

SÔNIA UEDA PURISCO

**Estudo de novos compostos e suas combinações
terapêuticas frente aos principais agentes da
criptococose**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da
Coordenadoria de Controle de
Doenças da Secretaria de Estado
da Saúde de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

Co-orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

**SÃO PAULO
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Purisco, Sônia Ueda.

Estudo de novos compostos e suas combinações terapêuticas frente aos principais agentes da criptococose / Sônia Ueda Purisco. – 2018.

Tese (doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem.

Colaboração: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

1. Preparações Farmacêuticas. 2. Criptococose. 3. Cryptococcus. 4. Produtos Biológicos. 5. Micoses.

SES/CCD/CD-360/2018

DEDICATÓRIA

A minha família, meus pais Élio e Yassuko, minha irmã Emília por todo amor, carinho, amizade e por me apoiarem no caminho da pesquisa e na concretização de mais uma etapa em minha vida. Aos meus amigos que me acompanharam durante o desenvolvimento deste trabalho. E a todos do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz - SP.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pela oportunidade de realizar essa tese.

À Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem por todo seu amor, dedicação, paciência e amizade. A sua paixão pela pesquisa científica é minha fonte de inspiração. Você é mais do que minha orientadora, minha mãe de São Paulo. Muito obrigada e serei sua eterna admiradora.

Ao Dr. André Gustavo Tempone, pela co-orientação, sugestões e atenção para a concretização desse grande projeto.

Ao Dr. Oscar Zaragoza e toda sua equipe pela oportunidade de aprendizado durante a minha estadia no Instituto de Salud Carlos III em Majadahonda – Madrid, Espanha.

Ao Dr. Marcelo Vallim do Laboratório de Interações Microbianas da Universidade Federal de São Paulo que me orientou nos ensaios em modelo alternativo. Muito obrigada por sua atenção, disponibilidade, questionamentos e ensinamentos.

À Dra. Renata Castiglioni Pascon do Laboratório de Interações Microbianas da Universidade Federal de São Paulo por ceder um espaço para a realização dos testes e por proporcionar condições para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Dr. Márcio Rodrigues da Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Carlos Chagas e Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por permitir a minha presença em seu laboratório para o

aprendizado de novas técnicas que enriqueceram este trabalho. E a todos do laboratório que me acolheram com muito carinho.

À Dra. Maria Walderez Szeszs minha querida amiga e conselheira que sempre me deu muito amor, carinho e atenção. Sou muito grata a você por sempre estar disponível para me escutar. Você sabe o quanto não foi fácil finalizar este sonho.

À Marilena dos Anjos Martins que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me deu forças e me apoiou. Obrigada lindinha!

Ao Andres Avelino Baez, Mirian e Lindete que sempre me auxiliaram quando precisei e por proporcionarem condições para o desenvolvimento deste estudo. E a todos os amigos do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz – SP.

A todos do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz – SP muito obrigada por me apoiarem e me darem forças para seguir em frente.

Aos meus amigos do Laboratório de Interações Microbianas da Unifesp, Campus Diadema por compartilharem o espaço, materiais e me auxiliarem quando necessitei. Em especial as minhas amigas Amanda, Crislaine, Gabrielle e Stefania que me escutaram nos momentos em que precisei e me deram forças para finalizar esta tese.

As minhas amigas que me apoiaram e acolheram quando precisei. Desculpem a ausência em alguns momentos, mas foi necessária. Vocês sabem o quanto esse caminho foi árduo. O apoio e a compreensão de vocês foi de imensa importância nesse período. Muito obrigada!

E a todos que me acolheram durante essa longa jornada! Muito obrigada!

Apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
Nível Superior – CAPES.

- Bolsa de Doutorado

Resumo

Criptococose, causada por espécies de *Cryptococcus*, é micose letal sob a forma de meningoencefalite, com maior incidência entre indivíduos imunocomprometidos, em particular, naqueles com AIDS. Anfotericina B, fármaco tóxico, 5-fluorocitosina e terapias combinadas para criptococose não impedem recidivas e persistência da doença. Novas classes de medicamentos anti-*Cryptococcus* são necessárias para evitar o desenvolvimento de resistência a esse escasso arsenal terapêutico. A prospecção de O objetivo deste trabalho foi prospectar compostos ativos contra os principais agentes da criptococose para aumentar a gama de opções terapêuticas para essa infecção. Poucos (1,9%) compostos foram ativos contra cepas do complexo *C.neoformans/C. gattii* em uma coleção de 154 compostos neste estudo. Laevicarpina e poligodial, além de 3 fármacos antimaláricos-cicloguanil, proguanil e clorproguanil foram identificados como ativos *in vitro* contra *C. gattii*. Os valores de CE₅₀, obtidos para cicloguanil, clorproguanil foram, respectivamente, 11,33µM e 9,39µM, com MIC e MFC de 32µg/mL. Para proguanil CE₅₀ 23,87µM, MIC 16µg/mL e MFC 32µg/mL. Os fármacos apresentaram valores de CC₅₀ > 200µM para cicloguanil e proguanil, e 30,21µM para clorproguanil, demonstrando uma seletividade de >17, >8,37 e 3, respectivamente. O estudo da combinação terapêutica, demonstrou que a combinação dos antimaláricos com os fármacos tradicionais foi indiferente para AmB e 5-Fc, mas sinérgica com FCZ. O mecanismo de ação do proguanil não pode ser determinado segundo a metodologia empregada, redirecionando os estudos para outros caminhos investigativos; no entanto, foi demonstrada alteração de estruturas intracelulares, incluindo mitocôndrias, retículo endoplasmático e membrana plasmática, relacionadas à exposição ao proguanil, estimulando investimento de pesquisa nessa direção. Os ensaios de sobrevivência em larvas de *Galleria mellonella*, de outro modo, indicaram que a eficácia do proguanil

in vivo depende da sua associação com fluconazol, não tendo sido demonstrado que a monoterapia seja adequada.

Palavras chaves: preparações farmacêuticas, criptococose, *Cryptococcus*, produtos biológicos

Abstract

Cryptococcosis, caused by *Cryptococcus* species, is a lethal mycoses in the form of meningoencephalitis, with the highest incidence among immunocompromised individuals, particularly those with AIDS. Amphotericin B, toxic drug and with administration associated with adverse effects, besides fluconazole, 5-fluorocytosine and combination therapies for cryptococcosis not prevent recurrence and persistence of the disease.

New classes of anti-*Cryptococcus* drugs are needed to prevent the development of drug resistance to the current therapeutic arsenal. The aim of this work was to prospect active compounds against the main agents of cryptococcosis to increase the range of therapeutic options for this infection.

Few (1.9%) compounds were active against *C. neoformans/C. gattii* complex strains in a collection of 154 compounds in this study. Laevicarpin and polygodial, in addition to 3 antimalarial drugs-cycloguanil, proguanil and chlorproguanil, were active against *C. gattii in vitro*. The EC₅₀ values for cycloguanil, chlorproguanil were 11.33 μ M and 9.39 μ M, respectively, with MIC and MFC of 32 μ g/mL. For proguanil CE₅₀ value of 23.87 μ M, MIC16 μ g/mL and MFC32 μ g/mL. The drugs showed CC₅₀ values of > 200 μ M for cycloguanil and proguanil, and 30.21 μ M for chlorproguanil, with selective index values of >17, > 8.37 and 3, respectively. Combination therapy study showed indifference between antimalarials and the traditional drugs amphotericin B and that the combination of biguanide with traditional drugs to be indifferent to AmB and 5-Fc, but synergistic with FCZ. The mechanism of action of proguanil could not be determined according to the applied methodology, redirecting the studies to other investigative paths; however, alterations of intracellular structures, including mitochondria, endoplasmic reticulum and plasma membrane, related to the exposition of proguanil, have been shown, stimulating research investment in this direction. Otherwise, survival assay in caterpillar of *Galleria mellonella* indicated that the *in vivo*

efficacy of proguanil depends on its association with fluconazole, and monotherapy has not been shown to be adequate.

Key words: pharmaceutical preparations, cryptococcosis, *Cryptococcus*, biological products

Lista de Abreviaturas e Siglas

AFLP: *Amplified fragment length polymorphism* (Polimorfismo de Tamanho de Fragmento Amplificado)

AFST: *Antifungal susceptibility testing* (Teste de sensibilidade a antifúngicos)

AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

AmB: anfotericina B

BSA: *bovine serum albumin* (albumina sérica bovina)

CC₅₀: concentração citotóxica 50%

CE₅₀: concentração efetiva 50%

C. gatti: *Cryptococcus gattii*

C. neoformans: *Cryptococcus neoformans*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EUCAST: *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*

et al.: *et aluminii*

FCZ: fluconazol

FIC: *fractional inhibitory concentration* (concentração inibitória fracionada)

FICI: *fractional inhibitory concentration index* (índice concentração inibitória fracionada)

g: grama

HIV: vírus da imunodeficiência humana

ISC III ES: Instituto de Salud Carlos III, Espanha

L: litro

LCR: líquido cefalorraquidiano

MAT: *mating type*

MFC: *Minimal Fungicidal Concentration* (concentração fungicida mínima)

MIC: *Minimal Inhibitory Concentration* (concentração inibitória mínima)

MOPS: Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico

mg: miligrama

mL: mililitro

MLST: *Multiclocus Sequence Type* (Tipificação de sequência em múltiplos loci)

NCTC: *National Collection of Type Cultures*

PBS: *phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino)

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

RAPD: *Random Amplified Polimorfism* (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso)

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA)

ROS: *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

SFB: soro fetal bovino

SNC: sistema nervoso central

SOSA: *systemic optimization of side activitus*

UFC: unidades formadoras de colônias

VG: variedade *gattii*

VN: variedade *neoformans*

WHO: *World Organization Heath*

YEPD: *Yeast extract peptone dextrose* (extrato de levedura peptona dextrose)

°C: graus Celsius

μL: microlitro

μM: micromolar

5-FC: 5-fluorcitosina

Lista de Tabelas e Quadro

Tabela 1. Atividade anti- <i>Cryptococcus gattii</i> de fármacos e compostos naturais	65
Tabela 2. Concentração inibitória mínima (MIC) de 12 cepas-padrão dos complexos <i>C. neoformans/C. gattii</i> para o fármaco proguanil.....	68
Tabela 3. Concentração antifúngica mínima (MIC) de 6 fármacos de cepas-padrão.....	68
Tabela 4. Resultados de interações entre fármacos tradicionais e biguanídeos, frente a <i>C. gattii</i> VGII	69
Quadro 1. Estudos relacionados ao tratamento da infecção causadas por agentes da criptococose com fármacos e outros compostos em modelo experimental não vertebrado de <i>Galleria mellonella</i>	44

Lista de Figuras

- Figura 1.** Ciclo de transmissão de *Cryptococcus spp.* (Adaptado de Kwon-Chung *et al.*, 2014). 22
- Figura 2.** Distribuição na América Latina de tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* (Fonte: San-Blas e Burger, 2011). 26
- Figura 3.** Distribuição dos tipos moleculares de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* no Brasil (Fonte: Adaptado de Trilles *et al.*, 2008)..... 27
- Figura 4.** Fórmulas estruturais dos antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose. (Fonte: PubChem Compound, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>). 35
- Figura 5.** Larvas de *Galleria mellonella* durante alimentação (esquerda) e larva de coloração parda, selecionada para inoculação experimental. 43
- Figura 6.** Exemplo de placa de microtitulação para determinação de concentração inibitória mínima (MIC), onde: poços com turvação indicam crescimento fúngico e poços sem turvação (transparentes) indicam ausência de crescimento por ação antifúngica..... 52
- Figura 7.** Exemplo de placa de microtitulação contendo teste de ação antifúngica com corante Alamar Blue®, para determinação de CE₅₀, onde: coloração azul indica ausência de crescimento e rosa indica crescimento de *Cryptococcus spp.*..... 53
- Figura 8.** Inoculação de *C. gattii* VGII em *G. mellonella* na região da última propata da larva..... 61

- Figura 9.** Curvas dose-resposta de sobrevivência de *C. gattii* VGII frente a concentrações de 5 compostos: poligodial, laevicarpina, cicloguanil, proguanil e clorproguanil. 66
- Figura 10.** Curvas de crescimento de *C. gattii* VGII sob 10 concentrações de proguanil ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo, monitorada por leitura de densidade óptica (D.O) a cada hora. Linha preta: controle positivo de crescimento sem adição de fármaco. 70
- Figura 11.** Curvas de viabilidade celular de *C. gattii* VGII, sob 4 concentrações de proguanil, fluconazol e anfotericina B, durante 48 h. 71
- Figura 12.** Concentração extracelular de GXM em sobrenadante de cultura de *C. gattii* VGII. Esquerda: células não tratadas com proguanil. Direita: células tratadas com proguanil (64 $\mu\text{g/mL}$). 72
- Figura 13.** Quantificação de urease por absorvância a. Da esquerda para direita: meio de uréia sem inoculação, controle negativo com *C. albicans* (UFRJ 11), controle positivo *C. gattii* não tratado e tubo-teste com *C. gattii* VGII tratado com fármaco proguanil. b. Absorvância (560 nm) das soluções controle negativo, controle positivo e tubo teste ($p > 0,05$). 73
- Figura 14.** Detecção, em citômetro de fluxo (pelo canal FL1-H), de espécies reativas de oxigênio em cepa de *C. gattii* VGII pós-exposição a distintas concentrações (cores) de proguanil, segundo tempo de exposição (de cima para baixo e da esquerda para direita: 1h, 3h, 6h e 24h). Controle positivo de Amb, Anfotericina B, controle-negativo de PBS, solução tampão fosfato. 74
- Figura 15.** Microscopia eletrônica de célula de *C. gattii* VGII (acima) e exposta (abaixo) à 64 $\mu\text{g/mL}$ de proguanil por 3 h, onde: M,

membrana plasmática; P, parede celular; Mi , mitocôndria; N, núcleo.	76
Figura 16. Microscopia eletrônica de célula de <i>C. gattii</i> VGII exposta à 64µg/mL de proguanil por 6h (acima) e 24 h (abaixo), onde: R é retículo endoplasmático liso desorganizado e Inv é invaginação da membrana plasmática.....	77
Figura 17. Sobrevida de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculada com suspensão de <i>C. gattii</i> VGII em 5 distintas concentrações. Linha preta, grupo controle negativo inoculado com tampão fosfato de sódio (PBS).....	78
Figura 18. Sobrevida de larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas com PBS (controle negativo), com suspensão de <i>C. gattii</i> VGII (controle positivo), com os fármacos fluconazol, anfotericina B, proguanil e suas associações, em uma única concentração.....	79
Figura 19. Curvas de sobrevida de larvas de <i>Galleria mellonella</i> inoculadas com <i>C. gattii</i> VGII e tratadas com 5 esquemas terapêuticos. PBS, grupo controle negativo inoculado com tampão fosfato de sódio.....	80
Figura 20. Contagem de unidades formadoras de colônias de larvas de <i>G. mellonella</i> , infectadas com <i>C. gattii</i> VGII, em grupo controle sem tratamento e grupos tratados com distintos fármacos, segundo tempo (h) de infecção.....	81

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. A doença.....	21
1.2. Epidemiologia	23
1.2.1. Agentes etiológicos.....	23
1.2.2 Ocorrência da doença	28
1.3. Tratamento da criptococose	33
1.4. Busca de fármacos	38
1.4.1. Compostos naturais e sintéticos	39
1.5. Novas terapias.....	40
1.5.1. Combinação de fármacos	40
1.5.2. Reposicionamento de fármacos	40
1.6. Modelos de experimentação animal	42
2. OBJETIVOS.....	46
2.1. Objetivo geral	46
2.2. Objetivos específicos.....	46
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1. Micro-organismos	47
a) <i>Cryptococcus neoformans</i>	47
b) <i>Cryptococcus gattii</i>	47
c) Outras cepas-padrão do complexo <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	47
d) <i>Candida krusei</i>	48
e) <i>Candida parapsilosis</i>	48
f) <i>Candida albicans</i>	48
3.2. Células de mamíferos	48

3.3. Triagem de compostos com ação antifúngica e seleção da espécie a ser utilizada no estudo de efetividade, citotoxicidade e interação	49
3.4. Seleção da espécie de <i>Cryptococcus</i> para avaliação de efetividade de 5 compostos ativos	51
3.4.1. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de biguanídeos	51
3.4.2. Determinação da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) de 3 biguanídeos, laevicarpina e poligodial	52
3.4.3. Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de 3 biguanídeos	54
3.4.4. Determinação da citotoxicidade e índice de seletividade (IS) ..	54
3.4.5. Avaliação de interação <i>in vitro</i> entre 3 biguanídeos e fármacos utilizados na terapia da criptococose	55
3.5. Seleção de um composto ativo para testes adicionais de efetividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	56
3.5.1. Determinação do crescimento celular por absorbância, pós exposição a proguanil	56
3.5.2 Determinação da viabilidade celular pós-exposição a proguanil ..	56
3.6. Investigação de mecanismo de ação do proguanil	57
3.6.1. Produção de glucuronoxilomanana (GXM)	57
3.6.2. Produção de urease	58
3.6.3. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	59
3.7. Análise de alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão (MET) pós-exposição a proguanil	60
3.8. Avaliação de efetividade de proguanil <i>in vivo</i> em modelo alternativo de <i>Galleria mellonella</i>	60
3.8.1. Procedimentos para determinação do inóculo e infecção experimental	61
3.8.2. Ensaio de toxicidade dos fármacos	62
3.8.3. Tratamento	62
3.8.4. Unidade formadora de colônias (UFC/mL)	63

4. RESULTADOS.....	64
4.1. Triagem de ação antifúngica de compostos naturais e fármacos ativos	64
4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de biguanídeos	67
4.3. Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de 3 biguanídeos	67
4.4. Avaliação de interação <i>in vitro</i> entre 3 biguanídeos e fármacos utilizados na terapia da criptococose.....	69
4.5. Determinação do crescimento celular por absorvância, pós exposição a proguanil.....	70
4.6. Determinação da viabilidade celular pós-exposição a proguanil ...	71
4.7. Produção de glucuronoxilomanana (GXM)	72
4.8. Produção de urease.....	72
4.9. Produção de ROS.....	73
4.10. Análise de alterações ultraestruturais por MET pós-exposição a proguanil.....	75
4.11. Avaliação de efetividade de proguanil in vivo em modelo alternativo de <i>Galleria mellonella</i>	78
4.11.1. Procedimentos para determinação do inóculo e infecção experimental	78
4.11.2. Ensaio de toxicidade dos fármacos	79
4.11.3. Tratamento	79
4.11.4. Unidade formadora de colônias	80
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÕES.....	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

APÊNDICE 1.....	132
APÊNDICE 2.....	148
APÊNDICE 3.....	153

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença

Criptococose é uma importante micose sistêmica, causada por leveduras que apresentam cápsula polissacarídica englobadas no complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* (Perfect e Casadevall, 2002; Perfect e Bicanic, 2015; Kwon-Chung *et al.*, 2017). Uma nova proposta de reclassificação das espécies foi sugerida por Hagen e colaboradores em 2015, sendo para *C. neoformans* (*C. neoformans*, *C. deneoformans*, *C. neoformans* X *C. deneoformans* híbrido) e para *C. gattii* (*C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii*, *C. decagattii*).

A infecção em hospedeiros mamíferos é adquirida através da inalação de células (blastoconídios) dessecadas ou, ainda, basidiósporos, como ilustrado na **Figura 1**. Esses pequenos propágulos infectantes (1,5 µm a 3,5 µm) são fagocitados por macrófagos pulmonares, acarretando doença focal pulmonar (Heittman *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2013). Apesar da eficácia da defesa do hospedeiro, as espécies de *Cryptococcus* desenvolveram fatores de virulência que lhes permitem multiplicar, infectar e prevalecer no hospedeiro de forma eficiente; fatores que promovem a sobrevivência desses agentes mesmo frente às ações do sistema imunológico. Os fatores de virulência melhor caracterizados são: produção de cápsula polissacarídica, síntese de melanina e produção de enzimas (Steenbergen *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2014; De Aguiar *et al.*, 2017).

Em indivíduos considerados saudáveis, os propágulos são eliminados pela resposta do sistema imune. Porém, em pacientes imunocomprometidos as células infectantes proliferam e são disseminadas via hematogênica, cruzam a barreira hematoencefálica e atingem o sistema nervoso central resultando em meningoencefalite (Casadevall e Perfect 1999; Sorrel, 2001; Sabiiti e May, 2012; Orsini *et al.*, 2015). A meningoencefalite é a forma mais grave e fatal da doença em grande parte dos casos (Heittman *et al.*, 2011; Harris *et al.*, 2013). Os sintomas típicos são: febre, perda de peso, fadiga, suor noturno, tosse, dor no peito, dor de

cabeça, vômito e rigidez na nuca (Phillips *et al.*, 2015). Ainda que os principais sítios da criptococose incluam o sistema nervoso central e pulmões, pele, olhos, miocárdio, ossos, articulações, próstata e trato urinário também podem ser acometidos pela doença (Lin e Heitman, 2006; Giles *et al.* 2009; Velagapudi *et al.*, 2009; Botts e Hull 2010; Kwon-Chung *et al.*, 2014).

Cryptococcus neoformans é associado, principalmente, a pacientes imunocomprometidos, como os infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou aqueles sob terapias imunossupressivas. *C. gattii*, por sua vez, acomete também indivíduos, aparentemente, imunocompetentes (Kwon-Chung *et al.*, 1992; Park *et al.*, 2009; MacDougall *et al.*, 2011). *C. neoformans* tem preferência pelo sistema nervoso central e *C. gattii* por infectar pulmões (Speed e Dunt 1995; Chen *et al.* 2000b). Por outro lado, criptococomas pulmonares e cerebrais são formados durante a infecção por *C. gattii*, mas não por *C. neoformans* (Mitchell *et al.* 1995; Chen *et al.* 2000b; Galanis *et al.* 2010; Byrnes e Marr 2011b). A meningite causada por *C. gattii* pode ser, completamente, curada nos estágios iniciais mas, geralmente, a doença é confundida com tuberculose ou outra infecção pulmonar bacteriana, ou ainda viral, na fase inicial (Chen *et al.*, 2012).

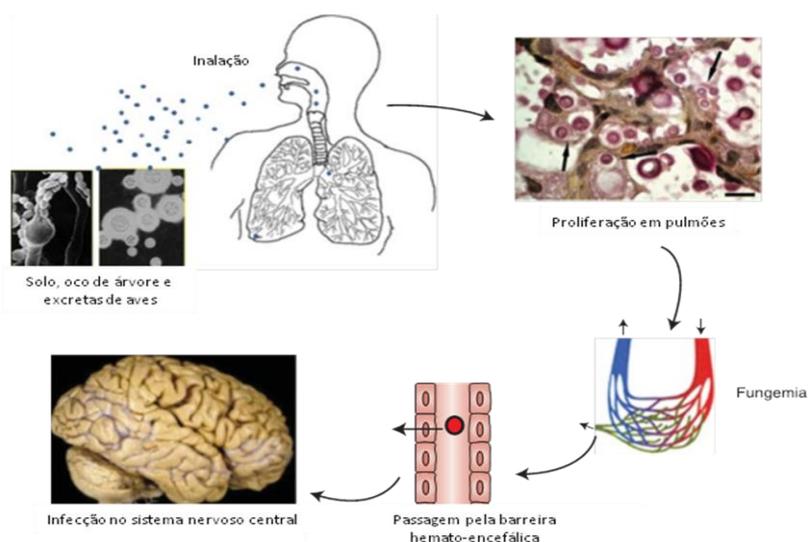


Figura 1. Ciclo de transmissão de *Cryptococcus spp.* (Adaptado de Kwon-Chung *et al.*, 2014).

1.2. Epidemiologia

1.2.1. Agentes etiológicos

Há, aproximadamente, 15 outros membros do gênero *Cryptococcus*, além de *C. neoformans* e *C. gattii*, descritos como agentes de doença humana: *C. laurentii*, *C. luteolus*, *C. albidus*, *C. diffluens* e *C. uniguttulatus* entre outros (Heitman *et al.*, 2011). As ferramentas moleculares permitiram comprovar a existência de 2 tipos conjugantes (*mating type*) *a* e *alfa* (Kwon-Chung e Bennett, 1978), sendo atribuída maior virulência ao tipo *a*. Os agentes, ainda, são classificados em variedades (análise de DNA) e sorotipos (análise de cápsula), sendo *C. neoformans* com duas variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), híbrido AD e *C. gattii* (sorotipos B e C). Os sorotipos são determinados pela composição polissacarídica da cápsula (Franzot *et al.*, 1999; Kwon-Chung *et al.*, 2006). Ainda há a descrição de interespecies híbridas entre sorotipos AB e BD (Bovers *et al.*, 2006; Bovers *et al.*, 2008). As duas espécies são definidas em genótipos, definidos como: VNI, VNII, VNIII e VNIV para *C. neoformans* e VGI, VGII, VGIII e VGIV, para *C. gattii* (Bovers *et al.*, 2008; Ngamskulrungrroj *et al.*, 2009; Firacative *et al.*, 2012). Os genótipos de *C. gattii*, VGII e VGIII, ainda podem ser subdivididos em subtipos de acordo com a técnica de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), sendo: VGIIa, VGIIb, VGIIc e VGIIIa, VGIIIb (Kidd *et al.*, 2004; Byrnes *et al.*, 2010; Byrnes *et al.*, 2011).

Com a utilização de técnicas de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *fingerprinting* e *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP) foram descritos formas híbridas VGI/VNIV (Bovers *et al.*, 2006), VNI/VGI (Bovers *et al.*, 2008; Aminnejad *et al.*, 2012) e VNI/VGII (Aminnejad *et al.*, 2012). Tais híbridos foram, raramente, descritos em diferentes áreas geográficas, a saber: um único isolado na Índia, Colômbia, Brasil, Canadá e 3 na Holanda. Entretanto, devido à dificuldade de identificação dos híbridos, pode ser que a sua prevalência seja subestimada (Bovers *et al.*, 2006; Bovers *et al.*, 2008).

A distribuição espacial, dos distintos tipos moleculares de cepas clínicas e ambientais, ao redor do mundo tem sido revelada em distintos estudos (**Figuras 2 e 3**). Estudo de Meyer e colaboradores (2011), englobando 2046 isolados clínicos e veterinários mundiais, *C. neoformans* VNI é o genótipo predominante com 63%, seguido de VGII, VGIII e VNIV (Meyer *et al.*, 2011); a maioria dos isolados VGII foi proveniente de estudos na América do Sul, dos seguintes países: Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México, Peru, Venezuela e Guatemala, sendo que 64% são do Brasil.

A distribuição e a prevalência do tipo molecular VGII é relevante para tentar esclarecer a origem do surto de *C. gattii* na Ilha de Vancouver, Costa Noroeste do Pacífico, e Estados Unidos. Esses dados confirmam a hipótese sugerida por outros autores, que o surto em Vancouver poderia ter originado na Austrália ou na América do Sul (Fraser *et al.*, 2005; Ngamskulrunroj *et al.*, 2009; Hagen *et al.*, 2013; Billmyre *et al.*, 2014; Engelthaler *et al.*, 2014). Outros estudos confirmaram a América do Sul como origem da dispersão *C.gattii* VGII. Inicialmente, foi proposto a floresta Amazônica como fonte original de *C. gattii* VGII (Hagen *et al.*, 2013), mas estudos recentes alteraram a origem desse tipo molecular para a região do deserto semiárido no Nordeste do Brasil (Souto *et al.*, 2016).

Na espécie *C. gattii*, prevalente na Ásia e região que compreende Austrália, Nova Zelândia e Nova Guiné, predomina o tipo molecular VGI, seguido de VGII e raramente VGIII (Chen *et al.*, 2014). Na Europa a maioria das infecções por *C. gattii* é por VGI; na África isolados de VGIV tem distribuição maior na região Sul (África Austral). O tipo molecular VGIV foi, também, registrado na Índia, Colômbia e México; interessante notar que isolados africanos e indianos estão, restritamente, correlacionados (por MLST) e diferentes dos isolados da América do Sul (Cogliati *et al.*, 2012b).

Na revisão de Cogliati (2013), confirma-se que o tipo molecular VNI é o prevalente no mundo e, em 2006, foi descrito um novo tipo em Botswana denominado VNB (Litvintseva *et al.*, 2006). Entretanto, estudo realizado na Itália por MLST mostrou a presença de 1 VNB, entre um grupo de isolados clínicos italianos, sugerindo que essa população está subestimada no

continente Europeu, assim como 3 isolados VNIII (Cogliati *et al.*, 2012a). Além disso, dois isolados VNB do Brasil e Colômbia, descritos anteriormente, como VNII, foram reconhecidos por análise do MLST, confirmando que o tipo molecular VNB não é exclusivo do Sul da África (Ngamskulrunroj *et al.*, 2009). Foi relatada, ainda, grande quantidade de híbridos VNIII AD que parece estar, estritamente, relacionada à presença do tipo VNIV, frequente na Europa e EUA, sugerindo que nessas regiões a formação de híbridos entre VNI e VNIV na população está ocorrendo. O tipo molecular VNII é raro, porém descritos em alguns continentes, exceto no Europeu (Cogliati *et al.*, 2012a).

No Brasil, Trilles e colaboradores (2008), em estudo com 443 isolados sobre tipos moleculares e localizações das espécies, relataram 320 isolados *C. neoformans* (251 clínicos e 69 ambientais) e 123 *C. gattii* (86 clínicos e 37 ambientais). Os tipos moleculares mais encontrados foram: VNI (64%) e VGII (21%), seguidos de VNII (5%), VGIII (4%), VGI e VNIV (3%, cada) e VNIII (<1%) e VGIV não foi identificado nesses isolados (Trilles *et al.*, 2008).

Em 2010, Souza e colaboradores, realizaram estudo na cidade de Goiânia, com 124 isolados de espécies de *Cryptococcus*, sendo 84 amostras clínicas de pacientes com Aids e 40 amostras ambientais isoladas de excretas de pombos e árvores de eucalipto. De um total de 120 isolados (80 clínicos e 40 ambientais) foram identificados como *C. neoformans* (sorotipo A, VNI) e 4 *C. gattii* clínicos (sorotipo B, VGIII).

No Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella, PiauÍ, foi conduzida uma pesquisa em 63 pacientes com meningite criptocócica, no período de janeiro 2008 a julho 2010, onde *C. neoformans* (VNI, 37/63; 58,7%) foi mais frequente, seguido de *C. gattii* (VGII, 24/63; 38,1%) (Martins *et al.*, 2011).

Freire e colaboradores em 2012, realizaram estudo em 57 isolados de *Cryptococcus* spp. de pacientes da Fundação de Medicina Tropical, Dr. Hector Vieira Dourado entre março de 2006 a fevereiro 2010. Foram encontrados 40 (70,2%) isolados de *C. neoformans*, onde VNI (39/57;

68,4%) e VNII (1/57; 1,8%) e 17 isolados de *C. gattii* onde o tipo molecular VGII (17/57; 29,8%).

Foi investigado em Hospital Referência do Mato Grosso do Sul, julho 1998 a julho 2012, 48 pacientes com infecção de corrente sanguínea por espécies de *Cryptococcus*. Em 14 anos de estudo, foram encontrados 47 (97,9%) pacientes infectados por *C. neoformans* (VNI, 45 pacientes, 93,7%; VNII, 2 pacientes, 4,2%) e 1 paciente por *C. gattii* (VGII, 2,1%) (Tsujiaki *et al.*, 2013).

