site *fungidb.org*. Em seguida, estes genes foram analisados por ontologia genética (*Gene Ontology* – GO), uma metodologia usada na bioinformática para agrupar genes por suas funções. Para isso, usamos o Revigo (Supek et al., 2011) (<http://revigo.irb.hr/>), uma ferramenta que resume longas listas de GO, encontrando um subconjunto representativo dos termos usando um

algoritmo de agrupamento simples que se baseia em medidas de semelhança semântica, agrupando-os por função.

#### 4.8 Quantificação do ergosterol

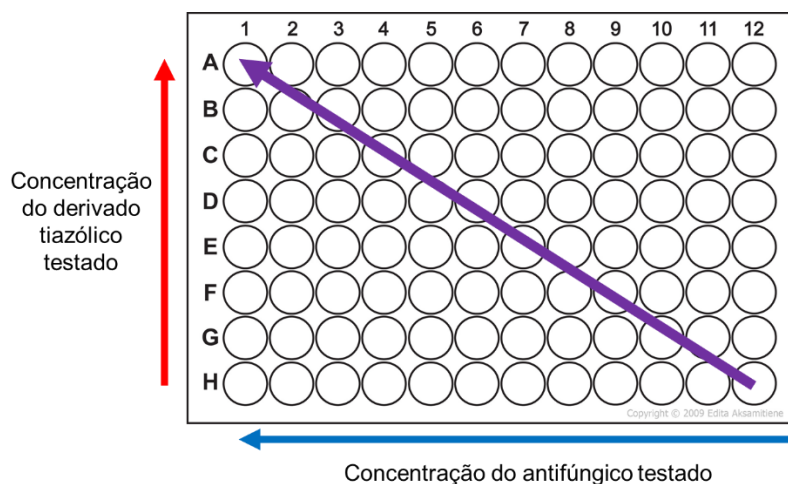
A quantificação de ergosterol das leveduras após contato com as substâncias teste foi realizada conforme Santos et al, 2012, com modificações. Inicialmente, as amostras fúngicas foram cultivadas em ASD a 37°C por 72 horas. Em seguida, um inóculo de  $1 \times 10^8$  células/mL de cada uma das linhagens foi preparado e foram incubados *overnight* com concentrações inibitórias de fluconazol e dos derivados RN40, RN86, RN88, RN104, RN105, RN112, RJ37 e RVJ42. Além dos grupos tratados com as drogas, um grupo controle de crescimento contendo apenas meio RPMI-1640 e as leveduras também foi incubado. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com água destilada esterilizada. Para a extração dos lipídios, 3 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio (KOH) 25% foram adicionados a cada massa celular, seguido por 1 minuto de agitação intensa em agitador de vórtice.

Posteriormente, os tubos foram incubados em banho-maria a 85 °C por 1 hora e então resfriados à temperatura ambiente. Uma mistura de 3 mL de n-heptano ( $C_7H_{16}$ ) (Sigma-Aldrich) e 1 mL de água destilada esterilizada foi adicionada a mistura, seguido de agitação por 3 minutos em agitador de vórtice. Os sobrenadantes foram colocados em placas de 96 poços de fundo chato e esta seguiu para leitura em espectrofotômetro a 282 nm. Uma curva-padrão de ergosterol (Sigma-Aldrich) foi produzida e utilizada para quantificação de ergosterol. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/mL}$  baseado na curva de calibração com o padrão de ergosterol.

A partir destes experimentos realizados, as substâncias RN86, RN88, RJ37 e RVJ42 foram selecionadas para dar sequência aos ensaios seguintes.

#### 4.9 Ensaio de interação entre tiazólicos e antifúngicos clínicos

Os derivados tiazólicos RN86, RN88, RJ37 e RVJ42 foram testados quanto a sua atividade em combinação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B. Dez diluições seriadas dos tiazóis e sete diluições dos antifúngicos foram preparadas. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de cada derivado (25  $\mu\text{g/mL}$  a 0,05  $\mu\text{g/mL}$ ) foram adicionadas aos poços de uma placa de 96 poços na orientação vertical e as alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de cada diluição do fluconazol (64  $\mu\text{g/mL}$  a 1  $\mu\text{g/mL}$ ) ou anfotericina B (16  $\mu\text{g/mL}$  a 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ) foram adicionadas em uma orientação horizontal, de modo que a placa ficou com todas as diferentes combinações possíveis de concentrações dos dois fármacos (Figura 10) (Gupta et al., 2003). Além disso, para controle, também foram adicionados poços com as diferentes diluições das drogas sem a presença da outra.



**Figura 10.** Esquema do protocolo experimental do teste de combinação. As setas (vertical e horizontal) indicam o aumento da concentração de cada agente individualmente e a seta em diagonal indica o aumento da concentração do antifúngico e composto em combinação.

Após o preparo das placas com as drogas, foi adicionado em cada poço 100  $\mu\text{L}$  de inóculo contendo de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  células/mL, preparado conforme descrito no item 4.4, totalizando um volume de 200  $\mu\text{L}$  por poço. As placas foram incubadas a 35  $^{\circ}\text{C}$  por 72 horas. A interação dos fármacos com os antifúngicos foi calculada de acordo com o modelo de referência ZIP, usando a plataforma *SynergyFinder 3.0* (lanevski et al., 2022). Neste modelo, é calculado a mudança no potencial (efeito da

droga em determinada concentração) quando a droga age sozinha ou em combinação com outra, obtendo-se assim o *score* ZIP, usado para calcular o sinergismo ou antagonismo.

#### **4.10 Ensaio de *spot* em diferentes estressores celulares**

Após verificada a susceptibilidade de *C. neoformans* aos tiazóis utilizados, o próximo passo foi investigar as possíveis alterações celulares induzidas por esses fármacos (Freitas et al., 2023). Para isso, *C. neoformans*, foi previamente cultivado em meio ASD por 72 horas de incubação a 35 °C, e dele foi preparado um inóculo de  $2 \times 10^4$  células/mL em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) acrescido de MOPS 0,165 M. 500 µl deste inóculo foi utilizado juntamente com 500 µl das drogas 37, 42, 86 e 88 em concentração de CIM, ficando assim uma concentração final de  $1 \times 10^4$  células/mL e as drogas em concentrações subinibitórias. Após isso, elas foram incubadas a 35°C durante 48h. Após a exposição aos fármacos, um novo inóculo foi preparado obtendo  $1 \times 10^6$  células/mL. Em seguida foram realizadas quatro diluições seriadas de 1:10 de cada inóculo e posteriormente 5µL de cada diluição foram dispensados em meio ASD suplementado com diferentes estressores celulares, sendo eles: Vermelho congo 0,5% (estresse de parede celular), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,5 mM (estresse oxidativo), triton 0,025% (estresse de parede celular e membrana), Cloreto de Sódio 1,5 M (estresse osmótico), Cloreto de potássio 1,5 M (estresse osmótico), DTT 15 mM (estresse no retículo endoplasmático), 0,03% SDS (estresse de membrana de membrana e parede) e Calcofluor 5 mg/mL (estresse de membrana celular e parede). As placas foram incubadas à 37°C durante 72 horas e, posteriormente fotografadas e analisadas.

#### **4.11 Avaliação da produção de melanina**

Para a avaliação da influência na produção de melanina quando em presença dos compostos em teste, um inóculo de  $10^3$  células/mL de cada linhagem foi preparado em solução salina e 100 µL deste foi plaqueado em placas de 96 poços de fundo chato. Posteriormente, 100 µL de concentrações subinibitórias das

substâncias RN86, RN88, RVJ37 e RJ42 também foram adicionados a estes poços. Também foi utilizado o fluconazol e um controle de crescimento sem a adição das drogas. A placa foi incubada a 37 °C por 72 horas.

Após o período de incubação, um novo inoculo foi preparado utilizando-se as leveduras que foram tratadas e 15 µL deste foi plaqueado em pontos diferentes em uma placa de meio mínimo ágar contendo L-DOPA (15 mM dextrose, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 29,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13 mM glicina, 3 µM tiamina e 1 mM L-DOPA; pH 5,5). Estas foram incubadas a 37 °C por cinco dias ao abrigo de luz e depois seguiram para avaliação visual no qual foi analisado o tamanho do crescimento das colônias, sua coloração e aspecto enquanto comparadas com o controle de crescimento.

## **4.12 Transmigração celular**

### **4.12.1 Ensaios de transcitose em modelo de BHE**

Uma vez tendo sido determinada a CIM de cada derivado e suas inibições da viabilidade celular, foram realizados os ensaios de migração da levedura através do sistema da barreira hematoencefálica *in vitro*. Para isso, o aparato *transwell* com uma membrana com poros de 8 µm coberta de colágeno foi utilizado. As células hCMEC/D3 foram cultivadas como descrito anteriormente na parte superior dessa membrana utilizando-se cerca de  $5 \times 10^4$  células por cm<sup>2</sup> até que uma confluência de 100% seja observada.

Para a formação da barreira, células foram cultivadas (no aparato supramencionado) sobre uma camada de colágeno (150 µg/mL) e mantidas em estufa a 37 °C com uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 4 a 6 dias com troca de meio a cada dois dias para obtenção de uma monocamada de células. Para uso posterior, as células foram dissociadas com o uso de tripsina/EDTA (Merk. Catálogo Nº SM-2003-C) e, em seguida, adicionadas de SFB e DMSO 10%. As passagens foram armazenadas em freezer -80 °C.

Células fúngicas em meio RPMI-1640 ( $1 \times 10^6$  células) foram adicionadas na parte apical da câmara e estas foram mantidas em estufa a 37 °C com uma



atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, o meio de cultivo foi coletado na parte inferior para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Diferentes tempos de coleta (3, 9 e 24 horas) foram testados para avaliar o tempo de passagem do fungo pela barreira. Como controle negativo, poços sem a adição das leveduras foram utilizados. Neste experimento, os meios coletados da parte basal das câmaras foram submetidos a diversas diluições logarítmicas e, em seguida, 100 µL de cada diluição foram plaqueados em ASD e incubado por 48 horas a 37 °C. Após esse período, foi realizada a contagem das placas onde foi contado o número de células entre 30 e 300. O número de unidades formadoras de colônias é calculado da seguinte fórmula:  $CFU = (\text{número de colônias na placa} \times \text{inverso da diluição onde a contagem foi realizada}) / \text{volume plaqueado em mL}$  (Breed & Dotterer, 1916).

Seguindo com os ensaios de transcitose, o próximo foi realizado, com o uso dos derivados RN86, RN88, RJ37 e RVJ42. O cultivo e o preparo dos poços foram realizados como descrito anteriormente. Juntamente das leveduras, concentrações inibitórias dos compostos foram adicionadas na parte apical do aparato e estes foram mantidos em estufa a 37 °C com uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 24 horas. Após este período, 100 µL da parte inferior foi coletado, plaqueado em uma placa contendo ASD e esta foi incubada por 48 horas a 37 °C e seguiu para posterior contagem de UFC.

#### **4.12.2 Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos por CLAE/DAD para quantificação de tiazóis**

Para a quantificação dos compostos em estudos de permeabilidade, foi necessário o desenvolvimento de métodos bioanalíticos de detectabilidade através de CLAE/DAD (Cromatografia Líquida de alta eficiência com detector *photodiodearray*). Os métodos utilizados para a quantificação dos derivados 37, 42, 86 e 88 foram desenvolvidos no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da UFMG, juntamente do professor José Eduardo Gonçalves. Inicialmente, foi realizada a otimização das condições cromatográficas do método previamente desenvolvido por Pierotte (2022), devido à similaridade das moléculas,

com a finalidade de torná-lo mais adequado à quantificação dos derivados em questão (Protocolo 1 – Tabela 1). Após análise inicial, decidiu-se por mudar a abordagem dos derivados 86 e 88 para melhorar sua detectabilidade (Protocolo 2 – Tabela 1).

**Tabela 1** – Parâmetros cromatográficos do método bioanalítico por CLAE/DAE desenvolvido para quantificar RJ37 e RVJ42 (Protocolo 1) e RN86 e RN88 (Protocolo 2) em tampão Hanks

Parâmetro	Protocolo 1	Protocolo 2
Coluna cromatográfica	ZORBAX Eclipse XDB C18	Phenyl
Fase móvel	Tampão de acetato de amônio 2 mM, ácido fórmico 0,1%, pH 2,5; acetonitrila (ACN)	Tampão de acetato de sódio 7,2 mM, ácido acético 1%, pH 5,7; acetonitrila
Eluição	ACN:Tampão (50:50)	ACN:Tampão (50:50)
Fluxo	1,0 mL/min	1,0 mL/min
Volume de injeção	5 µL	5 µL
Temperatura do forno da coluna	40 °C	40 °C

Para realizar o método cromatográfico, soluções padrões foram preparadas para cada composto no dia das análises. Separadamente, foi pesado 10 mg de cada composto e estes foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL. Para solubilizar, foi adicionada a cada balão 10 mL de metanol. Após chegar no volume final, os balões foram levados ao ultrassom por cinco minutos, as soluções filtradas e levadas para o *vial* de análise. Ao final, as soluções ficaram na concentração de 1 mg/mL.

#### 4.12.2.1 Curva de calibração

A curva de calibração é uma relação matemática entre a concentração de uma substância e o sinal analítico, usada para quantificar concentrações

desconhecidas e analisar a resposta do instrumento. Para isso, foi construída uma curva de calibração utilizando-se 3 concentrações diferentes de cada uma das moléculas independentemente.

Para o preparo das concentrações utilizadas para a curva de calibração, foi utilizado como base a solução estoque preparada anteriormente para cada um dos compostos. A partir dela, as novas concentrações foram preparadas ao se diluir com solução balanceada de Hank's sem cálcio e sem magnésio (KCl 5,33 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 mM, NaCl 138 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 mM e glicose 5,6 mM) essas amostras até as concentrações de 0,5, 5 e 20 µg/mL. 10 µL de cada uma dessas novas concentrações foi colocado em um *vial* de amostra e seguiu para a análise no cromatograma.

A curva de calibração foi construída ao se determinar a equação da reta gerada a partir dos três pontos e, através desta, é possível calcular concentrações desconhecidas em uma amostra através do sinal gerado.

#### **4.12.3 Estudo de permeabilidade *in vitro* em hCMEC/D3**

Para se avaliar a quantidade dos derivados tiazólicos que conseguiam passar através da barreira gerada pelas células hCMEC/D3, foi realizado um ensaio de permeabilidade.

Primeiramente, uma monocamada celular de hCMEC/D3 foi gerada em um *transwell* assim como descrito no item 4.12. Após o período de formação e confluência da barreira, seu meio de cultura da parte apical foi aspirado e a mesma foi lavada com a solução balanceada de Hank's sem cálcio e sem magnésio. Nestes poços foi adicionado 200 µL, individualmente, de soluções dos compostos RVJ37, RJ42, RN86 e RN88, nas concentrações de 20 e 200 µg/mL, diluídos em solução balanceada de Hank's sem cálcio e sem magnésio. As placas contendo os *transwells* foram incubadas em uma estufa a 37 °C com uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 24 horas.

Após o período de 24 horas, a parte basolateral da barreira foi completamente aspirada e esta seguiu para análise bioanálítica através de CLAE/DAD para quantificação utilizando-se a curva de calibração gerada no item 4.12.2.1.

#### **4.13 Ensaio *in vivo* em modelo murino**

Para o modelo animal, foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 de seis a oito semanas de vida, pesando entre 20 e 25 gramas, adquiridas do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais e seguindo metodologias de infecção e tratamento já anteriormente padronizadas por nosso grupo (Freitas et al., 2023). Os animais foram divididos em grupos de seis por gaiola, inclusive para os grupos controles. Água e ração eram fornecidas *ad libitum* e eles foram mantidos em ciclos de claro/escuro. Este trabalho foi aprovado (protocolo 237/2021) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais e seguiu-se protocolos e guias de manejo de acordo com o CONCEA (Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividade de ensino ou pesquisa científica, 2019).

##### **4.13.1 Avaliação da sobrevida em modelo murino de infecção por *C. neoformans***

Para avaliação da influência dos derivados tiazólicos na sobrevida dos animais infectados, foi realizado um estudo onde os animais foram infectados e então tratados com os compostos isoladamente e em combinação com anfotericina B. Inicialmente, a linhagem *C. neoformans* H99 foi previamente cultivada em ASD a 35°C durante 48 horas. Em seguida, as células foram transferidas para solução salina estéril (NaCl 0,9%) e o inóculo foi contabilizado em câmara de Neubauer com o uso de azul de Trypan e ajustado para  $1 \times 10^5$  células em 30  $\mu$ l.

Para a infecção, os camundongos foram previamente anestesiados com uma solução de quetamina e xilazina em PBS (80 mg/Kg e 10 mg/Kg) e, após 10 minutos, foi realizada uma pequena incisão na pele, próxima a tireóide e após a

separação das camadas dos tecidos, a traquéia foi exposta e inoculada com a suspensão fúngica feita anteriormente, ao final, a incisão foi suturada. Após o procedimento, os grupos experimentais foram mantidos em gaiolas separadas.

O tratamento foi iniciado 24 horas após a infecção. As injeções foram feitas através da via intraperitoneal e cada grupo recebeu um composto isolado ou em combinação com anfotericina B. Como controle, foi utilizado um grupo tratado com anfotericina B e também um grupo que não recebeu tratamento algum. As concentrações para o tratamento com os tiazóis foram utilizadas de acordo com doses previamente utilizadas por Sá (2018), a dose para anfotericina B (AmB) foi escolhida de acordo com estudos prévios do grupo (Freitas et al., 2023). Os animais foram divididos nos seguintes grupos: (1) 37 (10 mg/kg/dia), (2) 42 (10 mg/kg/dia), (3) 86 (10 mg/kg/dia), (4) 88 (10 mg/kg/dia), (5) 37 (10 mg/kg/dia) + AmB (0,5 mg/kg/dia), (6) 42 (10 mg/kg/dia) + AmB (0,5 mg/kg/dia), (7) 86 (10 mg/kg/dia) + AmB (0,5 mg/kg/dia), (8) 88 (10 mg/kg/dia) + AmB (0,5 mg/kg/dia), (9) AmB (0,5 mg/kg/dia) e (10) não tratado. Os camundongos foram monitorados diariamente e os animais que apresentavam perda de peso superior a 20%, tremores ou imobilidade foram eutanasiados de acordo com as normas do CONCEA.

#### **4.13.2 Avaliação da carga fúngica no cérebro e pulmão**

Depois do experimento de sobrevivência, foram realizados dois novos ensaios para se analisar a carga fúngica após a infecção e tratamento dos animais. No primeiro, a infecção e o tratamento foram realizados como descrito anteriormente e os animais foram eutanasiados após 10 dias de infecção, colhendo-se o cérebro e o pulmão. No segundo, a infecção ocorreu por via intracraniana: os camundongos foram anestesiados e, utilizando-se uma seringa, um inóculo de  $1 \times 10^3$  células em um volume de 5  $\mu$ L foi inserido diretamente no tecido cerebral através do crânio, na região do bregma (Hamed et al., 2023). Ao passar de cinco dias estes animais foram eutanasiados e o cérebro foi recolhido. Em ambos os experimentos os animais foram tratados com as mesmas doses dos compostos do experimento anterior.

O cérebro e pulmão que foram retirados dos animais foram macerados e então diluídos para quantificação da UFC. Após triturados e diluídos, 50  $\mu$ L de cada pulmão e 200  $\mu$ L de cada cérebro foi plaqueado em ASD e incubado a 35°C por 48 horas. Posteriormente, as colônias foram contadas visualmente e então estabelecido a quantidade de UFC/g de cada órgão.

#### **4.14 Análise estatística**

Os dados foram analisados por meio do software Prism 9.0.0 (GraphPad Software Inc.). Os testes realizados para cada experimento estão indicados nas figuras.

## 5. Resultados

### 5.1 Determinação da concentração inibitória mínima

Na triagem inicial para determinar os compostos com as melhores atividades antifúngicas, as seguintes concentrações inibitórias mínimas observadas na Tabela 2 foram obtidas.

**Tabela 2:** Concentração inibitória mínima dos 30 compostos iniciais do estudo obtidas frente às linhagens *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265.

Composto	<i>C. neoformans</i> H99	<i>C. gattii</i> R265
	Concentração inibitória mínima (µg/mL)	
RN18	6,3	12,5
RI20	6,3	6,3
RN40	1,6	0,8
RN86	3,1	1,6
RN88	1,6	0,8
RN99	12,5	12,5
RN100	25	12,5
RN104	0,8	0,8
RN105	0,8	0,8
RN112	3,1	1,6
RN113	0,8	0,8
RJ13	1,6	0,8
RJ30	6,3	6,3
RVJ31	6,3	50
RVJ33	3,1	1,6
RVJ35	1,6	1,6
RJ35	0,2	<0,1
RVJ36	0,8	0,8
RVJ37	>50	>50
RJ37	0,2	0,2
RJ38	0,4	0,2
RVJ42	0,2	0,1
RJ44	0,8	0,8
RVJ45	0,4	0,2
RVJ46	12,5	12,5
RVJ47	0,4	0,4
RJV49	0,2	0,4
RJ32	1,6	0,8
RVJ62	3,1	3,1
PD76	0,8	0,4
Anfotericina B	0,4	0,4
Fluconazol	2,0	4,0

Na tabela é possível observar que os valores de CIM para todos os derivados frente as duas leveduras testadas se mantiveram próximos, se diferenciando no máximo por duas diluições (4 vezes), e bem baixos. Os menores valores de CIM

observados para ambas as linhagens foram obtidos pelas substâncias RJ35, RJ37 e RJ42, com uma concentração inibitória de 0,2 e 0,1 µg/mL, valores bem próximos do CIM obtido para a AmB. Já os maiores valores de CIM obtidos foram pelas substâncias RN18, RN99, RN100 e RVJ37, com valores de concentração de inibição de 12,5 µg/mL, 12,5 µg/mL e maior que 50 µg/mL, respectivamente.

Após a triagem inicial, os compostos com as atividades mais promissoras (RJ37, RVJ42, RN86 e RN88) foram selecionados e um novo ensaio de CIM foi realizado utilizando-se um maior número de linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* para melhor avaliar o potencial de inibição destas moléculas (Tabela 3).

**Tabela 3:** Concentração inibitória mínima de 4 diferentes tiazóis e anfotericina B frente a 11 linhagens de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*.