Em artigo publicado em 2014 por Favalessa e colaboradores, em Hospitais Universitários de Cuiabá, agosto 2010 a julho 2013, de 27 pacientes admitidos foram isolados uma única amostra de *Cryptococcus* spp. Foram encontrados em 14 pacientes HIV positivos, 13 *C. neoformans* (VNI) e 1 *C. gattii* (VGII); 13 pacientes HIV negativos, 10 *C. gattii* e 3 *C. neoformans*.

Em estudo realizado com 18 isolados clínicos do Hospital de Clínicas de Curitiba, Paraná, no período de 1999 a 2015, todos pertenciam ao tipo molecular VGII, sendo 10 (55,6%) amostras de pacientes imunocompetentes. Foram 14 (77,8%) pacientes com envolvimento do SNC e 4 (22,2%) HIV positivos (Herkert *et al.*, 2016).

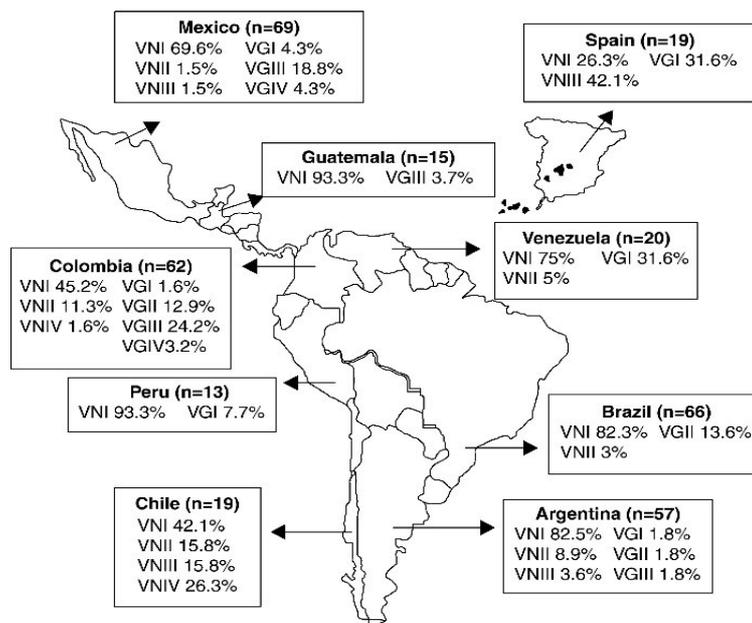


Figura 2. Distribuição na América Latina de tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii* (Fonte: San-Blas e Burger, 2011).

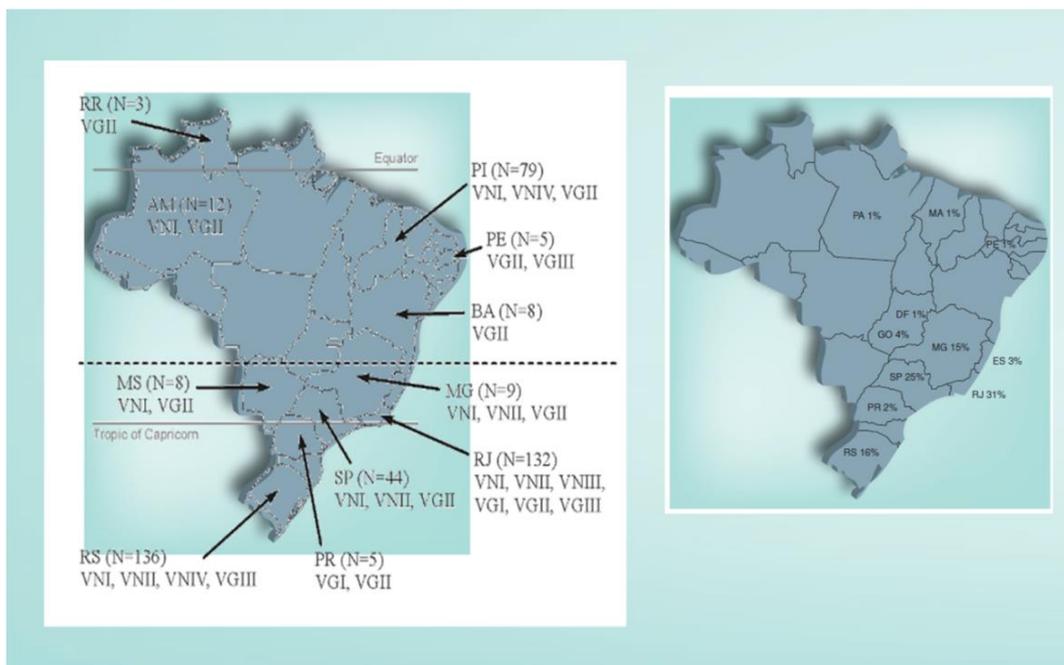


Figura 3. Distribuição dos tipos moleculares de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* no Brasil (Fonte: Adaptado de Trilles *et al.*, 2008).

A importância da determinação da espécie e do tipo molecular recai sobre diferentes aspectos. Além de questões clínicas e epidemiológicas, pode indicar diferenças na virulência e na sensibilidade aos antifúngicos (Robert e Casadevall, 2009).

É importante ressaltar que, ao considerar o fenômeno da virulência, vale lembrar que doença é resultado da interação entre um hospedeiro e um micro-organismo, uma vez que o hospedeiro pretende ter o controle do patógeno com redução de danos nos tecidos (Casadevall e Pirofski, 1999). São fatores de virulência em *Cryptococcus*: termotolerância, que é a capacidade do fungo crescer na temperatura corporal do hospedeiro (Robert e Casadevall, 2009); cápsula, uma estrutura polissacarídica complexa que se estende da parede e pode atingir dimensões que são várias vezes o diâmetro do corpo celular, seu tamanho aumenta significativamente durante a infecção, tem como maior componente a glucuronoxilomanana (GXM), seguido de galactoxilomanana (GXMGal) e manoproteínas, está intimamente associada à parede celular propiciando força e flexibilidade ao organismo em ambientes adversos além de propriedades antifagocíticas que

prejudicam o reconhecimento dos epítomos presentes na superfície da parede celular pelos receptores fagocíticos, dificultando a fagocitose (Kozel e Hermerath, 1984; McQuiston e Del Poeta, 2011; Kumar *et al.*, 2011; Coelho *et al.*, 2014; Levitz, 1994; Dupont e Smail, 1994; Liu, *et al.* 2008; Zaragoza *et al.*, 2009); a enzima lacase que faz a biossíntese de melanina a qual protege o fungo de agentes oxidantes, radiações ionizantes e agentes antifúngicos, e também contribui para a rigidez da parede celular (Wang e Casadevall, 1994a, 1994b, 1994c; Williamson, 1997); urease aparenta ter um papel crítico pois promove a travessia de fungos nas barreiras epiteliais e a invasão cerebral, mas esse fenômeno ainda é desconhecido (Olszewski *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2010, Singh *et al.*, 2013) e as fosfolipases que são enzimas que degradam fosfolipídeos.

1.2.2 Ocorrência da doença

Dados clínicos sugerem que a resposta terapêutica na infecção por *C. gattii* é mais lenta em relação a infecções por *C. neoformans*, e seu tratamento pode ser mais prolongado (Speed e Dunt, 1995; De Bedout *et al.*, 1999; Sorrel, 2001). Estudos *in vitro* demonstram que a suscetibilidade de *C. gattii* pode ser menor em relação a *C. neoformans*, em particular ao antifúngico fluconazol (De Bedout *et al.*, 1999; Garland *et al.*, 2004; Trilles *et al.*, 2004). Entretanto, em dois estudos essa diferença não é demonstrada (Chen *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2009). Uma possível razão para essas contradições são de que alguns estudos não consideraram diferenças genéticas e geográficas das duas espécies (Chong *et al.*, 2010).

Durante a maior parte do tempo, a criptococose foi associada, e os esforços em pesquisa foram focados em, *C. neoformans* como espécie patogênica dominante. Entretanto, em 1999, um surto de criptococose iniciado na ilha de Vancouver (Canadá) tendo como agente causador *C. gattii*, colocou em destaque esta espécie. O surto se propagou para o continente do Canadá e parte noroeste dos Estados Unidos (Oregon e Washington) (MacDougall *et al.*, 2007). No início, de 1999 a 2007, o surto

afetou 218 pessoas (5,8 pessoas/milhão na região/ano) com 19 mortes (8,7% de óbitos associados) (Galanis *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2015). De 2004 a 2011, o surto atingiu, aproximadamente, 100 pessoas, com taxa de mortalidade de 33% (Harris *et al.*, 2011). A maioria das pessoas apresentou a forma respiratória da doença (76,6%) ou criptococomas pulmonares (75,4%), com 1/3 de todos os pacientes apresentando a infecção no sistema nervoso central (Galanis *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2015).

Sendo *C. gattii* reconhecido como agente prevalente em regiões tropicais (Kwon-Chung e Bennet 1984), a aparição abrupta, no clima moderado da região do Pacífico, de casos da doença, não apenas em humanos saudáveis mas, também, em animais domésticos, terrestres e marinhos, alterou de modo significativo os conhecimentos da epidemiologia da criptococose (Stephen *et al.* 2002; Kidd *et al.* 2004; MacDougall *et al.* 2007; Upton *et al.* 2007).

A determinação da localização geográfica dos agentes da criptococose representa ferramenta importante para indicar os locais de sua sobrevivência e multiplicação no meio ambiente e, dessa maneira, identificar áreas de alto risco para aquisição da doença (Cogliati *et al.*, 2017). Os agentes de criptococose não são fitopatógenos, mas fontes arbóreas são locais de contaminação de *Cryptococcus* spp., incluindo: casca de árvores, troncos, ocos e madeira em decomposição (Lazera *et al.*, 2000; Nishikawa *et al.*, 2003; Xue *et al.*, 2007; Jesus *et al.*, 2012; Warpeha *et al.*, 2013). Esses fungos não pertencem à microbiota de solo e estudos datados de 1955 mostram que são encontrados em áreas com presença de pombos, galinhas e outras espécies de aves como, também, em guano de canários, papagaios e periquitos (Emmons, 1955; Casali *et al.*, 2003; Lugarini *et al.*, 2008; Litvintseva *et al.*, 2011). Estudos em *C. neoformans* indicam que esta espécie interage, como patógeno intracelular facultativo e outras situações, com outros organismos, como: amebas, ácaros, insetos, da mesma maneira como ocorre em macrófagos humanos, e que essa interação é um componente importante na evolução da espécie (Steenbergen *et al.*, 2001; Casadevall e Pirofiski, 2007).

Em recente estudo, Cogliati e colaboradores (2017) demonstraram a presença ambiental de *C. neoformans* e *C. gattii* na Europa e na bacia do Mediterrâneo, em amostras de solo, fontes arbóreas, excretas de animais domésticos (cães, gatos, cabras) e selvagem (esquilo). Na área geográfica pesquisada, foram encontrados 84 pontos de ocorrência para *C. neoformans* var. *grubii*, 26 para *C. neoformans* var. *neoformans* e 21 para *C. gattii*. Os resultados mostraram que casos infectados por *C. gattii* podem ocorrer no sul da Europa, ou seja, ao longo da costa sudeste da Espanha, sul da Itália, Grécia e em algumas áreas ao longo da costa da África. Casos autóctones de criptococose por *C. gattii* descritos na literatura estão de acordo com o mapa de distribuição previsto desta espécie, com a maioria dos casos relatados no sul da Itália, Grécia e Espanha (Velegraki *et al.*, 2001; Colom *et al.*, 2003; Iatta *et al.*, 2012; Hagen *et al.*, 2012).

A distribuição ambiental de *C. neoformans* var. *grubii* corresponde às costas da Itália e França, costa do sul da França, costa da Croácia, Albânia, Grécia, sul da Turquia e várias áreas do norte da África, sendo isolados clínicos encontrados em todo o continente europeu (Cogliati *et al.*, 2017).

Uma alta probabilidade de ocorrência de casos de criptococose por *C. neoformans* var. *neoformans* foi prevista no centro de Portugal, norte da Itália, Sicília Central e Sardenha Central, bacia de Paris, Grécia, região do Bósforo, província de Adana e na faixa subcontinental perto da costa mediterrânea da Argélia. Isolados clínicos foram, primeiramente, encontrados na Dinamarca, França, Alemanha, norte da Itália, Portugal e Espanha, confirmando a presença deste patógeno em áreas continentais e subcontinentais da Europa (Cogliati *et al.*, 2013 e 2017).

A criptococose é a terceira complicação neurológica mais frequente em pacientes HIV; de modo global, *C. neoformans* é o agente nessa população, com exceção da África, em que *C. gattii* é a espécie mais frequente (Del Valle e Piña-Oviedo, 2006; Chen *et al.*, 2014). Em artigo de Cogliati (2013) encontra-se um compilado de informações sobre *C. neoformans* e *C. gattii*, mostrando que, do total de 68.811 isolados clínicos e ambientais, a maioria foi obtida na Ásia (n=19.651) e África (n=19.647),

seguido da América Central e América do Sul, com 10.548 isolados, Europa (n=8.736), América do Norte (n=7.922) e Oceania (n=2.518). Os países prevalentes em número de isolados foram: África do Sul (15.361), China (9.736), EUA (6.198) e Brasil (5.709). Estados Unidos foi o país onde os isolados ambientais foram mais pesquisados, com total de 1.089, seguido por Brasil (893), Austrália (742) e Índia (569).

Em revisão de Cogliati (2013), *C. neoformans* (88,6%) foi o agente mais frequente, globalmente, em relação a *C. gattii* (11,4%). A doença causada por *C. neoformans* mata 650.000 pacientes com HIV/AIDS no mundo todos os anos (Park *et al.*, 2009); a infecção por *C. gattii* está presente, entretanto, estudos recentes indicam que pode estar mal ou sub diagnosticada (Iverson *et al.*, 2012; Tintelnot *et al.*, 2015). Um milhão de casos de meningite criptocócica associada à aids ocorrem, aproximadamente, a cada ano (Park *et al.*, 2009). Ainda que Aids seja importante, outras condições relevantes para a aquisição da infecção são: tratamento longo com corticoesteróides, transplante de órgãos, *diabetes mellitus*, sarcoidose e linfocitopenia idiopática (Casadevall e Perfect, 1999; Perfect, 2010).

Em dezembro de 2013, um total de 31,8 milhões de adultos no mundo viviam com HIV, sendo 21,7 milhões na África Subsaariana. Anualmente é estimado, que há 223.100 casos de meningite criptocócica no mundo, sendo que 73% dos casos ocorresse na África Subsaariana. E a região com a segunda maior incidência é a Ásia e o Pacífico com 43.200 casos (19% do total). São estimadas 181.100 mortes, mundialmente, por meningite criptocócica, sendo 135.900 mortes na África Subsaariana. Globalmente, a meningite criptocócica resulta em 15% da mortalidade relacionada à AIDS (Rajasingham *et al.*, 2017). A incidência global de meningite criptocócica é substancial, 223.100 casos por ano, resultando em morte anual de 181.100 casos em 2014 (Castelnuovo *et al.*, 2009; Rajasingham e Boulware, 2012; Rajasingham *et al.*, 2017). Estima-se que, em países de baixa renda, a mortalidade em 1 ano, após meningite criptocócica seja de 70% para os pacientes em tratamento e 100% para os sem tratamento. Em países de

renda média, presume-se mortalidade de 40%, com base no resumo estatístico de resultados daqueles que receberam tratamento com anfotericina B e fluconazol e 60% para aqueles que não foram cuidados (isto é, não receberam a terapia antiretroviral). Na Europa (incluindo a Europa Oriental e a Rússia), estimou-se mortalidade de 30% para os que estavam em tratamento e para 45% para os não tratados. E na América do Norte, 20% de mortalidade para os pacientes em tratamento e 30% para aqueles que não recebiam tratamento (Rajasingham *et al.*, 2017).

A América Latina é a terceira região no mundo com, aproximadamente, 54.400 casos de meningite criptococócica por ano (Vidal *et al.*, 2013). Na Colômbia, um inquérito nacional de criptococose permitiu estimar, de modo mais preciso, o espectro da doença, com incidência média de 2,4 casos em 1.000.000 indivíduos, entre 1995 e 2010. Nos pacientes com HIV, a incidência variou de 3 casos a 3,3 casos por 1.000 casos (Lizarazo *et al.*, 2007, Escandón *et al.*, 2012). No Brasil, não sendo doença de notificação compulsória, o valor exato da incidência de criptococose é desconhecida (Ministério da Saúde, 2010) Em estudo temporal das condições associadas à aids, de 1980 a 1999, a incidência de criptococose foi de 4 casos de meningite criptococócica/100 casos (Guimarães, 2000). A doença foi caracterizada como a micose mais frequente causadora de morte em pacientes com Aids (Prado *et al.*, 2009). Entre 1980 a 2002, aproximadamente, 215.000 casos de aids foram registrados no país, com 6% deles diagnosticados com criptococose (Nucci *et al.*, 2010). Em um hospital de referência no Estado de São Paulo, foram diagnosticados 98 pacientes HIV com meningite por *Cryptococcus* spp. em apenas um ano de estudo (Vidal *et al.*, 2012).

1.3. Tratamento da criptococose

Esse arsenal terapêutico é limitado e tem como base antigos fármacos, usados ou não em combinação. São utilizadas apenas 3 classes de antifúngicos no tratamento: azóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol), polienos (anfotericina B desoxicolato, anfotericina B lipossomal) e derivados da pirimidina (5-fluorocitosina). A escolha depende do estado imunitário do paciente, da doença de base, do sítio de infecção e toxicidade do antifúngico (Consenso Brasileiro de Criptococose, 2008; Perfect *et al.*, 2010). As estruturas químicas desses compostos encontram-se na **Figura 4**.

Fluconazol (FCZ) é um antifúngico azólico, peso molecular 306.277g/mol, fórmula molecular $C_{13}H_{12}F_2N_6O$, fungistático, com mecanismo de ação na inibição da enzima esterol 14-alfa-demetilase, parte de um sistema de enzimas dependentes do citocromo P450; o fármaco comprometendo, assim, a biossíntese do ergosterol na membrana plasmática e leva ao acúmulo de 14-alfa-metilesteróis, que por sua vez são tóxicos à célula fúngica (Laurence *et al.*, 2012). Itraconazol (peso molecular 705.641g/mol, fórmula molecular $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$) e voriconazol (peso molecular 349.317g/mol, fórmula molecular $C_{16}H_{14}F_3N_5O$) são, também, fármacos azólicos, fungistáticos, com mesmo mecanismo de ação do FCZ. De acordo com o consenso brasileiro de criptococose (2008), o itraconazol pode ser utilizado: no tratamento das formas pulmonares quando o paciente for HIV positivo ou cultura positiva de espécime respiratório, sem envolvimento do SNC; ou HIV positivo e outras formas de imunodepressão em SNC ou doença disseminada, na fase de manutenção. Voriconazol pode ser usado na fase de consolidação do tratamento da criptococose e apresenta boa atividade *in vitro* contra seus agentes etiológicos (Espinell-Ingroff *et al.*, 2012).

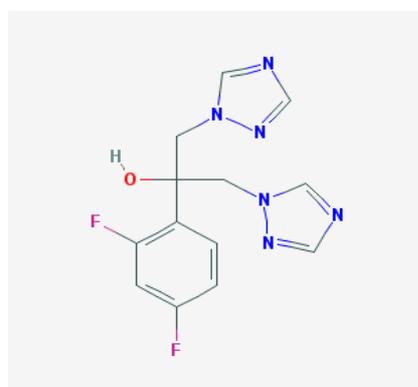
A anfotericina B (AmB) foi descoberta em 1956, por Gold e colaboradores, e pertence à família dos macrolídicos poliênicos. Apresenta peso molecular 924.091 g/mol e fórmula molecular $C_{47}H_{73}NO_{17}$, insolúvel em água e foi formulada em 1958 para infusão endovenosa (IV) através da

formação de um complexo com o sal biliar desoxicolato (Laurence *et al.*, 2012). Fármaco fungicida, tendo como mecanismo de ação a ligação a um grupo esterol, principalmente, ergosterol presente na membrana fúngica. Em virtude dessa interação formam-se poros, ou canais, resultando em aumento da permeabilidade da membrana e permitindo desse modo, o extravasamento de variedade de íons (Laurence *et al.*, 2012). Tem capacidade de se ligar ao colesterol das células de mamíferos, o que resulta em seu potencial tóxico, em particular, a nefrotoxicidade (Laniado-Laborín e Cabrales-Vargas, 2009). A formulação lipídica de AmB é melhor tolerada do que a de desoxicolato pois resulta em menor nefrotoxicidade e melhor eficácia (Gulati *et al.*, 1998; Saliba e Dupont, 2008; Laborín & Cabrales-Vargas, 2009). No entanto, sabe-se que existem outros mecanismos de ação ainda desconhecidos (Mesa-Arango *et al.*, 2012). A anfotericina B induz o acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Belenky *et al.*, 2013). Essas espécies são derivadas do metabolismo do oxigênio.

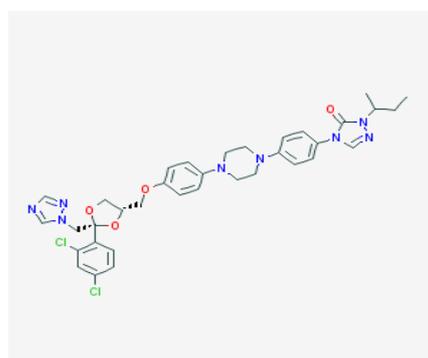
As mitocôndrias são a maior fonte endógena de produção de radicais livres nos eucariotos. Os radicais livres são subprodutos naturais da cadeia respiratória e contribuem para sinalização, adaptação metabólica e imunidade. No entanto, em condições para as quais a concentração endógena de ROS aumenta (ex. presença de oxidantes, luz ultravioleta, ou outros estímulos externos), eles produzem alterações em diferentes macromoléculas (proteínas, lipídios e DNA), que eventualmente levam danos à célula e morte. Por estas razões, ROS tem sido associada com apoptose e envelhecimento (Farber, 1994; Thannickal e Fanburg, 2000; Mesa-Arango *et al.*, 2014).

A 5-fluorocitosina (5-FC) é uma pirimidina fluoretada com maior ação seletiva sobre fungos, em relação a células humanas (Laurence *et al.*, 2012). Trata-se de um fármaco fungistático, bem absorvida de forma rápida pelo trato gastrointestinal (Cuenca-Estrella, 2010). Demonstra excelente absorção após a administração oral (80% -90%) e a maior parte do fármaco (> 90%) é excretada, de forma inalterada, na urina. O fármaco tem modo de ação

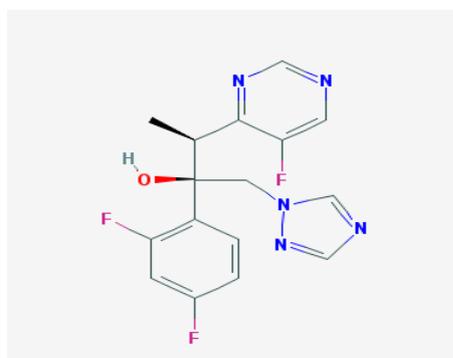
distinto dos polienos e azóis. Fluorocitosina entra na célula fúngica via permease citosina e, deste modo, é metabolizada pela enzima em 5-fluorouracil que inibe síntese protéica resultando em crescimento desequilibrado e morte do organismo (Cuenca-Estrella *et al.*, 2001). A combinação de fluorocitosina com anfotericina B é recomendada no tratamento de infecções criptocócicas, desde que a monoterapia com 5-FC induz resistência (Perfect *et al.*, 2010).



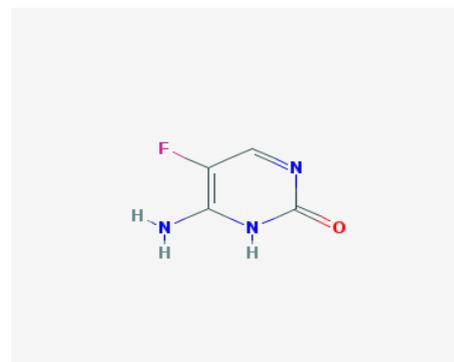
a. fluconazol



b. itraconazol



c. voriconazol



d. 5-fluorocitosina

Figura 4. Fórmulas estruturais dos antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose. (Fonte: PubChem Compound, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>).

Para meningite criptocócica o tratamento é dividido em 3 fases: a fase de indução da terapia com anfotericina B; seguido da fase de consolidação por 8 semanas e por fim a terapia de manutenção com fluconazol, de forma contínua por 6 a 12 meses e/ou até a melhora do sistema imune (Perfect *et al.*, 2010). Em regiões com recursos escassos, o fluconazol é comumente utilizado como alternativa à anfotericina B (Sloan *et al.*, 2009).

A terapia da meningite criptocócica, com base em evidências, tanto na era pré quanto na pós HIV é uma das melhores da micologia médica. Muitos estudos clínicos, analisando início e término de fase terapêutica, incluindo tempo e taxa de esterilização do liquor, demonstraram a maior efetividade da combinação de AmB com 5-FC, em relação à terapia única com AmB (Bennett *et al.*, 1979; Larsen *et al.*, 1990; van der Horst *et al.*, 1997; Brouwer *et al.*, 2004). A combinação de anfotericina B e 5-FC, como tratamento “padrão-ouro” para meningite criptocócica é indicada em ambos os *guidelines*, da *Infectious Disease Society of America* (Perfect *et al.*, 2010) e da *World Health Organization (Treatment Guidelines WHO, 2011)* e foi reafirmado, recentemente, em um grande estudo clínico no Vietnã (n = 299) (Day *et al.*, 2013). Apesar dessas orientações, o acesso global a esse tratamento permanece de difícil acesso, seja pela indisponibilidade de 5-FC, seja pelo alto custo da formulação lipossomal de AmB com mesma eficácia e menor toxicidade (Vidal *et al.*, 2013; Hamill *et al.*, 2010). De grande importância e representando um fator limitante do uso da AmB na forma de desoxicolato, é o seu efeito nefrotóxico e indução de anemia (Loyse *et al.*, 2013; Perfect e Bicanic, 2015). Além de outros efeitos colaterais como: febre, mal-estar, perda de peso, dor de cabeça, hipotensão, dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia e mialgia (Gulati *et al.*, 1998; Laniado-Laborín & Cabrales-Vargas, 2009).

O desenvolvimento de terapias antifúngicas diminuiu, infelizmente, pois a indústria farmacêutica tem dado menor atenção à essas patologias, visto que, a mais nova classe de antifúngicos introduzida na prática clínica, as equinocandinas, foi descoberta por volta de 1970 e trazida para o

mercado 30 anos depois, no começo do ano 2000 (Roemer e Krysan, 2014). Vale notar que as equinocandinas não apresentam atividade anti-*Cryptococcus* (Perfect *et al.*, 2010). Ainda com esse arsenal terapêutico, infecção recorrente e recidivas são freqüentes em criptococose. Com estas considerações, é clara a necessidade da descoberta de novos fármacos: produtos naturais, sintéticos, reposicionamento e combinação.

1.4. Busca de fármacos

Novos fármacos para criptococose devem ser pesquisados como ocorre para qualquer outro micro-organismo. A determinação da concentração efetiva de 50% (CE₅₀), assim como concentração inibitória mínima (*minimum inhibitory concentration*, MIC) e concentração fungicida mínima (*minimum fungicidal concentration*, MFC) são parâmetros usados para medir a eficácia do composto (Herrerros *et al.*, 2001; Klafke *et al.*, 2013; Magalhães *et al.*, 2013).

No encontro de atividade anti-*Cryptococcus*, testes de citotoxicidade devem ser executados para avaliação do índice de seletividade antes do seguimento do seu estudo para uso animal (Butts *et al.*, 2015; Forbes *et al.*, 2015); sendo o novo composto ativo e com seletividade adequada, o (s) mecanismo (s) de ação anti-*Cryptococcus* deve(m) ser investigados (Dolan *et al.*, 2009; Butts *et al.*, 2013; Roemer e Krysan, 2014; Krysan, 2015).

A investigação de novos produtos com ação antifúngica deve ser realizada com método de referência. Nesse sentido, o Instituto Norte Americano *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) publicou uma série de documentos intitulados M27 aplicados à testes com leveduras (CLSI, 2013). A associação europeia de microbiologia (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, ESCMID) formou um comitê para padronização de métodos para testes com antimicrobianos (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) e dentro deste, um subcomitê para antifúngicos (*Antifungal Susceptibility Testing*, AFST-EUCAST). O AFST-EUCAST propôs modificações no método do CLSI, no

intuito de tornar mais rápido a obtenção de resultados e mais objetiva a sua leitura, publicada como série E.Def. 7.1 (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2008). Os resultados, como demonstrados em estudos prévios são equivalentes por ambos os métodos, de modo que ambos podem ser utilizados na triagem de novos fármacos (Espinel-Ingroff *et al.*, 2005; Cuenca-Estrella *et al.*, 2010; Pfaller *et al.*, 2011; Purisco *et al.*, 2012). Em 2012, o comitê europeu publicou uma nota técnica referente ao documento E.Def. 7.2, onde incluíram o teste de susceptibilidade para *Cryptococcus* (Arendrup *et al.*, 2012).

1.4.1. Compostos naturais e sintéticos

Dentre todos os antibióticos utilizados na clínica médica, cerca de 80% são, diretamente ou indiretamente, derivados de produtos naturais (Roemer *et al.*, 2011; Negri *et al.*, 2014). Quanto aos antifúngicos, duas das três principais classes atualmente utilizadas, são derivadas de produtos naturais (polienos e equinocandinas) (Roemer e Krysan, 2014).

Na busca de novos produtos, estudo realizado para analisar o perfil de sensibilidade de 2 isolados de *C. neoformans* frente a extratos de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.), catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.), quixabeira (*Bumelia sartorum* Mart.) e jatobá (*Hymenaea courbaril* L.), todos apresentaram ação antifúngica (Barbosa Junior *et al.*, 2015).

A atividade antifúngica da seiva de *Hymenaea courbaril* L., e seu principal constituinte fisetina, foi demonstrada frente a isolados de *C. neoformans* (da Costa *et al.*, 2014). O óleo essencial de *L. nobilis* L. apresentou atividade antifúngica contra as cepas de *C. neoformans* (Pinheiro, 2014). O extrato bruto e frações hidroalcoólicas de *Hymenaea martiana* foram, também, ativos para *C. neoformans* (de Souza *et al.*, 2010), assim como, a fração de acetato-etil de *Hypericum perforatum*, contendo concentrações de xantonas (Tocci *et al.*, 2013). Oito extratos e 12 frações obtidas de *Pterogynenitens* Tul., *Fabaceae*, foram submetidas a testes antifúngicos frente a *C. neoformans*, demonstrando atividade fraca a

moderada (MFC > 1000mg/L) e comportamento fungistático dos extratos (Regasini *et al.*, 2010).

Poucas moléculas químicas foram demonstradas com atividade anti-*Cryptococcus*. Como exemplo, duas novas classes foram apresentadas: 1,2-benzisothiazolinonas (BTZ) (Dou *et al.*, 2011) e um conjunto de arilamidinas (T-2307) (Mitsuyama *et al.*, 2008). Compostos carbazólicos, furano e benzimidazólicos mostraram atividade frente a *C. neoformans* (Del Poeta *et al.*, 1998a). Vinte análogos da pentamidina e 30 benzimidazóis dicatiônicos, do mesmo modo, foram ativos contra essa espécie (Del Poeta *et al.*, 1998b).

1.5. Novas terapias

1.5.1. Combinação de fármacos

Uma estratégia importante na busca por novas terapias é a combinação terapêutica de fármacos para manejo de doenças, visando a seleção de sinergismo entre os compostos químicos que favoreceriam a diminuição ou prevenção de resistência clínica, aumento da eficácia do tratamento e/ou diminuição do tempo de administração do tratamento (Borisy, *et al.*, 2003). Combinações terapêuticas são padrões no tratamento de várias doenças virais, bacterianas ou mesmo fúngicas, sendo uma abordagem bastante promissora para estudo de novas terapias para criptococose (Segal *et al.*, 2007).

1.5.2. Reposicionamento de fármacos

Em 2004, Wemuth foi um dos primeiros defensores da triagem de fármacos aprovados para novas atividades, criando o termo “*systematic optimization of side-activities*” ou SOSA.

A avaliação de fármacos para além das suas indicações terapêuticas aprovadas inicialmente é um dos caminhos na descoberta de novas terapias (Ashburn *et al.*, 2004). Esta estratégia é conhecida como reposicionamento de fármacos ou “*drug repurposing, drug repositioning, piggy-back chemotherapy, therapeutic switching*” (Ekins *et al.*, 2011). O reposicionamento apresenta vantagens, em relação à pesquisa de novas substâncias ativas; o uso clínico de um medicamento já disponível no mercado é imediato e para a empresa farmacêutica fabricante há redução do custo da pesquisa e ampliação da indicação terapêutica (Cavalla, 2009).

Um dos primeiros exemplos de moléculas candidatas anti-*Cryptococcus* são de agentes imunossupressores da classe dos inibidores de calcineurina (Segal e Steinbach, 2007). Outro fármaco, o astemizol, indicou ter excelente atividade frente a *C. neoformans* e sinergismo com fluconazol (Vu e Gelli, 2010). A atividade do antidepressivo sertralina foi demonstrada, frente a *C. neoformans*, também com efeito sinérgico e aditivo com fluconazol (Zhai *et al.*, 2012). Em um grande estudo, do total de 1120 medicamentos reposicionados e moléculas bioativas testadas, foram encontradas 31 com atividade fungicida para *C. neoformans*, sendo 15 inéditas (Butts *et al.*, 2013). Butts e colaboradores (2014) demonstraram atividade fungicida *in vitro* de dois fármacos utilizados no tratamento do câncer de mama, tamoxifeno e toremifeno, além de apresentarem efeito sinérgico com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B. Além desses, amiodarona e tioridazina mostraram-se ativos contra essa espécie (Dolan *et al.*, 2009).

A atividade da aspirina e do ibuprofeno foi avaliada frente a 10 diferentes isolado de *C. neoformans* e *C. gattii* demonstrando atividade e ressaltando o sinergismo do ibuprofeno com fluconazol e anfotericina B (Ogundeji *et al.*, 2016). Ogundeji e colaboradores em 2017, revelaram atividade anti-*Cryptococcus* de dois antipsicóticos (quetiapina e olanzapina) e atividade sinérgica com fluconazol e anfotericina B de ambos os fármacos.

Em vista da dificuldade de tratamento efetivo para criptococose e de sua importância em termos de morbidade e mortalidade, em particular em

pacientes com aids, torna-se necessário ampliar o espectro terapêutico para a doença, seja por avaliação de compostos inéditos ou reposicionados.

1.6. Modelos de experimentação animal

A busca por modelos alternativos *in vivo* para a substituição ou complementação dos estudos em mamíferos é árdua. São encontrados vários estudos em fungos de importância médica em animais não vertebrados, como exemplos, podemos citar: em larva de *Galleria mellonella*, mosca da *Drosophila*, nematódeo *Caenorhabditiselegans*, amebas do solo *Acanthamoebacastellanii* e *Dictyosteliumdiscoideum*, bicho da seda *Bombyx mori*, mosquito *Culex quinquefasciatus*, barata alemã *Blatella germânica* (Lionakis, 2011). O grupo dos insetos é o de mais sucesso e são encontrados em quase todos os habitats (Kavanagh e Reeves, 2004).

O modelo de *Galleria mellonella* (**Figura 5**) pode ser utilizado para o estudo da eficácia *in vivo* de agentes antifúngicos (Mylonakis *et al.*, 2005). O primeiro patógeno fúngico humano a ser descrito nesse modelo foi *Candida albicans*, onde o desafio foi estudar a susceptibilidade da larva ao fungo e reconhecer as cepas de *C. albicans* em patogênicas ou não-patogênicas (Cotter *et al.*, 2000).

Características do modelo em *G. mellonella* em comparação à mamíferos: são mais baratas e fácil de manter, não é necessário o uso de laboratório e nem de equipamentos especializados, e até o momento não necessitam de aprovação de Ética. O modelo também permite estudos de *high throughput screening* em larga escala que não seria ético ou financeiramente possível utilizando mamíferos (Fuchs *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2016). Uma característica importante deste modelo é que, pode ser facilmente inoculado com doses precisas dos patógenos, permitindo comparar a virulência das cepas e mutantes, além de possibilitar a medida de fatores chave no desenvolvimento de medicamentos, incluindo resposta

imunológica do hospedeiro, a eficácia, e toxicidade (Pukkila-Worley *et al.*, 2009; Chamilos *et al.*, 2007; Sabiiti *et al.*, 2011; Campion *et al.*, 2016).

O **Quadro 1** apresenta estudos relacionados ao tratamento da criptococose com fármacos e outros compostos em modelo de *G. mellonella*.

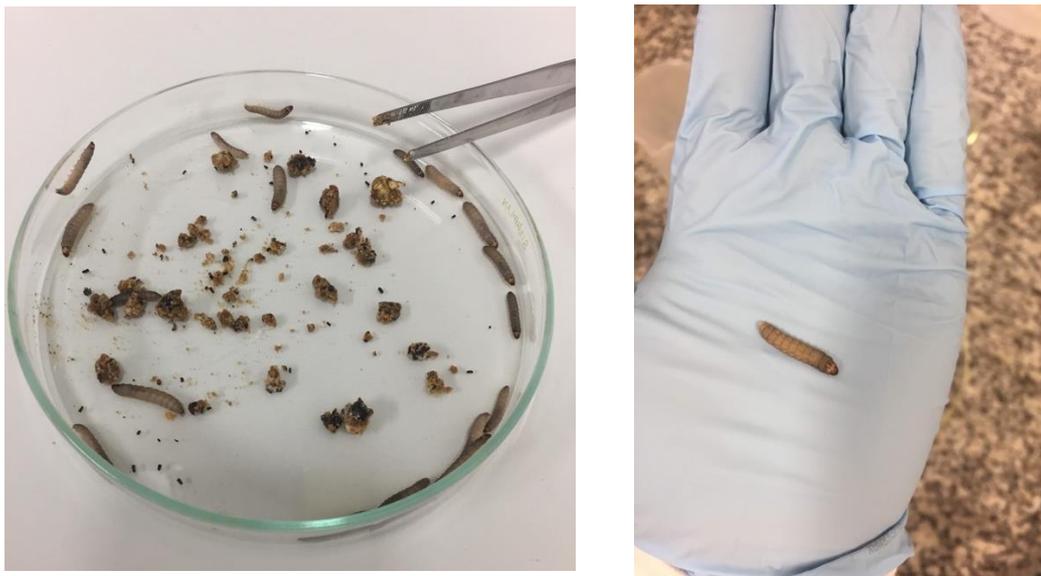


Figura 6. Larvas de *Galleria mellonella* durante alimentação (esquerda) e larva de coloração parda, selecionada para inoculação experimental.

Quadro 1. Estudos relacionados ao tratamento da infecção causadas por agentes da criptococose com fármacos e outros compostos em modelo experimental não vertebrado de *Galleria mellonella*

Autor	<i>Cryptococcus</i> spp.	Inóculo	Fármaco	Dose	n° larvas	Tratamento	Tempo
Palanco <i>et al.</i> , 2017	<i>C. gattii</i> (ATCC 56990 e isolado 118)	10µL (1X10 ⁶ cels/larva)	3-hydroxychalcone Anfotericina B	10µL (2, 80 and 160 mg/kg) 10µL (2mg/kg)	16/grupo (150mg)	Após a infecção	7 dias
Sangalli - Leite <i>et al.</i> , 2016	<i>C. neoformans</i> (ATCC 90112)	10µL (1X10 ⁶ cels/larva)	Pedaltina (PED) Anfotericina B (AmB)	10µL AmB (0.5, 1, 2 e 4mg/kg) 10µL PED (6.25, 15, 25, 40, 50, 100 e 200mg/kg) Combinação: AmB 0.3mg/kg + PED 10mg/kg	16/grupo (150-200mg)	1h após infecção	7 dias
Córdoba <i>et al.</i> , 2014	<i>C. neoformans</i>	10 µL (1X10 ⁶ cel/mL)	Anfotericina B (AB) Voriconazol (VZ) Fluconazol (FZ)	AB (1µg/g/larva) VZ (1µg/g/larva) FZ (20µg/g/larva)	60	Início pós inoculação, nos tempos 0 e 24h	15 dias

Cont. Quadro 1. Estudos relacionados ao tratamento da infecção causadas por agentes da criptococose com fármacos e outros compostos em modelo experimental não vertebrado de *Galleria mellonella*

Autor	<i>Cryptococcus</i> spp.	Inóculo	Fármaco	Dose	n° larvas	Tratamento	Tempo
Vu e Gelli, 2010	<i>C. neoformans</i> (H99)	8 µL (1.2X10 ³ cels)	Fluconazol (FCZ) Astemizol (AS) Análogo do astemizol (A2)	FCZ (4mg/mL) AS (4 mg/mL) A2 (10mg/mL)	14 (300mg ± 30mg)	48h após a infecção	≈ 7 dias
Mylonakis et al., 2005	<i>C. neoformans</i> (H99)	10 µL 1.2X10 ³ UFC/larva	Anfotericina B (AmB) Fluconazol (FCZ) Fluorocitosina (Fc)	AmB (1.5mg/kg), FCZ (14mg/kg), Fc (20mg/kg)	12 a 16 (330 ± 25mg)	início 48h após a infecção	Até evento morte
			Ampicilina (AM) - profilaxia Anfotericina B (AmB) Fluconazol (FCZ) Fluorocitosina (Fc)	AM (20mg/kg), AmB (1mg/kg), FCZ (14mg/kg), Fc (20mg/kg), Combinação: AmB (1mg/kg) + Fc (20mg/kg)	12 a 16 (330 ± 25mg)	4h antes do grupo profilático; 4h após inoculação (grupo de tratamento)	

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Prospectar compostos ativos contra os principais agentes da criptococose para aumentar a gama de opções terapêuticas para essa infecção.

2.2. Objetivos específicos

- Triagem antifúngica, de compostos naturais, fármacos e compostos sintéticos, sobre as espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii*;
- Indicar a espécie com maior sensibilidade para os testes de efetividade *in vitro* e *in vivo* e citotoxicidade *in vitro*;
- Selecionar compostos ativos para avaliação de efetividade, segundo concentrações: efetiva, mínima inibitória e fungicida mínima;
- Analisar citotoxicidade e índice de seletividade dos 3 compostos;
- Avaliar interação *in vitro* dos compostos com fármacos utilizados no tratamento de criptococose;
- Selecionar um dos compostos ativos para avaliar ação sobre viabilidade celular em comparação com fármacos utilizados para tratamento da criptococose;
- Investigar mecanismos de ação de um composto selecionado, quanto à produção de glucuronoxilomanana capsular, urease, espécies reativas de oxigênio;
- Descrever alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão pós-exposição ao composto selecionado, e
- Pesquisar em modelo de experimentação alternativo de *Galleria mellonella*, a ação do composto selecionado na infecção criptocócica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas

Todas as cepas utilizadas no estudo foram semeadas em ágar cromogênico (CHROMagar *Candida* Medium, BD) para certificação de sua pureza, antes dos testes.

a) *Cryptococcus neoformans*

A cepa-padrão *C. neoformans* tipo molecular VNI, sorotipo A, AFLP1, *mating type* α , origem Sidnei, hospedeiro HIV positivo, fonte líquido cefalorraquidiano, gentilmente, cedida pela Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ) e determinada como WM148 por Dr. Wieland Meyer (Universidade de Sidney, Austrália) foi utilizada nos testes de triagem de 42 compostos ativos, segundo metodologia AFST-EUCAST, para fármacos (n=18), compostos naturais (n=23) e sintético (n=1).

b) *Cryptococcus gattii*

A cepa-padrão *C. gattii* tipo molecular VGII, sorotipo B, AFLP6, *mating type* α , origem Sidnei, hospedeiro imunocompetente, fonte líquido cefalorraquidiano, gentilmente, cedida pela FIOCRUZ e determinada como WM 178 por Dr. Wieland Meyer (Universidade de Sidney, Austrália) foi utilizada nos testes de triagem de 123 compostos, segundo metodologia EUCAST- AFST, incluindo: fármacos (n=57), compostos naturais (n=37) e sintéticos (n=29).

c) Outras cepas-padrão do complexo *C. neoformans* e *C. gattii*

Além das cepas citadas no item *a* e *b*, outras 10 cepas-padrão foram utilizadas para definir a espécie mais suscetível (menor valor de MIC) para

melhor avaliação da atividade do mesmo. As cepas do complexo *C. neoformans* gentilmente, cedidas pela FIOCRUZ, foram: H99 (VNI, sorotipo A), B3501 (VNIV, sorotipo D), WM626 (VNII, sorotipo A), WM628 (VNIII, sorotipo AD) e WM629 (VNIV, sorotipo D). Complexo *C. gattii*: WM179 (VGI, sorotipo B), WM175 (VGIII, sorotipo B), WM779 (VGIV, sorotipo C), NIH191 (VGIII, sorotipo C) e CBS (CDC R265, VGII, sorotipo B).

d) *Candida krusei*

A cepa-padrão *American Type Culture Collection* (ATCC® 6258) de *C. krusei* foi utilizada em todos os testes, conforme recomendado no documento de referência E. Def.7.1 (AFST-EUCAST, 2008).

e) *Candida parapsilosis*

A cepa-padrão *American Type Culture Collection* (ATCC® 22019) de *C. parapsilosis* foi utilizada em todos os testes, conforme recomendado no documento de referência E.Def.7.1 (AFST-EUCAST, 2008).

f) *Candida albicans*

A cepa utilizada pertence à coleção ao Laboratório de Biologia Celular de Leveduras Patogênicas (BioCeIP) do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Rio de Janeiro, e tem a denominação *C. albicans* 11. A cepa foi utilizada como controle no teste para verificação da atividade da urease.

3.2 Células de mamíferos

Células de tecido conjuntivo de camundongos NCTC clone 929 do *American Type Culture Collection* (ATCC CCL1) foram fornecidas pela Seção de Cultura Celulares do Instituto Adolfo Lutz (SP) e armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer à -70 °C. Foram mantidas, posteriormente, em

meio M-199 suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), sob temperatura de 37°C em estufa com 5% de CO₂.

3.3 Triagem de compostos com ação antifúngica e seleção da espécie a ser utilizada no estudo de efetividade, citotoxicidade e interação

Foram avaliados 49 compostos de origem natural, 30 de origem sintética e 75 fármacos, gentilmente cedidos pelos Prof. Dr. André Gustavo Tempone (Laboratório de Novos Fármacos - Doenças Negligenciadas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo), Prof. Dra. Patricia Sartorelli (Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Campus Diadema) e Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago (Universidade Federal do ABC, Centro de Ciências Naturais e Humanas). A lista desses compostos, bem como a estrutura química, quando disponível, consta dos **APÊNDICES 1, 2 e 3**.

As cepas-padrão de *C. neoformans* (H99, VNI) e *C. gattii* (WM 178, VGII) foram repicadas e mantidas sob temperatura de 30°C, em ágar Sabouraud sem cloranfenicol, 24 h antes do teste de triagem dos compostos naturais, sintéticos e fármacos.

Os compostos foram preparados em solução-mãe, em solventes adequados (água ou dimetilsulfóxido) em concentrações entre 30mM e 80mM. Flaconetes de 2 mL, contendo as soluções-mãe foram armazenados em freezer sob 20 graus negativos. O volume de cada frasco foi dependente da disponibilidade de cada composto.

Antes da realização do teste de triagem, um flaconete de cada composto foi descongelado à temperatura ambiente e em ausência de luz e, a seguir, colocado no ultrassom (Ultracleaner 750A, Unique) e depois em micro-centrífuga (UniSpin, Uniscience®) por 1 minuto, aproximadamente. Cada composto foi, então, avaliado na concentração única 200 µM em meio RPMI 1640 (Sigma®, EUA) frente às duas cepas-padrão.

Para tanto, foi utilizada a equação:

$$C_1.V_1=C_2.V_2, \text{ onde:}$$

C_1 =concentração solução-mãe; V_1 =volume a ser utilizado da solução-mãe;
 C_2 = concentração desejada (200 μ M); V_2 =volume final do poço (200 μ L)

O meio RPMI 1640, contendo glutamina e sem bicarbonato de sódio foi diluído em tampão de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS), pH 7,0.

Os testes foram realizados em placas de microtitulação de 96 orifícios, fundo plano, tampadas e mantidas sob condições de assepsia. Cada placa comportou 30 compostos, controle positivo de crescimento (sem adição de compostos) e o controle-negativo (ou esterilidade, contendo meio de cultura). As placas foram incubadas por 24h, sob 30°C e submetida à avaliação sob microscópio invertido. O orifício contendo o controle-negativo foi observado para comprovar ausência de blastoconídios, assim como, o do controle positivo presença de blastoconídios, validando, desse modo, a leitura de resultados. Cada orifício-teste, contendo um composto frente a uma cepa-padrão foi também observado para leitura parcial de resultado indicando crescimento ou inibição celular. A seguir, corante azul de resazurina (Sigma) foi adicionado (20 μ L) a cada orifício-teste e orifícios-controle para facilitar a observação de crescimento na leitura final, procedida após 20 h. Para tanto, foi utilizado um espectrofotômetro sob filtro de 570nm para medida da absorbância de cada orifício que foi registrado em impressora do aparelho. Após a leitura automatizada foi realizada, também, observação da coloração adquirida em cada orifício, sendo rósea característica de crescimento da levedura e azul indicando inibição ou ausência de crescimento.

Os valores de absorbância do controle-positivo foram comparados aos dos orifícios-testes para definição da atividade anti-*Cryptococcus* dos compostos.

Nesta fase foram selecionados dentre os compostos ativos, 3 biguanídeos (clorproguanil, cicloguanil e proguanil) e 2 compostos naturais (laevicarpina e poligodial) para testes de efetividade e citotoxicidade. A seleção teve como base os critérios de: disponibilidade, única classe farmacológica e possibilidade de reposicionamento.

3.4 Seleção da espécie de *Cryptococcus* para avaliação de efetividade de 5 compostos ativos

3.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de biguanídeos

Os valores de MIC de 3 biguanídeos-cicloguanil, clorproguanil e proguanil- foram determinados pelo método de microdiluição em caldo segundo procedimento do E.Def 7.2 (AFST-EUCAST, 2012). Os MICs de 3 fármacos foram determinados, do mesmo modo, para fins de comparação de efetividade. Dez concentrações (diluídas à razão 2) utilizadas nos testes de anfotericina B foram 0,0313 a 16 µg/mL e para fluconazol, 5-fluorocitosina, cicloguanil, clorproguanil e proguanil foram iguais em 0,125 a 64µg/mL.

O inóculo foi preparado a partir de uma cultura de 24h em ágar Sabouraud sem cloranfenicol. As colônias foram suspensas em 5mL de solução salina e o inóculo ajustado para a escala 0,5 Mc Farland (1×10^6 a 5×10^6 cel/mL). Após esse preparo, foi realizada diluição 1:10 em meio RPMI 1640 com 2% de glicose (Sigma), resultando em uma solução de 5×10^5 a $2,5 \times 10^5$ cel/mL. Foram dispensados 100µL do inóculo nas placas contendo os antifúngicos a serem avaliados. As placas foram incubadas por 48h sob temperatura de 30°C e a leitura realizada em espectrofotômetro (Titertek Multiskan, Suécia). Os testes foram realizados em duplicata e adicionados controle de crescimento (100µL inóculo + 100µL meio RPMI) na coluna 12 e controle de esterilidade (200µl meio RPMI) na coluna 1 de cada placa. Para controle de qualidade do teste foram utilizadas cepas-padrão de *Candida krusei* (ATCC® 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019).

Para um dos biguanídeos –proguanil- foram determinados valores de MIC frente a 12 cepas-padrão para seleção da espécie mais sensível-*C. gattii*- que foi utilizada nos demais testes.

Um exemplo de placa de microtitulação utilizada para determinação de MIC consta da **Figura 6**.

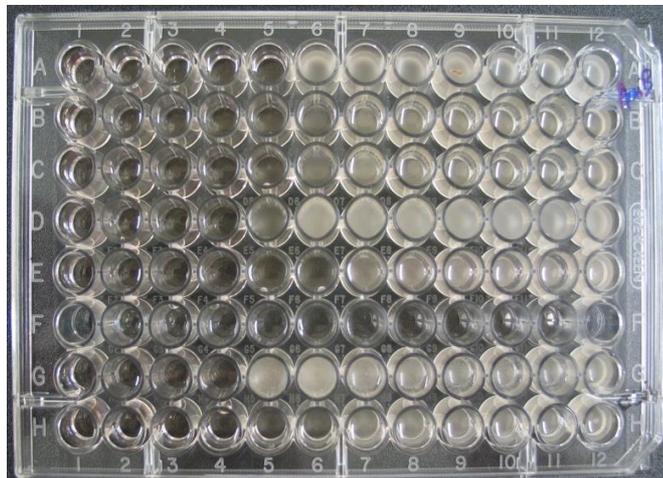


Figura 7. Exemplo de placa de microtitulação para determinação de concentração inibitória mínima (MIC), onde: poços com turvação indicam crescimento fúngico e poços sem turvação (transparentes) indicam ausência de crescimento por ação antifúngica.

3.4.2 Determinação da concentração efetiva 50% (CE₅₀) de 3 biguanídeos, laevicarpina e poligodial

A determinação de CE₅₀ foi realizada com diluições seriadas (razão 2) dos compostos na placa de microtitulação, resultando em 8 concentrações, a saber: 200µM, 100µM, 50µM, 25µM, 12,5µM, 6,25µM, 3,12µM e 1,56µM em volume de 100µL em meio RPMI 1640. Os inóculos das cepas-padrão foram adicionados (100µL) a cada concentração dos compostos. As placas foram incubadas por 24h, sob 30°C e submetida à avaliação sob microscópio invertido. O orifício contendo o controle-negativo foi observado para comprovar ausência de blastoconídios, assim como o do controle positivo, presença de blastoconídios, validando, desse modo, a leitura de resultados. Cada orifício-teste, contendo um composto frente a

uma cepa-padrão foi também observado para leitura parcial de resultado indicando crescimento ou inibição celular (**Figura 7**).

A seguir, para determinação da viabilidade celular, foi realizado o teste colorimétrico com a adição de 20µL de corante azul de resazurina (Alamar Blue®, Invitrogen) em cada orifício-teste e orifícios-controle, novamente incubada. Após 20h foi realizada leitura caracterizando o crescimento da levedura com a cor rósea e a cor azul indicando inibição ou ausência de crescimento. Ao final do ensaio, a leitura foi realizada por absorbância em espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 540 nm e emissão de 570 nm.

Os valores de absorbância do controle-positivo foram comparados aos dos orifícios-testes para definição da concentração inibitória de 50% de cada composto. Caso o CE_{50} encontre-se no intervalo de duas concentrações, foi preparado um novo gradiente entre essas medidas. E, assim, sucessivamente, até que o valor exato de 50% de inibição de crescimento, em relação ao controle positivo, seja observado e definido o CE_{50} de cada composto. Todos os valores de absorbância desta fase foram inseridos no programa GraphPad Prism 5.0 para determinação do cálculo do CE_{50} .

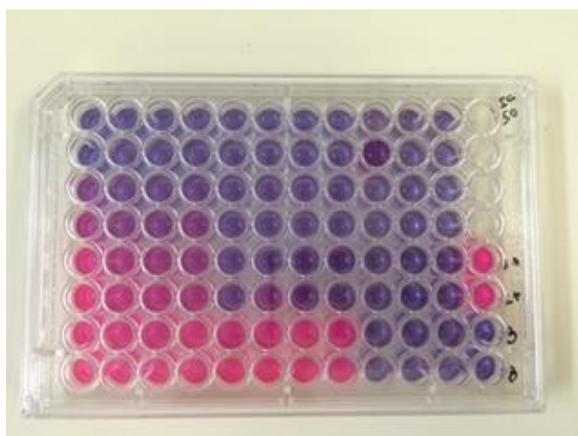


Figura 8. Exemplo de placa de microtitulação contendo teste de ação antifúngica com corante *Alamar Blue*®, para determinação de CE_{50} , onde: coloração azul indica ausência de crescimento e rosa indica crescimento de *Cryptococcus* spp.

3.4.3 Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de 3 biguanídeos

A atividade fungicida foi determinada *in vitro* segundo procedimentos e critérios descritos em Espinel-Ingroff (2001) e Cantón *et al.* (2004). Uma alíquota de 20µL foi retirada de todos os poços contendo as concentrações analisadas do teste de MIC. Cada amostra retirada foi semeada em uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose sem cloranfenicol, a qual foi incubada sob 30°C por 48h. Após esse período foi realizada a contagem de colônias e calculado o índice de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) para cada concentração. A MFC considerada foi a que resultou em crescimento de até 0,1% (99,9% de morte) do número de colônias contadas na placa de controle positivo (sem composto).

3.4.4 Determinação da citotoxicidade e índice de seletividade (IS)

Para determinar citotoxicidade foram utilizadas células de mamíferos como NCTC (Clone 929), cultivadas conforme descrito anteriormente e aplicadas, na concentração de 6×10^4 /poço, em placas de 96 poços contendo os diferentes compostos diluídos, serialmente, em meio M-199 com 10% de SFB. As placas foram, então, incubadas por um período de 24 h a 37°C em estufa com 5% de CO₂. A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico com uso de *Alamar Blue*®, ao final do ensaio. A leitura foi realizada por absorvância em espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 540 nm e emissão de 570 nm (Gehrke *et al.*, 2013). Como controle positivo foi utilizado células não tratadas (100% células vivas). Os ensaios foram feitos em duplicatas.

A seguir foi calculado o Índice de Seletividade (IS) dos compostos ativos selecionados, segundo Greco *et al.* (2010), através da seguinte razão:

$$IS = \frac{CC_{50} \text{ em células de mamíferos}}{CE_{50} \text{ do } Cryptococcus \text{ sp.}}$$

$$CE_{50} \text{ do } Cryptococcus \text{ sp.}$$

onde: CC₅₀= concentração citotóxica 50%; CE₅₀= concentração efetiva 50%

3.4.5 Avaliação de interação *in vitro* entre 3 biguanídeos e fármacos utilizados na terapia da criptococose

O teste de combinação foi realizado por método de xadrez (*checkerboard*) com cada composto ativo selecionado e um antifúngico tradicional em distintas diluições em placa de microtitulação. A técnica foi realizada de acordo com o descrito em Cuenca-Estrella (2004).

As combinações estudadas foram: cicloguanil com FCZ, cicloguanil com 5-FC, cicloguanil com AmB, clorproguanil com FCZ, clorproguanil com 5-FC, clorproguanil com AmB, proguanil com FCZ e proguanil com AmB. Concentrações de fármaco, de acordo com documento E. Def 7.1 (AFST-EUCAST, 2008) foram utilizadas 0,0313 mg/L a 16mg/L para AmB e 0,125 a 64mg/L para FCZ, 5-FC e compostos ativos selecionados.

As diluições foram distribuídas em placa de microtitulação com 96 orifícios na direção vertical e horizontal, referentes aos fármacos estudados. Sendo, 50µL do fármaco 1, 50µL do fármaco 2 e 100µL do inóculo dispensados em cada orifício.

A concentração inibitória fracionária (FIC) é calculada pela divisão do MIC da combinação sobre o MIC do fármaco. O resultado do somatório dos dois valores de FIC é o índice da concentração inibitória fracionária (FICI).

$$FIC = \frac{\text{MIC do fármaco em combinação}}{\text{MIC do fármaco sozinho}}$$

MIC do fármaco sozinho

$$FICI = \frac{\text{MIC do fármaco A em combinação}}{\text{MIC do fármaco A sozinho}} + \frac{\text{MIC do fármaco B em combinação}}{\text{MIC do fármaco B sozinho}}$$

MIC do fármaco A sozinho

MIC do fármaco B sozinho

O valor de FICI $\leq 0,5$ indica sinergismo, $>4,0$ antagonismo e entre 0,5 e 4, indiferença (Odds, 2003).

3.5 Seleção de um composto ativo para testes adicionais de efetividade *in vitro* e *in vivo*

Frente ao valor de MIC encontrado para os 3 biguanídeos e sob critério de acessibilidade comercial do composto p.a. o fármaco proguanil foi definido como composto selecionado para testes adicionais de efetividade *in vitro* e *in vivo*.

3.5.1. Determinação do crescimento celular por absorbância, pós exposição a proguanil

Os testes foram realizado no Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Servicio de Micología – Mahadajonda, Madrid, Espanha, na supervisão do Dr. Oscar Zaragoza.

Para a realização do teste de curva de crescimento foi utilizado a metodologia de microdiluição do documento E. Def. 7.2 (AFST-EUCAST, 2012), com modificações nas concentrações utilizadas na placa de 96 orifícios. O inóculo de *C. gattii* foi de acordo com a escala 0,5 Mc Farland, avaliado frente a 10 concentrações de proguanil (Sigma-Aldrich, EUA), realizadas à razão 2 (64µg/mL à 0,125µg/mL). A placa foi incubada à 30°C com agitação moderada em espectrofotômetro iEMS (Thermo Fisher Scientific). A densidade ótica foi medida a 540nm a cada hora por 48h. Os dados foram analisados com o GraphPad Prism®.

3.5.2 Determinação da viabilidade celular pós-exposição a proguanil

Este teste foi realizado no Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Servicio de Micología – Mahadajonda, Madrid, Espanha, na supervisão do Dr. Oscar Zaragoza.

Para o estudo da viabilidade celular de *C. gattii* foram utilizados os fármacos nas seguintes concentrações: proguanil (128µg/mL, 64µg/mL, 32µg/mL e 16µg/mL), fluconazol (32µg/mL) e anfotericina B (1µg/mL). Em uma placa de 96 orifícios foram dispostos em colunas os fármacos e suas diferentes concentrações, controle de crescimento (*C. gattii* e meio RPMI) e controle de esterilidade (meio RPMI). O inóculo utilizado foi de 0,5 McFarland e volume final em cada orifício foi de 200µL. Nos tempos 0h, 24h e 48h o volume foi retirado e semeado em placa de ágar Sabouraud e incubadas por 48h à 30°C.

3.6 Investigação de mecanismo de ação do proguanil

A possível ação do proguanil sobre alteração na produção de glucuronoxilomanana (GXM), urease e espécies reativas de oxigênio foi avaliada.

3.6.1 Produção de glucuronoxilomanana (GXM)

Este teste foi realizado no Laboratório de Biologia Celular de Leveduras Patogênicas (BioCelP) do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes no Centro de Ciências da Saúde – UFRJ, com o auxílio da Dra. Luna Sobrino Joffe e supervisão do Prof. Dr. Márcio L. Rodrigues.