		Concentração inibitória mínima (µg/mL)				
Linhagens		Compostos				
		RJ37	RVJ42	RN86	RN88	AmB
<i>C. neoformans</i>	ATCC® 24067	0,2	0,1	0,8	0,4	0,4
	WM 629 (ATCC® MYA-4567™)	0,8	0,2	1,6	0,4	0,4
	WM 626 (ATCC® MYA-4565™)	0,4	0,4	3,1	1,6	0,8
	WM 628 (ATCC® MYA-4566™)	0,4	0,2	<0,1	<0,1	0,8
	ATCC 28957	0,4	0,1	0,8	0,4	0,4
Média geométrica		0,4	0,2	1,3	0,5	0,6
<i>C. gattii</i>	L27/01	0,4	0,2	0,8	0,4	0,4
	29/0893	0,4	0,8	1,6	1,6	0,8
	547 OTTI	0,2	0,2	0,8	0,4	0,4
	96806	0,2	0,4	1,6	1,6	0,4
	28/0893	0,4	0,1	0,8	0,8	0,4
	1962	0,4	0,2	1,6	0,4	0,8
	Média geométrica	0,3	0,3	1,2	0,9	0,5

Os valores obtidos após a ampliação do número de linhagens se mantiveram similares ao observado com as duas utilizadas inicialmente na triagem, com a CIM variando de 0,1 a 1,6 µg/mL. Analisando as médias obtidas para cada derivado, o composto RVJ42 apresentou as menores, com 0,2 e 0,3 µg/mL para *C. neoformans* e *C. gatti* respectivamente. Já o RN86 as maiores, com 1,3 e 1,2 µg/mL para *C. neoformans* e *C. gatti* respectivamente.



### 5.1.1 Determinação da concentração fungicida mínima

A concentração fungicida mínima foi obtida ao se avaliar visualmente o crescimento fúngico. Se a relação CFM/CIM for maior do que 2, a substância é classificada como fungistática, do contrário, é fungicida (Hafidh, et al., 2011). No experimento aqui realizado, todos os derivados utilizados apresentaram uma relação CFM/CIM menor do que 2, ou seja, são compostos fungicidas. Como controle, utilizamos o fluconazol, este apresentou um CFM/CIM igual a 4, comprovando sua ação fungistática.

### 5.2 Ensaio de viabilidade celular em HCMEC

No ensaio de viabilidade celular, a citotoxicidade dos compostos foi testada frente às células hCMEC/D3. Neste trabalho, a citotoxicidade foi medida de acordo com o IC<sub>50</sub> observado, ou seja, a concentração mínima de cada droga que é necessária para inibir, *in vitro*, o processo de crescimento celular ou sua viabilidade em 50% quando comparada com um controle de crescimento, sem a presença das drogas. Quanto maior a concentração obtida, menos citotóxica a droga é para a célula em questão.

A substância RN18 foi a única dentre todas testadas que apresentou um IC<sub>50</sub> maior do que o valor máximo de concentração testado (300 µg/mL), ou seja, concentrações mais altas seriam necessárias para encontrar um valor de IC<sub>50</sub>. Já as substâncias RN104 e RN112 foram as que apresentaram os menores valores de IC<sub>50</sub>, 2,3 µg/mL. O restante dos valores de IC<sub>50</sub> pode ser observado na Tabela 4.

**Tabela 4:** Valores de 50% de índice de citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) na linhagem celular hCMEC/D3 para 13 derivados tiazólicos.

IC <sub>50</sub> (µg/mL)													
RN18	RI20	RN40	RN86	RN88	RN99	RN100	RN104	RN105	RN112	RN113	RJ37	RVJ42	Fluconazol
>300	9,4	150	150	37,5	4,7	37,5	2,3	18,8	2,3	4,7	150	75	>300

### 5.2.1 Índice de seletividade

Para analisar, de fato, a toxicidade dos compostos, o índice de seletividade foi utilizado. Essa medida indica a capacidade da droga de agir de forma específica contra um alvo desejado em relação a outros alvos. Quanto maior o valor do índice de seletividade, maior a preferência da droga por seu alvo específico, tornando-a potencialmente mais segura e eficaz para um tratamento (Katsuno et al., 2015). Os valores de índice de seletividade maiores que 10 indicam uma seletividade dez vezes maior do composto para com as leveduras do que para com as células hCMEC/D3. As substâncias RN18, RN40, RN86, RN88, RN104, RN105, RJ37 e RVJ42 apresentaram um IS superior a 10, indicando uma alta seletividade. Já os derivados RN20, RN99, RN100, RN112 e RN113 apresentaram um índice de seletividade menor do que 10, indicando uma possível toxicidade às células não-alvo. Como comparação, o valor obtido de IS para o fluconazol foi superior a 90.

**Tabela 5:** Índice de seletividade das 11 substâncias testadas e do fluconazol.

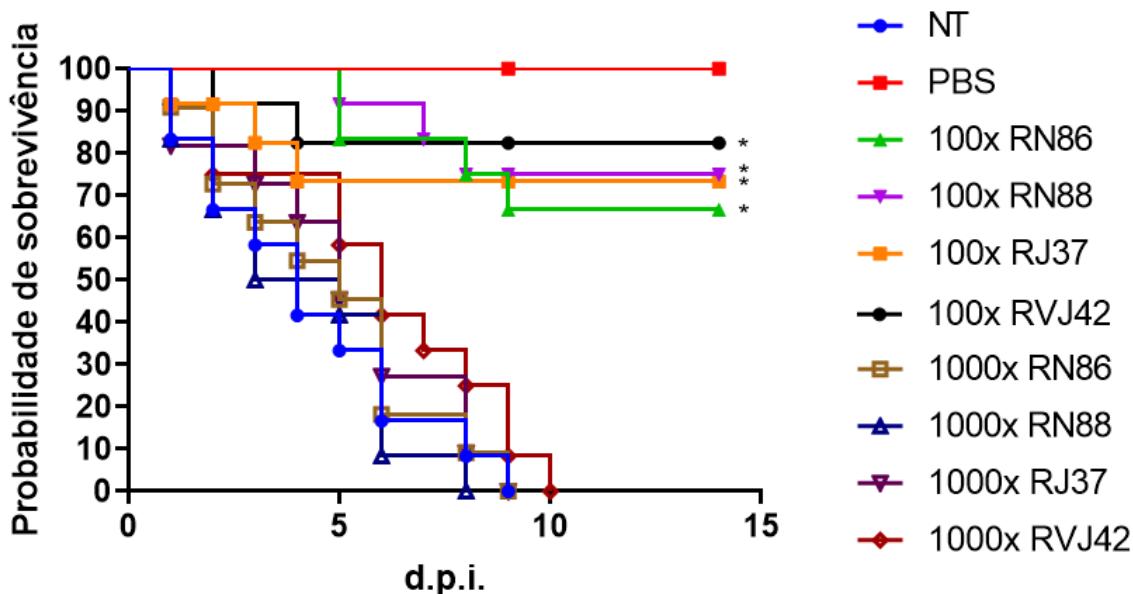
Índice de Seletividade													
RN18	RI20	RN40	RN86	RN88	RN99	RN100	RN104	RN105	RN112	RN113	RJ37	RVJ42	Fluconazol
32	1,5	128,2	64	31,6	0,4	2	2,9	24,1	1	6	750	500	96,5

### 5.2.2 Toxicidade em modelo de animal invertebrado

Além da análise da toxicidade através do IC<sub>50</sub> e do índice de seletividade, também foi realizado um experimento em modelo animal para avaliar os possíveis danos que os derivados poderiam causar de acordo com a concentração utilizada no tratamento além de avaliar também a interação da levedura com a droga.

Na curva de sobrevivência do modelo invertebrado (Figura 11), nenhum animal que recebeu somente o PBS veio a óbito. Todos os animais que receberam somente a levedura sucumbiram ao final de nove dias de infecção. Quando analisamos os animais que receberam os derivados na concentração de 100 vezes o CIM, observamos que estes conseguiram sobreviver à infecção, apresentando uma média de sobrevivência de 74,3% ao final dos 14 dias de observação do experimento. Já os grupos que receberam as drogas na concentração de 1000 vezes o CIM, morreram todos ao final de dez dias. Estes dados nos mostraram uma ausência de

toxicidade para tenébrios, além de indicar uma possível atividade *in vivo*, indicada mais adiante.



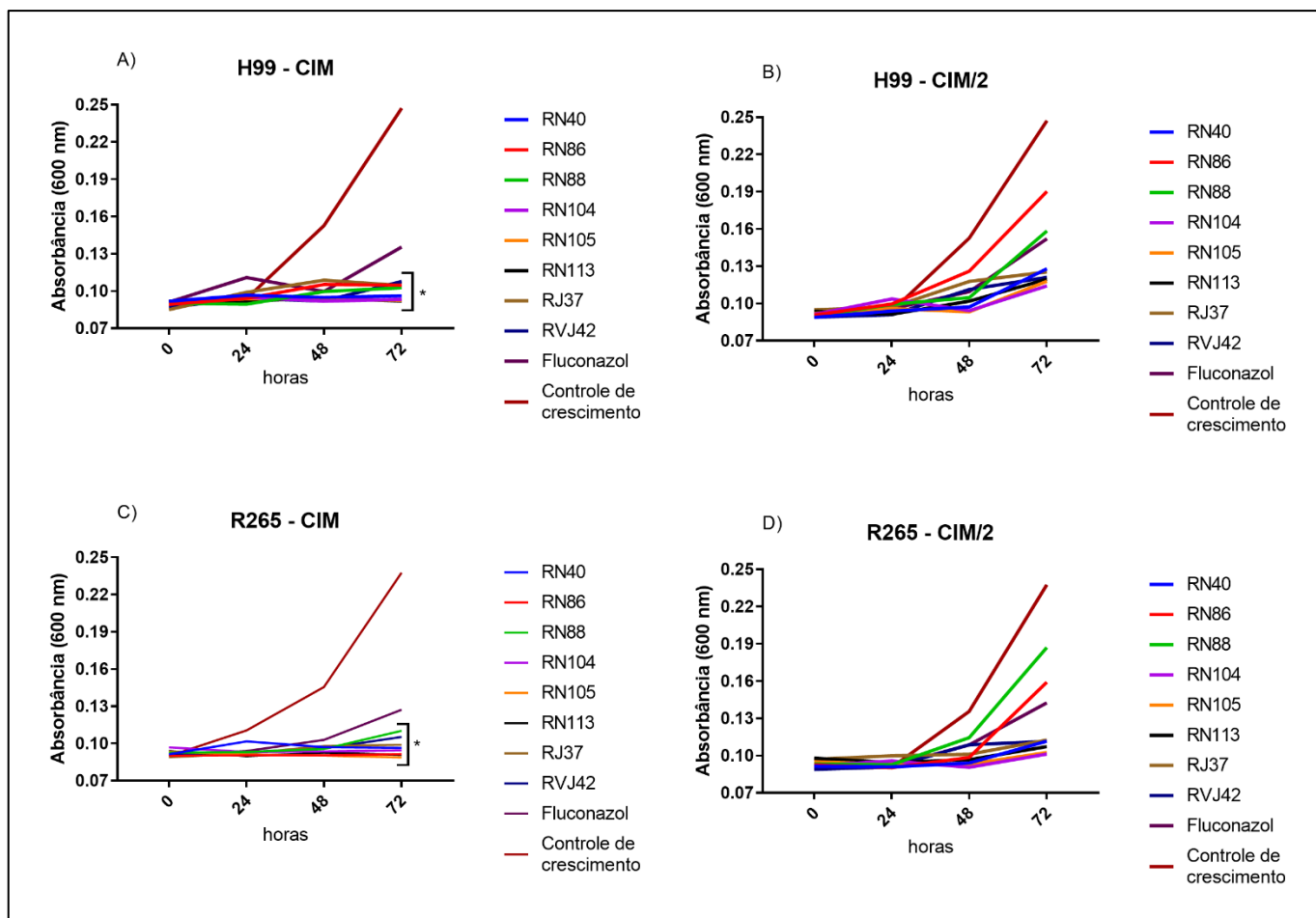
**Figura 11:** Gráfico de sobrevivência de *Tenebrio molitor* infectados com  $1 \times 10^5$  células de *Cryptococcus neoformans* H99 e tratados após 24 horas com os derivados tiazólicos. 100x: animais tratados com a droga na concentração de 100 vezes o CIM; 1000x: animais tratados com a droga na concentração de 1000 vezes o CIM; NT: não tratados. Análise estatística: curva feita pelo método Kaplan-Meier; análise estatística feita pelo teste *logrank*. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle não tratado.

## 5.2 Curva de crescimento

A figura 12 mostra os resultados das curvas de crescimento. Nestas, é observada a relação entre a concentração usada das drogas e a capacidade do fungo de crescer e se multiplicar. Usando como controle a curva do crescimento fúngico na ausência de drogas, é notável o aumento da carga fúngica após o período de 48 horas (Figura 12), sendo possível observar um crescimento exponencial até às 72 horas. É observado também que o fluconazol, mesmo na concentração de CIM, possibilita o crescimento do fungo uma vez que o mesmo possui ação fungistática.

Sob a ação dos tiazóis, os gráficos gerados nos mostram uma relação de dose-dependência. Na concentração d CIM, seu crescimento é inibido e, diminuindo a concentração para doses subinibitórias (CIM/2), a levedura consegue se multiplicar, mas ainda não chegando ao crescimento observado no controle de crescimento.

Analisando a área sob a curva, é possível afirmar quais derivados inibiram mais o crescimento total das leveduras ao longo das 72 horas. Para H99, os derivados RN104, RN113 e a RVJ42 foram os que mais inibiram nas concentrações de CIM e CIM/2. Já para a linhagem R265, os derivados RN86 e RN105 foram os que mais inibiram nas concentrações CIM e CIM/2.



**Figura 12:** Gráficos da curva de crescimento em meio RPMI para as linhagens *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 frente ao tratamento com os derivados de tiazol em concentrações inibitórias (CIM) e subinibitórias (CIM/2) por um período de 72 horas. Valores gerados em leitura na absorbância de 600 nm. Análise estatística: Área sob a curva e ANOVA seguida de pós-teste Tukey, \*  $p < 0,05$  em relação ao controle de crescimento.

### 5.3 Triagem químico-genética

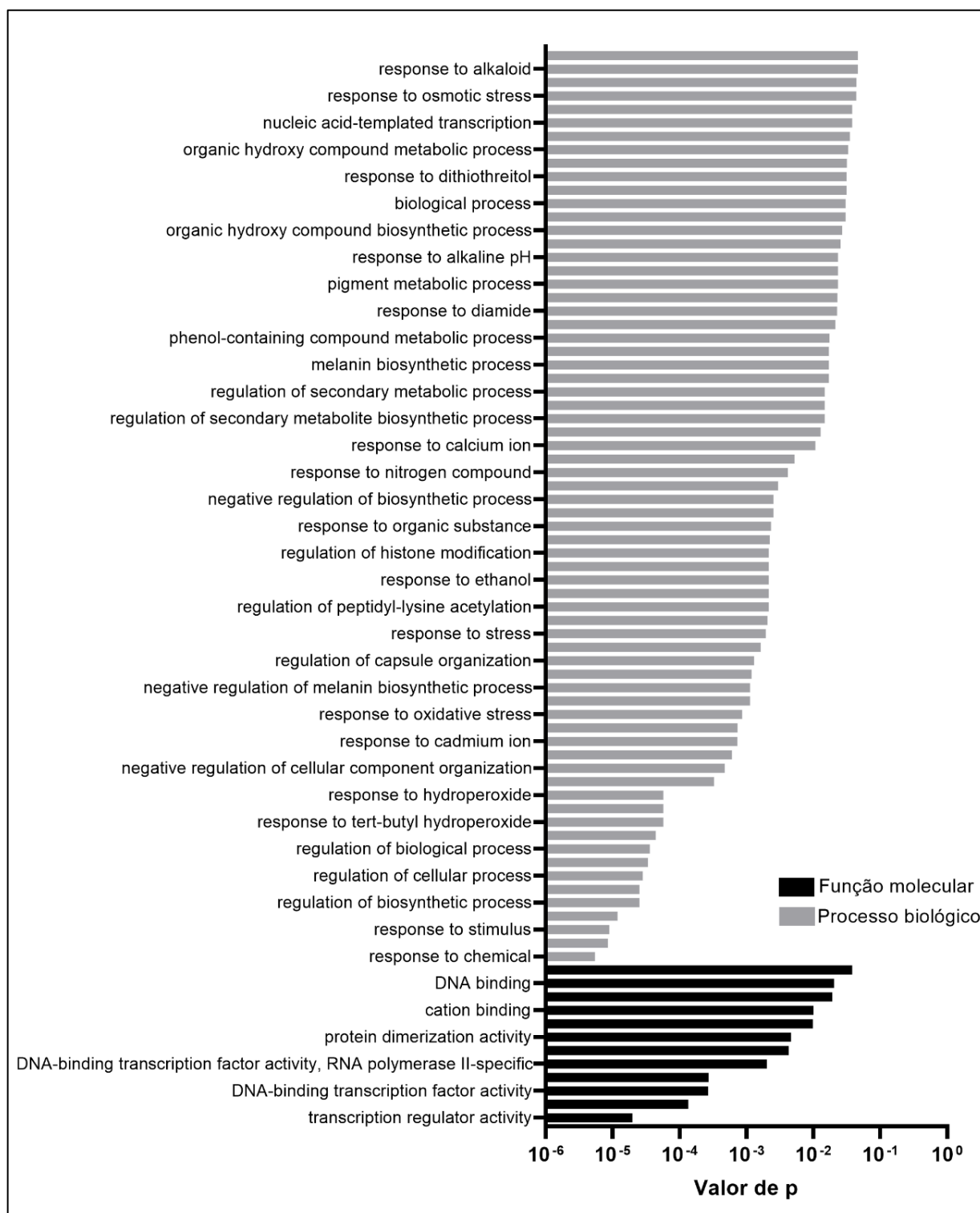
Para entendimento do mecanismo de ação, inicialmente foi realizada a triagem químico-genética, utilizamos os derivados RN86, RN88, RJ37 e RVJ42 para avaliar a resistência ou sensibilidade de uma coleção de mutantes de diversos fatores de transcrição. Após a realização dos testes, não foi observada a presença de nenhuma linhagem que era mais sensível a estes compostos testados, somente linhagens que apresentaram maior resistência quando comparadas ao controle *C. neoformans* H99. Com base do uso de ontologia gênica (GO), observamos quais processos biológicos e funções moleculares poderiam ter possibilitado esse

aumento na resistência frente às drogas testadas. A seguir somente serão apresentados os mutantes com genes já descritos e anotados, proteínas hipotéticas estão exibidas em anexo.

Na tabela 6 estão listados os mutantes e seus respectivos genes que foram resistentes à substância RN86 e que possuem um produto gênico já identificado à sua deleção. Através da análise de GO, podemos observar que as funções moleculares mais significativas envolvidas nessa resistência são atividades reguladora, coativadora e co-reguladora de transcrição, além de genes envolvidos na ligação de cátions. Sobre os processos biológicos, os mais significativos observados envolvem respostas a estresses e regulação negativa de processos celulares (Figura 13).

**Tabela 6:** Tabela com mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RN86, genes deletados e produtos gênicos correspondentes.

<b>Gene ID</b>	<b>Gene</b>	<b>Produto gênico deletado</b>
CNAG_00068	-	Specific RNA Polymerase II Transcription Factor
CNAG_00460	<i>LIV1</i>	Virulence Related Protein Of Unknown Function
CNAG_03902	<i>RDS2</i>	Regulator Of Drug Sensitivity 2, Putative
CNAG_05392	<i>ZAP104</i>	Specific RNA Polymerase II Transcription Factor
CNAG_01626	<i>ADA2</i>	Transcriptional Adapter 2-Alpha
CNAG_02700	<i>ZFC8</i>	C2H2 Type Zinc Finger Transcription Factor



**Figura 13:** Análise de ontologia genética para mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RN86. Termos de ontologia genética (GO) para a análise de funções moleculares (em preto) e processos biológicos (em cinza) com valores de  $p$  estatisticamente significativos.

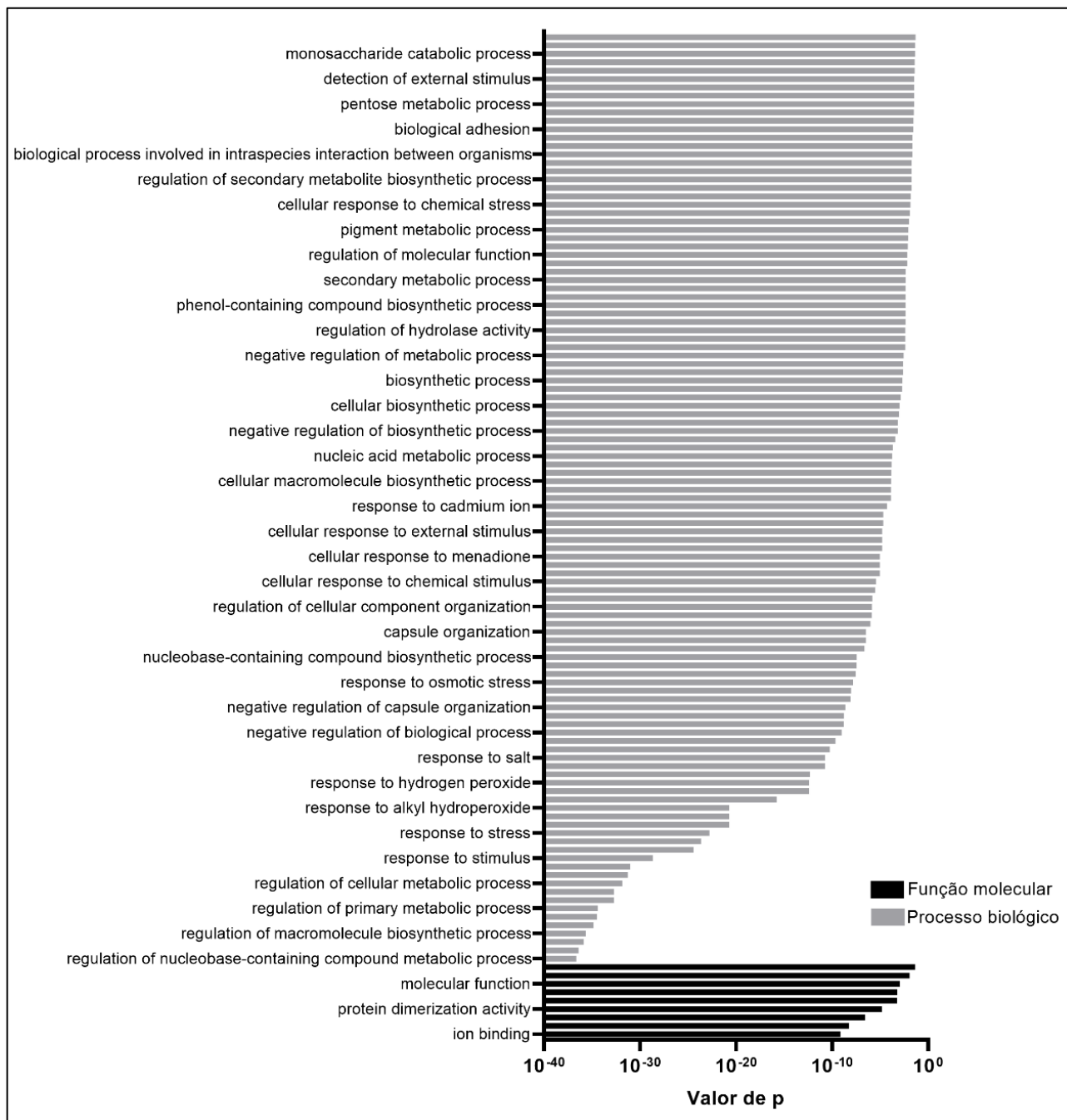
Sobre os mutantes resistentes ao derivado RN88 (Tabela 7, podemos observar que eles se apresentaram em uma maior quantidade quando comparado

aos resistentes ao RN86. Na análise de ontologia genética para funções moleculares, destacam-se genes com atividade de ligação a ácidos nucleicos (Figura 14). Para os processos biológicos, os genes de maior significância estão envolvidos com resposta a estresses, como oxidativo, químicos, a sais e osmóticos.

**Tabela 7:** Tabela com mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RN88, genes deletados e produtos gênicos correspondentes.

<b>Gene ID</b>	<b>Gene</b>	<b>Produto Gênico</b>
CNAG_02296	<i>RBK1</i>	ATP-Binding Protein
CNAG_05785	<i>STB4</i>	Putative Transcription Factor
CNAG_06425	<i>PPR1</i>	Fungal Specific Transcription Factor
CNAG_00068	-	Specific RNA Polymerase II Transcription Factor
CNAG_07924	<i>MCM1</i>	Pheromone Receptor Transcription Factor, Putative
CNAG_02555	<i>SIP402</i>	Putative Zn2-Cys6 Zinc-Finger Transcription Factor
CNAG_00896	<i>FZC34</i>	Transcription Factor
CNAG_06814	<i>SXI1alpha</i>	Alpha Cell-Type Homeodomain Transcription Factor
CNAG_01454	<i>STE12alpha</i>	Transcription Factor STE12
CNAG_03527	<i>HEL2</i>	Cytoplasmic Protein
CNAG_04268	<i>APN2</i>	Exodeoxyribonuclease III
CNAG_05420	<i>USV101</i>	Nutrient And Stress Factor 1, Putative
CNAG_03409	<i>SKN7</i>	Osmolarity Two-Component System, Response Regulator SKN7
CNAG_06483	<i>FZC25</i>	Hypothetical Protein
CNAG_02435	<i>BWC2</i>	White Collar 2 Protein
CNAG_00460	<i>LIV1</i>	Virulence Related Protein Of Unknown Function
CNAG_03902	<i>RDS2</i>	Regulator Of Drug Sensitivity 2, Putative
CNAG_04093	<i>YRM103</i>	Putative Transcription Factor
CNAG_03894	<i>PDR802</i>	Putative Zn2-Cys6 Zinc-Finger Transcription Factor
CNAG_03018	<i>ASG101</i>	Putative Zinc Finger Transcription Factor
CNAG_01973	<i>ZFC2</i>	C2H2 Zinc Finger Protein Zas1A
CNAG_03431	<i>FZC48</i>	Nuclear Protein
CNAG_07922	<i>FZC4</i>	Transcription Factor
CNAG_03366	<i>ZNF2</i>	C2H2 Type Zinc Finger Transcription Factor
CNAG_01948	<i>FZC36</i>	Nuclear Protein



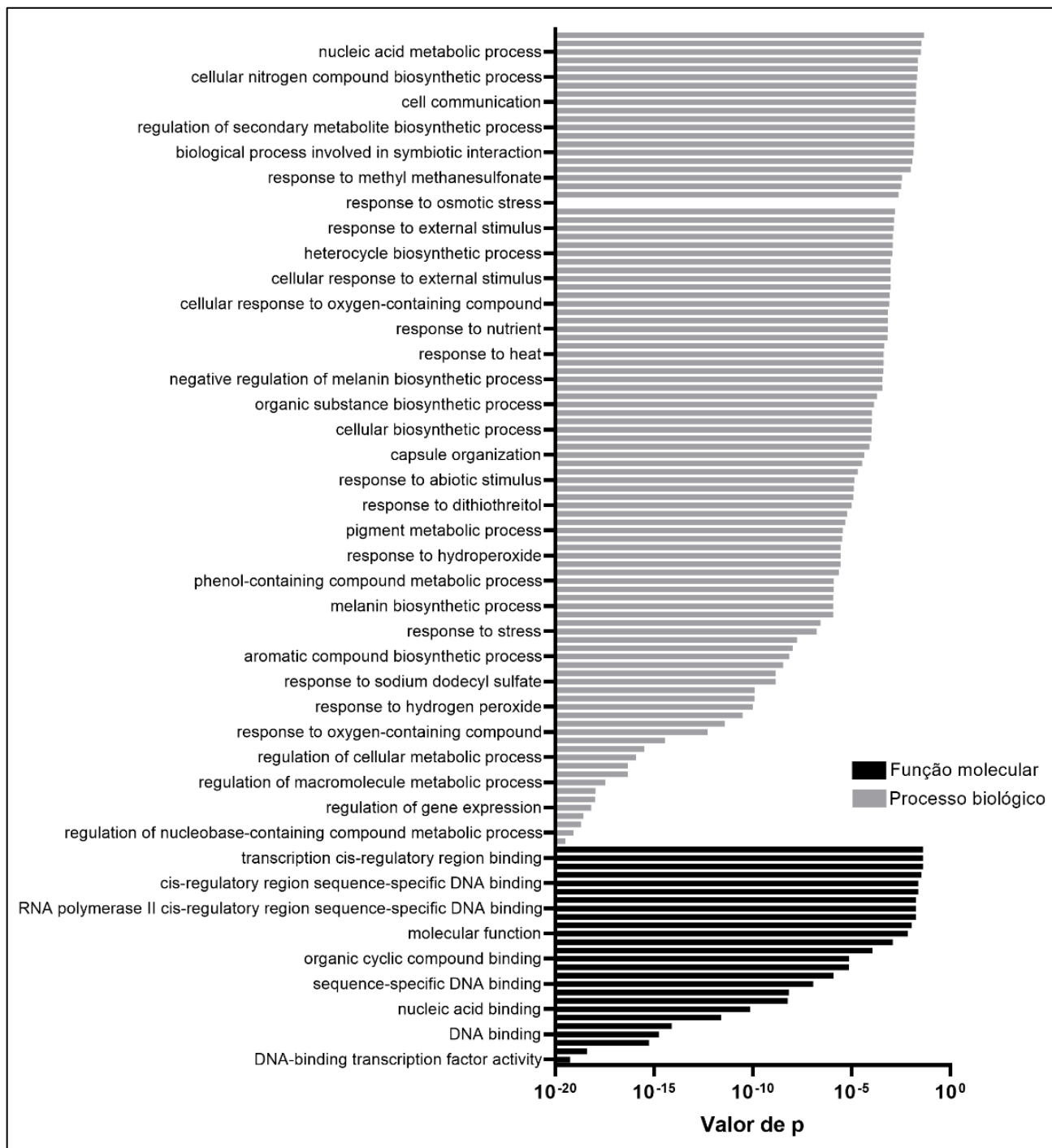


**Figura 14:** Análise de ontologia genética para mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RN88. Termos de ontologia genética (GO) para a análise de funções moleculares (em preto) e processos biológicos (em cinza) com valores de  $p$  estatisticamente significativos.

Os mutantes resistentes ao derivado RJ37 estão expostos na Tabela 8. Na análise de ontologia genética para os processos biológicos, os genes de maior significância estão envolvidos com resposta a estresses, como oxidativo, químicos, a sais e osmóticos (Figura 15).

**Tabela 8:** Tabela com mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RVJ37, genes deletados e produtos gênicos correspondentes.

<b>Gene ID</b>	<b>Gene</b>	<b>Produto gênico</b>
CNAG_00068		specific RNA polymerase II transcription factor
CNAG_00193	<i>GAT1</i>	GATA type zinc finger protein asd-4
CNAG_07506	<i>FAP1</i>	FKBP12-associated protein 1, putative
CNAG_02774	<i>MAL13</i>	Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain protein
CNAG_02603		early growth response protein 1
CNAG_06814	<i>SXI1alpha</i>	Alpha cell-type homeodomain transcription factor
CNAG_01438	<i>SWI6</i>	Cell-cycle box factor subunit SWI6, putative
CNAG_01173	<i>LAG1</i>	LAG1 family transcription factor, putative
CNAG_05785	<i>STB4</i>	putative transcription factor
CNAG_05861	<i>FKH101</i>	Fork head protein homolog 1, putative
CNAG_05861	<i>FKH101</i>	Fork head protein homolog 1, putative



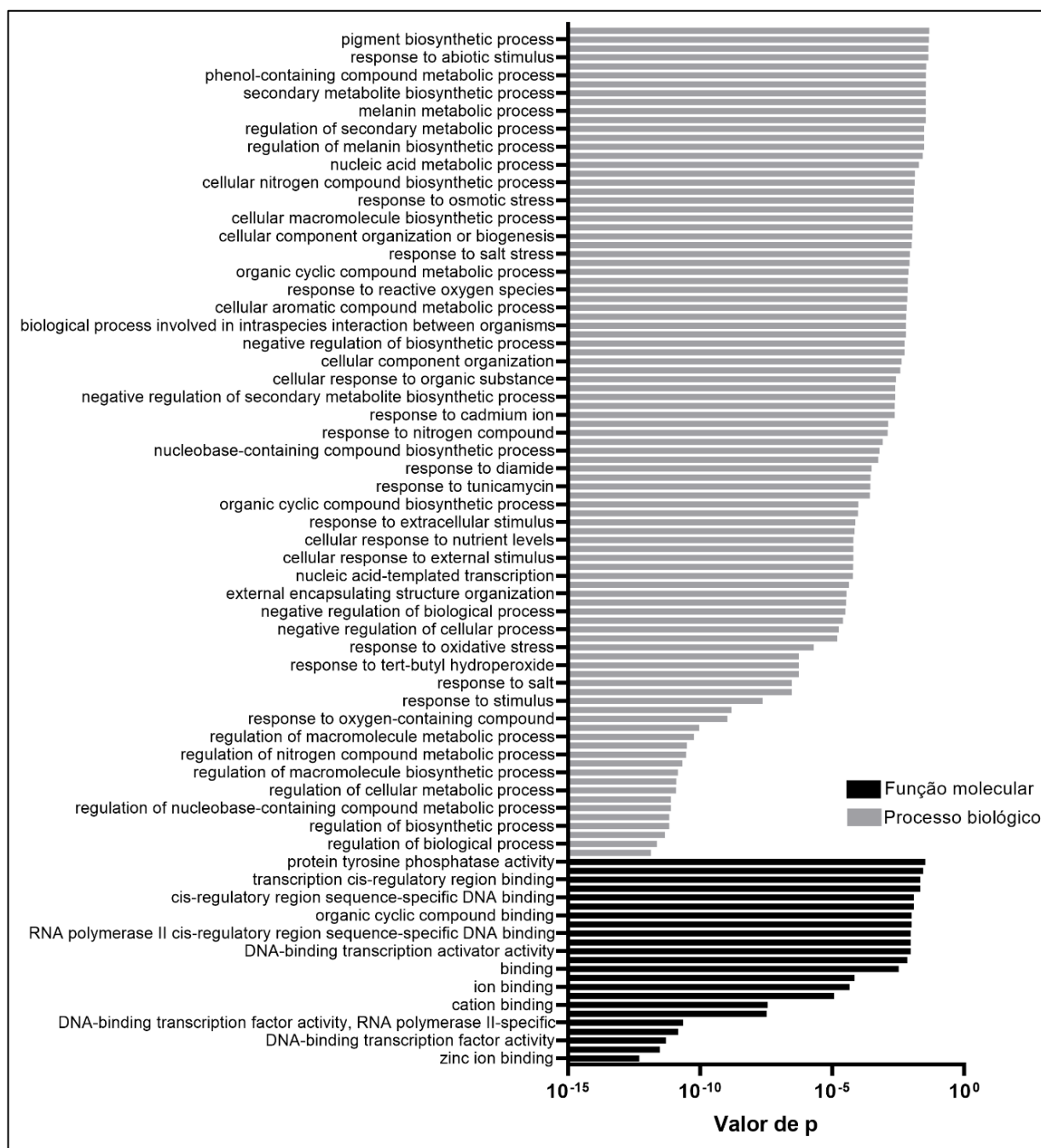
**Figura 15:** Análise de ontologia genética para mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RJ37. Termos de ontologia genética (GO) para a análise de funções moleculares (em preto) e processos biológicos (em cinza) com valores de  $p$  estatisticamente significativos.

Os mutantes resistentes ao derivado RVJ42 estão descritos na Tabela 9. Na análise de ontologia genética para os processos biológicos, os genes de maior significância estão envolvidos com um aumento em processos biológicos e também

na resposta a estresses, como oxidativo, a metais pesados, químicos e osmóticos (Figura 16).

**Tabela 9:** Tabela com mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RJ42, genes deletados e produtos gênicos correspondentes.

<b>Gene ID</b>	<b>Gene</b>	<b>Produto gênico</b>
CNAG_07506	<i>FAP1</i>	FKBP12-associated protein 1, putative
CNAG_07797	<i>CLR6</i>	transcriptional regulator
CNAG_07797	<i>CLR6</i>	transcriptional regulator, variant
CNAG_05222	<i>NRG1</i>	transcriptional regulator Nrg1
CNAG_01173	<i>LAG1</i>	LAG1 family transcription factor, putative
CNAG_06064	<i>PTP1</i>	Putative protein tyrosine phosphatase
CNAG_06425	<i>PPR1</i>	fungus specific transcription factor
CNAG_05538	<i>JJJ1</i>	DnaJ-like cochaperone



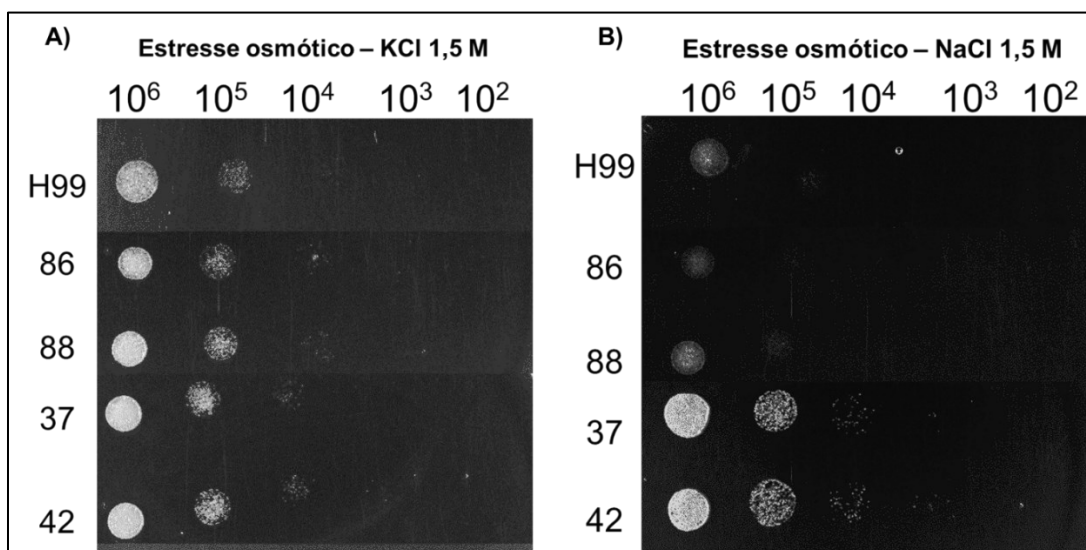
**Figura 16:** Análise de ontologia genética para mutantes de *C. neoformans* H99 resistentes ao derivado RVJ42. Termos de ontologia genética (GO) para a análise de funções moleculares (em preto) e processos biológicos (em cinza) com valores de  $p$  estatisticamente significativos.

#### 5.4 Avaliação do crescimento de linhagens de H99 previamente expostas aos derivados tiazólico sob o efeito de diversos estresses

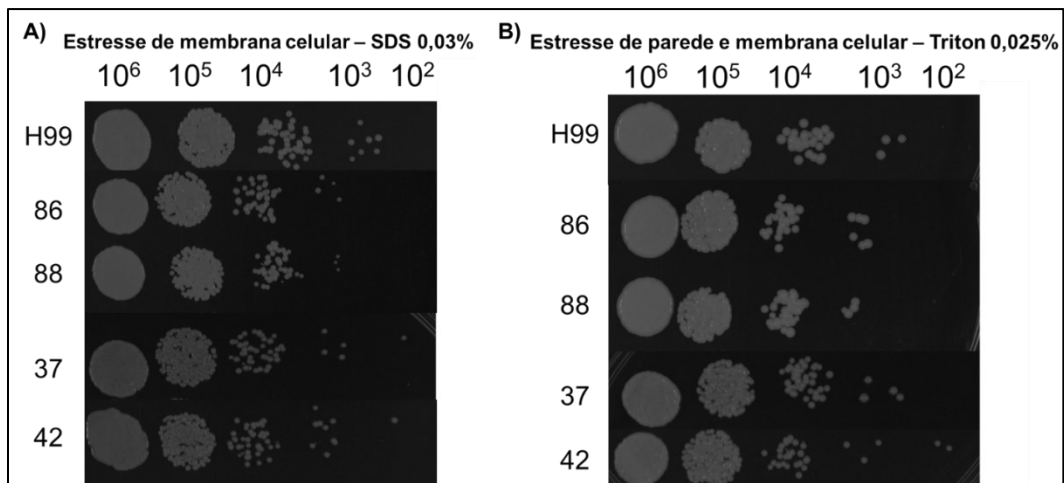
Consierando os resultados obtidos na triagem químico genética, verificamos que fatores de transcrição relacionados à resistência à diferentes estresses estão

envolvidos na resistência aos derivados tiazóis. Seguindo esta linha, a linhagem H99 foi exposta aos derivados tiazólicos e em seguida exposta a diferentes tipos de estresse. Para o estresse osmótico (KCl e NaCl), as linhagens previamente expostas a todos os tiazóis apresentaram maior crescimento em relação ao controle (Figura 17 A e 17 B). Para o estresse da membrana celular (SDS), as linhagens previamente expostas ao RJ37 e RVJ42 apresentaram maior crescimento quando comparadas ao controle (Figura 18 A). Para o estresse de membrana e parede celular (Triton), apenas a linhagem crescida em RVJ42 se destacou com um crescimento maior do que o controle (Figura 18 B). Já para o estresse de parede celular (Vermelho congo), todas as linhagens previamente expostas aos derivados apresentaram um crescimento maior quando comparadas ao controle (Figura 19 A). Estes dados confirmam os resultados da triagem químico-genética e mostram que o fungo apresenta diferentes mecanismos para sobreviver aos derivados tiazóis.

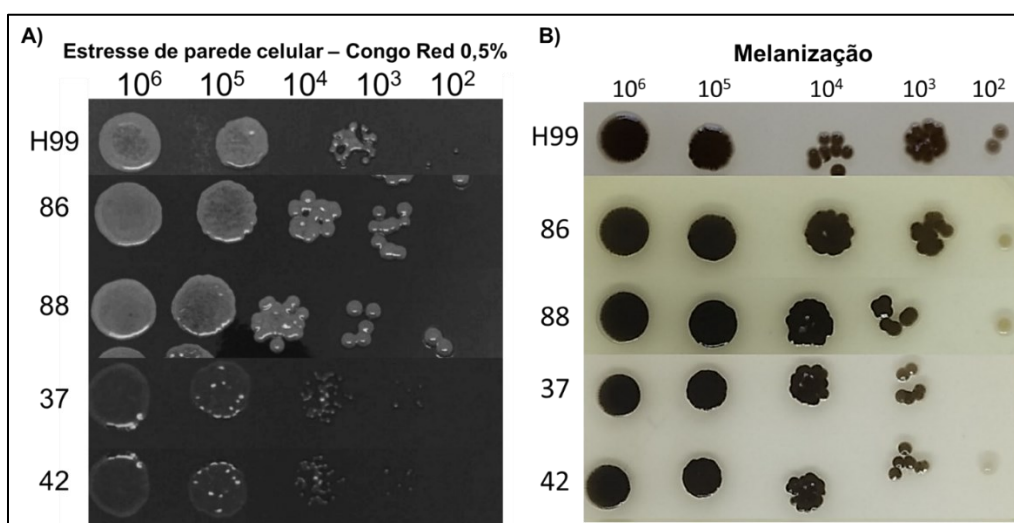
Por fim, para a melanização, é possível observar uma mudança no fenótipo de coloração para todas as linhagens previamente expostas aos derivados tiazólicos quando comparadas com o controle de crescimento (Figura 19 B).



**Figura 17:** Crescimento de linhagens de *C. neoformans* H99 sob estresse osmótico após exposição aos derivados tiazólicos com plaqueamento em diluição seriada de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^2$  células. Perfil de crescimento das linhagens em cloreto de potássio após exposição aos derivados (A) e perfil de crescimento das linhagens em cloreto de sódio após exposição (B).