Foi realizado um ensaio imunoenzimático de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), em duplicata, para detectar a presença de GXM em sobrenadante. Um cultivo de *C. gattii* foi realizado em caldo Sabouraud (20mL) à 30°C sob agitação 150 rpm *overnight*. No dia seguinte, um inóculo de 1×10^7 cels/mL foi realizado e adicionado ao meio RPMI 1640 com MOPS e pH7, contendo proguanil na concentração de 64µg/mL. Essa amostra foi incubada à 30°C e após o período de 3, 6 e 24 h, alíquotas foram retiradas e centrifugadas para a obtenção apenas do sobrenadante. Em uma placa de 96 orifícios foi realizada uma diluição inicial das amostras (1:50). O padrão (GXM) foi diluído em PBS na concentração de 10µg/mL e adicionado 75µL

nos primeiros poços de cada diluição. Os poços subsequentes foram preenchidos com 50µL de PBS. Uma diluição seriada (1:3) foi realizada do poço inicial para cada poço seguinte. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Após esse período, o conteúdo foi descartado e adicionado 200µL de PBS mais 1% BSA em cada poço e a placa novamente incubada a 37°C por 1h. Seguindo, a placa foi retirada e o conteúdo novamente descartado. O anticorpo anti-GXM foi diluído em PBS+1% BSA+ 0,05% Tween 20 na concentração final de 1µg/mL e adicionado 50µL em cada poço e novamente a placa foi incubada. O conteúdo da placa foi descartado e foi realizada uma lavagem com 200µL de PBS+0,05% Tween 20, 3 vezes. O anticorpo secundário foi diluído e conjugado a fosfatase alcalina na concentração de 1µg/mL e 50µL adicionado a cada poço, placa incubada por 1 hora a 37°C. Descartou-se novamente o conteúdo da placa e realizada uma tripla lavagem com 200µL de solução de PBS+ 0,05% Tween 20. Para finalizar, foi adicionado a cada poço 50µL do substrato paranitrofenilfosfato (PNPP) na concentração de 1mg/mL, previamente diluído em tampão ELISA. A placa foi incubada novamente a 37°C e foi observada a cada tempo até mudança de cor entre as diluições. A leitura foi realizada no leitor de microplaca (FilterMax5, Molecular Devices) no comprimento de onda de 540nm (Casadevall *et al.*, 1992).

3.6.2 Produção de urease

O teste de urease foi realizado, em duplicata, no Laboratório de Biologia Celular de Leveduras Patogênicas (BioCeIP) do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes no Centro de Ciências da Saúde do Rio Janeiro – UFRJ, com o auxílio da Dra. Luna Sobrino Joffe e supervisão do Prof. Dr. Márcio L. Rodrigues e a metodologia foi de acordo com o descrito em Kwon-Chung e colaboradores (1987).

Um meio líquido, contendo uréia, foi preparado ao dobro da concentração, contendo: uréia (4,0 g), extrato de levedura (0,02 g), vermelho

de fenol (2,0 mg), KH_2PO_4 (0,273g) e Na_2HPO_4 (0.285g). Os ingredientes foram dissolvidos em 100mL de água destilada, o meio foi filtrado e o valor final de pH 6.8 foi medido. Para iniciar o teste, foi realizado cultivo de *C. gattii* em meio YEPD líquido por 24h à 30°C e contagem de células, em câmara de Neubauer, para padronização da concentração celular em 1×10^7 cel/mL. A suspensão foi, então, agitada e 1mL foi adicionado ao meio de uréia. Alíquotas de 200 μ L foram adicionadas a uma placa de 96 orifícios; a seguir, a placa foi incubada a 37°C e a leitura foi realizada após 24h em leitor de microplaca (FilterMax5, Molecular Devices), sob comprimento de onda de 540nm. A coloração vermelho magenta é considerada para resultado positivo e a laranja/amarelo para negativo. Controle negativo com cepa de *Candida albicans* e controle positivo com cepa de *C. gattii* VGII não tratado foram processados nas mesmas condições experimentais.

3.6.3 Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Este teste foi realizado, em duplicata, no Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Servicio de Micología – Mahadajonda, Madri, Espanha, na supervisão do Dr. Oscar Zaragoza.

A detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS), foi realizado com diacetato de dihidrofluoresceína (DHF, Sigma-Aldrich), o qual produz fluorescência verde após o ataque de ROS. Foi realizada uma cultura de *C. gattii* (VGII) em 10mL caldo Sabouraud e colocada sob agitação à 30°C e 150 rpm *overnight*. As células foram lavadas 2 vezes com PBS e uma suspensão de 10^6 células/mL de *C. gattii* foi preparada em PBS e distribuída em 5 tubos de ensaios. Diferentes concentrações (64 μ g/mL, 32 μ g/mL e 16 μ g/mL) foram adicionadas as amostras, as quais foram incubadas à 37°C por diferentes tempos (1h, 3h, 6h e 24 h). Além disso, anfotericina B (1 μ g/mL) foi adicionado como controle positivo da produção de ROS. Após cada período de incubação, DHF foi adicionado na concentração de 40 μ M e

as amostras foram incubadas à 37°C por 30 min. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 min em temperatura ambiente e depois lavadas com PBS. A fluorescência foi quantificada utilizando citômetro FACS Calibur (canal FL-1, CellQuest; BD Biosciences). Os dados foram processados utilizando o software FlowJo 7.1.6 (OR, EUA). Controle de células em meio PBS não expostas ao proguanil (controle negativo) e anfotericina B foram incluídas como controle positivo. (Mesa-Arango *et al.*, 2014; Sangalli-Leite *et al.*, 2011).

3.7 Análise de alterações ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão (MET) pós-exposição a proguanil

O MET foi realizado na Espanha em colaboração com o Dr. Daniel Luque Buzo e a técnica Maria Carmen Terron Orellana da Unidad de Microscopía Electrónica y Confocal e do Dr. Oscar Zaragoza, Laboratório de Micologia – Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda – Madrid.

Um cultivo de *C. gattii* foi realizado em caldo Sabouraud (20mL) à 30°C sob agitação 150 rpm *overnight*. No dia seguinte, um inóculo de 1×10^7 cels/mL foi realizado e adicionado ao meio RPMI contendo proguanil na concentração de 64µg/mL. Essa amostra foi incubada à 30°C e após o período de 3, 6 e 24 h, uma alíquota foi encaminhada para a Unidade de Microscopia Eletrônica e Confocal do ISCIII. O teste foi realizado em duplicata segundo Zaragoza *et al.*, 2010 e Mesa-Arango *et al.*, 2016.

3.8 Avaliação de efetividade de proguanil *in vivo* em modelo alternativo de *Galleria mellonella*

Todos os estudos em modelo alternativo de *G. mellonella* foram realizados no Laboratório de Interações Microbianas (Laboratório 29) do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, sob a supervisão do Prof. Dr. Marcelo Vallim.

3.8.1 Procedimentos para determinação do inóculo e infecção experimental

A análise da virulência foi conduzida em *Galleria mellonella* segundo Mylonakis *et al.*, 2005. A cepa-padrão de *C. gattii* (VGII) foi cultivada em 5mL de meio YPD (yeast potato dextrose) por 16-18h sob agitação (150 rpm). Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes em PBS estéril e ressuspendidas em PBS contendo ampicilina (20mg/kg) nas concentrações de 1×10^3 cel/mL a 1×10^7 cel/mL. As lagartas foram separadas em 6 grupos com 16 lagartas com peso médio de aproximadamente 200mg. O volume de 10 μ L de cada suspensão foi inoculada com uma microseringa Hamilton na região da última propata direita da larva, nos respectivos grupos. Foi utilizado um grupo controle onde apenas foi inoculado meio PBS. Em seguida, as larvas infectadas foram depositadas em placas de Petri de vidro (15mm de diâmetro) e incubadas a 30°C durante 7 dias. A avaliação do experimento foi através da observação diária das larvas por movimentos espontâneos ou provocados.



Figura 9. Inoculação de *C. gattii* VGII em *G. mellonella* na região da última propata da larva

3.8.2 Ensaio de toxicidade dos fármacos

Para o ensaio de toxicidade foram separados em 5 grupos experimentais e 2 grupos controle, com 5 larvas de peso médio aproximado de 200mg. Os fármacos e doses utilizados foram: anfotericina B (1mg/kg), proguanil (2,9 mg/kg), fluconazol (14mg/kg) e associação de proguanil + anfotericina B (1,45mg/kg; 0,5mg/kg) e proguanil + fluconazol (1,45mg/kg; 7mg/kg). Foram utilizados 2 grupos controle: um inoculado apenas com PBS e outro com suspensão de *C. gattii* (1×10^7 cel/mL) sem tratamento.

Os fármacos, PBS e suspensão de *C. gattii* VGII foram injetados em volume de 10µL na região da ultima propata direita. Após esta etapa as larvas foram dispensadas em placas de Petri de vidro, incubadas a 30°C e observadas, diariamente, por 7 dias.

3.8.3 Tratamento

Após 24 h da inoculação, foi realizado o tratamento com volume de 10µL de cada fármaco, na ultima pró-pata do ladoesquerdo de cada larva separada em cadaum dos 5 grupos. Os antifúngicos e doses utilizadas para tratamento foram aquelas ensaiadas no estudo de toxicidade. As soluções de trabalho foram utilizadas a partir da solução estoque de cada fármaco. Os grupos foram armazenados em placa de Petri de vidro à 30°C. A observação de vitalidade foi realizada, diariamente, até completar 7 dias, segundo parâmetros de alteração de cor e diminuição de mobilidade.

Frente à ocorrência de escurecimento da cor ou visível diminuição de mobilidade ou, mesmo, imobilidade da larva, esta era excluída do grupo, compilado o dado de mortalidade para preparo das curvas de sobrevida.

3.8.4 Unidade formadora de colônias (UFC/mL)

Para realização da contagem de unidades formadoras de colônias, foram criados 7 grupos contendo 6 larvas em cada. Foram realizados a inoculação e o tratamento dos respectivos grupos, como descritos nos itens anteriores. Dois grupos controle foram separados: um inoculado com PBS e outro com a cepa de *C. gattii* (VGII) sem tratamento. Os outros grupos foram inoculados e tratados com fluconazol, proguanil, anfotericina B, associação de proguanil com fluconazol e associação de proguanil com anfotericina B nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio de toxicidade.

Após 24h e 48h do tratamento, 3 larvas de cada grupo foram sacrificadas por congelamento a -20°C seguido de maceramento em 1 mL de PBS. A seguir, diluições 1:100 e 1:1000 foram realizadas com PBS e 100 uL de cada suspensão diluída eram semeados na superfície de ágar Sabouraud com cloranfenicol dispensado em placas de Petri. As placas semeadas foram, então, incubadas a 30°C por 48h.

O número de unidades formadoras de colônias foram contadas e compiladas em planilha para análise comparativa com ufc/mL derivadas das larvas sem tratamento (grupo controle positivo). A análise estatística foi de acordo com a análise de variância (ANOVA) com nível de significância em 5%.

4 RESULTADOS

A fase de triagem resultou na análise de 154 fármacos e compostos analisados frente a *C.neoformans* ou *C. gattii*, sendo: 75 fármacos, 30 compostos sintéticos e 49 naturais. De 75 fármacos, 3 (4%) apresentaram atividade, nenhum composto sintético foi ativo e de 49 compostos naturais, 15 (30,6%) foram ativos.

4.1 Triagem de ação antifúngica de compostos naturais e fármacos ativos

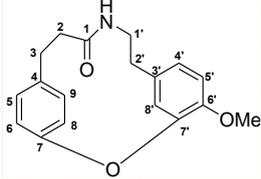
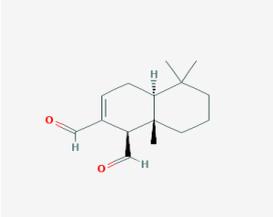
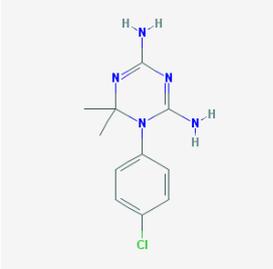
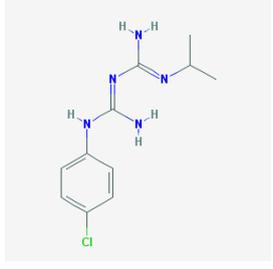
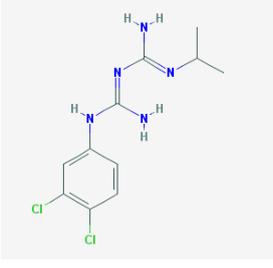
Os compostos naturais ativos, na máxima concentração analisada de 200 μM frente à *C. gattii*, foram: A 2908, AI 0109, An 0508, E 1108, PHB Bu 01, PMH-3, PMH-6, BA 6, BA13, BA18, BA22, BA30, 2A/106/1, laevicarpina e poligodial. Os 2 últimos compostos, com disponibilidade de maior volume, foram selecionados para avaliação mais detalhada. Laevicarpina e poligodial apresentaram, respectivamente, valores de CE_{50} de 7,92 μM e 2,18 μM e CC_{50} 337,71 μM e 165,96 μM . Os ISs foram de 42,64 para laevicarpina e 76,12 para poligodial. Os resultados foram apresentados no “9th International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis, 15-19 May, 2014, Amsterdam - Netherlands”.

Os 3 fármacos ativos foram cicloguanil, proguanil e clorproguanil. Os parâmetros para cicloguanil foram: CE_{50} 11,33 μM , $\text{CC}_{50}>200$ μM , $\text{IS}>17,65$. Para proguanil os achados foram: CE_{50} 23,87 μM , $\text{CC}_{50}>200\mu\text{M}$, $\text{IS} >8,37$. Para o clorproguanil os resultados foram: CE_{50} 9,39 μM , CC_{50} 30,21 μM , IS 3,21.

Os resultados destes 3 fármacos ativos e dos 2 compostos naturais ativos, estão apresentados na **Tabela 1**.

A **Figura 9** ilustra as curvas de dose-resposta indicando efeito concentração-dependente para 5 compostos ativos frente à cepa-padrão de *C. gattii* VGII.

Tabela 1. Atividade anti-*Cryptococcus gattii* de fármacos e compostos naturais

Compostos	Estrutura química	CE ₅₀ (µM) IC 95%	CC ₅₀ (µM) IC 95%	IS
Laevicarpina		7,92 (5,62 – 11,14)	337,71 (235,42 – 484,51)	42,64
Poligodial		2,18 (1,28 – 3,58)	165,96 (139,93 – 196,77)	76,12
Cicloguanil		11,33 (9,08 – 14,13)	>200	>17,65
Proguanil		23,87 (22,94 – 24,84)	>200	>8,37
Clorproguanil		9,39 (7,9 – 11,16)	30,21 (27,41 – 33,30)	3,21

CE₅₀, Concentração efetiva 50%; IC95%, Intervalo de Confiança 95%; CC₅₀, concentração citotóxica 50%; IS, Índice de Seletividade

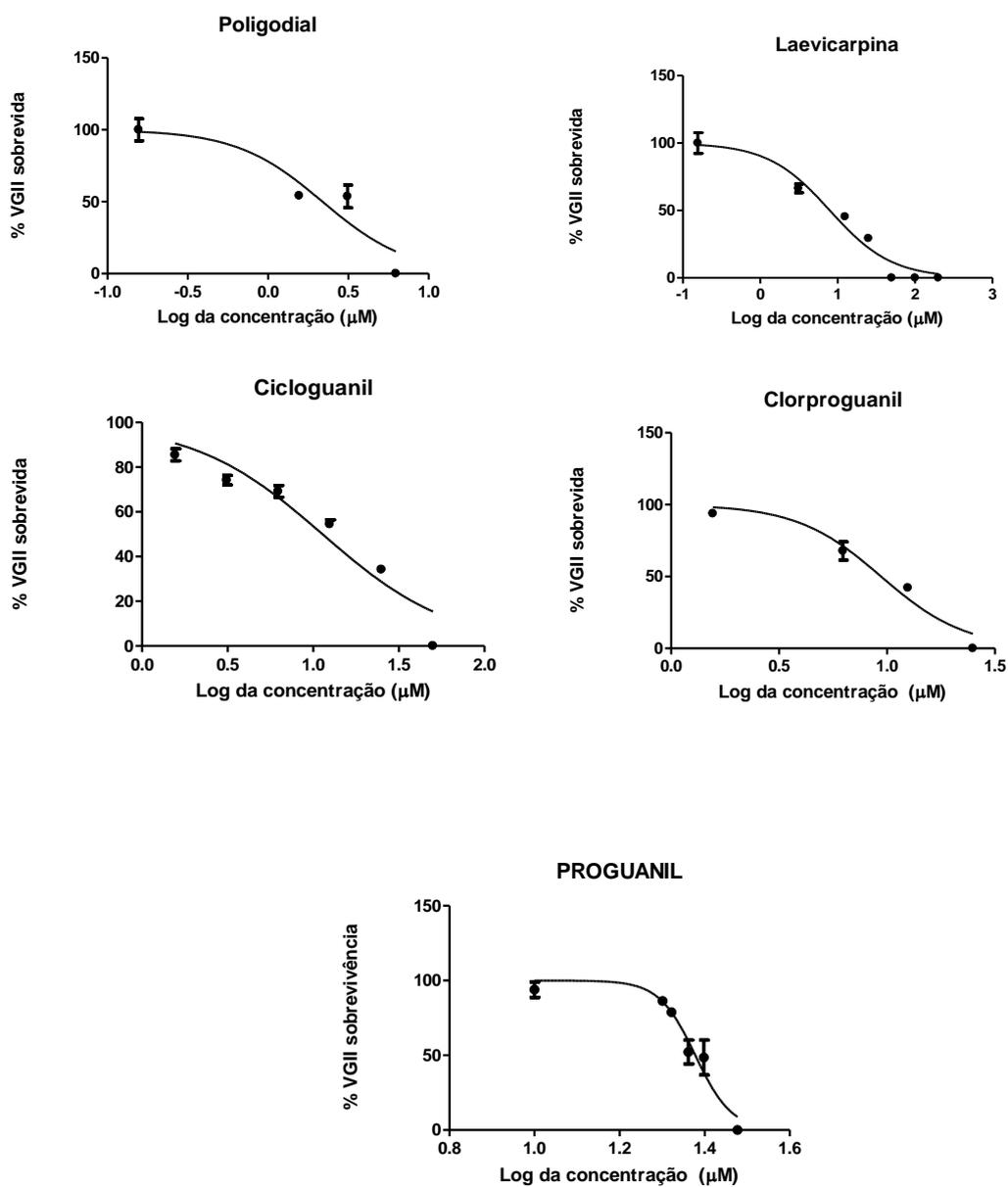


Figura 10. Curvas dose-resposta de sobrevivência de *C. gattii* VGII frente a concentrações de 5 compostos: poligodial, laeivarpina, cicloguanil, proguanil e clorproguanil.

4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) de biguanídeos

Testes iniciais de MIC com 12 cepas-padrão de *C. neoformans* e *C. gattii* foram realizados com proguanil, um dos 5 fármacos ativos e selecionados na fase de triagem com maior disponibilidade. Os resultados indicaram ser *C. gattii* a espécie mais sensível e, portanto, a que foi utilizada para na busca de mecanismo de ação antifúngica deste biguanídeo (**Tabela 2**).

Os resultados de MIC de *C. gattii* com proguanil (MIC 16 µg/mL), comparado com os de cicloguanil (MIC 32 µg/mL), clorproguanil (MIC 32 µg/mL), anfotericina B (MIC 1µg/mL), 5 fluorcitosina (MIC 4µg/mL e fluconazol (MIC 1 µg/mL) constam da **Tabela 3**, assim como, os valores frente às cepas-padrão de *Candida*.

4.3 Determinação da concentração fungicida mínima (MFC) de 3 biguanídeos

Os resultados de MFC para os fármacos cicloguanil, proguanil e clorproguanil, foram idênticos ao MIC no valor de 32µg/mL.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (MIC) de 12 cepas-padrão dos complexos *C. neoformans*/*C. gattii* para o fármaco proguanil

Complexos	Cepas-padrão	Tipos moleculares	Sorotipos	MIC proguanil (µg/mL)
<i>C. neoformans</i>	WM148	VNI	A	>64
	WM626	VNII	A	>64
	WM628	VNII	AD	>64
	WM629	VNIV	D	32
	H99	VNI	A	>64
	NIH B3501	VNIV	D	64
<i>C. gattii</i>	WM179	VGI	B	32
	WM178	VGII	B	16
	WM175	VGIII	B	32
	WM779	VGIV	C	>64
	NIH191	VGIII	C	32
	CBS 10514 (R265)	VGII	B	16

WM: Wieland Meyer; **NIH:** National Institutes of Health; **CBS:** Westerdijk Fungal Biodiversity Institute

Tabela 3. Concentração antifúngica mínima (MIC) de 6 fármacos de cepas-padrão

Cepas-padrão	MIC (µg/mL) de antifúngicos					
	Cicloguanil	Clorproguanil	Proguanil	AmB	5-Fc	FCZ
<i>C. gattii</i> (VGII)	32	32	16	1	4	1
<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)	NA	NA	NA	4	16	NR
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	NA	NA	NA	2	0,125	2

AmB, anfotericina B; **5-Fc,** 5 fluorcitosina; **FCZ,** fluconazol; **NA,** não ativo até a maior concentração avaliada; **NR,** não realizado, desde que, *C. krusei* é intrinsecamente resistente a FCZ

4.4 Avaliação de interação *in vitro* entre 3 biguanídeos e fármacos utilizados na terapia da criptococose

As combinações entre os fármacos resultaram nos valores explicitados na **Tabela 4** que revelaram resultado de sinergismo entre clorproguanil e fluconazol, e indiferença nas outras associações. Tendo como base o MIC e FIC de cada fármaco, calculou-se o FICI de cada associação. Para FCZ, foi encontrado FIC de cicloguanil, proguanil e clorproguanil, respectivamente, de 32µg/mL, 2 µg/mL e 8 µg/mL, com FICI de 2 µg/mL, 2,12 µg/mL e 0,5 µg/mL. Com 5-Fc e cicloguanil e 5-Fc com clorproguanil, observou-se FIC, respectivamente, de 32 µg/mL e 16 µg/mL, com FICI de 1 µg/mL e 0,56 µg/mL. Para AmB, obteve-se FIC de cicloproguanil, proguanil e clorproganil, respectivamente, de 32 µg/mL, 0,03 µg/mL e 16 µg/mL, com FICI de 2 µg/mL, 1 µg/mL e 1,5 µg/mL.

Tabela 4. Resultados de interações entre fármacos tradicionais e biguanídeos, frente a *C. gattii* VGII

Fármaco A	MIC de A	Fármaco B	MIC de B	FIC A	FIC B	FICI	Interpretação*
Cicloguanil	32			32	1	2	I
Proguanil	16	FCZ	1	2	2	2,12	I
Clorproguanil	32			8	0,25	0,5	S
Cicloguanil	32	5-Fc	4	32	0,25	1,06	I
Clorproguanil	32			16	0,25	0,56	I
Cicloguanil	32			32	0,25	2	I
Proguanil	16	AmB	0,25	0,03	0,25	1,0	I
Clorproguanil	32			16	0,25	1,5	I

MIC, concentração inibitória mínima (em µg/mL); **FCZ**, fluconazol; **5-Fc**, 5-fluorocitosina; **AmB**, anfotericina B; **FIC**, concentração inibitória fracionada; **FICI**, índice de concentração inibitória fracionada; I, indiferente; * Interpretação: $FICI \leq 0,5$ sinergismo (S), $FICI > 4$ antagonismo (A) e $FICI 0,5$ e 4 indiferente (I) (Odds, 2003)

4.5 Determinação do crescimento celular por absorbância, pós exposição a proguanil

Representadas na **Figura 10**, as curvas ilustram o crescimento de *C. gatii* VGII em cada uma de 10 concentrações (64 a 0,125 $\mu\text{g/mL}$) de proguanil, de acordo com o tempo. Nas concentrações de 64, 32 e 16 $\mu\text{g/mL}$ o crescimento é menor, em relação aos observados nas demais concentrações. As concentrações de 8 $\mu\text{g/mL}$ a 0,125 $\mu\text{g/mL}$ não inibiram crescimento de *C. gatii*, revelado pelas curvas em tendência ascendente como o controle positivo sem o fármaco.

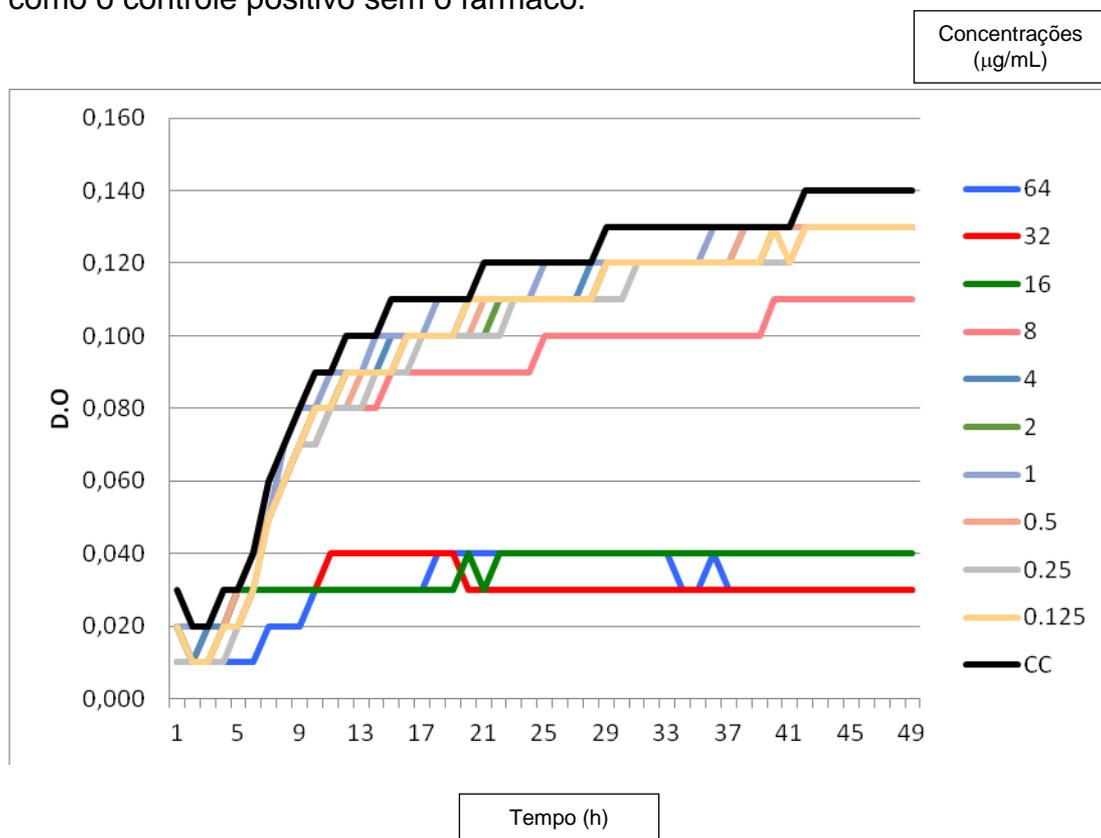


Figura 11. Curvas de crescimento de *C. gatii* VGII sob 10 concentrações de proguanil ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo, monitorada por leitura de densidade óptica (D.O) a cada hora. Linha preta: controle positivo de crescimento sem adição de fármaco.

4.6 Determinação da morte celular pós-exposição a proguanil

O teste de morte celular, conhecido como *time kill curve*, foi realizado em *C. gattii* VGII com os fármacos: proguanil em diferentes concentrações (128µg/mL, 64µg/mL, 32µg/mL e 16µg/mL), fluconazol (32µg/mL, controle de ação fungistática) e anfotericina B (1µg/mL, controle de ação fungicida). As contagens das colônias foram realizadas nos tempos 0h, 24h e 48h e exposição.

Fluconazol provou diminuição no número de colônias, a partir de 24h, e após esse período as colônias continuaram essa tendência mas não desapareceram até o período de 48h que foi o tempo limite do teste. Anfotericina B foi eficaz às 24 h na inviabilização das células. O proguanil mostrou um desempenho semelhante nas diversas concentrações analisadas, com diminuição de colônias após 24h e 48h de exposição. O comportamento do fungo frente ao proguanil, comparado àquele frente aos fármacos fluconazol e anfotericina B, indica ação fungicida (**Figura 11**).

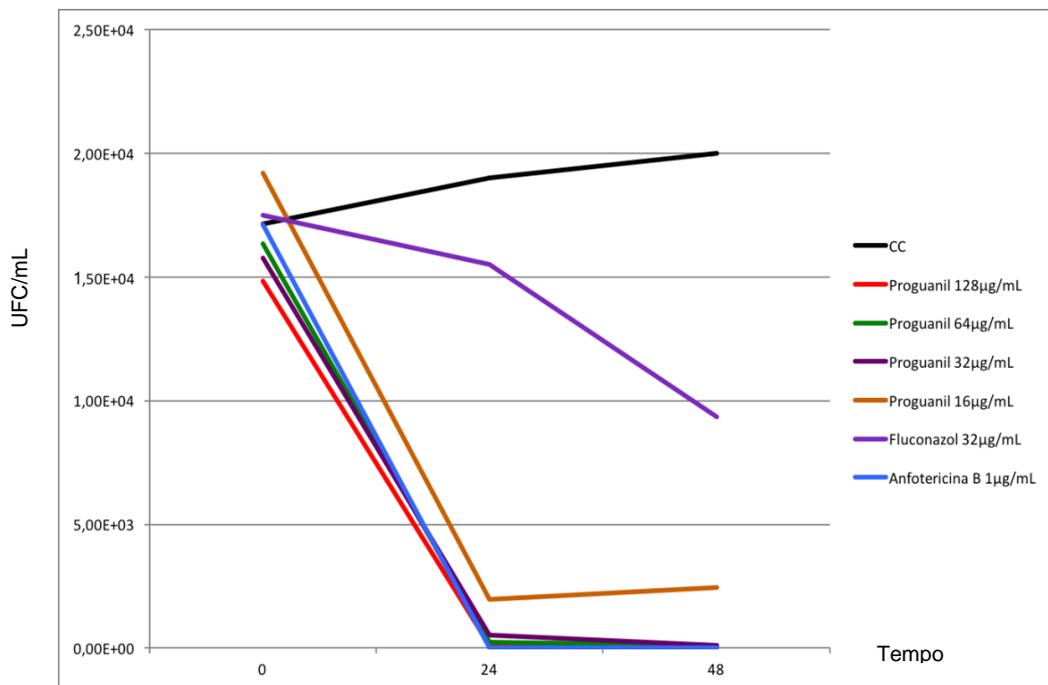


Figura 12. *Time kill curve* de *C. gattii* VGII, sob 4 concentrações de proguanil, fluconazol e anfotericina B, durante 48 h.

4.7 Produção de glucuronoxilomanana (GXM)

O sobrenadante das células de *C. gattii* tratadas com proguanil 64µg/mL foi utilizado para quantificar GXM por técnica de ELISA. Na **Figura 12**, são observados os resultados. O primeiro gráfico (A) representa a concentração de GXM nas células não tratadas (controle), após diferentes tempos e maior concentração é observada às 24 h. O segundo gráfico (B) representa a concentração de GXM em sobrenadante de cultura sob tratamento com proguanil. Em comparação ao controle, há maior concentração de GXM após 3h e 6h e diminuição após 24h.