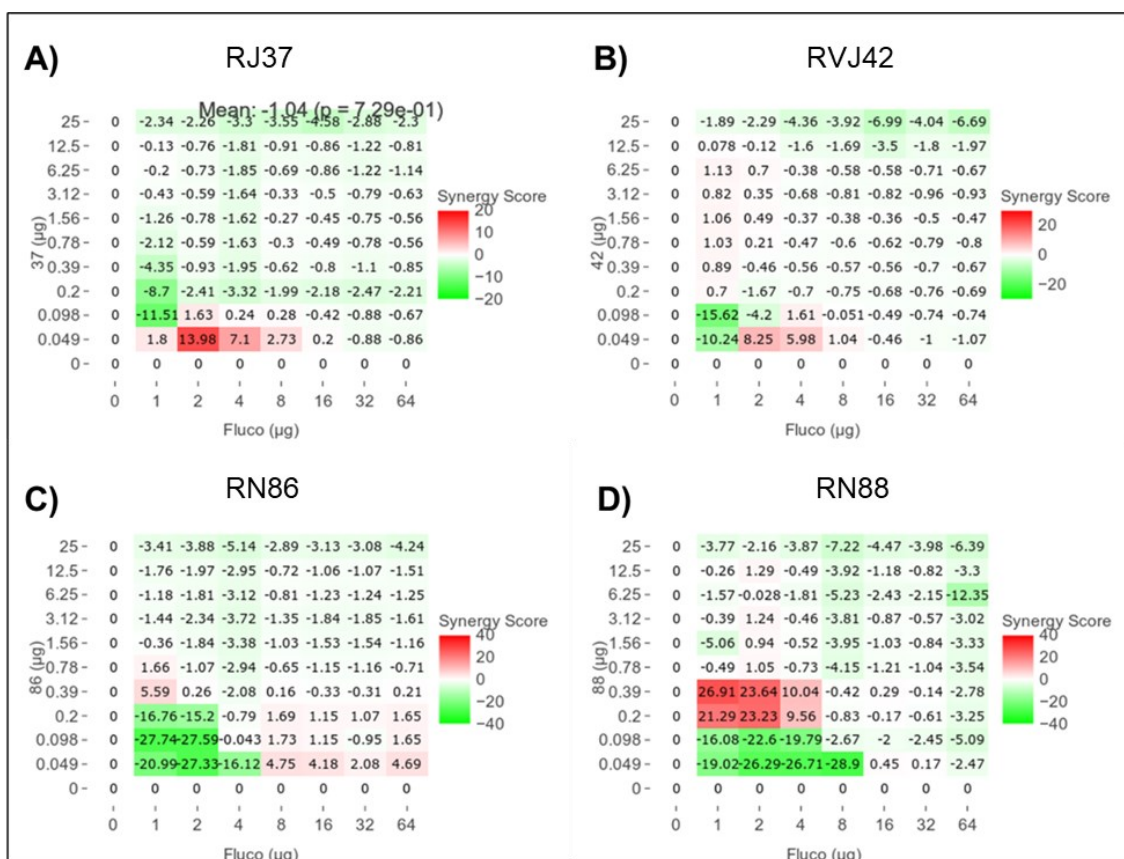
**Figura 18:** Crescimento de linhagens de *C. neoformans* H99 sob estresse de membrana e parede celular após exposição aos derivados tiazólicos com plaqueamento em diluição seriada de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^2$  células. Perfil de crescimento das linhagens em SDS após exposição aos derivados (A) e perfil de crescimento das linhagens em Triton após exposição (B).



**Figura 19:** Crescimento de linhagens de *C. neoformans* H99 sob estresse de parede celular e produção de melanina após exposição aos derivados tiazólicos com plaqueamento em diluição seriada de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^2$  células. Perfil de crescimento das linhagens em Vermelho Congo após exposição aos derivados (A) e perfil de crescimento das linhagens em meio mínimo com L-DOPA após exposição (B).

## 5.5 Sinergismo entre os derivados tiazólicos e anfotericina B ou fluconazol

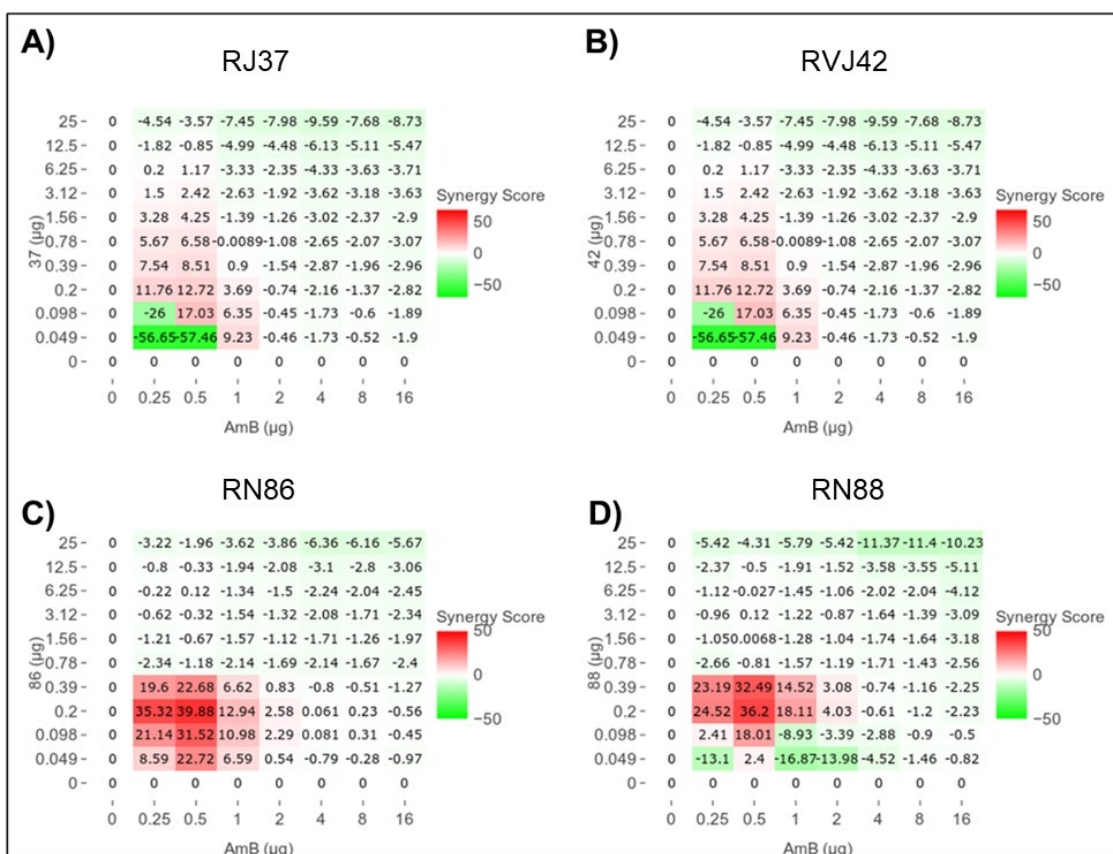
Os resultados da combinação entre os tiazóis com fluconazol e anfotericina B podem ser verificados nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Para os resultados com o fluconazol, é possível observar que a interação de antagonismo foi presente quando os dois fármacos estavam presentes nas maiores concentrações, entre 3,12 µg/mL e 25 µg/mL para os derivados e 2 µg/mL e 64 µg/mL para o fluconazol. Exceto para o composto RN86, o sinergismo foi observado em todas as combinações nas menores concentrações dos dois fármacos, entre 0,049 µg/mL e 0,098 µg/mL para os derivados e 1 µg/mL e 4 µg/mL para o fluconazol. Porém, para concentrações maiores, foi observado antagonismo.



**Figura 20:** Gráficos da interação entre diferentes concentrações dos derivados tiazólicos e o fluconazol. RJ37 em (A), RVJ42 em (B), RN86 em (C) e RN88 em (D). A coloração mais próxima ao vermelho indica uma relação de sinergismo enquanto que a mais próxima ao verde, de antagonismo. Gráficos gerados através da plataforma SynergyFinder 3.0.



Para os resultados com a anfotericina B, é possível observar que, assim como foi para o fluconazol, a interação de antagonismo foi presente quando os dois fármacos estavam presentes nas maiores concentrações, entre 3,12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para os derivados e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para a anfotericina B (Figura 21). Também como foi observado com o fluconazol, o sinergismo foi observado nas combinações nas menores concentrações dos dois fármacos, entre 0,049  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 0,78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para os derivados e 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para a anfotericina B.

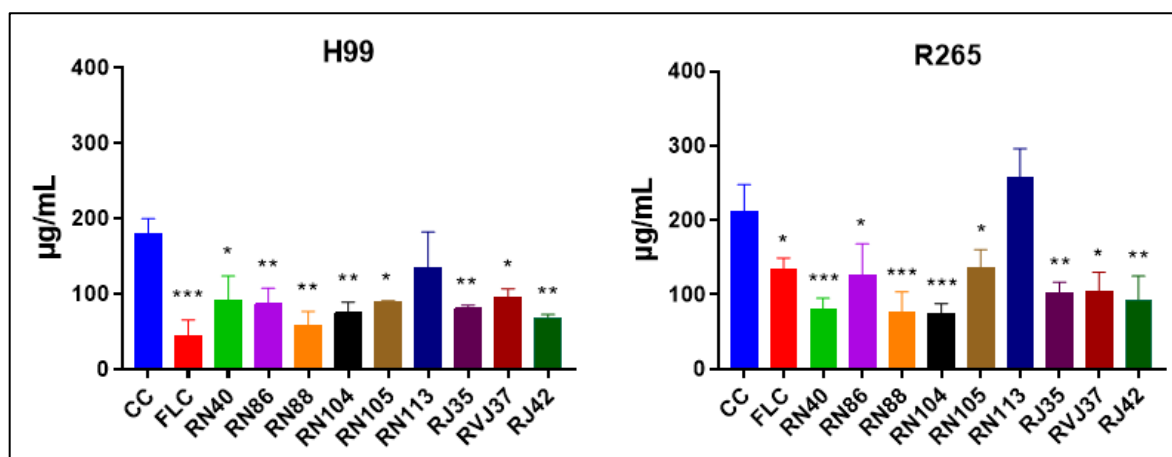


**Figura 21:** Gráficos da interação entre diferentes concentrações dos derivados tiazólicos e a anfotericina B. RJ37 em (A), RVJ42 em (B), RN86 em (C) e RN88 em (D). A coloração mais próxima ao vermelho indica uma relação de sinergismo enquanto que a mais próxima ao verde, de antagonismo. Gráficos gerados através da plataforma SynergyFinder 3.0.

Considerando que os mecanismos de ação de anfotericina B e fluconazol estão relacionados ao ergosterol, cogita-se uma provável competição entre estas substâncias com os derivados tiazóis aqui testados.

## 5.6 Quantificação do ergosterol

Após visualizar que pode haver antagonismo entre os tiazóis e antifúngicos que atuam no ergosterol, ou sobre a síntese deste, realizamos a quantificação de ergosterol. Após realizar o cálculo da curva-padrão para conseguir associar a absorbância obtida com uma concentração de fato do ergosterol, podemos observar o quanto deste estava presente em cada amostra (Figura 22). Para ambas as linhagens, o controle de crescimento apresentou valores similares de produção do esterol em análise. Também para as duas linhagens, o tratamento com o fluconazol diminuiu a produção da substância, assim como observado para todos os derivados utilizados, com exceção do RN113, que mantém uma quantidade produzida próxima ao controle de crescimento. Estes dados explicam, em parte, os resultados observados na combinação com fluconazol e anfotericina B. Uma redução nos níveis de ergosterol poderia reduzir alvos para ação de anfotericina B. Ao mesmo tempo, os tiazóis podem competir com fluconazol para exercer sua atividade.



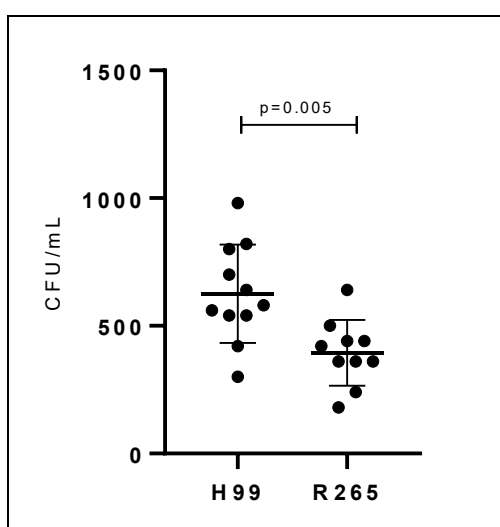
**Figura 22:** Gráfico da produção de ergosterol para as linhagens *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265 após tratamento com concentrações subinibitórias de fluconazol e dos derivados tiazólicos. F: Fluconazol; CC: controle de crescimento. Análise estatística: *one-way* ANOVA seguida de pós-teste Tukey; \*  $p < 0,05$  em relação ao controle de crescimento, \*\*  $p < 0,005$  em relação ao controle de crescimento, \*\*\*  $p < 0,0005$ .

## 5.7 Ensaios de transcitose

Neste t3pico, ser3o relatados os ensaios envolvendo o uso da metodologia com *transwell*. Al3m de um experimento inicial para avaliar a capacidade das linhagens de atravessarem a monocamada celular, t3m3m foram realizados experimentos para analisar o potencial de inibi33o de passagem que as drogas poderiam ter nas leveduras, o efeito de a33o dos derivados colocados antes e ap3s a barreira e a quantifica33o das mol3culas por CLAE/DAD. Somente as subst3ncias RN86, RN88, RJ37 e RVJ42 foram utilizadas.

### 5.7.1 Avalia33o da capacidade de transcitose das linhagens H99 e R265

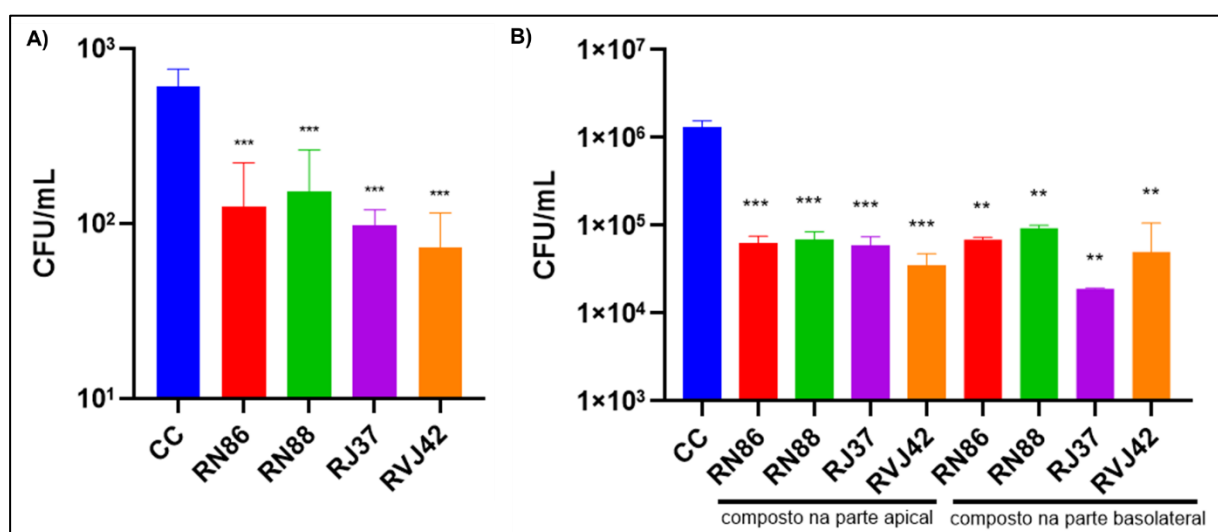
No primeiro ensaio de transcitose realizado, foi verificada a capacidade de cada linhagem em estudo atravessar, em 24 horas, a barreira formada pela hCMEC/D3. Os n3meros obtidos neste experimento mostraram uma maior capacidade da linhagem H99 em atravessar a barreira quando em compara33o com a R265. A m3dia de leveduras que conseguiram transpor a monocamada foi de 626 CFU/mL e 394 CFU/mL para H99 e R265, respectivamente (Figura 19). Estes n3meros obtidos corroboram com o observado na literatura (Sorrell et al., 2015) e em teste *in vivo*, uma vez que o neurotropismo 3 mais associado 3 H99 do que a R265. Com base nestes resultados, somente a linhagem H99 foi utilizada nos ensaios envolvendo a hCMEC/D3.



**Figura 23:** Carga fúngica obtida após ensaio de transcitose com a linhagem celular hCMEC/D3 e uso das linhagens *C. neoformans* H99 e *C. gattii* R265. Análise estatística: one-way ANOVA com pós teste de Tukey.

### 5.7.2 Ensaios de transcitose utilizando os derivados

Neste ensaio, os compostos foram selecionados, inicialmente, para dar continuidade e simular um possível tratamento de criptococose. É possível notar que a presença dos derivados diminuiu a quantidade de leveduras recuperadas na parte basolateral do sistema. Após 24 horas da adição das leveduras na parte apical, foi recuperada uma concentração de 606 CFU/mL na parte inferior para o controle de passagem sem a presença dos compostos e uma média de concentração de 101 CFU/mL para as leveduras em contato com os compostos. Avaliando individualmente a ação cada composto, obtivemos uma inibição de 79%, 74%, 83% e 87% para RN86, RN88, RJ37 e RVJ4 respectivamente (Figura 24 A).

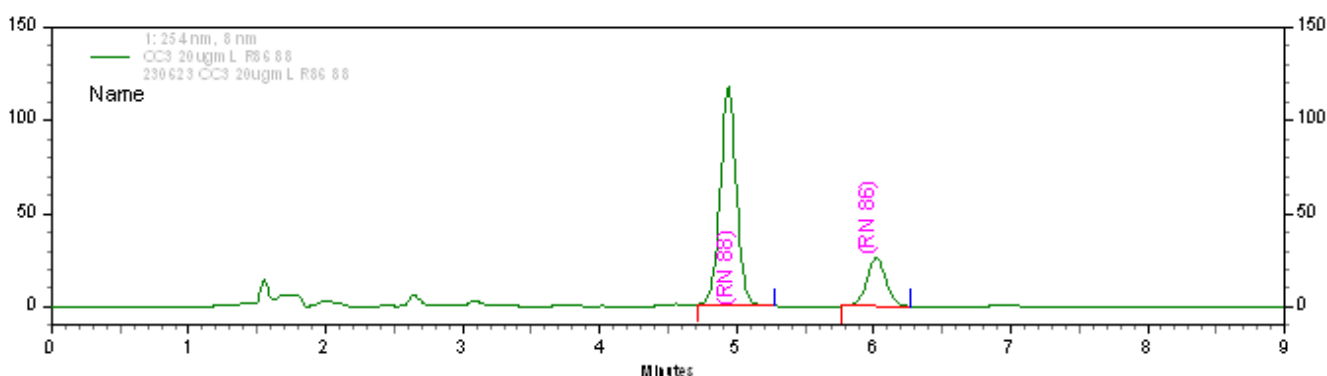


**Figura 24:** Gráfico da carga fúngica obtida após ensaio de transcitose da linhagem *C. neoformans* H99 na linhagem celular hCMEC/D3 juntamente dos derivados RN86, RN88, RJ37 e RVJ42. Em (A), tanto leveduras quanto os tiazóis foram adicionados na parte apical do sistema. Em (B), a levedura foi colocada na parte basolateral e os tiazóis colocados tanto na parte apical quanto na basolateral. Análise estatística: one-way ANOVA com pós teste de Tukey

Após verificada o efeito de inibição dos compostos na levedura quando colocados juntamente na porção apical do sistema, a próxima etapa foi verificar se realmente a droga estaria atravessando a monocamada celular e agindo na parte inferior do sistema. No controle de crescimento, como a levedura foi já colocada diretamente na parte basolateral, a quantidade recuperada após 24 horas do experimento foi maior quando comparada com os experimentos anteriores. Aqui foi obtida uma concentração de  $1,3 \times 10^6$  CFU/mL para o controle e uma média de  $5,6 \times 10^4$  CFU/mL para as leveduras nos poços onde os derivados foram colocados na parte apical e  $5,7 \times 10^4$  CFU/mL nos poços onde os derivados foram colocados na parte basolateral (Figura 24 B). Estatisticamente não houve diferença entre as metodologias, sendo, então, observado que os compostos adicionados na parte superior conseguiam agir diretamente nos fungos que já estavam na parte inferior.

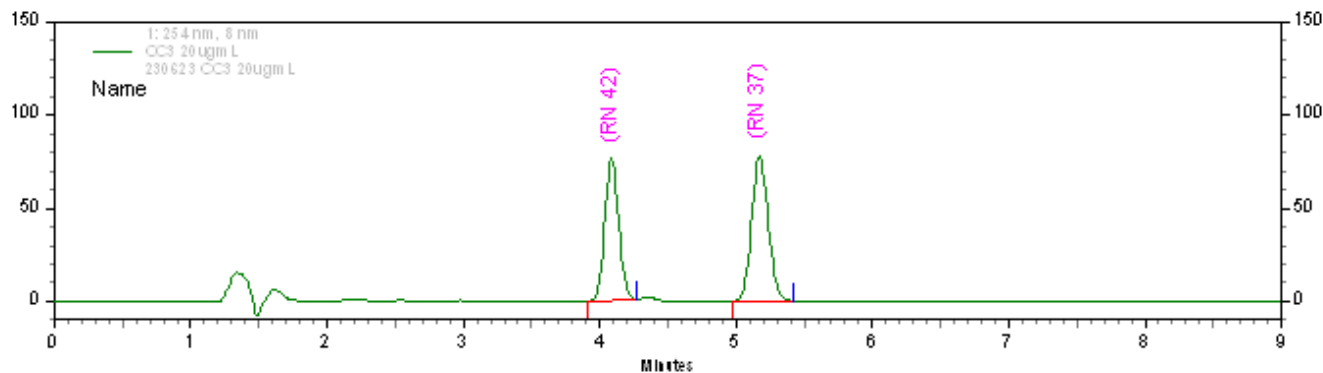
### 5.7.3 Quantificação dos derivados em amostras biológicas

Inicialmente, para conseguir quantificar as amostras biológicas, foi necessário a otimização do método anteriormente padronizado por Pierotte (2022). Para a metodologia utilizada nas moléculas RN86 e RN88, o tempo de retenção obtido foi de 5,7 e 4,6 minutos, respectivamente. O cromatograma obtido está representado na Figura 25. Os picos obtidos se apresentaram livres de impureza e isolados.



**Figura 25:** Cromatograma gerado na análise dos compostos RN86 e RN88 a 20 µg/mL nas condições otimizadas do método cromatográfico.

Para os compostos RJ37 e RVJ42, o cromatograma da Figura 26 foi obtido. Após padronização, os tempos de retenção obtidos foram de 5,12 minutos para RJ37 e 4 minutos para RVJ42. Ambos os picos se apresentaram livres de impureza e isolados.



**Figura 26:** Cromatograma gerado na análise dos compostos RJ37 e RVJ42 a 20 µg/mL nas condições otimizadas do método cromatográfico.

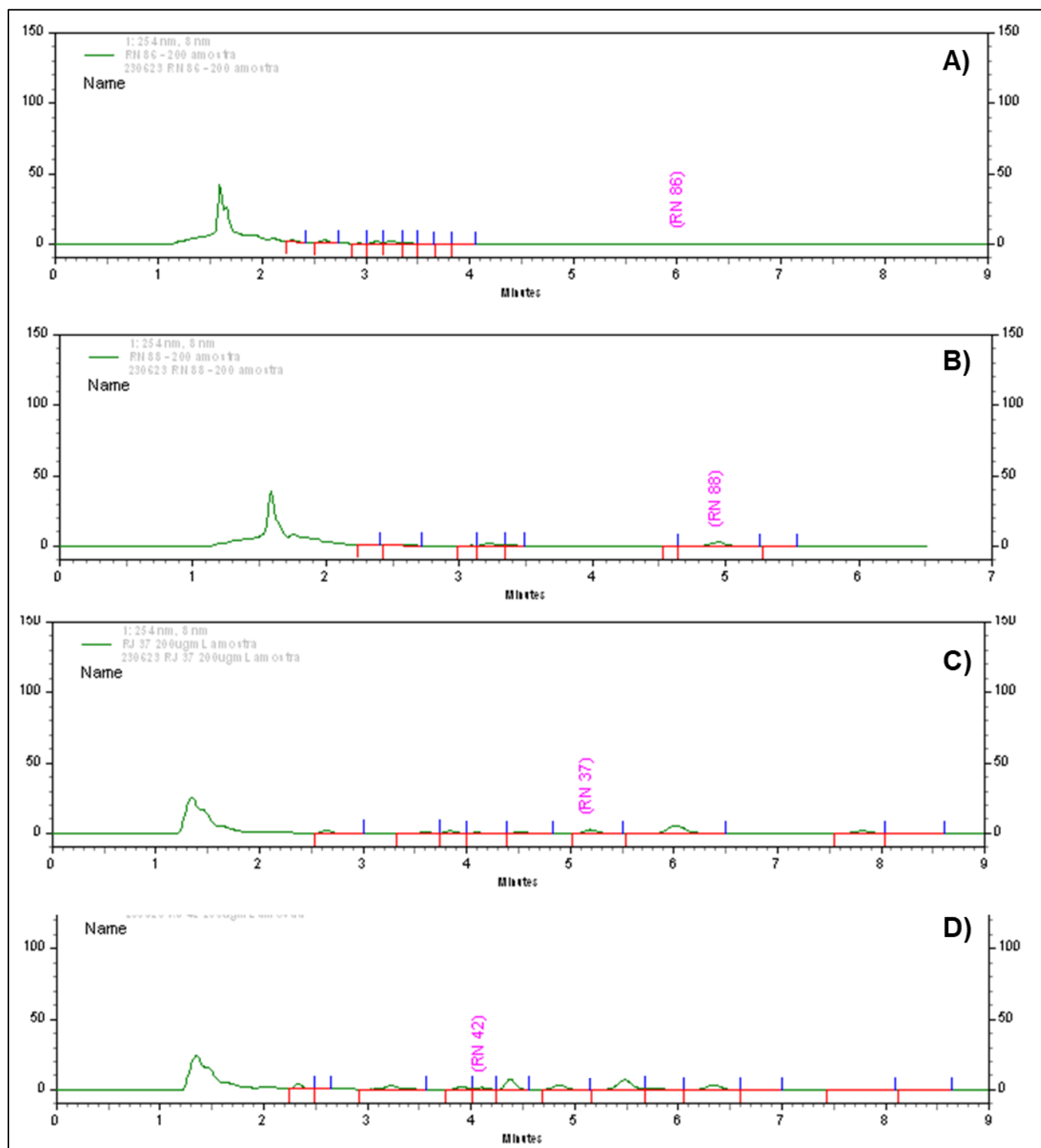
Na validação do método utilizando uma curva de calibração, foi utilizado o modelo de regressão  $y = ax + b$ , sendo  $y$  a área sob os picos de cada substância no cromatograma,  $a$  o coeficiente angular,  $x$  a concentração nominal dos compostos e  $b$  o coeficiente linear. As curvas de calibração para os quatro derivados foram aprovadas uma vez que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de todas foi maior do que 0,99, mostrando que o método aqui utilizado é preciso para as análises.

Por fim, na análise das amostras biológicas após as substâncias passarem pela monocamada de hCMEC/D3, os resultados expressos na Tabela 10 foram obtidos. Com o uso da curva de calibração, foi possível calcular a quantidade dos compostos presentes na amostra através da área sob a curva que seu pico possuía no cromatograma gerado. Comparando as concentrações adicionadas no início do experimento e as obtidas com a análise bioanalítica, a porcentagem da concentração inicial foi calculada.

**Tabela 10:** Relações de concentrações adicionadas no sistema de transwell na parte apical e depois obtidas na parte basolateral na análise através de cromatografia.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração adicionada (µg/mL)</b>	<b>Concentração obtida (µg/mL)</b>	<b>Porcentagem</b>
RN86	20	1,54	7,7
	200	1,69	0,8
RN88	20	1,03	5,2
	200	4,30	2,2
RJ37	20	0,58	2,9
	200	0,93	0,5
RVJ42	20	0,21	1,1
	200	0,43	0,2

Em todas as quatro moléculas foi observado uma maior porcentagem da concentração inicial nos experimentos utilizando 20 µg/mL dos derivados. A média obtida para a concentração de 20 µg/mL foi de 4,2%, enquanto que para as concentrações de 200 µg/mL, foi de 0,9%. Além disto, também foi calculado, utilizando o tempo de retenção, o quanto o pico da molécula representava em relação aos picos de outros resíduos obtidos no cromatograma (Figura 27). Foi observado um percentual de 1,6%, 2,3%, 4,8% e 5,2% para as moléculas RN86, RN88, RJ37 e RVJ42, respectivamente. Estes dados nos mostram que, apesar do efeito antifúngico dos derivados ser observado no uso do transwell, a permeabilidade dos mesmos e a porcentagem deles que ainda se mantém como as moléculas originais após a barreira é muito baixa.



**Figura 27:** Cromatogramas de amostras biológicas após o contato de 24 horas com uma monocamada de hCMC/D3 em sistema de *transwell*. A) RN86, B) RN88, C) RJ37 e D) RVJ42.



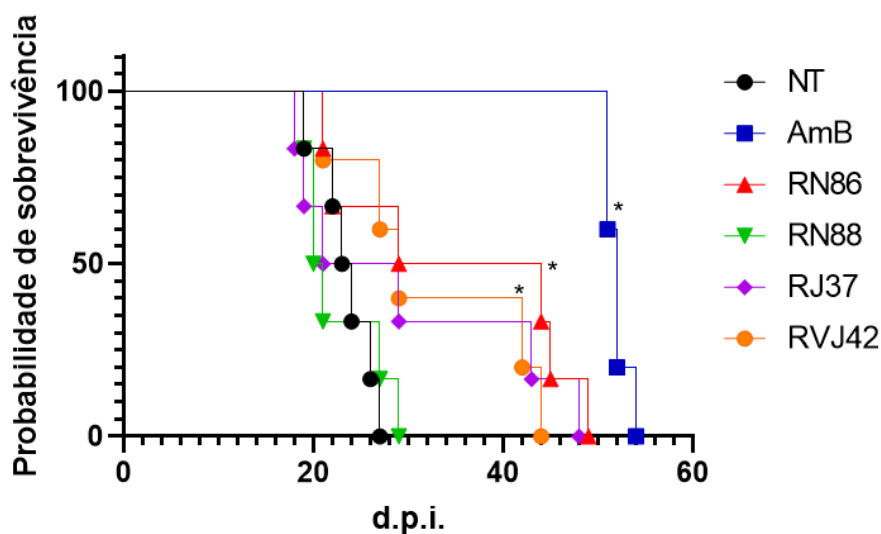
## 5.8 Ensaio *in vivo*

Além do ensaio de sobrevivência com o tratamento utilizando os derivados tiazólicos, é possível dividir em duas etapas os experimentos de análise de carga fúngica utilizando o modelo murino aqui realizados: o de infecção intracranial e o de infecção intratraqueal.

### 5.8.1 Sobrevivência em modelo murino

O primeiro experimento *in vivo* realizado foi o de sobrevivência em modelo murino de animais infectados com a linhagem H99 e tratados com os derivados tiazólicos (Figura 28). Os animais que foram infectados e não receberam nenhum tipo de tratamento vieram todos a óbito com 27 dias pós infecção (d.p.i.), com um tempo de 50% de letalidade ( $L_{50}$ ) de 24 dias. Além da anfotericina B, os compostos RN86 e RVJ42 prolongaram o tempo de sobrevivência dos animais infectados, com os animais tratados com a anfotericina B indo a óbito com 54 d.p.i. e os tratados com RN86 e RVJ42 com 49 e 44 d.p.i., respectivamente. O derivado RJ37 não apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo não tratado, mas os animais tratados com ele tiveram uma mortalidade tardia, com todos morrendo passados 48 d.p.i.. A anfotericina B apresentou um  $L_{50}$  de 52 dias e os derivados RN86 e RVJ42 de 29 e 27 dias, respectivamente.

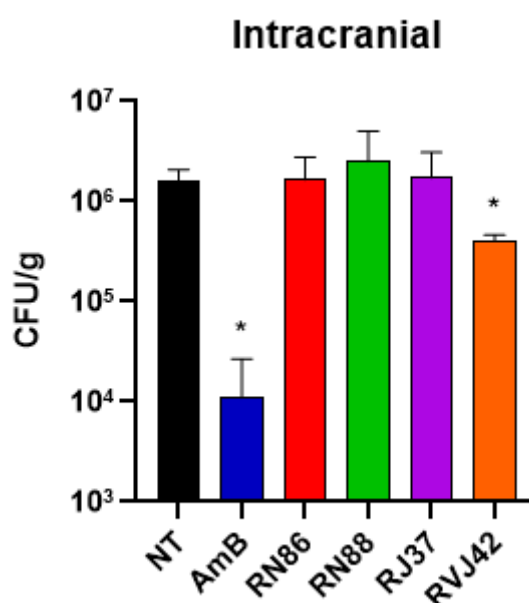
Com os dados obtidos neste experimento, também escolhemos os tempos para a eutanásia dos animais que seriam avaliados para a carga fúngica: 5 dias para os infectados via intracranial e 10 dias para os infectados via intratraqueal.



**Figura 28:** Curva de sobrevivência em modelo murino C57BL/6 após infecção intratraqueal com  $1 \times 10^5$  partículas de *C. neoformans* H99 e tratamento com anfotericina B ou tiazóis. Análise estatística: curva feita pelo método Kaplan-Meier; análise estatística feita pelo teste *logrank*. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle não tratado.

### 5.8.2 Carga fúngica em modelo de infecção intracraniana

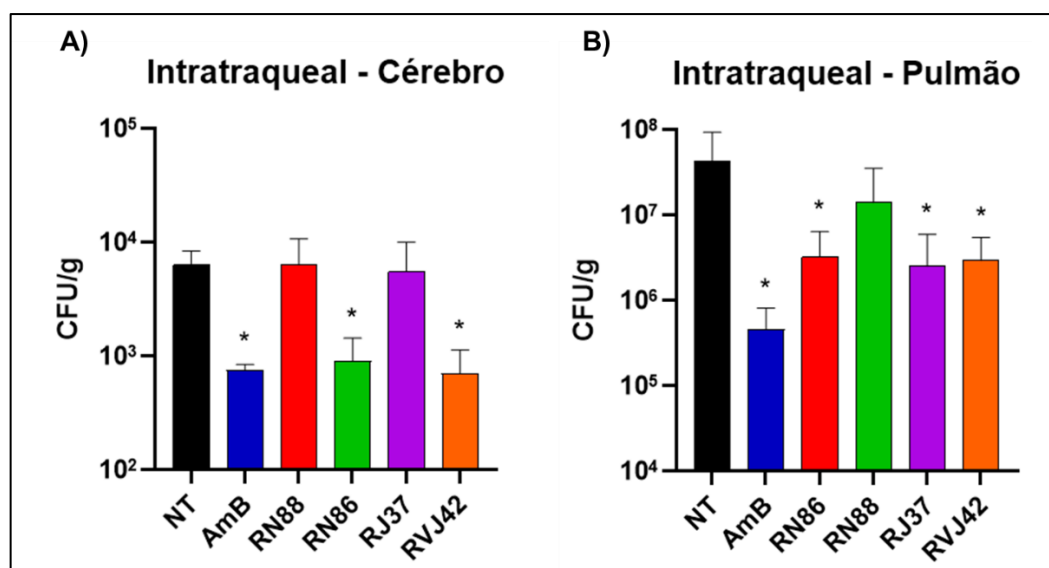
Uma vez determinado o tempo de letalidade da levedura, o próximo passo foi analisar a carga fúngica obtida no cérebro após cinco dias de uma infecção intracranial (Figura 29). A carga fúngica obtida para os animais que receberam o tratamento com a anfotericina B foi bem menor quando comparada com a dos animais que não receberam tratamento,  $1,09 \times 10^4$  e  $1,61 \times 10^6$  UFC/g, respectivamente. Para os animais que receberam tratamento com os derivados tiazólicos, a média de carga fúngica recuperada foi de  $1,55 \times 10^6$  CFU/g. Os animais tratados com a RVJ42 tiveram uma redução da carga fúngica quando comparada com o controle não tratado.



**Figura 29:** Avaliação da carga fúngica obtida no cérebro após 5 dias de infecção intracranial com  $1 \times 10^3$  células de *C. neoformans* H99 e tratamento diário com anfotericina B ou os derivados tiazólicos. NT: grupo não tratado. Análise estatística: teste *t* paramétrico; \*  $p < 0,05$  em relação ao controle de crescimento

### 5.8.3 Carga fúngica em modelo de infecção intratraqueal

Para finalizar, a carga fúngica do pulmão e cérebro de animais infectados por via intratraqueal após dez dias também foi analisada. Para a carga fúngica obtida no cérebro (Figura 30 A), além dos animais tratados com anfotericina B, os que receberam a RN86 e RVJ42 também tiveram a carga fúngica diminuída quando comparado com os animais que não receberam tratamento (NT). A média da carga fúngica recuperada nos animais NT foi de  $6,3 \times 10^3$  CFU/g. Para os grupos tratados e que apresentaram diminuição na carga fúngica, as médias foram de 746, 899 e 696 CFU/g para anfotericina B, RN86 e RVJ42, respectivamente. Os animais que receberam RN88 e RJ37 não apresentaram queda na carga fúngica recuperada do cérebro.




**Figura 30:** Avaliação da carga fúngica no cérebro e pulmão após 10 dias de infecção intratraqueal com  $1 \times 10^5$  células de *C. neoformans* H99 e tratamento diário com anfotericina B ou derivados tiazólicos. Determinação de UFC/g no cérebro (A) e UFC/g no pulmão (B) após 10 dias de infecção. NT: grupo não tratado. Análise estatística: one-way ANOVA seguida de pós-teste Tukey; \*  $p < 0,05$  em relação ao controle de crescimento.

Para finalizar, a carga fúngica do pulmão dos grupos que foram tratados com anfotericina B, RN86, RJ37 e RVJ42 são estatisticamente menores quando comparado com o grupo NT (Figura 30 B). A média da carga fúngica recuperada nos animais NT foi de  $4,2 \times 10^7$  CFU/g. Para os grupos tratados e que apresentaram diminuição na carga fúngica, as médias foram de  $4,5 \times 10^5$ ,  $3,2 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^6$  e  $2,9 \times 10^6$  CFU/g para anfotericina B, RN86, RJ37 e RVJ42, respectivamente. O grupo tratado com RN88 não apresentou queda na carga fúngica recuperada do pulmão.

## 5.9 Síntese de resultados

Os resultados obtidos neste estudo estão resumidos e esquematizados no *heatmap* a seguir (Figura 31), conforme variável analisada para os derivados tiazólicos. A coloração mais próxima do vermelho indica uma alta eficiência para o resultado obtido no experimento listado para cada um dos compostos, enquanto a mais azulada indica um baixo valor de eficiência.

	RN86	RN88	RJ37	RVJ42
CIM	Red	Red	Red	Red
Seletividade	Red	Red	Red	Red
Toxicidade <i>in vivo</i>	Blue	Blue	Blue	Blue
Inibição da produção de ergosterol	Red	Red	Red	Red
Resistência a estresse osmótico	Red	Red	Red	Red
Resistência a estresse de membrana e parede celular	Red	Red	Red	Red
Inibição de crescimento fúngico em sistema de transwell	Red	Red	Red	Red
Prolongamento da sobrevivência de animais com criptococose	Red	Blue	Red	Red
Diminuição da carga fúngica no cérebro	Red	Blue	Blue	Red
Diminuição da carga fúngica no pulmão	Red	Blue	Red	Red



**Figura 31:** Sumário dos resultados obtidos neste trabalho. A coloração vermelha indica uma alta eficiência para o resultado obtido no experimento listado para cada um dos compostos, enquanto que a azul indica um baixo valor de eficiência.

## 6. Discussão

Sendo uma doença negligenciada, é difícil obter números absolutos para a criptococose, mas cálculos e estimativas apontavam cerca de 950.000 casos anuais de meningite criptocócica ao redor do mundo, resultando em mais de 600.000 mortes após um período de infecção de média de 90 dias (Rajasingham et al., 2022). Após a inclusão da terapia moderna com antirretrovirais, este número caiu consideravelmente, cerca de 220 mil casos de criptococose são confirmados por ano, além de um total de 200 mil mortes (Rajasingham et al., 2017). A forma fatal mais comumente observada da doença é a meningite criptocócica como doença oportunista em indivíduos imunocomprometidos HIV-positivos (Sloan et al., 2014), mas o número de mortes vem caindo consideravelmente após a implementação da terapia antirretroviral moderna (Hevey et al., 2019). A maior taxa de letalidade é observada em regiões em desenvolvimento, como a África subsaariana, e as menores em regiões mais desenvolvidas, como Oceania e Europa central. A etiologia da criptococose está mais comumente relacionada ao *C. gatti* e *C. neoformans*, com infecções no SNC mais associadas ao *C. neoformans*, enquanto que *C. gatti* é mais correlacionado com infecções no trato respiratório. O tratamento para a meningite criptocócica enfrenta grandes problemas, como o alto custo dos medicamentos, a escassez de drogas efetivas disponíveis, dificuldades logísticas de distribuição e alta toxicidade durante o tratamento (Iyer et al., 2021). Tendo isso em vista, a busca por novos agentes antifúngicos vem se tornando cada vez mais necessária, seja para aperfeiçoar ainda mais o tratamento como também para diminuir os ônus causados pelos já disponíveis.

Os tiazóis heterocíclicos são compostos com alta atividade biológica, com eficácia já demonstrada em ensaios contra protozoários e microorganismos e também envolvendo o tratamento de câncer e de diabetes mellitus (Chimenti et al., 2011; Gomes et al., 2016; de Santana et al., 2018; Solangi et al., 2022). Comercialmente, alguns tiazóis já são vendidos como fungicidas, pesticidas e preservativos na agricultura, como o tiabendazol (*Reregistration Eligibility Decision For Thiabendazole And Salts – EPA, U.S.A., 2002*). Como antifúngico, diversos artigos já demonstraram a eficiência dos tiazóis contra espécies com importância clínica de *Candida* e *Cryptococcus* e também *Paracoccidioides brasiliensis* (Sá et al.,

2015, 2017, 2018; Cruz et al., 2018; Lino et al., 2018), exibindo um perfil de concentração de atividade semelhante a de drogas como a anfotericina B e fluconazol. Neste trabalho, o efeito antifúngico dos compostos utilizados foi observado, seja na inibição direta do crescimento ou então na alteração de processos biológicos das leveduras.

Primeiramente, nos ensaios realizados de concentração inibitória mínima (Tabela 2) e de curva de crescimento (Figura 11), é possível notar a capacidade de inibição do crescimento fúngico das linhagens analisadas e também o efeito fungicida que as drogas possuem sobre elas, semelhante ao efeito encontrado na anfotericina B. Essa capacidade de inibição observada apresentou um padrão de dose-dependência, aumentando a ação inibitória com o aumento das concentrações testadas, até cessar completamente o crescimento. Com isso, essas drogas seguiram para diferentes testes para a identificação de possíveis alvos destas moléculas como também para analisar a interação destas com a capacidade de transmigração celular das leveduras.

A melanina é um pigmento presente na parede celular de *Cryptococcus* spp., sendo fortemente associada com a virulência dos mesmos (Kwon-Chung et al., 1982; Salas et al., 1996; Fanzot et al., 1998) e na sua disseminação do pulmão para o SNC (Williamson et al., 1998; Noverr et al., 2004). A melanina é produzida através da enzima lacase, que oxida componentes exógenos ao fungo, usualmente um dihidroxifenol ou poliaminobenzeno, em uma via que culmina em sua síntese (Ito, 1993). O sistema nervoso central é abundante em catecolaminas, como os hormônios dopamina e adrenalina, compostos aminobenzenicos que podem servir para esse tropismo ao SNC que é observado. Os resultados aqui obtidos nos mostram que a maioria dos derivados utilizados diminuiu a produção visual deste pigmento, resultando em colônias com um fenótipo mais esbranquiçado quando comparadas com o controle. A causa dessa diminuição da melanização ainda será investigada, ou se os derivados testados diminuiriam a velocidade de sua produção ou se está relacionado a uma ação direta em sua síntese. Este resultado nos aponta uma possível via para o uso destes derivados, uma vez que interferindo em um importante fator de virulência do fungo, este pode ser menos danoso ao seu hospedeiro e também mais susceptível a resposta imune.