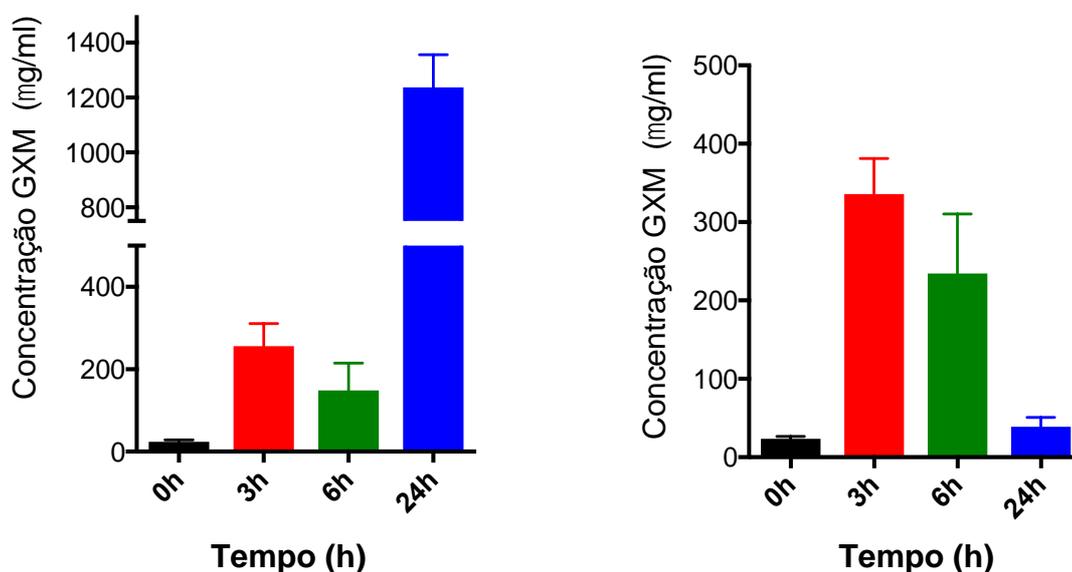


Figura 13. Concentração extracelular de GXM em sobrenadante de cultura de *C. gattii* VGII. Esquerda: células não tratadas tratadas com proguanil. Direita: células tratadas com proguanil (64 µg/mL).

4.8 Produção de urease

A leitura do teste de urease, realizada após 24h, indicou que não há diferença na atividade da enzima produzida por células não tratadas e por

células tratadas com fármaco proguanil (64 μ g/mL), como ilustrado na **Figura 13**.

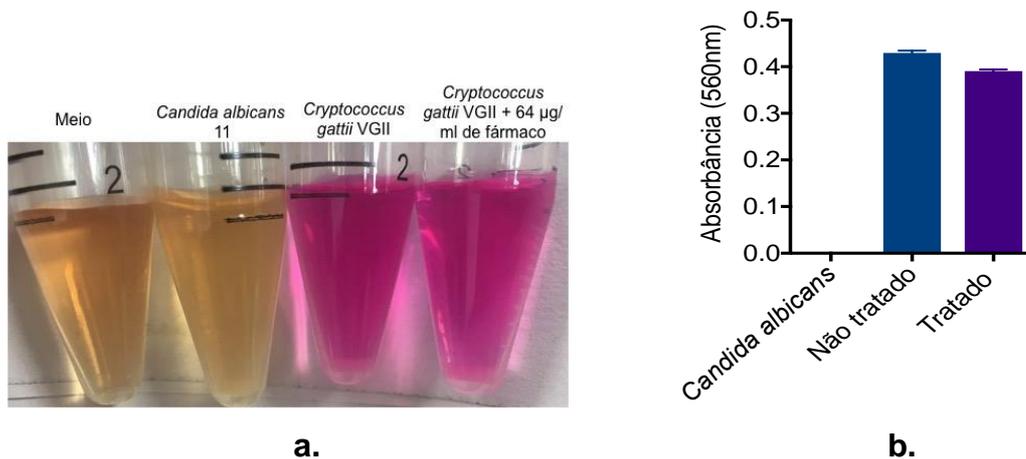


Figura 14. Quantificação de urease por absorvância **a.** Da esquerda para direita: meio de uréia sem inoculação, controle negativo com *C. albicans* (UFRJ 11), controle positivo *C. gattii* não tratado e tubo-teste com *C. gattii* VGII tratado com fármaco proguanil. **b.** Absorbância (560 nm) das soluções controle negativo, controle positivo e tubo teste ($p>0,05$).

4.9 Produção de ROS

A **Figura 14** representa resultados da exposição ao proguanil após 1, 3, 6 e 24h em diferentes concentrações. Os controles positivo (1 μ g/mL de anfotericina B) e negativo (PBS) foram inseridos na figura.

À primeira hora de exposição, nota-se que as curvas de detecção de ROS sob exposição de proguanil não se deslocam para a direita, em função de emissão de fluorescência, em relação ao controle negativo (PBS), seguindo-se essa tendência nos demais períodos. Sob ação de AmB, a produção de ROS é, imediatamente, aumentada, demonstrada pelo deslocamento para a direita e, após 6h e 24h, as células fúngicas começam a deixar de produzir os radicais livres.

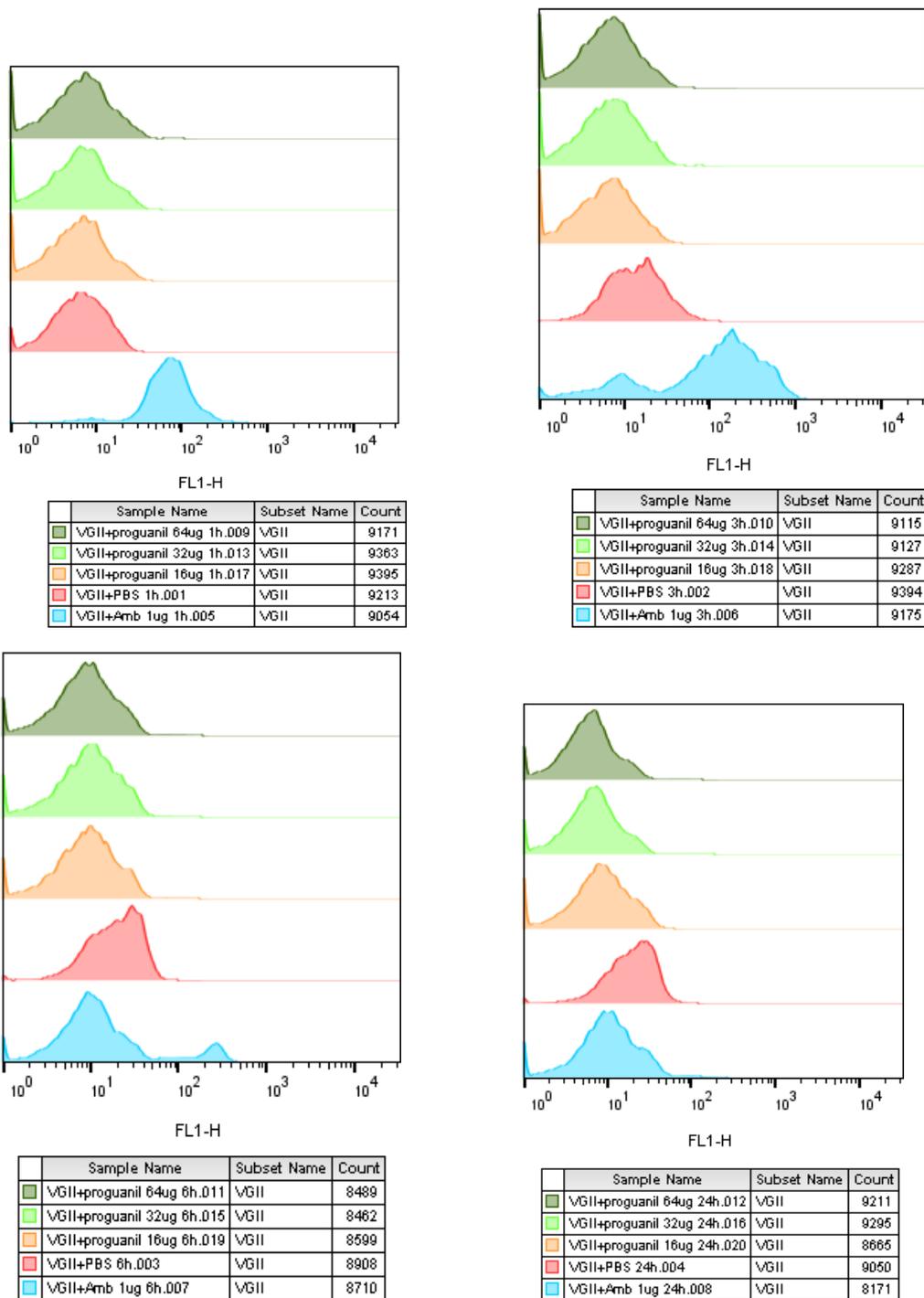


Figura 15. Detecção, em citômetro de fluxo (pelo canal FL1-H), de espécies reativas de oxigênio em cepa de *C. gattii* VGII pós-exposição a distintas concentrações (cores) de proguanil, segundo tempo de exposição (de cima para baixo e da esquerda para direita: 1h, 3h, 6h e 24h). Controle positivo de Amb, Anfotericina B, controle-negativo de PBS, solução tampão fosfato.

4.10 Análise de alterações ultraestruturais por MET pós-exposição a proguanil

Na microscopia eletrônica de transmissão, células de *C. gattii* VGII tratadas com proguanil (64µg/mL) apresentaram alterações estruturais já no tempo de 3h pós-exposicional. As mitocôndrias das células tratadas apresentaram-se aumentadas, após 3 h de exposição, se comparadas às das células-controle sem exposição ao proguanil (**Figura 15**). O retículo endoplasmático liso apresentou-se desorganizado após 6 h de exposição e invaginações da membrana plasmática foram observadas após 24 h de exposição (**Figura 16**). A parede celular e núcleo encontram-se sem alterações nas células tratadas sob as condições do experimento.



Figura 16. Fotomicrografia de célula de *C. gattii* VGII exposta (acima) e não exposta (abaixo) à 64 μ g/mL de proguanil por 3 h, onde: M, membrana plasmática; P, parede celular; Mi , mitocôndria; N, núcleo.

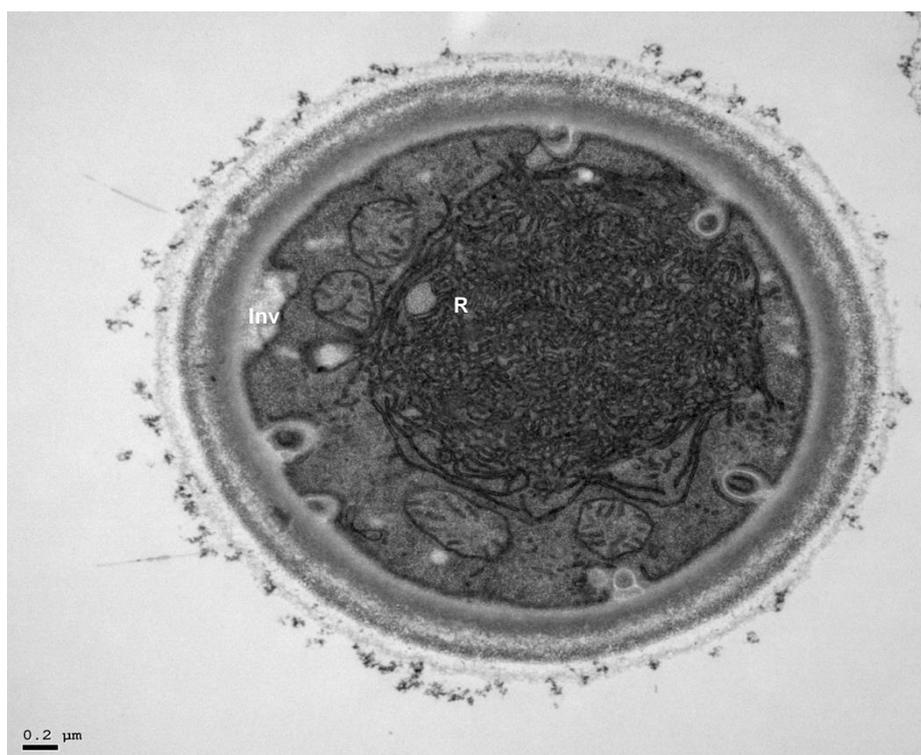
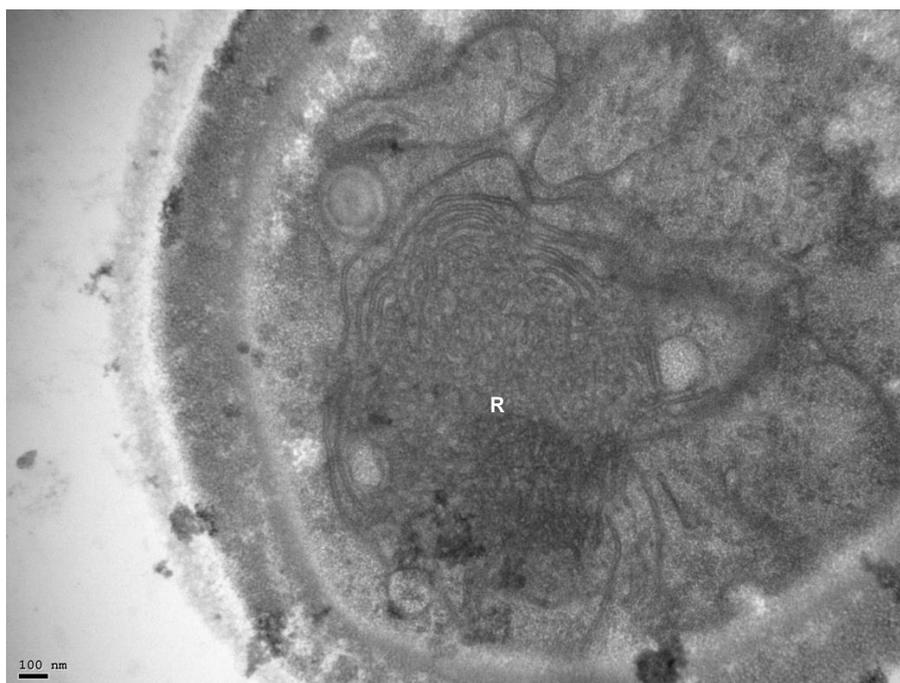


Figura 17. Fotomicrografia de célula de *C. gattii* VGII exposta à 64µg/mL de proguanil por 6h (acima) e 24 h (abaixo), onde: R é retículo endoplasmático liso desorganizado e Inv é invaginação da membrana plasmática.

4.11 Avaliação de efetividade de proguanil *in vivo* em modelo alternativo de *Galleria mellonella*

4.11.1 Procedimentos para determinação do inóculo e infecção experimental

O inóculo de 1×10^7 cel/mL induziu morte larval a partir do 4o. dia de experimento e foi adotado para o ensaio de tratamento com proguanil, fluconazol, anfotericina B e associações. A **Figura 17** ilustra a sobrevivência de *C. gattii*.

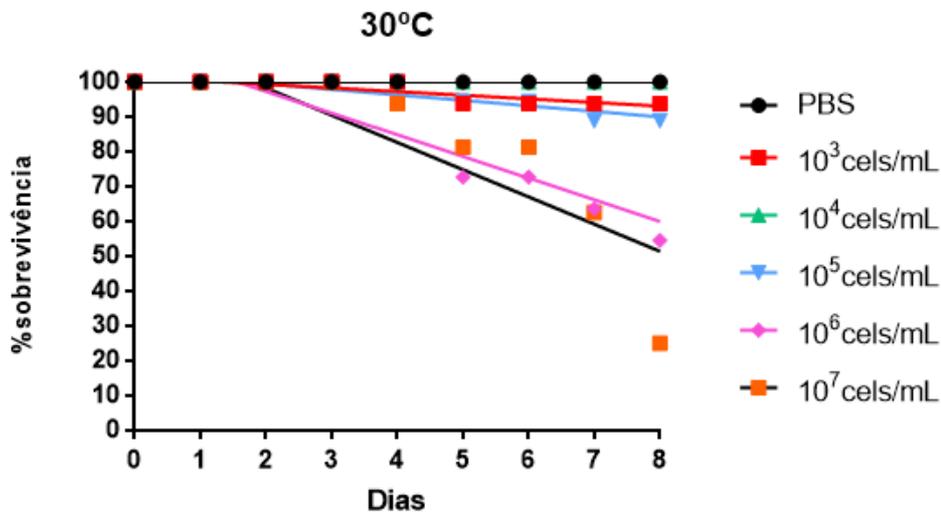


Figura 18. Sobrevida de larvas de *G. mellonella* inoculada com suspensão de *C. gattii* VGII em 5 distintas concentrações. Linha preta, grupo controle negativo inoculado com tampão fosfato de sódio (PBS).

4.11.2 Ensaio de toxicidade dos fármacos

Este teste foi realizado com o intuito de demonstrar algum possível efeito adverso dos fármacos utilizados no tratamento das lagartas. A **Figura 18** demonstra os resultados obtidos neste ensaio de toxicidade.

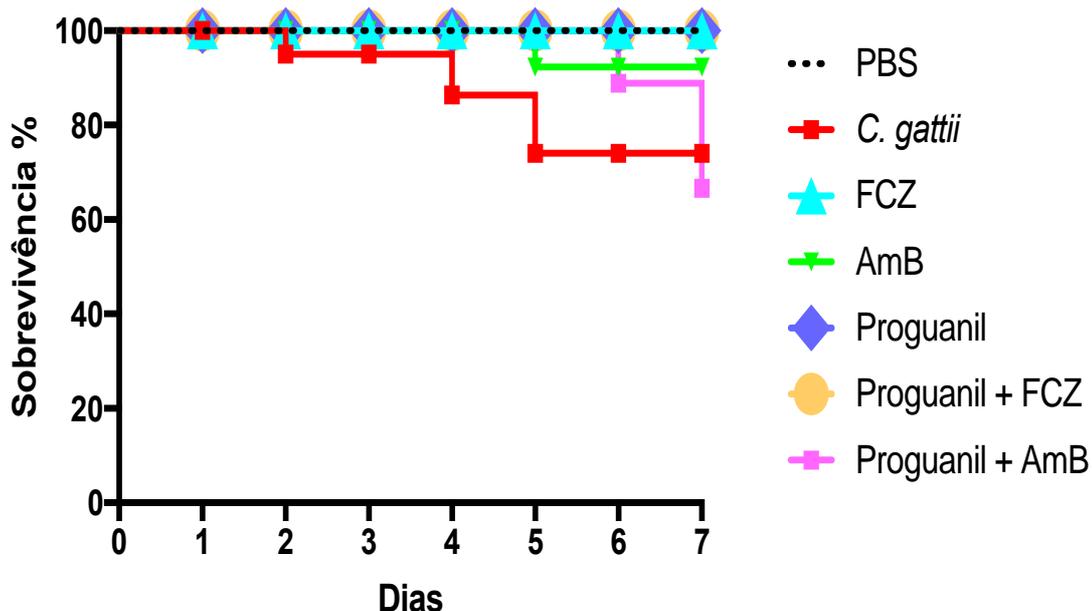


Figura 19. Sobrevivência de larvas de *G. mellonella* inoculadas com PBS (controle negativo), com suspensão de *C. gattii* VGII (controle positivo), com os fármacos fluconazol, anfotericina B, proguanil e suas associações, em uma única concentração.

4.11.3 Tratamento

O esquema terapêutico com fármacos, monoterapia e combinação (**Figura 19**), teve início após 24h da infecção com a cepa de *C. gattii* VGII. O grupo tratado com PBS permaneceu vivo até o último dia do experimento, de acordo com o esperado. O grupo larval infectado sem tratamento apresentou morte a partir do 3o. dia. Os grupos infectados e tratados apresentaram o mesmo resultado e aqueles tratados com fluconazol, tanto em monoterapia

quanto em combinação, apresentaram maior taxa de sobrevivência no período avaliado de 8 dias.

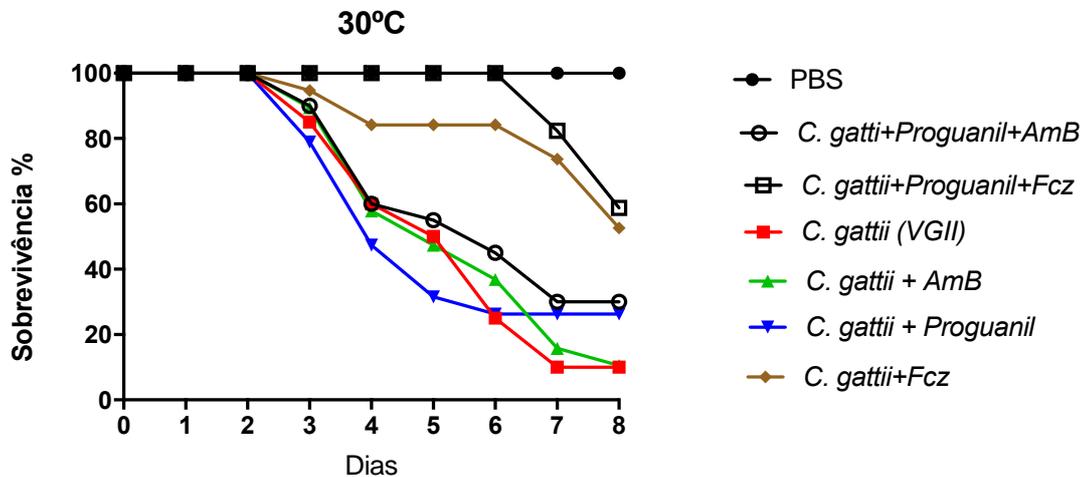


Figura 20. Curvas de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* inoculadas com *C. gattii* VGII e tratadas com 5 esquemas terapêuticos. PBS, grupo controle negativo inoculado com tampão fosfato de sódio.

4.11.4 Unidade formadora de colônias

Os resultados obtidos podem ser observados na **Figura 20**. Após o período de 24h, o grupo tratado com fluconazol apresentou menor carga fúngica ($p < 0,004$) em relação ao controle não tratado. Após 48 h, a carga fúngica do grupo controle foi similar ($p < 0,49$) à obtida às 24h de inoculação; o grupo com fluconazol e o grupo tratado com proguanil apresentaram menor carga fúngica em relação ao controle (respectivamente, $p < 0,0203$ e $p < 0,0296$). Após 72h a carga fúngica do grupo controle sem tratamento foi menor ($p < 0,0002$) do que a observada às 24h ou 48h; não houve diferença na carga fúngica ($p > 0,99$) entre os grupos: não tratado e tratados.

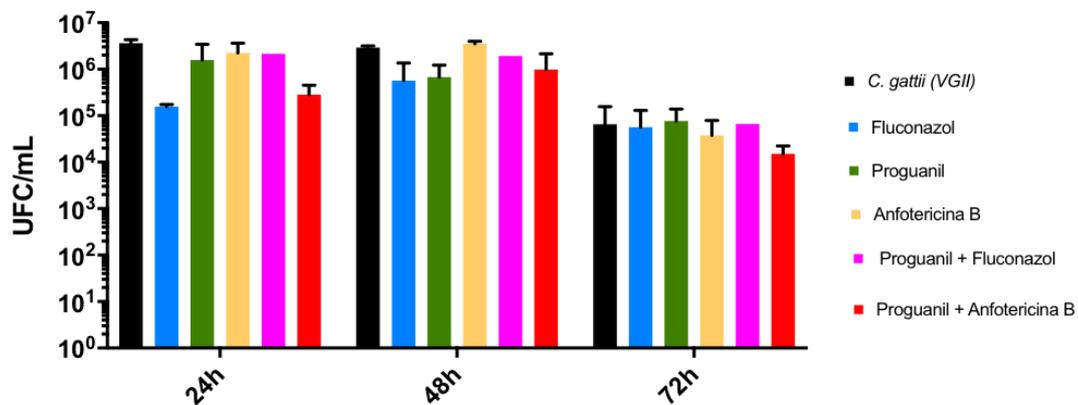


Figura 21. Contagem de unidades formadoras de colônias de larvas de *G. mellonella*, infectadas com *C. gattii* VGII, em grupo controle sem tratamento e grupos tratados com distintos fármacos, segundo tempo (h) de infecção

5 DISCUSSÃO

Infecções fúngicas invasivas estão entre as patologias importantes nos dias atuais (Kwon-Chung *et al.*, 2014). As causas dessa ocorrência são várias, mas talvez a principal seja a alta tecnologia médica que permite longevidade maior a pacientes imunossuprimidos (Perfect *et al.*, 2015). Essa população representa o grupo de maior risco para a invasão e disseminação de espécies fúngicas da microbiota e do meio ambiente.

A criptococose tornou-se um patógeno da "nova-era" que atinge todas as áreas da clínica médica, tanto em países em desenvolvimento quanto países ricos, deixando de ser uma doença rara, desde que, é observada em pacientes imunocomprometidos, em particular aqueles com aids (Perfect, 2014). A terapia da criptococose continua, nos dias de hoje, insatisfatória. Para essa grave doença existem terapias estabelecidas em *guidelines*, no entanto, a cura ou diminuição dos sinais e sintomas é meta difícil de ser atingida. Recidivas e persistência da infecção, além de sequelas são ocorrências comuns na criptococose; a síndrome da imunorreconstituição inflamatória, aumento da pressão intracraniana e criptococomas necessitam de novas estratégias para melhor prognóstico dos casos (Perfect *et al.*, 2010).

A problemática da terapia da criptococose está, ainda, relacionada aos antifúngicos comercializados, pois estes possuem algumas limitações como: alta toxicidade, custo elevado ou resistência clínica. Dadas as altas taxas de mortalidade de pacientes submetidos ao tratamento para meningite criptocócica, a prática clínica se beneficiaria muito da capacidade de prever os medicamentos a que uma infecção provavelmente responderia e a qual dose seria efetiva. Isto seria particularmente vantajoso se pudesse ser usado para limitar o tratamento com anfotericina B que é altamente tóxico e caro, para aqueles pacientes que provavelmente não responderiam ao fluconazol, reduzindo assim os custos, evitando efeitos colaterais

desnecessários e preservando os estoques de drogas em áreas onde a disponibilidade é baixa (Grossman e Casadevall, 2017).

As características de um fármaco ideal com atividade anti-*Cryptococcus* são: atividade fungicida, penetração na barreira hematoencefálica para passagem ao SNC, além de, ser de baixo custo, ser de fácil obtenção, assim como administração simples, como a via oral (Krysan, 2015). Os fármacos recomendados para tratamento da criptococose estão longe de serem ideais, além de serem antigos e em número restrito. A mais nova classe de antifúngicos, as equinocandinas, data do início dos anos 2000. Sua ação está direcionada enzima 1-3 beta glucana da parede celular, que não é encontrada em células humanas e, portanto, sua especificidade reduz o potencial dos efeitos colaterais tóxicos; no entanto, essa classe não apresenta ação sobre o gênero *Cryptococcus*, pela baixa concentração da enzima-alvo neste agente (Harvey *et al.*, 2015; Jonhson e Perfect, 2003).

Um dos principais obstáculos no desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos é a necessidade de uma atividade específica direcionada a alvos únicos de patógenos (Harvey *et al.*, 2015; Jonhson e Perfect, 2003). Os fármacos azólicos têm novos representantes na clínica, posaconazol, isavuconazol e ravuconazol, mas todos com o mesmo mecanismo de ação para o qual já foram descritas formas de resistência fúngica, prevendo a indesejada resistência clínica. O isavuconazol, ainda que, não aprovado para tratamento de casos de criptococose, apresentou boa atividade *in vitro* para *C. neoformans*, em estudo de Pfaller e colaboradores (2013), sendo atualmente alvo de estudos adicionais para emprego na clínica.

Ao lado dos fármacos sintéticos disponíveis no mercado, plantas medicinais têm base histórica para cuidados à saúde e representam uma alternativa, muitas vezes, econômica, acessível e aplicável a diversas patologias, em especial, em países em desenvolvimento. Plantas produzem variedade de componentes medicinais que podem inibir o crescimento de patógenos e um número considerável de estudos foi conduzido para avaliar a atividade antifúngica de extratos e óleos essenciais, de plantas medicinais.

Produtos naturais possuem características químicas que influenciam a avaliação da atividade antifúngica, tais como liberação de constituintes ativos, solubilidade, estabilidade, absorção e dissolução (Negri *et al.*, 2014).

Muitas vezes, quando se trabalha com compostos naturais a etnofarmacologia é tomada como passo inicial, resultando em uma busca mais racional de compostos ativos. Terapias de conhecimento popular e de formulação caseira são usadas há séculos e as espécies vegetais relacionadas têm sido investigadas, extensivamente, quanto às suas propriedades medicinais e potencial para fármacos naturais. No entanto, essa estratégia não foi aqui adotada e, por isso, os resultados na fase de triagem foram surpreendentemente bons, frente ao encontro de compostos ativos em quase 10% dos naturais e apenas 1,9% dos fármacos.

Como cepa-padrão de *C. neoformans* VNI foi usado *C. neoformans* H99 na fase de triagem. Apesar de ser padrão de virulência, essa cepa é estudada, extensivamente, não apenas em estudos de virulência, mas também, em outros testes (Sionov *et al.*, 2009; Varma e Kwon-Chung, 2010). A espécie representa o agente de criptococose mais frequente, globalmente, incluindo o Brasil, *C. neoformans* VNI, pela importância de sua morbidade. Ainda que, a proporção de *C. neoformans* seja maior do que *C. gattii* e variável segundo o continente (Europa 68:1, África 33:1, Ásia 7,6:1, América Central e Sul 4,5:1, América do Norte 3,5:1; Oceania 1:1,5), *C. gattii* é considerada, nos dias atuais como espécie mais virulenta e resistente a fármacos (Cogliati, 2013). No surto na ilha canadense, estendido para as regiões vizinhas, incluindo Estados Unidos, *C. gattii* VGII resultou em dezenas de casos e 8 óbitos. Soma-se a esses aspectos, o fato de *C. gattii* causar doenças em indivíduos sem imunodepressão aparente, indicando ser um patógeno primário (Stephen *et al.*, 2002; Hoang *et al.*, 2004). *C. gattii* VGII é importante em regiões tropicais, como o Brasil, em particular na região nordeste, e fármacos ativos contra essa espécie seria de extrema importância no panorama nacional (Kwon-Chung *et al.*, 1992; Lazera *et al.*, 1998; Hoang *et al.*, 2004; MacDougall *et al.*, 2007; Byrnes e Heitman, 2009; Byrnes *et al.*, 2010).

No estudo de CE₅₀, MIC e MFC foi analisada a atividade antifúngica dos compostos ativos selecionados frente a *C. gattii* VGII, agente de relevância crescente a nível mundial. Dentre os compostos naturais ativos encontrados, o valor de CE₅₀ para poligodial e laevicarpina, frente a essa espécie, foram: 2,18µM e 7,92µM, respectivamente. Poligodial é um sesquiterpeno extraído da espécie *Drymis brasiliensis*, que é utilizada na medicina popular devido a suas propriedades antialérgica, antiinflamatória, antinociceptiva e antiespasmódica. Sua atividade antifúngica foi demonstrada, anteriormente, frente a fungos filamentosos (de Almeida Alves *et al.*, 2001). Frente a *Cryptococcus* spp. a ação do poligodial foi, anteriormente, investigada e comprovada por Lee *et al.* (1999) e a concentração citotóxica foi de 165,96 µM e ótimo IS, no valor de 76,12. Laevicarpina, isolada de *Piper laeviscarpo*, nunca antes foi avaliada frente aos agentes de criptococose e, apresentou CC₅₀ 337,71 µM e IS de 42, esse composto apresenta potencial como um futuro protótipo farmacêutico. Nenhuma atividade biológica foi descrita na literatura para fungos, demonstrando o ineditismo deste trabalho. Há apenas um estudo avaliando a atividade antitripanossoma, com valor baixo de IS 7 frente a formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi* (Maciel *et al.*, 2015).