A triagem químico-genética é um importante ensaio que permite uma visualização em um grande espectro de como uma droga age em uma célula. Ao se analisar todos os mutantes que foram resistentes às drogas testadas, é possível observar os genes envolvidos, podendo começar a entender os mecanismos envolvidos na ação das drogas utilizadas.

Para os derivados RN86, RN88, RJ37 e RVJ42, foram observados mutantes com 12 genes envolvidos no aumento da espessura capsular (*CLR1*, *USV101*, *SKN7*, *FZC51*, *FZC14*, *ZFC3*, *FZC49*, *FZC17*, *FZC36*, *HLH4*, *FZC46* e *NGR2*) (Jung et al., 2015). Já foi mostrado que um aumento da espessura capsular está diretamente relacionado a um aumento na resistência a diversas drogas, sendo a capsula a primeira barreira física que os compostos encontram ao interagir com a levedura (Zafar et al., 2019).

Para os compostos RN86 e RN88, seis genes envolvidos na resistência a metais pesados (*ZFC3*, *ADA2*, *CLR1*, *RDS2*, *SIP4* e *ZNF2*). Na natureza, a resistência a metais-pesados está diretamente relacionada com um aumento na produção de melanina (García-Rivera & Casadevall, 2001), mas essa correlação não é observada para estes mutantes. Outra explicação para a resistência a metais pesados já foi observada em leveduras que utilizam ATPases como bombas de extrusão para eliminar íons de seu interior (Mielniczek-Pereira et al., 2011; Toh-E et al., 2022). Também foram observados 5 genes envolvidos na resistência a tunicamicina (*ZFC3*, *PPR1*, *HEL2*, *ZFC2* e *CLR1*). A tunicamicina é bastante utilizada como um estressor do retículo endoplasmático (RE) e ativador da via de resposta a proteínas mal-formadas, sendo diretamente relacionada com morte celular (Iwawaki et al., 2004).

Para somente o derivado RN88, tres mutantes com genes ligados ao aumento de resistência ao DTT (dithiothreitol) (*GAT203*, *STB4* e *HLH1*) e tres genes relacionados com aumento da produção de urease (*HOB4*, *SXI1alpha* e *SKN7*) foram encontrados. O DTT é um estressor de RE e possui uma ação semelhante à tunicamicina. A urease é um complexo proteico que participa da conversão de ureia em amônia para utilização da levedura e é um forte fator de virulência da mesma, sendo apontado como uma das causas da invasão ao SNC (Kronstad et al., 2011). A presença de mutantes com resistência a estressores do



RE pode estar intimamente ligada ao mecanismo de ação dos derivados tiazólicos. Uma vez que a biossíntese do ergosterol e de diversos outros lipídeos da levedura ocorre no RE (Rodrigues, 2018), a ação de drogas que atuam nesta síntese pode causar danos nesta organela e dificultar o funcionamento da mesma (Pan et al., 2018). Uma maior resistência a estressores do RE pode estar ligada também a uma maior resistência a compostos que atuam na biossíntese de lipídeos.

Os derivados RN88, RJ37 e RVJ42, apresentaram sete genes relacionados com um aumento da produção de melanina (*GAT2*, *SIP4*, *FZC31*, *NGR2*, *HLH1*, *SKN7* e *FZC51*). A ação da melanina já foi descrita anteriormente e sua ação é diretamente relacionada com a virulência do fungo.

Os derivados RJ37 e RVJ42, apresentaram 5 mutantes com genes que conferiam uma maior resistência ao fluconazol (*HOB6*, *FZCC*, *NGR2*, *PPP1* e *JJJ1*). A resistência ao fluconazol esta, normalmente, ligada a maior expressão de bombas de efluxo, que jogam a droga para fora da célula e também com uma mutação ou supressão do gene *ERG11*, responsável pela produção da enzima alvo desta droga (Cowen et al., 2008). Esta resistência a este azólico pode estar diretamente ligada com o mecanismo efetivo de ação dos compostos, como será apresentado a seguir.

Ergosterol é um importante esterol presente na membrana celular de células fúngicas, mas ausente em seus hospedeiros (Nes et al., 1978). Além de sua função básica de conferir a rigidez estrutural e permeabilidade para a célula, ele também participa ativamente de processos fisiológicos (Dufourc et al., 2008; Hannich et al., 2011; Kristan & Rižner, 2011). Ele é o alvo da anfotericina B, que, ligando-se a ele, forma canais transmembrana que se comportam como poros. Estes poros causam uma desregulação osmótica no interior da célula, aumentando sua permeabilidade a cátions, como o  $K^+$ , levando a morte (Kontoyiannis et al., 2002; Loeffler et al., 2003). Além desse aumento de permeabilidade, a AMB também causa danos por estresse oxidativo e nitrosativo (Ferreira et al., 2013). O fluconazol também age no ergosterol, reduzindo sua biossíntese por inativação da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase, impedindo a conversão do lanosterol em ergosterol, essa redução causa instabilidade na membrana plasmática e altera a permeabilidade da célula, levando a uma interrupção do crescimento (Richardson, 1990; Kartalija et al., 1996). Os

resultados obtidos mostraram que alguns dos derivados testados inibiram a produção do ergosterol pelas leveduras, podendo ser esse um dos mecanismos no qual eles exercem sua ação. Futuras análises podem nos ajudar a entender esse mecanismo, como a dosagem da peroxidação lipídica e dos estresses oxidativo e nitrosativo, elucidando ainda mais a via de ação desses candidatos a antifúngicos.

Outro ponto importante que sustenta a hipótese de ação dos tiazóis sobre os esteróis foi o antagonismo de ação aqui observado quando fluconazol ou anfotericina B estavam em combinação com os derivados. Como já observado e apontado anteriormente, a ação combinada de azóis e polienos pode causar um antagonismo, uma vez que azóis diminuem a quantidade de ergosterol presente na membrana celular, reduzindo os alvos dos polienos (Mukherjee et al., 2005). Esse efeito também já foi observado em trabalhos do nosso grupo (Santos et al., 2012), onde o antagonismo da combinação entre fluconazol e anfotericina *in vitro* era dose-dependente e observado em altas concentrações de fluconazol. Além dos resultados aqui encontrados na produção do ergosterol e no efeito de combinação entre os fármacos, diversas análises *in silico* utilizando a metodologia do *molecular docking* (Filho et al., 2016; Kaplancıklı et al., 2017; Pricopie et al., 2020; Evren et al., 2022) apontaram a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51) como alvo dos tiazóis.

Sobre a capacidade de cada levedura atravessar o sistema de *transwel* aqui utilizado, inicialmente confirmamos o que já é observado clinicamente e na literatura (Ngamskulrungrroj et al., 2012): a linhagem *C. neoformans* H99 consegue mais ativamente transpor a barreira hematoencefálica e chegar ao sistema nervoso central (aqui representado como um CFU maior na parte basal do sistema) quando comparada com a *C. gattii* R265. As explicações do porquê dessa diferença ainda não são totalmente claras. Uma das possíveis causas pode envolver o mecanismo de cavalo de Troia: macrófagos com *C. neoformans* internalizados transpõem mais a BHE do que macrófagos com *C. gattii*, além de que o *Cn* é mais fagocitado e expulso dos macrófagos do que *Cg* (Sorrell et al., 2016). Outra explicação está ligada ao fator de transcrição Hob1, um regulador da expressão de diversos genes ligados à infecção do SNC, como transportadores de inositol e de uma metaloprotease. H99 mutantes desta proteína são significativamente menos virulentas e defectivas, ao passo que R265 mutantes não apresentam mudanças fenotípicas (Lee et al., 2020).

A exposição das leveduras juntamente com os derivados diminuiu a recuperação de H99 na parte basolateral do *transwell*, demonstrando, *in vitro*, a efetiva ação destes compostos em um modelo de barreira hematoencefálica. A permeabilidade das moléculas foi demonstrada uma vez que a sua ação fungicida foi observada quando colocada em compartimentos diferentes da levedura (como visto no tópico 5.7.2) e ao se analisar os cromatogramas gerados ao passar uma amostra biológica da região basolateral do sistema de *transwell* em um aparelho de cromatografia líquida. A maior dificuldade para o tratamento de doenças no SNC é encontrar drogas que consigam atravessa-lo, superando as fortes ligações da zona de oclusão e também as altamente ativas bombas de efluxo. Cerca de 98% das moléculas com alvo no SNC não conseguem ser utilizadas devido a baixa concentração encontrada nele (Li et al., 2019). Esta baixa capacidade de permeabilidade também foi observada neste estudo através dos dados obtidos nas análises por CLAE/DAD. Uma forma para tentar contornar este problema é aumentar a permeabilidade das moléculas, estudos já conseguiram isso ao utilizar lipossomas carregando anticorpos para receptores presentes nas células da BHE (Markoutsas et al., 2011) e receptores de LDL (Pinzón-Daza et al., 2012).

Os estudos *in vivo* demonstraram, de fato, a ação antifúngica dos compostos em análise. A sobrevivência de grupos com criptococose e tratados foi estendida, além também da carga fúngica ter sido menos recuperada nestes. A eficiência de cada derivado nos resultados *in vivo* foi correspondente aos resultados obtidos anteriormente nos experimentos *in vitro*, com a substância RVJ42 sendo a mais eficaz em ambas as situações.

## 7. Conclusão

Os derivados tiazólicos aqui testados apresentaram uma ação fungicida frente ao *Cryptococcus* spp. Estes apresentaram inibição na produção da melanina e do ergosterol, reduzindo os mesmos. Além disso, quatro derivados se mostraram bem promissores após ser feita uma triagem químico-genética para compreender melhor seus mecanismos de ação. Em ensaios de transcitose, os derivados conseguiram inibir a passagem da levedura e em experimentos *in vivo*, a sobrevivência foi estendida e a carga fúngica diminuída em animais tratados com os compostos.

## 8. Referências

- Aaghaz, S., Digwal, C. S., Neshat, N., Maurya, I. K., Kumar, V., Tikoo, K., Jain, R., & Kamal, A. (2023). Synthesis, biological evaluation and mechanistic studies of 4-(1,3-thiazol-2-yl)morpholine-benzimidazole hybrids as a new structural class of antimicrobials. *Bioorganic chemistry*, 136, 106538. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106538>
- Abadi, J., S. Nachman, A. B. Kressel, and L.-A. Pirofski. 1999. Cryptococcosis in children with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 28:309–313
- Agustinho, Daniel P, Miller, Liza C, Li, Lucy X, & Doering, Tamara L. (2018). Peeling the onion: the outer layers of *Cryptococcus neoformans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(7), e180040. Epub May 07 et al., 2018.
- Althagafi, I., El-Metwaly, N., & Farghaly, T. A. (2019). New Series of Thiazole Derivatives: Synthesis, Structural Elucidation, Antimicrobial Activity, Molecular Modeling and MOE Docking. *Molecules*, 24(9), 1741.
- Appelbaum, E., and S. Shitokalko. 1956. *Cryptococcus meningitis* arrested with amphotericin B. *Ann. Intern. Med.* 47:346–351
- Bennett JE, Dismukes WE, Duma RJ, Medoff G, Sande MA, Gallis H, Leonard J, Fields BT, Bradshaw M, Haywood H, McGee ZA, Cate TR, Cobbs CG, Warner JF, Alling DW. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. *N Engl J Med.* 1979 Jul 19;301(3):126-31. doi: 10.1056/NEJM197907193010303. PMID: 449951.
- Bhattacharjee, A. K., J. E. Bennett, and C. P. J. Glaudemans. 1984. Capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Infect. Dis.* 6:619–624
- Bielska, E., Sisquella, M. A., Aldeieg, M., Birch, C., O'Donoghue, E. J., & May, R. C. (2018). Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. *Nature Communications*, 9(1).
- Brammer KW, Farrow PR, Faulkner JK. 1990. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. *Rev. Infect. Dis.* 12(Suppl 3):S318–S326.
- Bratton E, El Hussein N, Chastain C, et al. Approaches to antifungal therapies and their effectiveness among patients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(6):2485–95
- Breed RS, Dotterrer WD (1916). "The Number of Colonies Allowable on Satisfactory Agar Plates". *Journal of Bacteriology.* 1 (3): 321–31. doi:10.1128/JB.1.3.321-331.1916. PMC 378655. PMID 16558698.
- Brizendine K, Baddley J, Pappas P. Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2011;32(6):727–34
- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *SciTranslMed.*2012;4 (165):165rv13

- Buschke, A. 1895. Über eine durch coccidien hervorgerufene Krankheit des Menschen. Dtsch. Med. Wochenschr. 21:14
- Busse, O. 1894. Über parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Züchtung. Zentralbl. Bakteriol. 16:175–180///
- Butt, Arthur M.; Jones, Hazel C.; Abbott, N. Joan. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. The Journal of physiology, v. 429, n. 1, p. 47-62, 1990.
- Casadevall, A., A. L. Rosas, and J. D. Nosanchuk. 2000 Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Curr. Opin. Microbiol. 3:354–358
- Chang CC, Hall V, Cooper C, Grigoriadis G, Beardsley J, Sorrell TC, Heath CH; and the Australasian Antifungal Guidelines Steering Committee. Consensus guidelines for the diagnosis and management of cryptococcosis and rare yeast infections in the haematology/oncology setting, 2021. Intern Med J. 2021 Nov;51 Suppl 7:118-142. doi: 10.1111/imj.15590. PMID: 34937137.
- Chang, Y. C., and K. J. Kwon-Chung. 1994. Complementation of a capsule-deficiency mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. Mol. Cell. Biol. 14: 4912–4919
- Charlier, C., F. Dromer, C. Leveque, L. Chartier, Y. S. Cordoliani, A. Fontanet, O. Launay, and O. Lortholary. 2008. Cryptococcal neuroradiological lesions correlate with severity during cryptococcal meningoencephalitis in HIVpositive patients in the HAART era. PLoS ONE 3:e1950
- Chem. 54 (2017) 2417e2425, <https://doi.org/10.1002/jhet.2838>. [19] F. Chimenti, B. Bizzarri, A. Bolasco, D. Secci, P. Chimenti, A. Granese, S. Carradori, M. D'Ascenzio, D. Lilli, D. Rivanera, Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-disubstituted-1,3-thiazoles as anti-*Candida* spp. Agents, Eur. J. Med. Chem. 46 (2011) 378e382
- Chen SC, Slavin MA, Heath CH, Playford EG, Byth K, Marriott D, Kidd SE, Bak N, Currie B, Hajkovicz K, Korman TM, McBride WJ, Meyer W Murray R, Sorrell TC, Australia New Zealand Mycoses Interest Group/Cryptococcus Study. 2012. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. Clin. Infect. Dis. 55:789–798
- Chen SHM, Stins MF, Huang SH, Chen YH, Kwon-Chung KJ, Chang Y, Kim KS, Suzuki K, Jong AY. *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. J Med Microbiol. 2003 Nov;52(Pt 11):961-970. doi: 10.1099/jmm.0.05230-0. PMID: 14532340.
- Chen, S., T. Sorrell, G. Nimmo, B. Speed, B. Currie, D. Ellis, D. Marriott, T. Pfeiffer, D. Parr, K. Byth, and the Australasian Cryptococcal Study Group. 2000. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Clin. Infect. Dis. 31:499–508.

- Cheng MF, Chiou CC, Liu YC, Wang HZ, Hsieh KS. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J Clin Microbiol.* 2001;39(4):1608–1611. doi:10.1128/JCM.39.4.1608-1611.2001
- Cherniak, R., and J. B. Sundstrom. 1994. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 62:1507–1512
- COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. *Cell Microbiol*, 18, n. 6, p. 792-799, 06 2016.
- Coomber BL, Stewart PA. 1985. Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res*30:99 –115.
- Cowen, L. E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 187–198 (2008)
- Cox GM, Mcdade HC, Chen SC et al.. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 39(1), 166–175 (2001).
- Cox, G.M.; Mukherjee, J.; Cole, G.T.; Casadevall, A.; Perfect, J.R. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. *Infect. Immun.* 2000, 68, 443–448. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]
- Cruz, L., Lopes, L., de Camargo Ribeiro, F., de Sá, N., Lino, C., Tharmalingam, N., Johann, S. (2018). Anti-*Candida albicans* Activity of Thiazolyhydrazone Derivatives in Invertebrate and Murine Models. *Journal of Fungi*, 4(4), 134.
- Currie, B. P., L. F. Freundlich, and A. Casadevall. 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. *J. Clin. Microbiol.* 32:1188–1192
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a020412.
- Day JN, Chau T, Wolbers M, et al. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N Engl J Med* 2013;368:1291–302
- De Sá NPD, Lima CMD, Lino CI, Barbeira PJS, Baltazar LDM, Santos DA, Oliveira RBD, Mylonakis E, Fuchs BB, Johann S. 2017. Heterocycle thiazole compounds exhibit antifungal activity through increase in the production of reactive oxygen species in the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02700-16
- De Sá, N. P. D, de Barros, P. P., Junqueira, J. C., Vaz, J. A., de Oliveira, R. B., Rosa, C. A., Johann, S. (2018). Thiazole derivatives act on virulence factors of *Cryptococcus* spp. *Medical Mycology*. doi:10.1093/mmy/myx158
- De Sá, N. P. D, Lima CMD, Lino CI, Barbeira PJS, Baltazar LDM, Santos DA, Oliveira RBD, Mylonakis E, Fuchs BB, Johann S. 2017. Heterocycle thiazole compounds exhibit

antifungal activity through increase in the production of reactive oxygen species in the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02700-16

De Sá, N. P., de Barros, P. P., Junqueira, J. C., Vaz, J. A., de Oliveira, R. B., Rosa, C. A., ... Johann, S. (2018). Thiazole derivatives act on virulence factors of *Cryptococcus* spp. *Medical Mycology*

de Sá, N., Lino, C. I., Fonseca, N. C., Borelli, B. M., Ramos, J. P., Souza-Fagundes, E. M., ... Johann, S. (2015). Thiazole compounds with activity against *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in vitro. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 102, 233–242.

de Sousa, H.R.; de Oliveira, G.P., Jr.; Frazão, S.d.O.; Gorgonha, K.C.d.M.; Rosa, C.P.; Garcez, E.M.; Lucas, J., Jr.; Correia, A.F.; de Freitas, W.F.; Borges, H.M.; Brito Alves, L.G.d.; Paes, H.C.; Trilles, L.; Lazera, M.d.S.; Teixeira, M.d.M.; Pinto, V.L., Jr.; Felipe, M.S.S.; Casadevall, A.; Silva-Pereira, I.; Albuquerque, P.; Nicola, A.M. Faster *Cryptococcus* Melanization Increases Virulence in Experimental and Human Cryptococcosis. *J. Fungi* 2022, 8, 393. <https://doi.org/10.3390/jof8040393>

Delgado, A. C. N., H. Taguchi, Y. Mikami, M. Myiajy M. C. B. Villares, and M. L. Moretti. 2005. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. *Mycopathologia* 159:7–11

Denning DW, Tucker RM, Hanson LH, Hamilton JR, Stevens DA. Itraconazole Therapy for Cryptococcal Meningitis and Cryptococcosis. *Arch Intern Med*. 1989;149(10):2301–2308

Dismukes WE, Cloud G, Gallis HA, et al. Treatment of cryptococcal meningitis with combination amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. *N Engl J Med* 1987;317:334–41

Dixit, A., S. F. Carroll, and S. T. Qureshi. 2009. *Cryptococcus gattii*: an emerging cause of fungal disease in North America. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis*. 2009:840452.

Dromer F, Casadevall A, Perfect J e Sorrel T in Kwon-Chung, Kyung J.; Kozel, Thomas R.; Perfect, John R.; Heitman, Joseph; Casadevall, Arturo (2011): *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*: American Society of Microbiology.

Dufourc, E.J., 2008. Sterols and membrane dynamics. *J. Chem. Biol.* 1, 63–77. <https://doi.org/10.1007/s12154-008-0010-6>

Eicher, T.; Hauptmann, S. (June 2003). *The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Synthesis, and Applications* (2nd ed.). John Wiley & Sons

Emmons, C. W. 1955. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am. J. Hyg.* 62:227–232.

- Evans, E. E., and J. W. Mehl. 1950. A qualitative analysis of capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* by filter paper chromatography. *Science* 114:10–11.
- Evren, A. E., Karaduman, A. B., Sağlık, B. N., Özkay, Y., & Yurttaş, L. (2022). Investigation of Novel Quinoline–Thiazole Derivatives as Antimicrobial Agents: *In Vitro* and *In Silico* Approaches. *ACS Omega*, 8(1), 1410–1429. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06871>
- Fan-Havard, P., E. Yamaguchi, S. Smith, and R. Eng. 1992. Diastolic hypertension in AIDS patients with cryptococcal meningitis. *Am. J. Med.* 93:347.
- Feldmesser, M.; Kress, Y.; Novikoff, P.; Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* is a Facultative Intracellular Pathogen in Murine Pulmonary Infection. *Infect. Immun.* 2000, 68, 4225–4237. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed][Green Version]
- Felipe H. Santiago-Tirado, Michael D. Onken, John A. Cooper, Robyn S. Klein, Tamara L. Doering Trojan Horse Transit Contributes to Blood-Brain Barrier Crossing of a Eukaryotic Pathogen *mBio* Jan 2017, 8 (1) e02183-16; DOI: 10.1128/mBio.02183-16
- Ferreira, G. F.; Baltazar, I. E. M.; Santos, J. R.; Monteiro, A. S. et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother*, 68, n. 8, p. 1801-1811, Aug 2013
- Ferreira, GF; Santos, JRA; Costa, MC; Holanda, RA; Denadai, A M L; Freitas, G J C de et al. (2015): Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. *Em: Antimicrobial agents and chemotherapy* 59 (8), pág. 4600–4609.
- Figueiredo, A. B. C., Fonseca, F. L., Kuczera, D., Conte, F. P., Arissawa, M., & Rodrigues, M. L. (2021). Monoclonal Antibodies against Cell Wall Chitooligomers as Accessory Tools for the Control of Cryptococcosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 65(12), e0118121. <https://doi.org/10.1128/AAC.01181-21>
- Filho, J. F. A., Roldi, L. L., Delarmelina, M., Fiorot, R. G., Andrade, J. T., Aleixo, Á. A., Carvalho, R., Araújo, M. G. F., Ferreira, J. M. S., Taranto, A. G., Romão, W., & Greco, S. J. (2016). Synthesis, *in vitro* Antifungal Activity and Molecular Modeling Studies of New Mannich Bases Derived from Lawsone. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160104>
- Firacative, Carolina, Lizarazo, Jairo, Illnait-Zaragozí, María Teresa, & Castañeda, Elizabeth. (2018). The status of cryptococcosis in Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(7), e170554. Epub April 05, 2018
- Franzot, S. P., J. Mukherjee, R. Cherniak, L. C. Chen, J. S. Hamdan, and A. Casadevall. 1998. Microevolution of a standard strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. *Infect.*



- Fraser J, Giles S, Wenink E, et al.. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature* 2005;437:1360–4.
- Freitas, G.J.C., Ribeiro, N.Q., Gouveia-Eufrasio, L., Emidio, E.C.P., Guimarães, G.M., César, I.C., Paixão, T.A., Oliveira, J.B.S., Caza, M., Kronstad, J.W., Santos, D.A. (2023). Antimalarials and amphotericin B interact synergistically and are new options to treat cryptococcosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Gaikwad, N. D., Patil, S. V., & Bobade, V. D. (2013). Synthesis and Antimicrobial Activity of Novel Thiazole Substituted Pyrazole Derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 50(3), 519–527.
- Galanis E, Hoang L, Kibsey P, Morshed M, Phillips P. 2009. Clinical presentation, diagnosis and management of *Cryptococcus gattii* cases: lessons learned from British Columbia. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 20:23–28.
- García-Rivera, J.; Casadevall, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. *Med. Mycol.* 2001, 39, 353–357.
- García-Rodas, R., Trevijano-Contador, N., Román, E., Janbon, G., Moyrand, F., Pla, J., ... Zaragoza, O. (2015). Role of Cln1 during melanization of *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genet Biol*, 78, p. 76-86, May 2015
- Gish, Stacey R.; Maier, Ezekiel J.; Haynes, Brian C.; Santiago-Tirado, Felipe H.; Srikanta, Deepa L.; Ma, Cynthia Z.; Li, Lucy X.; Williams, Matthew; Crouch, Erika C.; Khader, Shabaana A.; Brent, Michael R.; Doering, Tamara L. (2016). Computational Analysis Reveals a Key Regulator of Cryptococcal Virulence and Determinant of Host Response. *mBio*, 7(2), e00313-16–. doi:10.1128/mbio.00313-16
- Goldman D, Khine H, Abadi J, et al.. *Pediatrics* 2001;107(5):E66
- Gordon, M. A., and A. Casadevall. 1995. Serum therapy for cryptococcal meningitis. *Clin. Infect. Dis.* 21:1477–1479.
- Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividade de ensino ou pesquisa científica, 2019
- Gupta, A. K., & Kohli, Y. (2003). In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *The British journal of dermatology*, 149(2), 296–305. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05418.x>
- Hafidh, R. R. (2011). Inhibition of Growth of Highly Resistant Bacterial and Fungal Pathogens by a Natural Product. *The Open Microbiology Journal*, 5(1), 96–106. doi:10.2174/1874285801105010096

- Hagen F, Khayhan K, Theelen B, et al.. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol* 2015;78:17.
- Hajjeh RA, Conn LA, Stephens DS, et al.. Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons. *Cryptococcal Active Surveillance Group. J Infect Dis* 1999;179:449–54
- Hamed, M. F., Enriquez, V., Munzen, M. E., Charles-Niño, C. L., Mihu, M. R., Khoshbouei, H., Alviña, K., & Martinez, L. R. (2023). Clinical and pathological characterization of Central Nervous System cryptococcosis in an experimental mouse model of stereotaxic intracerebral infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 17(1), e0011068. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011068>
- Hannich, J.T., Umebayashi, K., Riezman, H., 2011. Distribution and functions of sterols. *Cold Spring Harb. Lab. Press* 3, 47–62. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004762>
- Harris JR, Lockhart SR, Debess E, Marsden-Haug N, Goldoft M, Wohrle R, Lee S, Smelser C, Park B, Chiller T. 2011. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 53:1188–1195
- Hevey, M. A., Presti, R. M., O'Halloran, J. A., Larson, L., Raval, K., Powderly, W. G., & Spec, A. (2019). Mortality After Cryptococcal Infection in the Modern Antiretroviral Therapy Era. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 82(1), 81–87. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000002095>
- Hoang, L. M. N., J. A. Maguire, P. Doyle, M. Fyfe, and D. L. Roscoe. 2004. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Science Centre (1997– 2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *J. Med. Microbiol.* 53:935–940
- Hodges, M. R., Ople, E., Wedel, P., Shaw, K. J., Jakate, A., Kramer, W. G., Van Marle, S., Van Hoogdalem, E., & Tawadrous, M. (2023). Safety and pharmacokinetics of intravenous and oral fosmanogepix, a First-in-Class antifungal agent, in healthy volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/aac.01623-22>
- Hogan, L. H., B. S. Klein, and S. M. Levitz. 1996. Virulence factors of medically important fungi. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:469–488.
- Hoy S. M. (2022). Oteseconazole: First Approval. *Drugs*, 82(9), 1017–1023. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01734-y>
- HSUEH YP, LIN X, KWON-CHUNG KJ e HEITMAN J in Kwon-Chung, Kyung J.; Kozel, Thomas R.; Perfect, John R.; Heitman, Joseph; Casadevall, Arturo (2011): *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*: American Society of Microbiology.
- Hull CM, Heitman J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Genet* 2002;36:557–615

- Ianevski, A., Giri, K. A., Aittokallio, T., 2022. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Research*. gkac382, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac382>
- Ito, S. 1993. Biochemistry and physiology of melanin, pp. 33–59. In N. Levine (ed.), *Pigmentation and Pigmentary Disorders*. CRC Press, Boca Raton, FL
- Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K., Miura, M., 2004. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat. Med.* 10, 98–102.
- Iyer, K. R., Revie, N. M., Fu, C., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. *Nature Reviews Microbiology*, 19(7), 454–466.
- Jacobson, E. S., and H. S. Emery. 1991. Catecholamine uptake, melanization, and oxygen toxicity in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* 173:401–403
- Jacobson, E. S., and S. B. Tinnell. 1993. Antioxidant function of fungal melanin. *J. Bacteriol.* 175:7102–7104
- Jain, N., L. Li, Y.-P. Hsueh, A. Guerrero, J. Heitman, D. L. Goldman, and B. C. Fries. 2009. Loss of allergen 1 confers a hypervirulent phenotype that resembles mucoid switch variants of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 77:128–140.
- Jong A, Wu CH, Shackleford GM et al.. Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol.* 10(6), 1313–1326 (2008)
- Joseph-Horne, T., D. Holloman, R. S. T. Loeffler, and S. L. Kelly. 1995. Cross-resistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1526–1529
- Jung, Kwang-Woo; Yang, Dong-Hoon; Maeng, Shinae; Lee, Kyung-Tae; So, Yee-Seul; Hong, Joohyeon; Choi, Jaeyoung; Byun, Hyo-Jeong; Kim, Hyelim; Bang, Soohyun; Song, Min-Hee; Lee, Jang-Won; Kim, Min Su; Kim, Seo-Young; Ji, Je-Hyun; Park, Goun; Kwon, Hyojeong; Cha, Suyeon; Meyers, Gena Lee; Wang, Li Li; Jang, Jooyoung; Janbon, Guilhem; Adedoyin, Gloria; Kim, Taeyup; Averette, Anna K.; Heitman, Joseph; Cheong, Eunji; Lee, Yong-Hwan; Lee, Yin-Won; Bahn, Yong-Sun (2015). Systematic functional profiling of transcription factor networks in *Cryptococcus neoformans*. *Nature Communications*, 6(), 6757–. doi:10.1038/ncomms7757
- K. Vu, B. Weksler, I. Romero, P. O. Couraud, and A. Gelli, “Immortalized human brain endothelial cell line HCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates in vitro studies of central nervous system infection by *Cryptococcus neoformans*,” *Eukaryotic Cell*, vol. 8, no. 11, pp. 1803–1807 et al., 2009
- K.J. Kwon-Chung, A. Varma Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res.*, 6 (4) (2006), pp. 574-587

- Kaplancıklı, Z. A., Levent, S., Osmaniye, D., Sağlık, B. N., Çevik, U. A., Çavuşoğlu, B. K., Özkay, Y., & Ilgin, S. (2017). Synthesis and Anticandidal Activity Evaluation of New Benzimidazole-Thiazole Derivatives. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(12), 2051. <https://doi.org/10.3390/molecules22122051>
- Kartalija M, Kaye K, Tureen JH, et al. Treatment of experimental cryptococcal meningitis with fluconazole: impact of dose and addition of flucytosine on mycologic and pathophysiologic outcome. *J Infect Dis.* 1996;173(5):1216-1221. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627075>.
- Katsuno, K., Burrows, J. N., Duncan, K., Van Huijsduijnen, R. H., Kaneko, T., Kita, K., Mowbray, C. E., Schmatz, D. M., Warner, P., & Slingsby, B. (2015). Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(11), 751–758. <https://doi.org/10.1038/nrd4683>
- Kelly SL, Lamb DC, Taylor M, Corran AJ, Baldwin BC, Powderly WG. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol  $\Delta 8 \rightarrow 7$  isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. *FEMS Microbiol Lett.* 1994;122:39–42.
- Kidd, S. E., F. Hagen, R. L. Tschärke, M. Huynh, K. H. Bartlett, M. Fyfe, L. MacDougall, T. Boekhout, K. J. Kwon-Chung, and W. Meyer. 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:17258–17263
- Kordossis T, Avlami A, Velegraki A, Stefanou I, Georgakopoulos G, Papalambrou C, Legakis N J. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. *Med Mycol.* 1998;36:335–339.
- Kristan K, Rižner TL. Steroid-transforming enzymes in fungi. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012 Mar;129(1-2):79-91. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.08.012. Epub 2011 Sep 14. PMID: 21946531.
- Kronstad, J. W.; Attarian, R.; Cadieux, B.; Choi, J. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol*, 9, n. 3, p. 193-203, Mar 2011.
- Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, Bahn YS. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Jul 1;4(7):a019760. doi: 10.1101/cshperspect.a019760. PMID: 24985132; PMCID: PMC4066639.
- Kwon-Chung, K. J. & Bennett, J. E. Distribution of founding types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am. J. Epidemiol.* 108,337–340 (1978)
- Kwon-Chung, K. J., I. Polacheck, and T. J. Popkin. 1982. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J. Bacteriol.* 150:1414–1421.
- Kwon-Chung, Kyung J., Teun Boekhout, Jack W. Fell, and Mara Diaz. “(1557) Proposal to Conserve the Name *Cryptococcus Gattii* against *C. Honduricus* and *C. Bacillisporus*

- (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae)." *Taxon* 51, no. 4 (2002): 804–6. <https://doi.org/10.2307/1555045>.
- Kwon-Chung, Kyung J.; Kozel, Thomas R.; Perfect, John R.; Heitman, Joseph; Casadevall, Arturo (2011): *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*: American Society of Microbiology.
- Laloo, D., D. Fisher, S. Naraqi, I. Laurenson, P. Temu, A. Sinha, A Sawerie, and B. Mavo. 1994. Cryptococcal meningitis (*C. neoformans* var. *gattii*) leading to blindness in previously healthy Melanesian adults in Papua New Guinea. *Q. J. Med.* 87:343–349
- Larsen, R. A., Bauer, M., Thomas, A. M., & Graybill, J. R. (2004). Amphotericin B and Fluconazole, a Potent Combination Therapy for Cryptococcal Meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(3), 985–991.
- Larsen, R. A., P. G. Pappas, J. Perfect, J. A. Aberg, A. Casadevall, G. A. Cloud, R. James, S. Filler, and W. E. Dismukes. 2005. Phase I evaluation of the safety and pharmacokinetics of murine-derived anti-cryptococcal antibody 18B7 in subjects with treated cryptococcal meningitis. The NIAID Mycoses Study Group. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:952–958
- Lee, K. T., Hong, J., Lee, D. G., Lee, M., Cha, S., Lim, Y. G., Jung, K. W., Hwangbo, A., Lee, Y., Yu, S. J., Chen, Y. L., Lee, J. S., Cheong, E., & Bahn, Y. S. (2020). Fungal kinases and transcription factors regulating brain infection in *Cryptococcus neoformans*. *Nature communications*, 11(1), 1521. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15329-2>
- Lee, KT., Hong, J., Lee, DG. *et al.* Fungal kinases and transcription factors regulating brain infection in *Cryptococcus neoformans*. *Nat Commun* 11, 1521 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15329-2>
- Levitz, S. M., S. Nong, M. K. Mansour, C. Huang, and C. A. Specht. 2001. Molecular characterization of a mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates T-cell responses to *Cryptococcus neoformans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10422–10427.
- Levitz, S.M. et al.. (2001) Molecular characterization of a mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates T cell responses to *Cryptococcus neoformans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10422–10427
- Li, G., Shao, K., & Umeshappa, C. S. (2019). Recent progress in blood-brain barrier transportation research. In Elsevier eBooks (pp. 33–51). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814001-7.00003-2>
- Lin, X., Hull, C. M., & Heitman, J. (2005). Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature*, 434(7036), 1017–1021.
- Lino, C. I., Gonçalves de Souza, I., Borelli, B. M., Silvério Matos, T. T., Santos Teixeira, I. N., Ramos, J. P., ... de Oliveira, R. B. (2018). Synthesis, molecular modeling studies and

evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 151, 248–260.

Lino, C.I.; de Souza, I.G.; Borelli, B.M.; Matos, T.T.S.; Teixeira, I.N.S.; Ramos, J.P.; de Souza Fagundes, E.M.; Fernandes, P.O.; Maltarollo, V.G.; Johann, S.; 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

Liu TB, Kim JC, Wang Y et al.. Brain inositol is a novel stimulator for promoting *Cryptococcus* penetration of the blood–brain barrier. *PLoS Pathog.* 9(4), e1003247 (2013).

Liu, Tong-Bao; Kim, Jong-Chul; Wang, Yina; Toffaletti, Dena L.; Eugenin, Eliseo; Perfect, John R.; Kim, Kee Jun; Xue, Chaoyang; May, Robin Charles (2013). Brain Inositol Is a Novel Stimulator for Promoting *Cryptococcus* Penetration of the Blood-Brain Barrier. *PLoS Pathogens*, 9(4), e1003247–. doi:10.1371/journal.ppat.1003247

Loeffler, J., and D. A. Stevens. 2003. Antifungal drug resistance. *Clin. Infect. Dis.* 36:S31–S41.

Loftus, B. J., E. Fung, P. Roncaglia, D. Rowley, P. Amedeo, D. Bruno, J. Vamathevan, M. Miranda, I. J. Anderson, J. A. Fraser, J. E. Allen, I. E. Bosdet, M. R. Brent, R. Chiu, T. L. Doering, M. J. Donlin, C. A. D'Souza, D. S. Fox, V. Grinberg, J. Fu, M. Fukushima, B. J. Haas, J. C. Huang, G. Janbon, S. J. Jones, H. L. Koo, M. I. Krzywinski, J. K. Kwon-Chung, K. B. Lengeler, R. Maiti, M. A. Marra, R. E. Marra, C. A. Mathewson, T. G. Mitchell, M. Pertea, F. R. Riggs, S. L. Salzberg, J. E. Schein, A. Shvartsbeyn, H. Shin, M. Shumway, C. A. Specht, B. B. Suh, A. Tenney, T. R. Utterback, B. L. Wickes, J. R. Wortman, N. H. Wye, J. W. Kronstad, J. K. Lodge, J. Heitman, R. W. Davis, C. M. Fraser, and R. W. Hyman. 2005. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* 307: 1321–1324

Loyse A., Dromer F., Day J., Lortholary O., Harrison T.S. Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013;68(11):2435–2444

M. Bovers, F. Hagen, E.E. Kuramae, T. Boekhout Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing *Fungal Genet. Biol.*, 45 (4) (2008), pp. 400-421

Mager, J., and M. Aschner. 1947. Biological studies on capsulated yeasts. *J. Bacteriol.* 53:283–295

Manosuthi W, Chetchotisakd P, Nolen TL, Wallace D, Sungkanu-parph S, Anekthananon T, Supparatpinyo K, Pappas PG, Larsen RA, Filler SG, Andes D. 2010. Monitoring and impact of fluconazole serum and cerebrospinal fluid concentration in HIV-associated cryptococcal meningitis-infected patients. *HIV Med.* 11:276–281.

Markoutsas, E., Pampalakis, G., Niarakis, A., Romero, I. A., Weksler, B. B., Couraud, P., & Antimisiaris, S. G. (2011). Uptake and permeability studies of BBB-targeting

immunoliposomes using the hCMEC/D3 cell line. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(2), 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.015>

Martinez, L. R., and A. Casadevall. 2006. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1021–1033.

Maruvada, R.; Zhu, L.; Pearce, D.; Zheng, Y.; Perfect, J.; Kwon-Chung, K.J.; Kim, K.S. *Cryptococcus neoformans* Phospholipase B1 Activates Host Cell Rac1 for Traversal across the Blood-Brain Barrier. *Cell. Microbiol.* 2012, 14, 1544–1553. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]

Maziarz EK, Perfect JR. *Cryptococcosis*. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(1):179–206.

McCarthy, K. M., J. Morgan, K. A. Wannemuehler, S. A. Mirza, S. M. Gould, N. Mhlongo, P. Moeng, B. R. Maloba, H. H. Crewe-Brown, M. E. Brandt, and R. A. Hajjeh for the Gauteng Cryptococcal Surveillance Initiative Group. 2006. Population-based surveillance for cryptococcosis in an antiretroviral-naïve South African province with a high HIV seroprevalence. *AIDS* 20:2199–2206

McCarty, T. P., & Pappas, P. G. (2021). Antifungal Pipeline. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 732223. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.732223>

McDonough, E. S., A. L. Lewis, and L. A. Penn. 1966. Relationship of *Cryptococcus neoformans* to pigeons in Milwaukee, Wisconsin. *Public Health Rep.* 81:1119–1123

Mednick, A. J., J. D. Nosanchuk, and A. Casadevall. 2005. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. *Infect. Immun.* 73:2012–2019.

Meyer, W., K. Marszewska, M. Amirmostofian, R. P. Igreja, C. Hardtke, K. Methling, M. A. Viviani, A. Chindamporn, S. Sukroongreung, M. A. John, D. H. Ellis, and T. C. Sorrell. 1999. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA: a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 20:1790–1799.

Mielniczek-Pereira AA, Hahn AB, Bonato D, Roger CJ, Eleutherio EC & Henriques JA (2011) New insights into the Ca<sup>2+</sup>-ATPases that contribute to cadmium tolerance in yeast. *Toxicol Lett* 207, 104–111.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, CORDENAÇÃO GERAL DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS, UNIDADE DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS DE TRANSMISSÃO RESPIRATÓRIA E IMUNOPREVENÍVEIS, Vigilância e Epidemiológica Da Criptococose 2012

Mirza, S. A., Phelan, M., Rimland, D., Graviss, E., Hamill, R., Brandt, M. E., Hajjeh, R. A. (2003). The Changing Epidemiology of Cryptococcosis: An Update from Population-

Based Active Surveillance in 2 Large Metropolitan Areas et al., 1992–2000. *Clinical Infectious Diseases*, 36(6), 789–794. doi:10.1086/368091

Mistry N, Tan K, Shokravi M, Hoang L. 2011. *Cryptococcus gattii* infections with cutaneous involvement. *J. Cutan. Med. Surg.* 15:236–237

Mitchell TG, Castaneda E, Nielsen K, Wanke B e Lazéra M in Sorrel TC, Chen SCA, Phillips P e Marr KA in Kwon-Chung, Kyung J.; Kozel, Thomas R.; Perfect, John R.; Heitman, Joseph; Casadevall, Arturo (2011): *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*: American Society of Microbiology.

Moyrand F, Chang YC, Himmelreich U, Kwon-Chung KJ, Janbon G. 2004. Cas3p belongs to a seven-member family of capsule structure designer proteins. *Eukaryot. Cell* 3:1513–1524.

Mpoza E, Rhein J, Abassi M. Emerging fluconazole resistance: Implications for the management of cryptococcal meningitis. *Med Mycol Case Rep.* 2017;19:30–32. Published 2017 Nov 26.

Mukherjee, P. K., Sheehan, D. J., Hitchcock, C. A., & Ghannoum, M. A. (2005). Combination treatment of invasive fungal infections. *Clinical microbiology reviews*, 18(1), 163–194. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.163-194.2005>

Na Pombejra, S.; Salemi, M.; Phinney, B.S.; Gelli, A. The Metalloprotease, Mpr1, Engages AnnexinA2 to Promote the Transcytosis of Fungal Cells across the Blood-Brain Barrier. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017, 7, 296. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]

Na Pombejra, Sarisa; Jamklang, Mantana; Uhrig, John P.; Vu, Kiem; Gelli, Angie (2018): The structure-function analysis of the Mpr1 metalloprotease determinants of activity during migration of fungal cells across the blood-brain barrier. *Em: PloS one* 13 (8), e0203020.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2

Ngamskulrungraj P, Serena C, Gilgado F, Malik R, Meyer W. 2011. Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:251–258.