Para determinação da atividade antifúngica, foram também analisados os biguanídeos: proguanil, cicloguanil e clorproguanil. Os valores de CE₅₀ e CC₅₀ foram: 23,87µM e >200 µM para proguanil, 11,33 µM e >200 µM para cicloguanil, 9,39 µM e 30,21 µM para clorproguanil. Analisando-se a estrutura entre os biguanídeos e fármacos de ação antifúngica, verifica-se semelhança, apenas, na porção referente ao anel benzênico (seis átomos de carbono e os seis átomos de hidrogênio em anel hexagonal). O proguanil é um pró-fármaco que é transformado em cicloguanil, tem efeito antimalárico e, geralmente, é administrado em associação à outros fármacos, como cloroquina e atovaquona. Potente inibidor do receptor 5-HT₃ (antagonista) (Carrington *et al.*, 1951; Lochner e Thompson, 2014). A função desses receptores é mediar uma rápida ativação, dessensibilização, corrente interna, que é predominantemente transportada por íons de sódio e

potássio. Esses receptores são encontrados no sistema nervoso periférico e central e intestino. Estão localizados em muitas áreas do cérebro, incluindo córtex, hipocampo, núcleo *accumbens*, substância negra e área tegmental ventral, com níveis mais altos no tronco encefálico, especialmente nas áreas envolvidas no reflexo de vômitos (Thompson e Lummis, 2006). Pode ser usado como monoterapia (ex. Paludrine®, AstraZeneca) ou em combinação (ex. Malarone®, GlaxoSmithKline). Administração oral de 2 comprimidos de 100mg, atinge o pico de 4,1 μM na concentração sanguínea após 2 a 4 h (Wattanagoon *et al.*, 1987; Wattanagoon *et al.*, 1993).

Esses compostos têm atividade antimalárica, sendo cicloguanil um metabólito triazínico cíclico inibidor seletivo da enzima bifuncional diidrofolato redutase/timidilato sintetase do plasmódio. A inibição da enzima di-hidrofolato redutase (DHFR) plasmodial leva à depleção do folato, que é um co-fator essencial na biossíntese do ácido nucléico e, conseqüente, diminuição na síntese proteica. Os inibidores de folato têm longa história de fármacos anticâncer e antimicrobianos, além de antiprotozoários (Yuthavong *et al.*, 2012). A pesquisa de compostos apresentando semelhança estrutural com o cicloguanil levou ao desenvolvimento de outros inibidores da diidrofolato redutase, como a pirimetamina. A substituição dialogênica, nas posições 3 e 4 do anel benzeno, gera o clorproguanil (Nevill *et al.*, 1988; Keystone, 1990; Srivastava e Vaidya, 1999).

A atividade antifúngica dos inibidores da enzima DHFR foi, recentemente, observada frente a *Candida albicans* e *C. glabrata* (G-Daynandan *et al.*, 2014). No entanto, a seletividade da inibição para enzimas fúngicas, assim como para agentes parasitários, não é muito diferente daquela verificada para enzimas encontradas nas células de seres humanos e estudos sobre modelagem conformacional são descritos na literatura, sem ainda indicação clínica (Tawari *et al.*, 2011). Pode-se traçar a hipótese de que estes compostos tenham o mesmo alvo em células de *Cryptococcus*. De fato, a enzima DHFR (~25 KDa) também ocorre em *C. neoformans*, segundo um antigo estudo que não teve desdobramentos para verificar diferenças da enzima humana, para estimular possível alvo terapêutico para criptococose

(Sirawaraporn *et al.*, 1993). Mas o interesse por antimaláricos no tratamento de micoses invasivas está em voga. Estudo recente de Mayer e Kronstad (2017) descreve triagem em biblioteca química denominada *PathogenBox* (*MedicinesforMalariaVenture*, Suíça), na busca de identificar novos compostos antifúngicos. Os autores comprovaram ser o composto MMV688271 ($C_{18}H_{16}N_6OCl_2$) ativo (MIC <1 μ M) frente a cepas de *C. albicans* (SC 5314), *C. neoformans* (H99) e *C. gattii* (R265) (Mayer e Kronstad, 2017).

C. krusei ATCC 22019 e *C. parapsilosis* ATCC 6258 foram usadas em todos os testes de suscetibilidade, elas foram introduzidas no estudo porque são as recomendadas para controle de qualidade dos fármacos antifúngicos em métodos de referência CLSI e AFST-EUCAST. Elas foram selecionadas, dentre um extenso grupo de leveduras, por serem as mais estáveis, geneticamente, preservando o mesmo perfil de suscetibilidade a antifúngicos durante longos períodos e condições de manutenção (Pfaller e Barry, 1995). *C. krusei* é resistente a fluconazol e *C. parapsilosis* sensível a este fármaco, e a suscetibilidade frente a cicloguanil, clorproguanil e proguanil foi determinada, de modo inédito, neste estudo. As cepas-controle de *Candida* não foram inibidas pelos biguanídeos nas concentrações avaliadas. Foi notável que estas duas espécies de *Candida* foram bem menos suscetíveis aos compostos se comparadas à cepa de *C. gattii*.

Nas questões técnicas, vale a pena ressaltar algumas observações resultantes da experiência deste estudo. Nos testes de CE_{50} , CC_{50} , bem como nos de triagem, foram utilizado o corante vital resazurina que é metabolizado por mitocôndrias. Este insumo tem vantagens de baixo custo, leitura por colorimetria ou fluorescência, boa sensibilidade, mas apresenta desvantagens como período de incubação às vezes longo como no caso deste estudo em 20h, toxicidade ao manipulador, interferência na fluorescência.

Os testes que avaliam o MIC variam no ponto de leitura de reação, para azóis a leitura é em 50%, como dito, o que permite a comparação com CE_{50} realizado com os compostos ativos selecionados. Isso se justifica pela ação fungistática dos azóis que inibem, gradativamente, as cepas fúngicas e

que podem resultar em um crescimento residual acima do valor do MIC. Deste modo, para contornar esse problema, denominado *trailing*, os testes com azólicos e outros fármacos fungistáticos têm *endpoint* em 50% de inibição, quando comparado com o controle positivo de crescimento.

Quando são realizados testes de suscetibilidade antifúngica com fármacos fungicidas, como o fármaco poliênico AmB, o *endpoint* correto é na ocorrência de 100% de inibição de crescimento. No caso de AmB os valores de MIC são em torno 0,25µg/mL a 1µg/mL frente a leveduras, incluindo *Cryptococcus* spp. Os valores de MIC encontrados para clorproguanil e cicloguanil foram idênticos em 32µg/mL e para proguanil 16µg/mL sendo alto se comparado com os MICs encontrados para AmB. No entanto, observou-se padrão de inibição fungicida *in vitro*, ou seja, inibição drástica e completa em determinada concentração, ao contrário do padrão observado com compostos fungistáticos de ação gradual, como já explicado. Importante ressaltar que, os testes foram realizados dentro do rigor técnico e de acordo com método de referência internacional, de modo a validar todos os resultados e permitir a comparação com dados de literatura obtidos com fármacos tradicionais, tanto azólicos, quanto AmB.

Linhagem celular NCTC de mamíferos foi utilizada para investigar a ação citotóxica do cicloguanil, clorproguanil e proguanil e permitir o cálculo de IS. O cálculo, que leva em conta a citotoxicidade para células de mamíferos e para célula fúngica, resultou em valor interessante para cicloguanil de >17,65. O ideal para que um composto possa ser considerado protótipo de um novo fármaco, ou no caso, válido para reposicionamento, seu índice de seletividade deve ser maior ou igual a 10. O achado, portanto, além de inédito é de grande interesse pois outros inibidores de folato não foram seletivos frente a *C. neoformans* e outros fungos, como *Candida albicans* e *P. carinii* (Sirawaraporn *et al.*, 1993). Citotoxicidade de outro composto antimalárico (MV688271) também mostrou citotoxicidade para linhagens murinas, mas com melhor seletividade (valores de IS>50) para células de *C. neoformans*, incluindo valores de CC₅₀ para distintos tipos celulares: 15,4µM para a linhagem MRC-5 de células de tecido pulmonar,

16 μ M para macrófagos peritoniais de camundongos e 13,5 μ M para macrófagos peritoniais murino (Mayer e Kronstad, 2017).

Para clorproguanil, de outro modo, o valor encontrado para IS foi muito baixo (3), sendo considerado um composto com baixa seletividade e, portanto, tóxico. Resultado diverso deste poderia ter sido obtido se os ensaios tivessem sido desenvolvidos com linhagens de outras células. Outras opções seriam células de rim de mamíferos (HEK293), células de fígado de mamíferos (HEPG2), células de rins de macaco Vero ou de rins felinos ou de bovinos, células humanas de tecido epitelial da cérvix (HeLa) (Bagla *et al.*, 2014; Hartland *et al.*, 2015). As linhagens NIH/3T3 (fibroblastos de camundongo), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HPL1A (epitélio periférico pulmonar humano), quando foram usadas em ensaios de toxicidade para novo fármaco contra criptococose, mostraram sensibilidades distintas e, portanto, valores de IS diferentes (Corson *et al.*, 2016). Portanto, a questão metodológica tem impacto importante nos resultados de prospecção de fármacos. Não há, até o momento consenso sobre qual linhagem celular deva ser utilizada nos ensaios para medir citotoxicidade de fármacos para criptococose. Uma das hipóteses da citotoxicidade do clorproguanil é sua ação inibitória da enzima-alvo DHFR, também presente em células murinas (Hughes *et al.*, 2015).

Os testes de combinação dos antimaláricos e fármacos tradicionais indicaram sinergismo entre clorproguanil e fluconazol. Embora, os resultados de FICI, de acordo com o critério adotado, indicaram interação indiferente para a maior parte das combinações avaliadas, de outro modo, um achado, considerado de interesse foi o sinergismo encontrado na associação entre clorproguanil e fluconazol. Os estudos de combinação fármacos antifúngicos convencionais com os biguanídeos- proguanil, cicloguanil e clorproguanil-tiveram como objetivo, empírico até o momento, atingir vários alvos simultaneamente para inibir ou matar cepas de *Cryptococcus* spp. Um dos maiores benefícios de tal estratégia é a descoberta de efeito sinérgico, ou seja, quando o benefício geral da combinação terapêutica é maior do que a

soma dos efeitos de cada antimicrobiano isoladamente (Borisy *et al*, 2003; Onyewu *et al.*, 2007; Zimmermann *et al*, 2007).

O estudo de sinergismo visa gerar maior janela farmacológica e reduzir a dose dos fármacos combinados e, portanto, possibilitar a redução da toxicidade de cada um deles. Desse modo, o resultado da interação entre clorproguanil e fluconazol foi de interesse e estimula estudos adicionais *in vivo* para comprovar a vantagem da terapia combinada, observada *in vitro*, sobre monoterapia. A busca de terapias combinatórias e possivelmente multi-alvos é tendência atual e mundial (Borisy *et al*, 2003; Onyewu *et al.*, 2007; Zimmermann *et al*, 2007). Ainda é desconhecido o mecanismo de ação do clorproguanil na célula de *Cryptococcus*, mas supondo-se que seja outro que o de fluconazol, a combinação destes compostos pode ser vantajosa. As terapias combinadas que impactam alvos distintos, de uma só vez, são menos propensas a estimular o desenvolvimento de resistência medicamentosa e aumentar a eficácia terapêutica (Groll e Walsh, 2002; Zimmermann *et al.*, 2007).

A ação do fármaco proguanil é observada logo nas primeiras horas nas concentrações acima de 8µg/mL, segundo as curvas de crescimento, comprovando o exato valor de MIC. A dinâmica da atividade anti-*Cryptococcus* de proguanil foi, portanto, demonstrada reforçando a provável ação fungicida.

As ações fungicidas de AmB e fungistática de FCZ foram utilizadas como parâmetros para monitorar a atividade de proguanil e os resultados dos ensaios de viabilidade celular indicam comportamento, deste composto, semelhante a da AmB, caracterizando ação fungicida às 24h de exposição, independente da concentração avaliada.

A secreção de diversos fatores de virulência é um mecanismo utilizado por diferentes patógenos para causar danos às células hospedeiras. A infecção por *Cryptococcus* necessita de alguns mecanismos patogênicos, incluindo produção de enzimas lacase, urease e fosfolipases e formação de cápsula, composta principalmente de GXM (Kwon-Chung *et al.*

1982; Chang & Kwon-Chung, 1994; Cox *et al.* 2000; Cox *et al.* 2001; Zhu & Williamson, 2004).

Os resultados obtidos através da detecção de GXM neste trabalho demonstram alta concentração de GXM secretada após o período de 24h em células não tratadas, e de uma maneira interessante, diminuição nas células tratadas com proguanil. Este dado sugere que este composto pode estar interferindo nas vesículas que fazem o transporte de GXM. GXM é o polissacarídeo predominante (~90%) na cápsula, secretado em culturas fúngicas e em fluidos e tecidos durante a doença *in vivo* (Lee *et al.*, 1996; Yoneda e Doering, 2006; Nimrichter *et al.*, 2007; Zaragoza *et al.*, 2009). GXM é sintetizado no citoplasma da célula e transportado em vesículas para o espaço extracelular, onde está conectado à parede celular e utilizado para aumento capsular (Feldmesser *et al.*, 2001; Yoneda *et al.*, 2006; Zaragoza *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007). As vesículas contendo polissacarídeos em *C. neoformans* parecem estar associadas ao Complexo de Golgi para ser associado à secreção derivada do aparelho de Golgi, derivando da via de secreção (Yoneda *et al.*, 2006).

A enzima de degradação, urease, tem um papel na patogenicidade de *Cryptococcus*. A detecção da atividade da urease por ensaio colorimétrico mostrou alta concentração nas células não tratadas com proguanil, como esperado e, ao se realizar o tratamento na concentração de 64µg/mL, não se observou diferença significativa na atividade dessa enzima, indicando, dessa maneira, que o fármaco não deve atuar nessa via. A urease catalisa a hidrólise de uréia para amônia e carbamato, e em condições fisiológicas essa reação pode resultar em um aumento de pH. Grande parte de isolados clínicos de *Cryptococcus* produzem grandes quantidades de urease (Cox *et al.*, 2000). Atividades da enzima são importantes na propagação do fungo nos pulmões e na habilidade de cruzar a barreira hematoencefálica (Olszewski *et al.* 2004; Osterholzer *et al.* 2009; Shi *et al.* 2010). Muitos fungos patogênicos possuem atividade da urease, dentre eles *C. neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*,

Sporothrix schenckii e espécies de *Trichosporon* e *Aspergillus* (Cox *et al.*, 2000).

Para tentar elucidar um possível mecanismo de ação do proguanil, a detecção de ROS foi realizada. Para AmB os resultados foram positivos e para PBS foram negativos indicando o desempenho do ensaio. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que não há estímulo de produção de ROS por proguanil, independente, da concentração e tempos de exposição. Para a detecção de radicais livres o corante DHF foi eficaz, indicando que AmB induziu forte explosão oxidativa em *C. gattii* após 1h e diminuiu com o passar do tempo, como demonstrado em estudo prévio com *C. neoformans* (Sangalli-Leite *et al.*, 2011). O uso de diversas concentrações de proguanil durante diferentes tempos nos permitiu concluir que não há um *stress* oxidativo. A super produção de ROS é modulada pela indução repentina da atividade mitocondrial. O mecanismo de ação mais conhecido da AmB é sua ligação ao ergosterol no nível da membrana celular, onde induz a formação de poros e perda de integridade celular, porém outros possíveis mecanismos de ação são investigados e, um deles é a indução da morte celular por caminhos apoptóticos ou necróticos que envolvem a produção de ROS, conseqüentemente causando um dano oxidativo e morte (Phillips *et al.*, 2003; Thevissen *et al.*, 2007; Belenky *et al.*, 2013).

MET provou ter grande valor na análise de quase todos os componentes celulares, incluindo citoesqueleto, sistemas de membrana, organelas, e bem como estruturas especializadas em sistemas diferenciados. Não há como observar a complexidade das células e suas estruturas sem MET (Winey *et al.*, 2013) que, neste estudo permitiu avaliar: parede e membrana celular, retículo endoplasmático, mitocôndrias e núcleo celular. O proguanil foi capaz de alterar a morfologia das células de *C. gattii* na concentração de 64µg/mL, logo após 3 horas de exposição.

Por MET foram verificadas invaginações da membrana plasmática, enquanto a parede celular e núcleo não apresentaram alterações sob ação do proguanil. Invaginações também foram observadas por Pereira e colaboradores (2016) que evidenciaram desprendimento, não apenas da

membrana plasmática mas, também da parede celular e encolhimento citoplasmático resultantes do tratamento com 2 compostos eicosanóides ácidos (do fungo endofítico *Mycosphereella* spp.), frente a isolados de *C. gattii* e *C. neoformans*. Na presença de um dos compostos (*myriocin*), células de *C. gattii* (ATCC 24065) mostraram invaginações na superfície celular e danos na membrana celular, semelhante ao que aconteceu neste trabalho, após a exposição de 24h, com o proguanil. As estruturas químicas desses compostos eicoisanóicos são semelhantes aos esfingolipídeos, importantes para tráfico na membrana celular. Lipídeos desempenham uma função subjacente e importante nos mecanismos que regulam a patogenicidade fúngica (Shea *et al.*, 2006). Os metabólitos de esfingolipídeos atuam como importantes moléculas de sinalização e implicam em variedade de processos celulares e fisiológicos, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose (Miklosz *et al.*, 2013; Spiegel e Merriell, 1996). De acordo com Leiter e colaboradores (2005), este desprendimento celular é semelhante à apoptose celular.

Alterações internas na forma de desarranjo do retículo endoplasmático foram, ainda, verificadas. O retículo é uma organela dinâmica com papéis essenciais na síntese de proteínas, modificação, secreção, síntese lipídica, armazenamento de cálcio e sinalização (Cheon *et al.*, 2014). Muitas vezes, está fortemente associado com quase todas aos outros compartimentos dentro da célula, como membrana plasmática, núcleo, mitocôndrias, vacúolos e peroxissomos (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2012). Ao contrário da extensa estrutura reticular em mamíferos do retículo endoplasmático, esta estrutura tubular em leveduras está localizada perto da membrana plasmática (Hu *et al.*, 2011). Além de processos celulares chave, o RE de *Cryptococcus* parece ter um importante papel na resistência a azóis (Ngamskulrungrroj *et al.*, 2012). Em estudo de Chen e colaboradores (2013), foram demonstradas rupturas na membrana plasmática em mutantes de calcineurina de *C. gattii* e *C. neoformans* à 37°C quando comparadas as cepas-padrão de *C. gattii* (R265, R272, WM276) e de *C. neoformans* (H99). A calcineurina, uma fosfatase ativada por

Ca²⁺/calmodulina, é formada por uma subunidade catalítica, calcineurina A, e uma subunidade regulatória, calcineurina B. Todos os organismos eucariotos possuem ao menos um gene codificando cada subunidade. A ativação da calcineurina se dá quando há aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺, e ligação do complexo Ca²⁺/calmodulina à subunidade A, o que leva à alteração conformacional que expõe o sítio ativo, cessando a auto-inibição. Está, também, estabelecido o papel da calcineurina na resposta a estresse do retículo endoplasmático (Kissinger *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2010). Foram demonstrados em diversos trabalhos que a calcineurina está envolvida em diversos fatores de virulência como: transição morfológica em fungos dimórficos, crescimento à temperatura corporal de mamífero, sobrevivência em soro e aderência em tecidos hospedeiros (Kwon-Chung *et al.*, 1982; Braun *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2010). No entanto, estudos adicionais devem ser realizados para elucidar a ação do proguanil na membrana plasmática e, posteriormente, seu emprego na clínica. De fato, a correlação dos resultados *in vitro versus in vivo* ainda é incerta para diversos fármacos antifúngicos.

A escolha do tratamento para infecções por *Cryptococcus* spp. depende do sítio topográfico e do estado imunitário do paciente. Ocorre em 3 fases: indução, consolidação e manutenção. Em regra, a primeira escolha é a anfotericina B, quando disponível, e em seguida dos outros fármacos em monoterapia ou associação. Devido a altas taxas de mortalidade em pacientes submetidos ao tratamento da meningite criptocócica, a prática clínica seria beneficiada com a capacidade de prognosticar os medicamentos em resposta a uma infecção e sua dose. Isto seria de extrema vantagem se pudesse ser utilizado para limitar a alta toxicidade e o tratamento de alto custo com anfotericina B daqueles pacientes os quais não respondem à terapia com fluconazol, desse modo reduzindo custos, prevenindo efeitos adversos desnecessários e preservando estoque de fármacos em regiões onde a disponibilidade é baixa (Grossman e Casadevall, 2017).

Para algumas espécies de *Candida*, de acordo com AFST-EUCAST, os testes demonstraram ser ferramentas efetivas na tomada de decisões relacionadas ao tratamento e de acordo com os breakpoints propostos pelo CLSI, 92% dos isolados susceptíveis ao fluconazol de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* foram tratados com êxito com o fármaco fluconazol, enquanto, o mesmo foi verdadeiro para apenas 37% isolados resistentes. Nenhuma dessas previsões, infelizmente, foi adequada em estudos de sensibilidade à antifúngicos para *C. neoformans* (Grossman e Casadevall, 2017; Pfaller *et al.*, 2012).

Estudos não encontraram a correlação entre os valores de MICs com o resultado do tratamento com anfotericina B ou fluconazol e, ainda, há poucas evidências de que essas avaliações de padrões de suscetibilidade tenham aplicabilidade clínica (Grossman e Casadevall, 2017; Lee *et al.*, 2012; Larsen *et al.*, 2011; Dannaoui *et al.*, 2006; Jessup *et al.*, 1998). Fato que, não há *breakpoints* clínicos estabelecidos para *Cryptococcus* spp. Diferenças de protocolos e metodologia, foram apresentados por alguns grupos de pesquisadores, como razões para esta falta de correlação. Porém, um raciocínio em potencial que ainda não foi explorado adequadamente é a possibilidade de que as diferenças biológicas entre a infecção *in vivo* do meio ambiente e a *in vitro* dos testes de suscetibilidade à antifúngicos levam a diferentes perfis de sensibilidade (Grossman e Casadevall, 2017).

À procura de um paralelismo neste trabalho, foi realizado um estudo *in vivo* de infecção de *C. gattii* e tratamento com fármacos e associações, em modelo de *G. mellonella*. Até o presente momento, são raros os estudos semelhantes a este. Na análise da sobrevida nos grupos de tratamento com fluconazol, e nas associações do proguanil com a anfotericina B e proguanil com fluconazol, após infecção, ocorreu aumento de sobrevida quando comparado ao grupo controle, indicando o potencial do proguanil, não apenas como monoterapia, mas também, como terapia em associação. Melhora na sobrevida, foi relatada também em estudo de Palanco e colaboradores em 2017, no tratamento com anfotericina B na infecção por *C.*

gattii (ATCC 59660). Para *C. neoformans*, apenas 3 estudos de sobrevivência indicam eficácia do fluconazol (Cordoba *et al.*, 2014, Vu e Gelli, 2010 Milonakis *et al.*, 2005).

Um dos primeiros estudos de tratamento em modelo invertebrado de Mylonakis e colaboradores (2005) demonstrou tendência sugerindo que a monoterapia com fluconazol foi efetiva ($p=0,072$) e com anfotericina B a sobrevivência aumentou ($p=0,001$), ambos quando comparados ao controle. A terapia de associação de anfotericina B com fluorcitosina foi mais efetiva ($p=0,002$) do que a terapia única com anfotericina B.

A atividade protetora do fluconazol na infecção experimental com *G. mellonella* foi também observada em estudo de Vu e Gelli (2010), na terapia de associação do antifúngico fluconazol com os fármacos astemizol e seu análogo A2 ($p=0,019$ e $p=0,002$, respectivamente) e, demonstrada em estudo argentino após 24h da inoculação com sobrevivência larval de 15 dias e para anfotericina e voriconazol, 7 e 14 dias, respectivamente (Córdoba *et al.*, 2014).

Em 2016, estudo de Sangalli-Leite e colaboradores, avaliaram a eficácia de 3 fármacos frente ao isolado de *C. neoformans* (ATCC 90112). A sobrevivência foi aumentada nos grupos tratados com anfotericina B e do composto analisado (pedalítina) com valor de $p>0,05$. Analisando a sobrevivência após o 5° e 6° dias, a sobrevivência para anfotericina B foi de 50% e 18,7%, para pedalítina 26% e 0%, para a combinação foi maior do que 56% até o final do experimento.

Em relação à carga fúngica, foi notória a ação do proguanil, na redução da infecção larval após 48h de tratamento. A eficácia desse composto foi comparável à observada para fluconazol. Redução de carga fúngica foi demonstrado em estudo com anfotericina B ($p<0,05$) após 48h em isolados de *C. gattii* (Palanco *et al.*, 2017). Neste trabalho, após 72h de tratamento, foi inesperado observado que a carga fúngica do grupo não tratado, assim como do tratado, foi decrescente. Sendo o oposto, no estudo de Sangalli-Leite *et al.*, 2016, onde ocorreu uma diminuição da carga fúngica

no 1º dia para anfotericina B (88%), pedalitina (87%) e para a combinação dos fármacos (93%) e após o 4º dia uma redução de quase 100%.

Maiores estudos sobre a capacidade do controle da infecção pelo sistema imunológico das larvas poderão justificar essa ocorrência. O sistema imunológico das larvas de *Galleria mellonella* dessa compartilha um alto grau de homologia estrutural e funcional com o sistema imune inato dos vertebrados e possui defesas celulares e humorais. A resposta imune humoral dos insetos consiste em vários processos, incluindo melanização, coagulação da hemolinfa, e a produção de numerosos peptídeos antimicrobianos. A resposta celular inclui fagocitose, nodulização e encapsulamento em grande escala (Hoffman, 1995; Kavanagh e Reeves, 2004; Fuchs *et al.*, 2010; Lionakis, 2011).

Os ensaios de carga fúngica *in vivo* são trabalhosos, árduos e dispendiosos, mas oferecem um panorama real da evolução da infecção ao longo do tempo. Poucos estudos com essa ferramenta foram publicados até o momento, mantendo grandes lacunas no conhecimento da patogênese da infecção experimental em animais invertebrados. O uso desse tipo de modelo oferece vantagens bioéticas porque reforça a aplicação da regra dos 3Rs (*Reduction, Refinement, Replacement*) para reduzir o número, minimizar dor e o sofrimento e buscar alternativas para substituição dos animais (Trevijano-Contador *et al.*, 2015). Estudos em modelo alternativo em *Galleria mellonella* estão em ascensão, porém, os que se referem ao uso de fármacos ou produtos naturais no tratamento da infecção por *Cryptococcus* sp. ainda são escassos (Mylonakis *et al.*, 2005). Este modelo mostrou correlação positiva quando a patogenicidade dos micro-organismos nas larvas foi comparada com a dos modelos em mamíferos vertebrados e, portanto, deve ser incrementado em distintos centros de pesquisa (Firacative *et al.*, 2014).

Na literatura consultada, apenas um estudo de carga fúngica em infecção larval experimental com *C. neoformans* e outro com *C. gattii* trazem prejuízo para comparação de resultados. Em estudo de Sangalli-Leite *et al.*, 2016, ocorreu diminuição nas colônias de *C. neoformans* no tratamento com

anfotericina B (4mg/kg). Em 24h a redução foi de 88% e total (100%) às 96 h na carga fúngica.

Poucos estudos tem sido realizados com cepas de *Cryptococcus* spp., apesar da grande necessidade de buscar alternativas para terapia da criptococose (Pfaller *et al.*, 2009). Este estudo levou a achados surpreendentes quanto à alta porcentagem de compostos naturais com ação antifúngica. Como, previamente, discutido muitos fármacos comercializados, incluindo antifúngicos foram descobertos por observações aleatórias em bibliotecas de compostos.

6 CONCLUSÕES

1. Dentre 154 compostos avaliados, apenas 1,9% foi ativo contra cepas do complexo *C.neoformans/C. gattii* indicando o árduo caminho da busca de terapias alternativas contra os agentes da criptococose;

2. Dois compostos naturais, laevicarpina e poligodial, além de 3 fármacos antimaláricos-cicloguanil, proguanil e clorguanil- foram identificados como ativos *in vitro* contra *C. gattii*, sendo para laevicarpina, um achado inédito. Para esses compostos, estudos sobre eficácia *in vivo* e custo-benefício devem ser aprimorados para desenvolvimento de novos fármacos para criptococose;

3. *C. gattii* apresentou maior suscetibilidade para proguanil e permitiu avaliar, extensivamente, a sua efetividade *in vivo* e *in vivo*, interação com outros fármacos usados na terapia da criptococose e investigar seus possíveis mecanismos de ação e efeitos sobre a célula fúngica;

4. A forte ação inibitória do proguanil, foi caracterizada como fungicida, com efeitos observados já às 24 h de exposição; clorproguanil e cicloguanil tiveram ação inibitória igual, sendo o mais ativo clorproguanil, porém o de maior citotoxicidade; no entanto, em combinação com fluconazol, os resultados foram promissores vista a interação sinérgica. Assim, há grande motivação para prosseguimento da avaliação com menores doses de clorproguanil associados ao fluconazol, bem como, modelagem química para diminuição da toxicidade;

5. A ação de proguanil no decréscimo de viabilidade celular foi similar à da anfotericina B, indicando ser um forte candidato a reposicionamento para tratamento da criptococose;

6. O mecanismo de ação do proguanil não pode ser determinado segundo a metodologia empregada, redirecionando os estudos para outros caminhos

investigativos; no entanto, foi demonstrada alteração de estruturas intracelulares, incluindo mitocôndrias, retículo endoplasmático e membrana, relacionadas à exposição a proguanil, estimulando investimento de pesquisa nessa direção e,

7. Os estudos de carga fúngica *in vivo* não foram conclusivos e merecem novas abordagens. Os ensaios de sobrevivência, de outro modo, indicaram que a eficácia do proguanil *in vivo* depende da sua associação com fluconazol, não tendo sido demonstrado que a monoterapia seja adequada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadi J, Nachman S, Kressel AB, Pirofski L. Cryptococcosis in children with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1999;28(2):309–13.

Alonso-Monge R, Carvaiho S, Nombela C, Rial E, Pla J. The Hog1 MAP kinase controls respiratory metabolism in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology.* 2009;155:413–23.

Aminnejad M, Diaz M, Arabatzis M, Castañeda E, Lazera M, Velegaki A, et al. Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathologia.* 2012; 173:337–46.

Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W; AFST-EUCAST. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(7):E246-7

Ashburn TT and Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3:673–83.

Bagla VP, McGaw LJ, Elgorashi EE, Eloff JN. Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (*Podocarpaceae*) leaves. *BMC Complement Altern Med.* 2014; 14:383.

Barbosa Junior, A. M; Mélo, D. L. F. M De; Almeida, F. T. C. DE; Trindade, R. De C. Estudo comparativo da susceptibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice, 1895) frente a alguns antifúngicos de uso hospitalar e extratos vegetais obtidos de plantas medicinais da região semiárida sergipana. *Rev. bras. plantas med.* 2015;

Belenky P, Camacho D, Collins JJ. Belenky P, Camacho D, Collins JJ. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. *Cell Rep.* 2013; 21;3(2):350-8.

Bellí G, Molina MM, García-Martínez J, Pérez-Ortín JE, Herrero E. *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 5-deficient cells subjected to continuous oxidizing conditions are affected in the expression of specific sets of genes. *J Biol Chem.* 2004; 279:12386–95.

Bennett JE, Dismukes WE, Duma RJ, Medoff G, Sande MA, Gallis H, Leonard J, Fields BT, *et al.* A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptoccal meningitis. *N Engl J Med.* 1979;301(3):126-31.

Billmyre RB, Croll D, Li W, Mieczkowski P, Carter DA, Cuomo CA, *et al.* Highly recombinant VGII *Cryptococcus gattii* population develops clonal outbreak clusters through both sexual macroevolution and asexual microevolution. *mBio* 2014;5:e01494–14.

Borisy AA, Elliott PJ, Hurst NW, Lee MS, Lehar J, Price ER, Serbedzija G, Zimmermann GR, Foley MA, Stockwell BR, Keith CT. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:7977–82.

Botts MR, Giles SS, Gates MA, Kozel TR, Hull CM. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis. *Eukaryot Cell.* 2009;8:595–605.

Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Diaz MR, Spanjaard L, Dromer F, *et al.* Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res.* 2006;6:599–607.

Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Hoogveld HL, Dromer F, St-Germain G, Boekhout T. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *C. gattii* hybrid. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14:1105–8.

Brouwer AE, Rajanuwong A, Chierakul W, Griffin GE, Larsen RA, White NJ, Harrison TS. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. *Lancet*. 2004; 363:1764–7.

Butts A, DiDone L, Koselny K, Baxter BK, Chabrier-Rosello Y, Wellington M, et al. A repurposing approach identifies off-patent drugs with fungicidal cryptococcal activity, a common structural chemotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of cryptococcosis. *Eukaryot Cell*. 2013; 12:278–87.

Butts A, Martin JA, DiDone L, Bradley EK, Mutz M, Krysan DJ. Structure-activity relationships for the antifungal activity of selective estrogen receptor antagonists related to tamoxifen. *PLoS One*. 2015; 10:e0125927.

Byrnes EJ and Heitman J. *Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences. *F1000 Biol Rep*. 2009; 17;1. pii: 62.

Byrnes EJ 3rd, Li W, Lewit Y, Ma H, Voelz K, Ren P, et al. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog*. 2010; 6:e1000850.

Byrnes EJ, Bartlett KH, Perfect JR, Heitman J. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes Infect*. 2011a; 13:895–907.

Byrnes EJ, III, Marr KA. The outbreak of *Cryptococcus gattii* in Western North America: epidemiology and clinical issues. *Curr Infect Dis Rep* 2011b;13:256–61.

Cabiscol E, Piulats E, Echave P, Herrero E, Ros J. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2000;275:27393–8.

Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:2477–82.

Carrington HC, Crowther AF, Davey DG, Levi AA, Rose FL. A metabolite of paludrine with high antimalarial activity. *Nature*. 1951;168:1080.

Casadevall A. and Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 1999; 147(1):59–60.

Casadevall A, Pirofski L. Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. *Eukaryot Cell*. 2007;6:2169–74.

Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH, et al. Molecular typing of clinical and environmental isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *FEMS Yeast Res*. The Oxford University Press; 2003; 3:405–15.

Castelnuovo B, Manabe YC, Kiragga A, Kanya M, Easterbrook P, Kambugu A. Cause-specific mortality and the contribution of immune reconstitution inflammatory syndrome in the first 3 years after antiretroviral therapy initiation in an urban African cohort. *Clin Infect Dis*. 2009; 15;49(6):965-72.

Cavalla D. APT drug R&D: the right active ingredient in the right presentation for the right therapeutic use. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8:849–53.

Chen Y-C, Chang S-C, Shih C-C, Hung C-C, Luhbd K-T, Pan Y-S, et al. Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Elsevier; 2000a; 36(3):175–83.

Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, et al. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. *Clin Infect Dis.*2000b;31: 499–508.

Chen SC, Slavin MA, Heath CH, Playford EG, Byth K, Marriott D, et al. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. *Clin Infect Dis.*2012;55:789–98.

Chen Y, Toffaletti DL, Tenor JL, Litvintseva AP, Fang C, Mitchell TG, et al. The *Cryptococcus neoformans* transcriptome at the site of human meningitis. *MBio.* 2014; 5(1):e01087–13.

Cheon SA, Jung KW, Bahn YS, Kang HA. The unfolded protein response (UPR) pathway in *Cryptococcus*. *Virulence.* 2014; 15;5(2):341-50.

Chong HS, Dagg R, Malik R, Chen S, Carter D. *In vitro* susceptibility of the yeast pathogen cryptococcus to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(11):4115–20.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard - third edition. CLSI document M27-A3. 2008. Clinical and laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA.

Coelho C, Bocca AL, Casadevall A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*. 2014;87:1-41.

Cogliati M, Barchiesi F, Spreghini E, Tortorano AM. Heterozygosis and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* AD-hybrid isolates. *Mycopathologia*. 2012a;173(5-6):347-57.

Cogliati M, Chandrashekar N, Esposto MC, Chandramuki A, Petrini B, Viviani MA. *Cryptococcus gattii* serotype-C strains isolated in Bangalore, Karnataka, India. *Mycoses*. 2012b; 55(3):262–8.

Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica (Cairo). 2013; 2013:675213.

Cogliati M, Puccianti E, Montagna MT, De Donno A, Susever S, Ergin C, et al. Fundamental niche prediction of the pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Europe. *Environ Microbiol*. 2017;19(10):4318-4325.

Colom, M.F., Frasés, S., Ferrer, C., Jover, A., Andreu, M., Torres-Rodríguez, J.M., et al. First local case of human cryptococcosis in Spain caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Rev Iberoam Micol*. 2003; 20:181.

Consenso em criptococose 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008; 41(5):524-544.

Córdoba S., Vivot W., Szusz W., Canteros C. E., Davel G., Alvarez R. Usefulness of *Galleria mellonella* invertebrate model for studying the *Cryptococcus neoformans* host-pathogen-antifungal interactions. *INFOCUS* 2014; paper code: 56.

Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy--what value are they? *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54(5):854–69.

Cuenca-Estrella M. Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances. *Rev Esp Quimioter.* 2010; 23(4):169–76.

Da Costa MP, Bozinis MCV, Andrade WM, Costa CR, da Silva AL, Alves de Oliveira CM, et al. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. *BMC Complement Altern Med.* 2014; 14:245.

Day JN, Chau TT, Wolbers M, Mai PP, Dung NT, Mai NH, Phu NH, Nghia HD, Phong ND, Thai CQ, Thai le H, Chuong LV, Sinh DX, Duong VA et al. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N Engl J Med.* 2013; 368(14):1291-302.

de Almeida Alves TM, Ribeiro FL, Kloos H, Zani CL. Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96(6):831-3.

De Aguiar, P. A. D. F., Pedroso, R. Dos S., Borges, A. S., Moreira, T. De A., De Araújo, et al. The Epidemiology Of Cryptococcosis And The characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo.* 2017; 59, E13.

de Bedout C, Ordóñez N, Gómez BL, Rodríguez MC, Arango M, Restrepo A, et al. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *C. neoformans* var. *gattii*. *Rev Iberoam Micol.* 1999;16(1):36–9.

de Souza ACM, Kato L, da Silva CC, Cidade AF, de Oliveira CMA, Silva M do RR. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses*. 2010; 53(6):500–3.

Del Poeta M, Schell WA, Dykstra CC, Jones SK, Tidwell RR, Kumar A, et al. *In vitro* antifungal activities of a series of dication-substituted carbazoles, furans, and benzimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998a; 42(10):2503-10.

Del Poeta M, Schell WA, Dykstra CC, Jones S, Tidwell RR, Czarny A, et al. Structure *in vitro* activity relationships of pentamidine analogues and dication-substituted bis-benzimidazoles as new antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998b; 42(10):2495-502.

Del Poeta M, Casadevall A. Ten Challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. *Mycopathologia*. 2012;173(5-6):303–10.

Del Valle L, Piña-Oviedo S. HIV disorders of the brain: pathology and pathogenesis. *Front Biosci*. 2006; 11:718–32.

Dolan K, Montgomery S, Buchheit B, Didone L, Wellington M, Krysan DJ. Antifungal activity of tamoxifen: *in vitro* and *in vivo* activities and mechanistic characterization. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(8):3337–46.

Dou D, Alex D, Du B, Tiew KC, Aravapalli S, Mandadapu SR, Calderone R, Groutas WC. Antifungal activity of a series of 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2011; 19(19):5782-7.

Engelthaler DM, Hicks ND, Gillece JD, Roe CC, Schupp JM, Driebe EM, et al. *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: whole-population genome analysis provides insights into species evolution and dispersal. *mBio* 2014;5:e01464–14.

Ekins S, Williams AJ, Krasowski MD, Freundlich JS. *In silico* repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discov Today*. 2011; 16(7-8):298–310.

Emmons, CW. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Hyg*. 1955;62(3):227–32.

Escandón P, de Bedout C, Lizarazo J, Agudelo CI, Tobón A, Bello S, et al. Cryptococcosis in Colombia: results of the national surveillance program for the years 2006-2010. *Biomedica*. 2012;32(3):386–98.

Espinel-Ingroff A. *In vitro* fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(3):954–8.

Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL, et al. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(8):3884–9.

Espinel-Ingroff A, Aller AI, Cantón E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Córdoba S, Cuenca-Estrella M, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(11):5898-906.

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disponible em: <http://www.eucast.org/>

Farber JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Perspect.* 1994;102,10:17-24.

Favalessa OC, de Paula DA, Dutra V, Nakazato L, Tadano T, Lazera M dos S, et al. Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 2014; 13;8(8):1037-43.

Firacative C, Trilles L, Meyer W. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *PLoS One.* 2012; 7(5):e37566.

Firacative C, Duan S, Meyer W. *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS One.* 2014; 18;9(8): e105076.

Forbes L, Ebsworth-Mojica K, DiDone L, Li S-G, Freundlich JS, Connell N, et al. A High Throughput Screening Assay for Anti-Mycobacterial Small Molecules Based on Adenylate Kinase Release as a Reporter of Cell Lysis. *PLoS One.* 2015; 10(6):e0129234.

Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(3):838–40.

Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S, et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature.* 2005; 437(7063):1360–4.

Galanis E, Macdougall L, Kidd S, Morshed M; British Columbia *Cryptococcus gattii* Working Group. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. *Emerg Infect Dis* 2010;16:251–7.

Garland SM, Davies NW, Menary RC. The dissipation of tebuconazole and propiconazole in boronia (*Boronia megastigma* Nees). J Agric Food Chem. American Chemical Society; 2004; 52(20):6200–4.

Gehrke SS, Pinto EG, Steverding D, Pleban K, Tempone AG, Hider RC, et al. Conjugation to 4-aminoquinoline improves the anti-trypanosomal activity of Deferiprone-type iron chelators. Bioorg Med Chem. 2013; 21(3):805–13.

Giles SS, Dagenais TRT, Botts MR, Keller NP, Hull CM. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 2009; 77(8):3491–500.

González-Párraga P, Hernández JA, Argüelles JC. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress H₂O₂ and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. Yeast. 2003; 20(14):1161–9.

Groll AH, Walsh TJ. Antifungal chemotherapy: advances and perspectives. Swiss Med Wkly. 2002; 132(23-24):303–11.

Grossman NT and Casadevall A. Physiological differences in *Cryptococcus neoformans* strains *in vitro* versus *in vivo* and their effects on antifungal susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 23;61(3).

Grumach AS, Telles Filho F de Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML, Kono A, et al. Consenso em criptococose – 2008.

Guimarães MDC. Estudo temporal das doenças associadas à AIDS no Brasil, 1980-1999. Cad Saude Publica. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2000;16:S21–36.

Gulati M, Bajad S, Singh S, Ferdous AJ, Singh M. Development of liposomal amphotericin B formulation. J Microencapsul. 1998; 15(2):137-51.

G-Dayananandan N, Paulsen JL, Viswanathan K, Keshipeddy S, Lombardo MN, Zhou W, et al. Propargyl-linked antifolates are dual inhibitors of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J Med Chem*. 2014; 27;57(6):2643-56.

Hagen, F., Colom, M.F., Swinne, D., Tintelnot, K., Iatta, R., Montagna, M.T., et al. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18: 1618-1624.

Hagen F, Ceresini PC, Polacheck I, Ma H, van Nieuwerburgh F, Gabaldón T, et al. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. *PLoS One* 2013;8:e71148.

Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*. 2015; 78:16–48.

Hamill RJ, Sobel JD, El-Sadr W, Johnson PC, Graybill JR, Javaly K, et al. Comparison of 2 doses of liposomal amphotericin B and conventional amphotericin B deoxycholate for treatment of AIDS-associated acute cryptococcal meningitis: a randomized, double-blind clinical trial of efficacy and safety. *Clin Infect Dis*. 2010; 51(2):225–32.

Harris, J. R., Lockhart, S. R., Sondermeyer, G., Vugia, D. J., Crist, M. B., D'Angelo, M. T., et al. *Cryptococcus gattii* infections in multiple states outside the US Pacific Northwest. *Emerg. Infect. Dis*. 2013; 19, 1620–1626.

Hartland CL, Pu J, Krysan D, Didone L, Moquist PN, Dandapani S, et al. Discovery and evaluation of fungicidal anti-Cryptococcal molecules. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010-2014 Apr 15.

Hasimoto e Souza LK, Costa CR, Fernandes Ode F, Abrão FY, Silva TC, Treméa CM, Silva Mdo R. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013; 46(3):343-7.

Helmerhorst EJ, Breeuwer P, van't Hof W, Walgreen-Weterings E, Oomen LC, Veerman EC, Amerongen AV, Abee T. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem.* 1999; 274(11):7286-91.

Heitman J, Carter DA, Dyer PS, Soll DR. Sexual reproduction of human fungal pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 1;4(8).

Herkert PF, Hagen F, de Oliveira Salvador GL, Gomes RR, Ferreira MS, Vicente VA, Muro MD, et al. Molecular characterisation and antifungal susceptibility of clinical *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII) isolates from Southern Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(11):1803-1810.

Herreros E, Almela MJ, Lozano S, Gomez de las Heras F, Gargallo-Viola D. Antifungal activities and cytotoxicity studies of six new azasordarins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(11):3132–9.

Hoang LMN, Maguire JA, Doyle P, Fyfe M, Roscoe DL. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *J Med Microbiol.* 2004; 53 (Pt 9):935–40.

Hu J, Prinz WA, Rapoport TA. Weaving the web of ER tubules. *Cell.* 2011. 9;147(6):1226-31

Hughes L, Carton R, Minguzzi S, McEntee G, Deinum EE, O'Connell MJ, Parle-McDermott A. An active second dihydrofolate reductase enzyme is not

a feature of rat and mouse, but they do have activity in their mitochondria. *FEBS Lett.* 2015;589(15):1855-62.

Iatta, R., Hagen, F., Fico, C., Lopatriello, N., Boekhout, T., Montagna, M.T. *Cryptococcus gattii* infection in an immunocompetent patient from Southern Italy. *Mycopathologia.* 2012; 174: 87- 92.

Iqbal N, DeBess EE, Wohrle R, Sun B, Nett RJ, Ahlquist AM, et al. Correlation of genotype and in vitro susceptibilities of *Cryptococcus gattii* strains from the Pacific Northwest of the United States. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(2):539–44.

Iverson SA, Chiller T, Beekmann S, et al. Recognition and diagnosis of *Cryptococcus gattii* infections in the United States. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1012–5.

Jesus MS de, Rodrigues WC, Barbosa G, Trilles L, Wanke B, Lazéra M dos S, et al. *Cryptococcus neoformans* carried by *Odontomachus bauri* ants. *Mem Inst Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz;* 2012; 107(4):466–9.

Johnson MD, Perfect JR. Caspofungin: first approved agent in a new class of antifungals. *Expert Opin Pharmacother.* 2003; 4(5):807-23.

Keystone JS. Prevention of malaria. *Drug.* 1990; 39(3):337–54.

Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, Macdougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(49):17258-63.

Klafke GB, Moreira GMSG, Monte LG, Pereira JL, Brandolt TM, Xavier MO, et al. Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of major importance in medical mycology. *Mycopathologia.* 2013; 175(1-2):147–51.

Krysan DJ. Toward improved anti-cryptococcal drugs: Novel molecules and repurposed drugs. *Fungal Genet Biol.* 2015; 78:93–8.

Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Booth JL, Vishniac HS, Bennett JE. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 1987 Aug;55(8):1751-4.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Distribution of alpha and alpha mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am J Epidemiol.* 1978; 108(4):337–40.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. *Zbl Bakt-Int J Med M* 1984; 257:213–8.

Kwon-Chung KJ, Varma A, Edman JC, Bennett JE. Selection of *ura5* and *ura3* mutants from the two varieties of *Cryptococcus neoformans* on 5-fluoroorotic acid medium. *J Med Vet Mycol.* 1992; 30(1):61–9.

Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(4):574–87.

Kwon-Chung KJ, Fraser J a, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4(7):1–27.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, Bicanic TA, et al. The Case for Adopting the "Species Complex" Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere.* 2017; 2(1).

Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol.* 2009; 26(4):223–7.

Larsen RA, Leal MA, Chan LS. Fluconazole compared with amphotericin B plus flucytosine for cryptococcal meningitis in AIDS. A randomized trial. *Ann Intern Med.* 1990; 113(3):183–7.

Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman - 12.ed.* AMGH Editora, 2012.

Lazera MS, Cavalcanti MA, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Med Mycol.* 1998; 36(2):119–22.

Lazera MS, Salmito Cavalcanti MA, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol.* 2000; 38(5):379–83.

Leal AL, Faganello J, Fuentefria AM, Boldo JT, Bassanesi MC, Vainstein MH. Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia.* 2008; 166(2):71–5.

Lee SH, Lee JR, Lunde CS, Kubo I. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Candida albicans* and other fungal pathogens to polygodial, a sesquiterpene dialdehyde. *Planta Med.* 1999; 65(3):204-8.

Lehár J, Krueger AS, Avery W, Heilbut AM, Johansen LM, Price ER, et al. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. *Nat Biotechnol.* 2009; 27(7):659–66.

Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol.* 2006; 60:69–105.

Lindenberg A de S, Chang MR, Paniago AM, Lazera M dos S, Moncada PM, Bonfim GF, Nogueira SA, Wanke B. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2008; 50(2):75-80.

Litvintseva AP, Carbone I, Rossouw J, Thakur R, Govender NP, Mitchell TG. Evidence that the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* may have evolved in Africa. *PLoS One.* 2011; 6(5):e19688.

Lizarazo J, Linares M, de Bedout C, Restrepo A, Agudelo CI, Castañeda E; Grupo Colombiano para el Estudio de la Criptococosis. Results of nine years of the clinical and epidemiological survey on cryptococcosis in Colombia, 1997-2005. *Biomedica.* 2007; 27(1): 94-109.

Lizarazo J, Escandon P, Agudelo CI, *et al.* Retrospective study of the epidemiology and clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infections in Colombia from 1997–2011. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e3272.

Lochner M, Thompson AJ. The antimalarial drug proguanil is an antagonist at 5-HT₃ receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014;351(3):674-84.

Loyse A, Thangaraj H, Easterbrook P, Ford N, Roy M, Chiller T, *et al.* Cryptococcal meningitis: improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13(7):629–37.

Lugarini C, Goebel CS, Condas LAZ, Muro MD, de Farias MR, Ferreira FM, *et al.* *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. *Mycopathologia.* 2008; 166(2):61–9.

MacDougall L, Kidd SE, Galanis E, Mak S, Leslie MJ, Cieslak PR, et al. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and Detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg Infect Dis*. Centers for Disease Control and Prevention; 2007; 13(1):42–50.

Maciel D da SA, Pinto EG, Tempone AG, Kato MJ, Lago JHG. Avaliação da atividade antitripanossoma da laevicarpina, uma nova amida isolada de *Piper laevis* (Piperaceae) [Internet]. Resumos. 2015. Available from: <http://www.adaltech.com.br/testes/sbq2015/resumos/T0490-1.pdf>

Magalhães TFF, da Silva CM, de Fátima Â, da Silva DL, Modolo L V, Martins CVB, et al. Hydroxyaldimines as potent in vitro anticryptococcal agents. *Lett Appl Microbiol*. 2013; 57(2):137–43.

Matsumoto Y, Miyazaki S, Fukunaga DH, Shimizu K, Kawamoto S, Sekimizu K. Quantitative evaluation of cryptococcal pathogenesis and antifungal drugs using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans*. *J Appl Microbiol*. 2012;112(1):138-46.

Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol*. 2012; 3:286.

Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Román E, Sánchez-Fresneda R, Casas C, Herrero E, et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(11):6627–38.

Matsumoto Y, Miyazaki S, Fukunaga DH, Shimizu K, Kawamoto S, Sekimizu K. Quantitative evaluation of cryptococcal pathogenesis and antifungal drugs

using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans*. J Appl Microbiol. 2012;112(1):138-46.

Meyer W, Gilgado F, Ngamskulrungrroj P, Trilles L, Hagen F, et al. Molecular typing of the *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex (2011) In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung J, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. Washington D.C.: ASM Press. pp 327–357.

Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias. Guia de bolso, oitava edição da revista, Brasília - DF, 2010.

Mitchell DH, Sorrell TC, Allworth AM, et al. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts: influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. Clin Infect Dis 1995; 20:611–6.

Mitsuyama J, Nomura N, Hashimoto K, Yamada E, Nishikawa H, Kaeriyama M, et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of T-2307, a novel arylamidine. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(4):1318–24.

Mónaco LS, Tamayo Antabak N. Cryptococcosis in AIDS patients: case study from 1996 to 2006 in Paroissien Hospital. Rev Argent Microbiol. 2008; 40(4):218–21.

Mora DJ, da Cunha Colombo ER, Ferreira-Paim K, Andrade-Silva LE, Nascentes GAN, Silva-Vergara ML. Clinical, epidemiological and outcome features of patients with cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Mycopathologia. 2012; 173(5-6):321–7.

Moreira T de A, Ferreira MS, Ribas RM, Borges AS. Cryptococcosis: clinical epidemiological laboratorial study and fungi varieties in 96 patients. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39(3):255–8.

National Institute for Communicable Diseases. GERMS-South Africa Annual Report 2015. <http://www.nicd.ac.za/>

Negri M, Salci TP, Shinobu-Mesquita CS, Capoci IR, Svidzinski TI, Kioshima ES. Early state research on antifungal natural products. *Molecules*. 2014; 19(3):2925-56.

Nevill CG, Watkins WM, Carter JY, Munafu CG. Comparison of mosquito nets, proguanil hydrochloride, and placebo to prevent malaria. *BMJ*. 1988; 297(6645):401–3.

Ngamskulrungrroj P, Gilgado F, Faganello J, Litvintseva AP, Leal AL, Tsui KM, et al. Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. *PLoS One*. 2009; 4(6):e5862.

Ngamskulrungrroj P, Chang Y, Hansen B, Bugge C, Fischer E, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* Yop1, an endoplasmic reticulum curvature-stabilizing protein, participates with Sey1 in influencing fluconazole-induced disomy formation. *FEMS Yeast Res*. 2012;12(7):748-54.

Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RCL, et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(1):73–7.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2010; 51(5):561–70.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52(1):1.

Oliver BG, Silver PM, Marie C, Hoot SJ, Leyde SE, White TC. Tetracycline alters drug susceptibility in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *Microbiology*. 2008; 154(Pt 3):960-70.

Ogundeji A O, Pohl CH, Sebolai OM. Repurposing of aspirin and ibuprofen as candidate anti-*Cryptococcus* Drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(8):4799-808.

Ogundeji AO, Pohl CH, Sebolai OM. The repurposing of anti-psychotic drugs, quetiapine and olanzapine, as anti-*Cryptococcus* drugs. *Front Microbiol*. 2017; 8:815.

Onyewu C, Eads E, Schell WA, Perfect JR, Ullmann Y, Kaufman G, et al. Targeting the calcineurin pathway enhances ergosterol biosynthesis inhibitors against *Trichophyton mentagrophytes in vitro* and in a human skin infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(10):3743–6.

Orsini J, Blaak C, Mahmoud D, Young-Gwang J. Massive cerebral edema resulting in brain death as a complication of *Cryptococcus neoformans* meningitis. *J community Hosp Intern Med Perspect*. 2015; 5(1):26098.

Palanco AC, Lacorte Singulani J, Costa-Orlandi CB, Gullo FP, Strohmayer Lourencetti NM, Gomes PC¹, Ayusso GM, Dutra LA, Silva Bolzani VD, Regasini LO, Soares Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM. Activity of 3'-hydroxychalcone against *Cryptococcus gattii* and toxicity, and efficacy in alternative animal models. *Future Microbiol*. 2017; 12:1123-1134.

Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003; 45(6):299–305.

Pappalardo MCSM, Paschoal RC, Melhem MSC. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. *AIDS*. 2007; 21(14):1971–2.

Pappas PG. Therapy of Cryptococcal Meningitis in non-HIV-infected Patients. *Curr Infect Dis Rep*. 2001; 3(4):365–70.

Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. 2009; 23(4):525–30.

Perfect, JR and Casadevall, A. Cryptococcosis. *Infect. Dis. Clin. North Am*. 2002; 16(4): 837-874.

Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(3):291–322.

Perfect JR. Cryptococcosis: a model for the understanding of infectious diseases. *J Clin Invest*. 2014; 124(5):1893–5.

Perfect JR, Bicanic T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genet Biol*. 2015; 78:49–54.

Pfaller MA, Barry AL. *In vitro* susceptibilities of clinical yeast isolates to three antifungal agents determined by the microdilution method. *Mycopathologia*. 1995;130(1):3–9.

Pfaller MA, Messer SA, Georgopapadakou N, Martell LA, Besterman JM, Diekema DJ. Activity of MGCD290, a Hos2 histone deacetylase inhibitor, in

combination with azole antifungals against opportunistic fungal pathogens. J Clin Microbiol. 2009; 47(12):3797–804.

Pfaller MA, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN, Castanheira M. *In vitro* activities of isavuconazole and comparator antifungal agents tested against a global collection of opportunistic yeasts and molds. J Clin Microbiol. 2013; 51(8):2608-16.

Phillips, A.J., Sudbery, I., and Ramsdale, M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. 2003; 14327–14332.

Phillips P, Galanis E, MacDougall L, *et al.* Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia. Clin Infect Dis. 2015; 60:1368–76.

Pinheiro, L S. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *LaurusNobilis l.* (louro) sobre cepas de *Cryptococcus neoformans* 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

Prado M, Silva MB da, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(3):513–21.

Purisco SU, Martins MA, Szeszs MW, Castro e Silva DM, Pukinskas SRBS, Bonfietti LX, *et al.* Comparison of the broth microdilution (BMD) method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and the Clinical Laboratory Standards Institute BMD method for non-*Candida albicans* and non-*C. tropicalis* bloodstream isolates from eleven. FEMS Yeast Res. 2012; 12(8):890–6.

Rajasingham R, Meya DB, Boulware DR. Integrating cryptococcal antigen screening and pre-emptive treatment into routine HIV care. *J Acquir Immune De c Syndr.*2012; 59: e85–91.

Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, Jarvis JN, Govender NP, Chiller TM, Denning DW, Loyse A, Boulware DR. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(8):873-881

Regasini LO, Pivatto M, Scorzoni L, Benaducci T, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS, Barreiro EJ, Siva DHS, Bolzani VS. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens Tul., Fabaceae*, against opportunistic fungi. *Rev. bras. farmacogn.* 2010; 20(5): 706-711.

Rodrigues ML, Nimrichter L, Oliveira DL, Frases S, Miranda K, Zaragoza O, Alvarez M, Nakouzi A, Feldmesser M, Casadevall A. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. *Eukaryotic Cell.* 2007; 6 (1):48-59.

Roemer T, Krysan DJ. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4(5).

Rozenbaum R, Gonçalves AJ. Clinical epidemiological study of 171 cases of Cryptococcosis. *Clin Infect Dis.* 1994; 18(3):369–80.

Sabiiti W, May RC. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol.* 2012; 7(11):1297–313.

Saliba F, Dupont B. Renal impairment and amphotericin B formulations in patients with invasive fungal infections. *Med Mycol.* 2008; 46(2):97-112.

San-Blas G, Burger E. Experimental medical mycological research in Latin America - a 2000-2009 overview. *Rev Iberoam Micol.* Elsevier; 2011; 28(1):1–25.

Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Mesa-Arango AC, Casas C, Herrero E, Gianinni MJSM, et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes Infect.* 2011; 13(5):457–67.

Segal BH, Steinbach WJ. Combination antifungals: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007; 5(5):883–92.

Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(7):2804–15.

Sirawaraporn W, Cao M, Santi D V, Edman JC. Cloning, expression, and characterization of *Cryptococcus neoformans* dihydrofolate reductase. *J Biol Chem.* 1993; 268(12):8888–92.

Sloan DJ, Dedicoat MJ, Lalloo DG. Treatment of cryptococcal meningitis in resource limited settings. *Curr Opin Infect Dis.* 2009; 22(5):455–63.

Sorrell TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol.* 2001; 39(2):155–68.

Sorrell TC, Juillard PG, Djordjevic JT, Kaufman-Francis K, Dietmann A, Milonig A, et al. 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(1):57-67.

Souza LK, Souza Junior AH, Costa CR, Faganello J, Vainstein MH, Chagas AL, Souza AC, Silva MR. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. *Mycoses*. 2010; 53(1):62-7.

Souza LKH e, Costa CR, Fernandes O de FL, Abrao FY, Silva TC, Tremea CM, et al. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013; 46(3):343–7.

Souza LKH e, Costa CR, Fernandes O de FL, Abrao FY, Silva TC, Tremea CM, et al. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. *Rev Soc Bras Med Trop*. SBMT; 2013; 46(3):343–7.

Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis*. 1995; 21(1):28–34.

Srivastava IK, Vaidya AB. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(6):1334–9.

Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(26):15245–50.

Steenbergen, J. N., Nosanchuk, J. D., Malliaris, S. D., & Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium Discoideum*. *Infection And Immunity*. 2003; 71(9), 4862–4872.

Stephen C, Lester S, Black W, Fyfe M, Raverty S. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. *Can Vet J.* 2002; 43(10):792–4.

Sun N, Fonzi W, Chen H, She X, Zhang L, Zhang L, et al. Azole susceptibility and transcriptome profiling in *Candida albicans* mitochondrial electron transport chain complex I mutants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(1):532–42.

Tawari NR, Bag S, Degani MS. review of molecular modelling studies of dihydrofolate reductase inhibitors against opportunistic microorganisms and comprehensive evaluation of new models. *Curr Pharm Des.* 2011;17(7):712-51.

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279(6):L1005-28.

Thevissen, K., Ayscough, K.R., Aerts, A.M., Du, W., De Brucker, K., Meert, E.M., Ausma, J., Borgers, M., Cammue, B.P., and Francois, I.E. Miconazole induces changes in actin cytoskeleton prior to reactive oxygen species induction in yeast. *J. Biol. Chem.* 2007; 282, 21592–21597.

Thompson AJ e Lummis SCR. 5-HT₃ Receptors. *Curr Pharm Des.* 2006; 12(28): 3615–3630.

Thompson GR, Wiederhold NP, Fothergill AW, Vallor AC, Wickes BL, Patterson TF. Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(1):309–11.