Ngamskulrungraj, P., Chang, Y., Sionov, E., and Kwon-Chung, K. J. (2012). The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *MBio* 3:e00103–e00112. Doi: 10.1128/mBio.00103–112

Noverr MC, Williamson PR, Fajardo RS, Huffnagle GB. CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. *Infect Immun.* 2004 Mar;72(3):1693-9. doi: 10.1128/IAI.72.3.1693-1699.2004. PMID: 14977977; PMCID: PMC356011



- Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH et al.. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *Am. J. Pathol.* 164(5), 1761–1771 (2004).
- Othman, N., N. A. Abdullah, and Z. A. Wahab. 2004. Cryptococcal meningitis in an immunocompetent child: a case report and literature review. *Southeast. Asian J. Trop. Med. Public Health* 35:930–934
- P. Ngamskulrungraj, F. Gilgado, J. Faganello, A.P. Litvintseva, A.L. Leal, K.M. Tsui, T.G. Mitchell, M.H. Vainstein, W. Meyer Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties *PLoS ONE*, 4 (6) (2009), p. e5862
- P.A.T.M. Gomes, M.O. Barbosa, E.F. Santiago, M.V.O. Cardoso, N.T.C. Costa, M.Z. Hernandez, D.R.M. Moreira, A.C. Silva, T.A.R. Santos, V.R.A. Pereira, F.A.B. Santos, G.A.N. Pereira, R.S. Ferreira, A.C.L. Leite, New 1,3-thiazole derivatives and their biological and ultrastructural effects on *Trypanosoma cruzi*, *Eur. J. Med. Chem.* 121 (2016) 387e398
- Pan, J., Hu, C., & Yu, J. H. (2018). Lipid Biosynthesis as an Antifungal Target. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 4(2), 50. <https://doi.org/10.3390/jof4020050>
- Pappas, P. G., J. R. Perfect, G. A. Cloud, R. A. Larsen, G. A. Pankey, D. J. Lancaster, H. Henderson, C. A. Kauffman, D. W. Haas, M. Saccente, R. J. Hamill, M. S. Holloway, R. M. Warren, and W. E. Dismukes. 2001. Cryptococcosis in human immunodeficiency virus-negative patients in the era of effective azole therapy. *Clin. Infect. Dis.* 33:690–699
- Park, B. J., K. A. Wannemuehler, B. J. Marston, N. P. Govender, P. G. Pappas, and T. M. Chiller. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23:525–530
- Park, M. K., D. R. Hoshenthal, and J. E. Bennett. 1999. Treatment of hydrocephalus secondary to cryptococcal meningitis by use of shunting. *Clin. Infect. Dis.* 28:629–633
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC. 2010. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 50:291–322
- Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;45:395–404.
- Perfect, J. R., and G. M. Cox. 1999. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resist. Updates* 2:259–269

- Phillips, N. A., Rocktashel, M., & Merjanian, L. (2023). Ibrexafungerp for the Treatment of Vulvovaginal Candidiasis: Design, Development and Place in Therapy. *Drug design, development and therapy*, 17, 363–367. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S339349>
- Pierotte, I.C. Avaliação da permeabilidade intestinal de derivados tiazolilhidrazona e tiazolilhidrazina com atividade antifúngica. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2022.
- Pietrella, D. et al.. (2005) Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation. *Infect. Immun.* 73, 820–827
- Pinzòn-Daza, M., Garzón, R., Couraud, P. O., Romero, I. A., Weksler, B. B., Ghigo, D., Bosia, A., & Riganti, C. (2012). The association of statins plus LDL receptor-targeted liposome-encapsulated doxorubicin increases in vitro drug delivery across blood-brain barrier cells. *British Journal of Pharmacology*, 167(7), 1431–1447. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02103.x>
- Prates RA, Fuchs BB, Mizuno K, Naqvi Q, Kato IT, Ribeiro MS, et al. (2013) Effect of Virulence Factors on the Photodynamic Inactivation of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE* 8(1): e54387
- Pricopie, A.-I.; Focșan, M.; Ionuț, I.; Marc, G.; Vlase, L.; Găină, L.-I.; Vodnar, D.C.; Simon, E.; Barta, G.; Pîrnău, A.; et al. Novel 2,4-Disubstituted-1,3-Thiazole Derivatives: Synthesis, Anti-*Candida* Activity Evaluation and Interaction with Bovine Serum Albumine. *Molecules* 2020, 25, 1079. <https://doi.org/10.3390/molecules25051079>
- Protopopova M, Hanrahan C, Nikonenko B, Samala R, Chen P, Gearhart J, Einck L, Nacy CA. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Nov;56(5):968-74. doi: 10.1093/jac/dki319. Epub 2005 Sep 19. PMID: 16172107.
- Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, et al.. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(8): 873-81.
- Rajasingham, R., Govender, N. P., Jordan, A., Loyse, A., Shroufi, A., Denning, D. W., Meya, D. B., Chiller, T., & Boulware, D. R. (2022). The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. *Lancet Infect Dis.*, 22(12), 1748–1755. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(22\)00499-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(22)00499-6)
- Reese TS, Karnovsky MJ. 1967. Fine structural localization of a blood – brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*34:207 – 217
- Richardson K. The discovery and profile of fluconazole. *J Chemother.* 1990;2(1):51-54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2332784>.
- Rodrigues, M. L. (2018). The Multifunctional Fungal Ergosterol. *mBIO*, 9(5). <https://doi.org/10.1128/mbio.01755-18>

- Rosas, A. L., and A. Casadevall. 2001. Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation. *Mycopathologia* 151:53–56
- Rosas, A. L., R. S. MacGill, J. D. Nosanchuk, T. R. Kozel, and A. Casadevall. 2002. Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Clin Diagn. Lab. Immunol.* 9:144–148.
- Rozenbaum R, Goncalves AJ. 1994. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. *Clin. Infect. Dis.* 18:369–380
- Salas, S. D., J. E. Bennett, K. J. Kwon-Chung, J. R. Perfect, and P. R. Williamson. 1996. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J. Exp. Med.* 184:377–386 *Immun.* 66:89–97
- Sanfelice, F. 1895. Ueber einen neuen pathogenen Blastomyceten, welcher innerhalb der Gewebe unter Bildung kalkartig aussehender Massen degeneriert. *Zentralbl. Bakt Parasit.* 18:521–526
- Santiago-Tirado, F. H., Klein, R. S., & Doering, T. L. (2019). An In Vitro Brain Endothelial Model for Studies of Cryptococcal Transmigration into the Central Nervous System. *Current Protocols in Microbiology*, e78.
- Santiago-Tirado, F. H., Klein, R. S., & Doering, T. L. (2019). An in vitro brain endothelial model for studies of cryptococcal transmigration into the central nervous system. *Current Protocols in Microbiology*, e78. doi: 10.1002/cpmc.78
- Santiago-Tirado, F. H., Onken, M. D., Cooper, J. A., Klein, R. S., & Doering, T. L. (2017). Trojan Horse Transit Contributes to Blood-Brain Barrier Crossing of a Eukaryotic Pathogen. *mBio*, 8(1).
- Santos, J. R., Gouveia, L. F., Taylor, E. L., Resende-Stoianoff, M. A., Pianetti, G. A., César, I. C., & Santos, D. A. (2012). Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(5), 2553–2558. <https://doi.org/10.1128/AAC.06098-11>
- Singh, N., Dromer, F., Perfect, J. R., & Lortholary, O. (2008). Immunocompromised Hosts: Cryptococcosis in Solid Organ Transplant Recipients: Current State of the Science. *Clinical Infectious Diseases*, 47(10), 1321–1327. doi:10.1086/592690
- Sinha, S.; Doble, M.; Manju, S.L. Design, synthesis and identification of novel substituted 2-amino thiazole analogues as potential anti-inflammatory agents targeting 5-lipoxygenase. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 158, 34–50
- Sloan DJ, Parris V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clin Epidemiol.* 2014;6:169–82
- Snider, W. D., D. M. Simpson, S. Nielsen, J. W. M. Gold, C. E. Metroka, and J. B. Posner. 1983. Neurological complications of acquired immune deficiency syndrome: analysis of 50 patients. *Ann. Neurol.* 14:403–418.

- Soares EA. Mortalidade por criptococose no Brasil (2000 a 2012) [Tese]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca; 2015. 95 pp.
- Solangi M, Kanwal, Khan KM, Chigurupati S, Saleem F, Qureshi U, Ul-Haq Z, Jabeen A, Felemban SG, Zafar F, Perveen S, Taha M, Bhatia S. Isatin thiazoles as antidiabetic: Synthesis, in vitro enzyme inhibitory activities, kinetics, and in silico studies. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2022 Mar 30:e2100481. doi: 10.1002/ardp.202100481
- Sorrel TC, Chen SCA, Phillips P e Marr KA in Kwon-Chung, Kyung J.; Kozel, Thomas R.; Perfect, John R.; Heitman, Joseph; Casadevall, Arturo (2011): *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*: American Society of Microbiology.
- Sorrell TC, Juillard PG, Djordjevic JT, Kaufman-Francis K, Dietmann A, Milonig A, Combes V, Grau GE. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. *Microbes Infect*. 2016 Jan;18(1):57-67. doi: 10.1016/j.micinf.2015.08.017. Epub 2015 Sep 11. PMID: 26369713.
- Sorrell, T.C.; Juillard, P.G.; Djordjevic, J.T.; Kaufman-Francis, K.; Dietmann, A.; Milonig, A.; Combes, V.; Grau, G.E.R. Cryptococcal Transmigration across a Model Brain Blood-Barrier: Evidence of the Trojan Horse Mechanism and Differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* Strain H99 and *Cryptococcus gattii* Strain R265. *Microbes Infect*. 2016, 18, 57–67. [Google Scholar] [CrossRef]
- Sorrell, Tania C.; Juillard, Pierre; Djordjevic, Julianne T.; Francis, Keren; Dietmann, Anelia; Milonig, Alban; Combes, Valery; Grau, Georges E.R. (2015). Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. *Microbes and Infection*, (), S1286457915001896–. doi:10.1016/j.micinf.2015.08.017
- Staib, F. 1962. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (syn. *G. Oleifera* D.C.). *Z. Hyg.* 148:466–475
- Stie J, Fox D. Induction of brain microvascular endothelial cell urokinase expression by *Cryptococcus neoformans* facilitates blood–brain barrier invasion. *PLoS ONE* 7(11), e49402 (2012).
- Stoddard, J. L., and E. C. Cutler. 1916. *Torula* Infection in Man. Rockefeller Institute for Medical Research, Monograph no. 6, p. 1–98
- Strickland, A.B.; Shi, M. Mechanisms of Fungal Dissemination. *Cell. Mol. Life Sci.* 2021, 78, 3219–3238. [Google Scholar] [CrossRef]
- Sun H, Alexander B, Lortholary O, et al.. Unrecognized pretransplant and donor-derived cryptococcal disease in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2010;51(9):1062–9
- Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. "REVIGO summarizes and visualizes long lists of Gene Ontology terms" *PLoS ONE* 2011. doi:10.1371/journal.pone.0021800

- T.I. de Santana, M.O. Barbosa, P.A.T.M. Gomes, A.D.N. da Cruz, T.G. da Silva, A.C.L. Leite, Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 144 (2018) 874e886. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.040>
- Takishita et al.. (2010) Molecular evidence that phylogenetically diverged ciliates are active in microbial mats of deep-sea cold-seep sediment. *57(1): 76-86*
- Toh-E A, Ohkusu M, Ishiwada N, Watanabe A, Kamei K. Genetic system underlying responses of *Cryptococcus neoformans* to cadmium. *Curr Genet.* 2022 Feb;68(1):125-141. doi: 10.1007/s00294-021-01222-y. Epub 2021 Nov 10. PMID: 34761291.
- Truelsen, K., T. Young, and T. R. Kozel. 1992. In vivo complement activation and binding of C3 to encapsulated *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 60:3937–3939.
- Tucker SC, Casadevall A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99(5), 3165–3170 (2002).
- Turner, S. H., R. Cherniak, E. Reiss, and K. J. KwonChung. 1992. Structural variability in the glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates determined by <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 233:205–218
- UNAIDS08. 2008. 2008 Report on the Global AIDS Epidemic. XVII International AIDS Conference, Mexico City. 1-362. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Van Duin, D., A. Casadevall, and J. D. Nosanchuk. 2002. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibility to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3394–3400
- Vishniac H. S., Kurtzman C. P. (1992) *Cryptococcus antarcticus* sp. nov. and *Cryptococcus albidosimilis* sp. nov., Basidiobolomycetes from Antarctic Soils. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42(4) 547-553
- Vogelsinger H, Weiler S, Djanani A, Kountchev J, Bellmann-Weiler R, Wiedermann CJ, Bellmann R. 2006. Amphotericin B tissue distribution in autopsy material after treatment with liposomal amphotericin B and amphotericin B colloidal dispersion. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:1153–1160
- Vu, K., Tham, R., Uhrig, J. P., Thompson, G. R., Na Pombejra, S., Jamklang, M., Gelli, A. (2014). Invasion of the Central Nervous System by *Cryptococcus neoformans* Requires a Secreted Fungal Metalloprotease. *mBio*, 5(3). doi:10.1128/mbio.01101-14
- Vu, K.; Eigenheer, R. A.; Phinney, B. S.; Gelli, A. (2013). *Cryptococcus neoformans* Promotes Its Transmigration into the Central Nervous System by Inducing Molecular and Cellular Changes in Brain Endothelial Cells. *Infection and Immunity*, 81(9), 3139–3147. doi:10.1128/IAI.00554-13

- W.R. Nes, B.C. Sekula, W.D. Nes, J.H. Adler, The functional importance of structural features of ergosterol in yeast, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 6218–6225
- Weksler B, Romero IA, Couraud PO. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS.* 2013 Mar 26;10(1):16. doi: 10.1186/2045-8118-10-16. PMID: 23531482; PMCID: PMC3623852.
- Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA e Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *The FASEB Journal* 2005 19:13, 1872-1874
- Williamson PR, Wakamatsu K, Ito S. Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol.* 1998; 180(6): 1570-2.
- Wormley, F.L., Jr et al.. (2005) Evaluation of host immune responses to pulmonary cryptococcosis using a temperaturesensitive *C. neoformans* calcineurin A mutant strain. *Microb. Pathog.* 38, 113–123
- Yauch, L. E., J. S. Lam, and S. M. Levitz. 2006. Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus capsular* polysaccharide glucuronoxylomannan. *PLoS Pathog.* 2:e120
- Zafar, H., Altamirano, S., Ballou, E. R., & Nielsen, K. (2019). A titanic drug resistance threat in *Cryptococcus neoformans*. *Current opinion in microbiology*, 52, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.11.001>
- Zaragoza, O., Chrisman, C. J., Castelli, M. V., Frases, S., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J. L., & Casadevall, A. (2008). Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cellular microbiology*, 10(10), 2043–2057. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01186.x>
- Zlokovic BV. 2008. The blood – brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57:178 –201

## 9. Artigos publicados em colaboração durante o doutorado

- Randomized, phase 1/2, double-blind pioglitazone repositioning trial combined with antifungals for the treatment of cryptococcal meningitis – PIO study. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.conctc.2021.100745>
- Exposure to itraconazole influences the susceptibility to antifungals, physiology, and virulence of *Trichophyton interdigitale*. *MEDICAL MYCOLOGY*, v. 60, p. 1, 2022.

## 10. Material suplementar

Tabela de todas as linhagens mutantes de *C. neoformans* H99 tolerantes (CIM de, no mínimo, 4xCIM quando comparado a *C. neoformans* H99) ao derivado RN86.

Gene ID	Gene	Produto gênico
CNAG_00068		specific RNA polymerase II transcription factor
CNAG_00460	LIV1	virulence related protein of unknown function
CNAG_03902	RDS2	Regulator of drug sensitivity 2, putative
CNAG_05940	ZFC3	hypothetical protein
CNAG_05392	ZAP104	specific RNA polymerase II transcription factor
CNAG_06719	FZC49	hypothetical protein
CNAG_02322	FZC17	hypothetical protein
CNAG_04176	HSF2	hypothetical protein
CNAG_01626	ADA2	transcriptional adapter 2-alpha
CNAG_03768	FZC32	hypothetical protein
CNAG_02700	ZFC8	C2H2 type zinc finger transcription factor
CNAG_02516	HLH5	hypothetical protein

Tabela de todas as linhagens mutantes de *C. neoformans* H99 tolerantes (CIM de, no mínimo, 4xCIM quando comparado a *C. neoformans* H99) ao derivado RN88.

Gene ID	Gene	Produto gênico
CNAG_05093	HOB6	hypothetical protein
CNAG_02296	RBK1	ATP-binding protein
CNAG_05785	STB4	putative transcription factor
CNAG_03401	GAT203	hypothetical protein
CNAG_00791	HLH1	hypothetical protein
CNAG_06425	PPR1	fungal specific transcription factor
CNAG_00068		specific RNA polymerase II transcription factor
CNAG_04630	YAP2	hypothetical protein
CNAG_07924	MCM1	Pheromone receptor transcription factor, putative
CNAG_02555	SIP402	Putative Zn2-Cys6 zinc-finger transcription factor
CNAG_04594	FZC27	hypothetical protein
CNAG_06188	FZC15	hypothetical protein
CNAG_05170	PIP2	hypothetical protein
CNAG_02241	HOB5	hypothetical protein
CNAG_06921	HOB4	hypothetical protein
CNAG_05186	GRF1	hypothetical protein
CNAG_00896	FZC34	transcription factor
CNAG_00039	ZFC6	hypothetical protein
CNAG_07940	BZP5	hypothetical protein

CNAG_06814	SXI1alpha	Alpha cell-type homeodomain transcription factor
CNAG_01454	STE12alpha	transcription factor STE12
CNAG_03527	HEL2	cytoplasmic protein
CNAG_05255	FZC2	hypothetical protein
CNAG_04353	CLR1	hypothetical protein
CNAG_06871	FZC41	hypothetical protein
CNAG_04268	APN2	exodeoxyribonuclease III
CNAG_05420	USV101	Nutrient and stress factor 1, putative
CNAG_03409	SKN7	osomolarity two-component system, response regulator SKN7
CNAG_06483	FZC25	hypothetical protein
CNAG_02435	BWC2	white collar 2 protein
CNAG_02877	FZC51	hypothetical protein
CNAG_03914	FZC14	hypothetical protein
CNAG_02364	FZC19	hypothetical protein
CNAG_04518	ZFC5	hypothetical protein
CNAG_05380	FZC44	hypothetical protein
CNAG_00460	LIV1	virulence related protein of unknown function
CNAG_03902	RDS2	Regulator of drug sensitivity 2, putative
CNAG_05940	ZFC3	hypothetical protein
CNAG_06719	FZC49	hypothetical protein
CNAG_02322	FZC17	hypothetical protein
CNAG_01858	HOB2	hypothetical protein
CNAG_04176	HSF2	hypothetical protein
CNAG_04093	YRM103	putative transcription factor
CNAG_03768	FZC32	hypothetical protein
CNAG_03894	PDR802	Putative Zn <sup>2</sup> -Cys <sup>6</sup> zinc-finger transcription factor
CNAG_00332	SIP4	hypothetical protein
CNAG_03018	ASG101	Putative zinc finger transcription factor
CNAG_01708	GAT7	hypothetical protein
CNAG_01973	ZFC2	C2H2 zinc finger protein Zas1A
CNAG_03431	FZC48	nuclear protein
CNAG_07922	FZC4	transcription factor
CNAG_00031	MLR1	hypothetical protein
CNAG_03366	ZNF2	C2H2 type zinc finger transcription factor
CNAG_04916	FZC16	hypothetical protein
CNAG_06751	HLH3	hypothetical protein
CNAG_01948	FZC36	nuclear protein
CNAG_00505	FZC28	hypothetical protein
CNAG_02516	HLH5	hypothetical protein
CNAG_05375		hypothetical protein

---



Tabela de todas as linhagens mutantes de *C. neoformans* H99 tolerantes (CIM de, no mínimo, 4xCIM quando comparado a *C. neoformans* H99) ao derivado RJ37:

<b>Gene ID</b>	<b>Gene</b>	<b>Produto gênico</b>
CNAG_00068		specific RNA polymerase II transcription factor
CNAG_00193	<i>GAT1</i>	GATA type zinc finger protein asd-4
CNAG_00332	<i>SIP4</i>	hypothetical protein
CNAG_00514		hypothetical protein
CNAG_03741	<i>FZC31</i>	hypothetical protein
CNAG_04036		hypothetical protein
CNAG_07506	<i>FAP1</i>	FKBP12-associated protein 1, putative
CNAG_02774	<i>MAL13</i>	Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain protein
CNAG_02603		early growth response protein 1
CNAG_05093	<i>HOB6</i>	hypothetical protein
CNAG_05255	<i>FZC2</i>	hypothetical protein
CNAG_06814	<i>SX11alpha</i>	Alpha cell-type homeodomain transcription factor
CNAG_01438	<i>SWI6</i>	Cell-cycle box factor subunit SWI6, putative
CNAG_01173	<i>LAG1</i>	LAG1 family transcription factor, putative
CNAG_07443	<i>HLH4</i>	hypothetical protein
CNAG_02305	<i>FZC45</i>	hypothetical protein
CNAG_05785	<i>STB4</i>	putative transcription factor
CNAG_05861	<i>FKH101</i>	Fork head protein homolog 1, putative
CNAG_05861	<i>FKH101</i>	Fork head protein homolog 1, putative
CNAG_03115	<i>FZC46</i>	hypothetical protein

Tabela de todas as linhagens mutantes de *C. neoformans* H99 tolerantes (CIM de, no mínimo, 4xCIM quando comparado a *C. neoformans* H99) ao derivado RVJ42:

<b>Gene ID</b>	<b>Gene</b>	<b>Produto gênico</b>
CNAG_00332	<i>SIP4</i>	hypothetical protein
CNAG_00514		hypothetical protein
CNAG_07506	<i>FAP1</i>	FKBP12-associated protein 1, putative
CNAG_02877	<i>FZC51</i>	hypothetical protein
CNAG_07797	<i>CLR6</i>	transcriptional regulator
CNAG_07797	<i>CLR6</i>	transcriptional regulator, variant
CNAG_05019	<i>FZC21</i>	hypothetical protein
CNAG_05222	<i>NRG1</i>	transcriptional regulator Nrg1

CNAG_01173	<i>LAG1</i>	LAG1 family transcription factor, putative
CNAG_02305	<i>FZC45</i>	hypothetical protein
CNAG_03561	<i>FZC33</i>	hypothetical protein
CNAG_04518	<i>ZFC5</i>	hypothetical protein
CNAG_06064	<i>PTP1</i>	Putative protein tyrosine phosphatase
CNAG_07011		hypothetical protein
CNAG_07011		hypothetical protein, variant
CNAG_06339	<i>FZC35</i>	hypothetical protein
CNAG_06425	<i>PPR1</i>	fungal specific transcription factor
CNAG_05538	<i>JJJ1</i>	DnaJ-like cochaperone

---