Tintelnot K, Hagen F, Han CO, et al. Pitfalls in serological diagnosis of *Cryptococcus gattii* infections. *Med Mycol.* 2015; 53:874–9.

Tocci N, D'Auria FD, Simonetti G, Panella S, Palamara AT, Debrassi A, et al. Bioassay-guided fractionation of extracts from *Hypericum perforatum in vitro* roots treated with carboxymethylchitosans and determination of antifungal activity against human fungal pathogens. *Plant Physiol Biochem.* 2013; 70:342–7.

Trevijano-Contador N, Herrero-Fernández I, García-Barbazán I, Scorzoni L, Rueda C, Rossi SA, García-Rodas R, Zaragoza O. *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. *Virulence.* 2015;6(1):66-74.

Trilles L, Lazéra M, Wanke B, Theelen B, Boekhout T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. *Med Mycol.* 2003; 41(5):383–90.

Trilles L, Fernández-Torres B, Lazéra M dos S, Wanke B, Guarro J. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(10):4815–7.

Trilles L, Lazéra M dos S, Wanke B, Oliveira RV, Barbosa GG, Nishikawa MM, et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(5):455–62.

Tsujisaki RA, Paniago AM, Lima Júnior MS, Alencar Dde S, Sposito FL, Nunes Mde O, Trilles L, Chang MR. First molecular typing of cryptococci causing cryptococcosis in central-west Brazil. *Mycopathologia.* 2013;176(3-4):267-72.

Upton A, Fraser JA, Kidd SE, et al. First contemporary case of human infection with *Cryptococcus gattii* in Puget Sound: evidence for spread of the Vancouver Island outbreak. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:3086–8.

Van der Horst CM, Saag MS, Cloud GA, Hamill RJ, Graybill JR, Sobel JD, et al. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med.* 1997; 337(1):15–21.

Varma A, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(6):2303–11.

Velagapudi R, Hsueh Y-P, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun.* 2009; 77(10):4345–55.

Velegraki A., Kiosses, V.G., Pitsouni, H., Toukas, D., Daniilidis, V.D., Legakis, N.J. First report of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B from Greece. *Med Mycol.* 2001; 39: 419- 422.

Vidal JE, Gerhardt J, Peixoto de Miranda EJ, Dauar RF, Oliveira Filho GS, Penalva de Oliveira AC, et al. Role of quantitative CSF microscopy to predict culture status and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis in a Brazilian cohort. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Elsevier; 2012; 73(1):68–73.

Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Dauar RF, Boulware DR. Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America. *Brazilian J Infect Dis.* NIH Public Access; 2013; 17(3):353–62.

Vu K, Gelli A. Astemizole and an analogue promote fungicidal activity of fluconazole against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol.* 2010; 48(2):255–62.

Warpeha KM, Park Y-D, Williamson PR. Susceptibility of Intact Germinating *Arabidopsis thaliana* to Human Fungal Pathogens *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79(9):2979–88.

Wermuth CG. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. *J Med Chem.* 2004; 47(6):1303–14.

WHO- World Health Organization. Rapid Advice Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV-infected Adults, Adolescents and Children. 2011. Disponible em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502979_eng.pdf

Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra R, Kirkpatrick WR, Sorrell TC, Patterson TF. Limited activity of miltefosine in murine models of cryptococcal meningoencephalitis and disseminated cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013: 745–50.

Winey M, Meehl JB, O'Toole ET, Giddings TH Jr. Conventional transmission electron microscopy. *Mol Biol Cell.* 2014 Feb;25(3):319-23.

Wright J. African American males and HIV: the challenge of the AIDS epidemic. *Med Anthropol Q.* 1997; 11(4):454–5.

Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe.* Elsevier; 2007; 1(4):263–73.

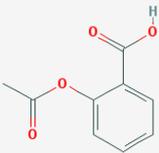
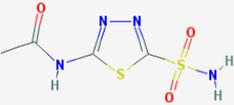
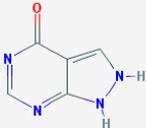
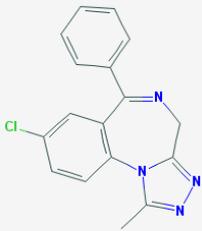
Yuthavong Y, Tarnchompoo B, Vilaivan T, Chitnumsub P, Kamchonwongpaisan S, Charman SA, et al. Malarial dihydrofolate reductase as a paradigm for drug development against a resistance-compromised target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(42):16823–8.

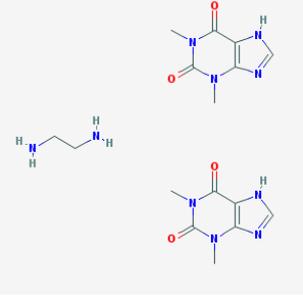
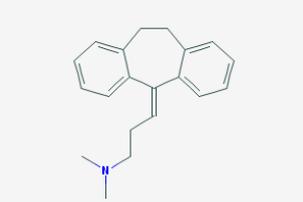
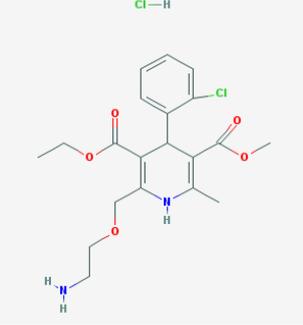
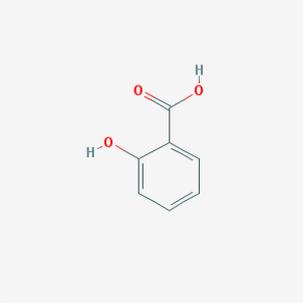
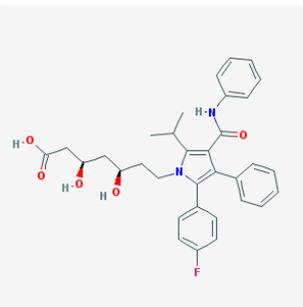
Zaragoza, O., and Casadevall, A. (2004). Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biol. Proced. Online* 6, 10–15.

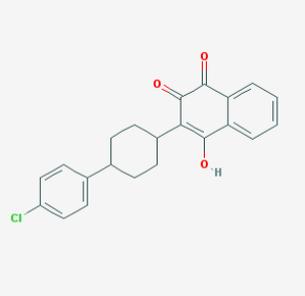
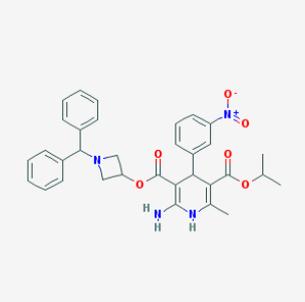
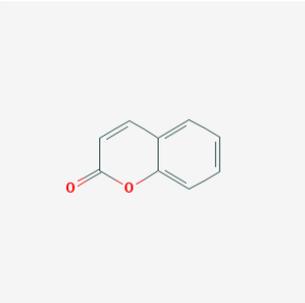
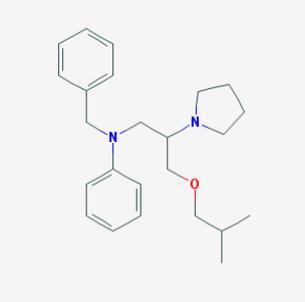
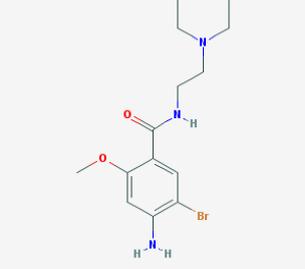
Zhai B, Wu C, Wang L, Sachs MS, Lin X. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(7):3758–66.

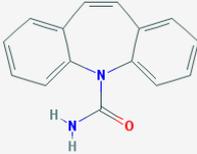
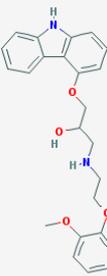
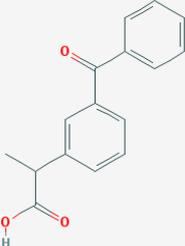
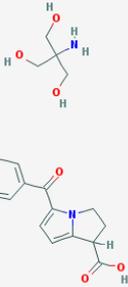
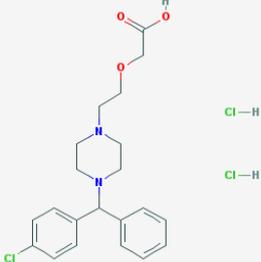
Zimmermann GR, Lehár J, Keith CT. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov Today.* 2007; 12(1-2):34–42.

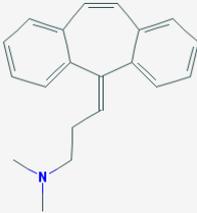
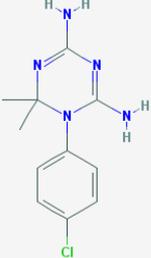
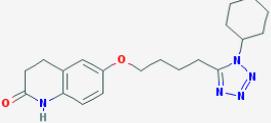
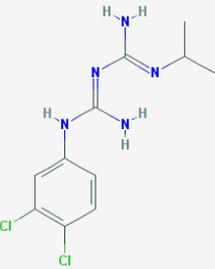
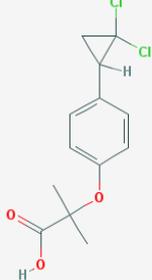
APÊNDICE 1

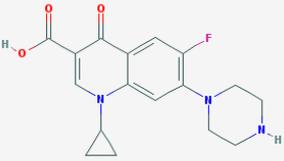
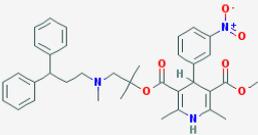
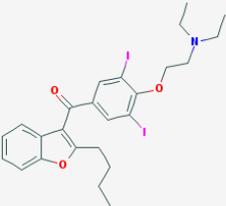
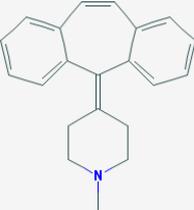
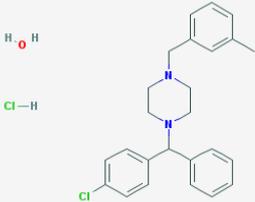
Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
1. Ácido acetil salicílico (C ₉ H ₁₈ O ₄)		<ul style="list-style-type: none">• Anti-inflamatório não esteroidal• Antiagregante plaquetario	VGII
2. Acetazolamida (C ₄ H ₆ N ₄ O ₃ S ₂)		<ul style="list-style-type: none">• Diurético• Anticonvulsivante• Glaucoma	VGII
3. Alopurinol (C ₅ H ₄ N ₄ O)		<ul style="list-style-type: none">• Tratamento da gota• Captador de radicais livres• Antimetabólito• Inibidor enzimático	VNI
4. Alprazolam (C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄)		<ul style="list-style-type: none">• Hipnótico• Sedativo• Ansiolítico	VNI

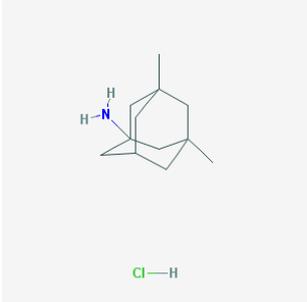
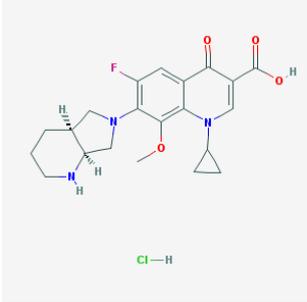
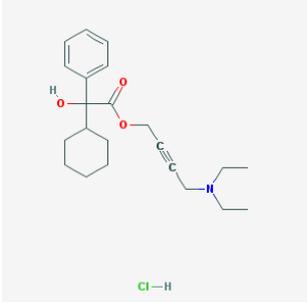
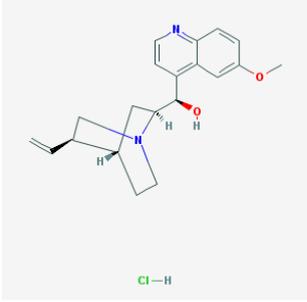
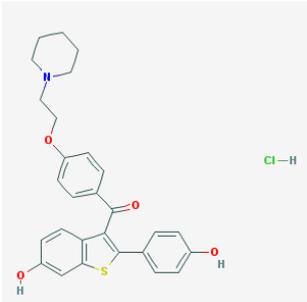
Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
5. Aminofilina (C ₁₆ H ₂₄ N ₁₀ O ₄)		<ul style="list-style-type: none"> • Cardiotônico • Broncodilatador 	VGII
6. Amitriptilina (C ₂₀ H ₂₄ ClN)		<ul style="list-style-type: none"> • Antidepressivo 	VGII
7. Amlodipina (C ₂₀ H ₂₅ ClN ₂ O ₅)		<ul style="list-style-type: none"> • Anti-hipertensivo • Angina 	VNI
8. Ácido salicílico (C ₇ H ₆ O ₃)		<ul style="list-style-type: none"> • Antimicrobiano • Queratolítico 	VGII
9. Atorvastatina (C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅)		<ul style="list-style-type: none"> • Anticolesterolêmico 	VGII

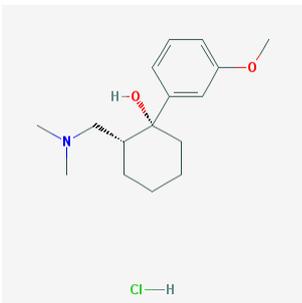
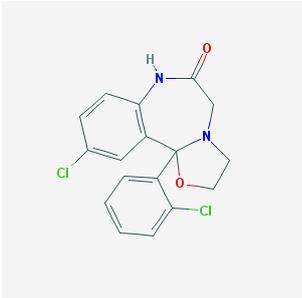
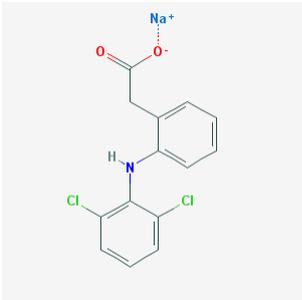
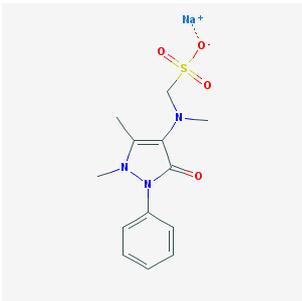
Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
10. Atovaquona (C ₂₂ H ₁₉ ClO ₃)		<ul style="list-style-type: none"> • Antimalárico • Antiprotozoário 	VGII
11. Azelnidipine (C ₃₃ H ₃₄ N ₄ O ₆)		<ul style="list-style-type: none"> • Anti-hipertensivo 	VNI
12. Benzopirona (C ₉ H ₆ O ₂)		<ul style="list-style-type: none"> • Ação linfocinética 	VGII
13. Bepidil (C ₂₄ H ₃₄ N ₂ O)		<ul style="list-style-type: none"> • Anti-hipertensivo • Vasodilatador • Antiarrítmico 	VNI
14. Bromoprida (C ₁₄ H ₂₂ BrN ₃ O ₂)		<ul style="list-style-type: none"> • Antiemético 	VNI

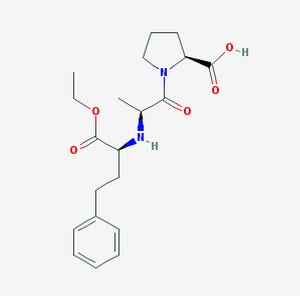
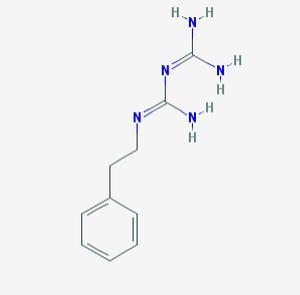
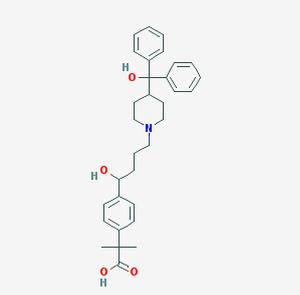
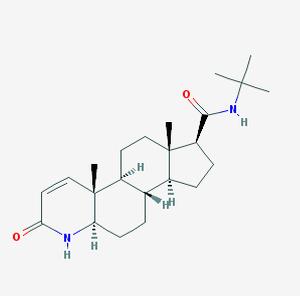
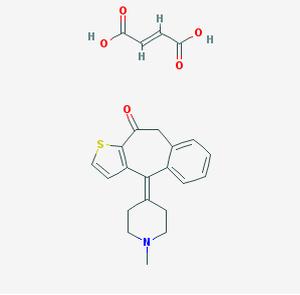
Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
15. Carbamazepina (C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O)		<ul style="list-style-type: none"> • Anticonvulsivante • Analgésico não opióide • Antipsicótico 	VGII
16. Carvedilol (C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄)		<ul style="list-style-type: none"> • Anti-hipertensivo • Vasodilatador 	VGII
17. Cetoprofeno (C ₁₆ H ₁₄ O ₃)		<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatório • Analgésico • Antipirético 	VGII
18. Cetorolaco de trometamina (C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₆)		<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatório não esteroideal • Analgésico 	VGII
19. Cetrizina diidrocloreto (C ₂₁ H ₂₇ Cl ₃ N ₂ O ₃)		<ul style="list-style-type: none"> • Anti-histamínico 	VGII

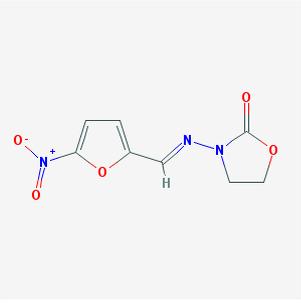
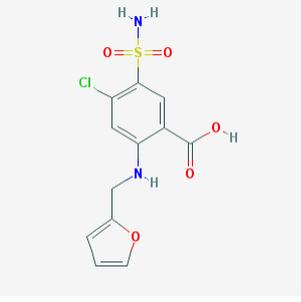
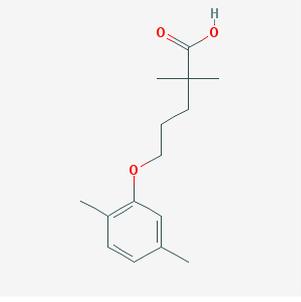
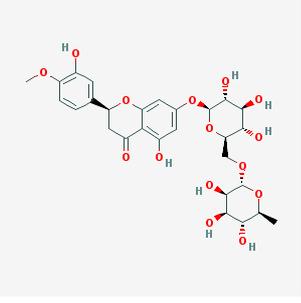
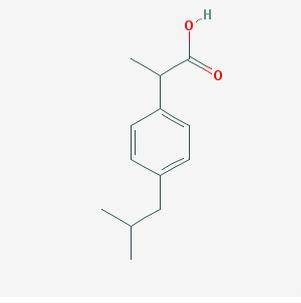
Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
20. Ciclobenzaprina (C ₂₀ H ₂₁ N)		<ul style="list-style-type: none"> Relaxante muscular 	VGII
21. Cicloguanil		<ul style="list-style-type: none"> Antimalárico 	VGII
22. Cilostazol (C ₂₀ H ₂₇ N ₅ O ₂)		<ul style="list-style-type: none"> Vasodilatador 	VGII
23. Clorproguanil (C ₁₁ H ₁₅ Cl ₂ N ₅)		<ul style="list-style-type: none"> Antimalárico 	VGII
24. Ciprofibrato (C ₁₃ H ₁₄ Cl ₂ O ₃)		<ul style="list-style-type: none"> Tratamento do colesterol 	VGII

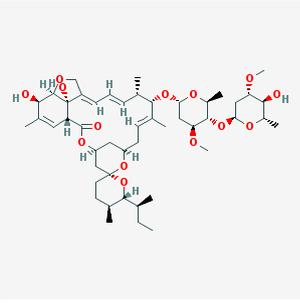
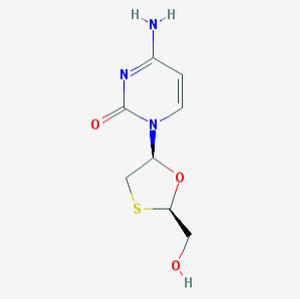
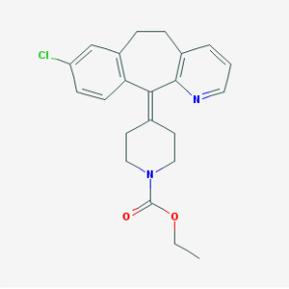
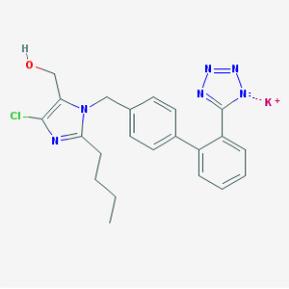
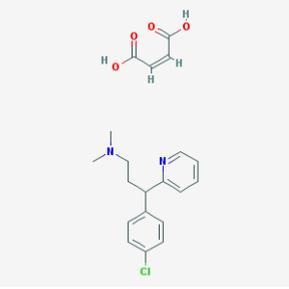
Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
25. Ciprofloxacino (C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃)		<ul style="list-style-type: none"> • Antimicrobiano 	VGII
26. Cloridrato de lercanidipino (C ₃₆ H ₄₂ ClN ₃ O ₆)	 <p style="text-align: center;">Cl-H</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Anti hipertensivo 	VNI
27. Cloridrato de amiodarona (C ₂₅ H ₃₀ ClI ₂ NO ₃)	 <p style="text-align: center;">Cl-H</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Antiarritmico 	VGII
28. Ciproheptadina (C ₂₁ H ₂₁ N)		<ul style="list-style-type: none"> • Anti-histamínico 	VGII
29. Cloridrato de meclizina (C ₂₅ H ₃₁ Cl ₃ N ₂ O)	 <p style="text-align: center;">Cl-H</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Antiemético • Antivertiginoso • Anticinetótico 	VGII

Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
30. Cloridrato de memantina (C ₁₂ H ₂₂ ClN)		<ul style="list-style-type: none"> • Tratamento do Alzheimer 	VGII
31. Cloridrato de moxifloxacino (C ₂₁ H ₂₅ ClFN ₃ O ₄)		<ul style="list-style-type: none"> • Antimicrobiano 	VNI
32. Cloridrato de oxibutinina (C ₂₂ H ₃₂ ClNO ₃)		<ul style="list-style-type: none"> • Incontinência urinária 	VGII
33. Cloridrato de quinino (C ₂₀ H ₂₅ ClN ₂ O ₂)		<ul style="list-style-type: none"> • Analgésico • Relaxante muscular • Antimalárico 	VGII
34. Cloridrato de raloxifeno (C ₂₈ H ₂₈ ClNO ₄ S)		<ul style="list-style-type: none"> • Prevenção da osteoporose 	VGII

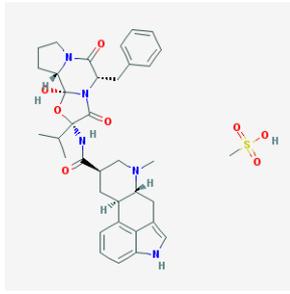
Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
35. Cloridrato de tramadol (C ₁₆ H ₂₆ ClNO ₂)		<ul style="list-style-type: none"> • Analgésico opióide 	VNI
36. Cloxazolam (C ₁₇ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O ₂)		<ul style="list-style-type: none"> • Ansiolítico • Hipnótico/sedativo • Relaxante muscular • Antiepilético 	VNI
37. Diclofenaco sódico (C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂)		<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatório não esteroidal 	VGII
38. Dipirona sódica (C ₁₃ H ₁₆ N ₃ NaO ₄ S)		<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatório não esteroidal 	VGII

39. Enalapril (C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅)		<ul style="list-style-type: none"> • Anti-hipertensivo 	VNI
Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
40. Fenformina (C ₁₀ H ₁₅ N ₅)		<ul style="list-style-type: none"> • Hipoglicemiante 	VGII
41. Fexofenadina (C ₃₂ H ₃₉ NO ₄)		<ul style="list-style-type: none"> • Anti-histamínico 	VGII
42. Finasterida (C ₂₃ H ₃₆ N ₂ O ₂)		<ul style="list-style-type: none"> • Calvície • Hiperplasia prostática benigna • Câncer de próstata 	VGII
43. Fumarato cetotifeno (C ₂₃ H ₂₃ NO ₅ S)		<ul style="list-style-type: none"> • Antialérgico • Antiasmático 	VGII

44. Furazolidona (C ₈ H ₇ N ₃ O ₅)		<ul style="list-style-type: none"> • Antimicrobiano 	VNI
Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
45. Furosemina (C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S)		<ul style="list-style-type: none"> • Diurético • Anti-hipertensivo 	VGII
46. Genfibrozila (C ₁₅ H ₂₂ O ₃)		<ul style="list-style-type: none"> • Tratamento de dislipidemias 	VGII
47. Hesperidina (C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅)		<ul style="list-style-type: none"> • Tratamento da má circulação 	VGII
48. Ibruprofeno (C ₁₃ H ₁₈ O ₂)		<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatório não esteroidal 	VGII

49. Ivermectina B (C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄)		• Antiparasitário	VGII
Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
50. Lamivudina (C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S)		• Antirretroviral	VGII
51. Loratadina (C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₂)		• Anti-histamínico	VNI
52. Losartana potássica (C ₂₂ H ₂₂ ClKN ₆ O)		• Anti-hipertensivo • Insuficiência cardíaca	VGII
53. Maleato clorfeniramina (C ₂₀ H ₂₃ ClN ₂ O ₄)		• Anti-histamínico	VGII

54. Mesilato de diidroergocristina
(C₃₆H₄₅N₅O₈S)



• Vasodilatador

VGII

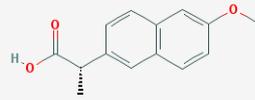
Nome e fórmula

Estrutura

Ação farmacológica

Tipo molecular

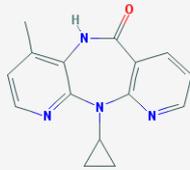
55. Naproxeno
(C₁₄H₁₄O₃)



• Antiinflamatório não esteroideal

VGII

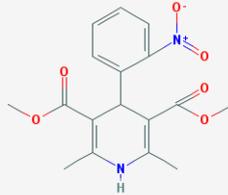
56. Nevirapina
(C₁₅H₁₄N₄O)



• Antirretroviral

VGII

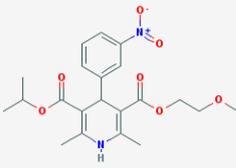
57. Nifedipina
(C₁₇H₁₈N₂O₆)



• Vasodilatador

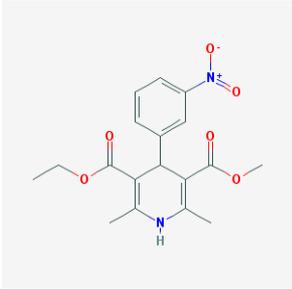
VNI

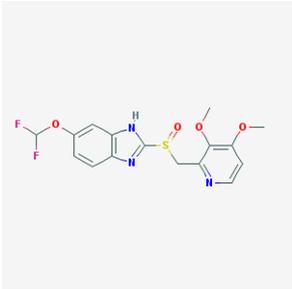
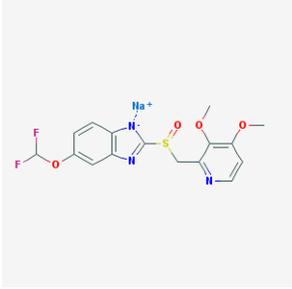
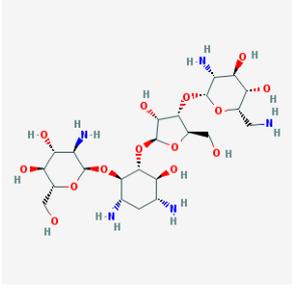
58. Nimodipino
(C₂₁H₂₆N₂O₇)

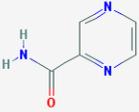
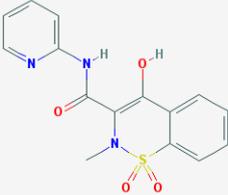


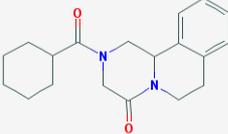
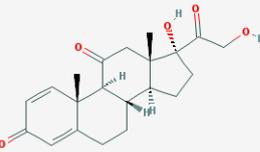
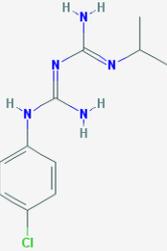
• Vasodilatador

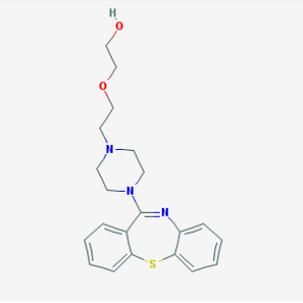
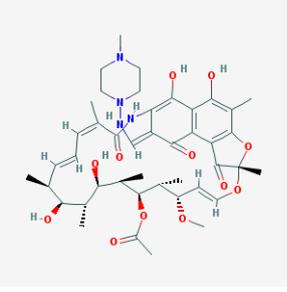
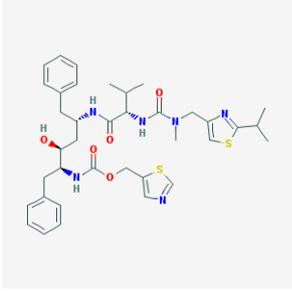
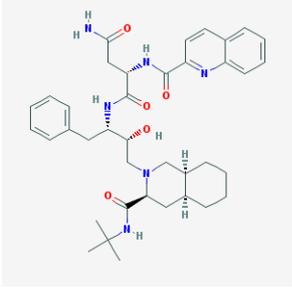
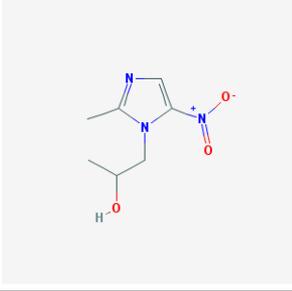
VNI

59. Nitredipino (C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₆)		<ul style="list-style-type: none"> • Anti-hipertensivo • Vasodilatador 	VNI
---	---	--	-----

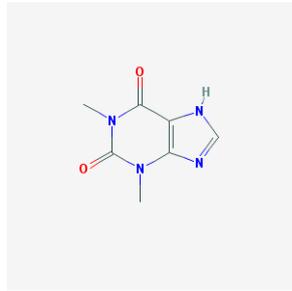
Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
60. Pantoprazol (C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ O ₄ S)		<ul style="list-style-type: none"> • Gastrite • Tratamento da úlcera 	VGII
61. Pantoprazol sódico (C ₁₆ H ₁₄ F ₂ N ₃ NaO ₄ S)		<ul style="list-style-type: none"> • Gastrite • Tratamento da úlcera 	VGII
62. Paromomicina (C ₂₃ H ₄₅ N ₅ O ₁₄)		<ul style="list-style-type: none"> • Antibacteriano • Amebicida 	VGII

63. Pirazinamida (C ₅ H ₅ N ₃ O)		<ul style="list-style-type: none"> • Tratamento da tuberculose 	VGII
64. Piroxicam (C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S)		<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatório não esteroidal 	VGII

Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
65. Praziquantel (C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂)		<ul style="list-style-type: none"> • Anti-helmíntico 	VGII
66. Predinisona (C ₂₁ H ₂₆ O ₅)		<ul style="list-style-type: none"> • Corticoesteróide 	VGII
67. Proguanil (C ₁₁ H ₁₆ ClN ₅)		<ul style="list-style-type: none"> • Antimalárico 	VGII

68. Quetiapina (C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂ S)		<ul style="list-style-type: none"> • Antipsicótico 	VNI
69. Rifampicina (C ₄₃ H ₅₈ N ₄ O ₁₂)		<ul style="list-style-type: none"> • Antimicrobiano • Tratamento da tuberculose 	VGII
Nome e fórmula	Estrutura	Ação farmacológica	Tipo molecular
70. Ritonavir (C ₃₇ H ₄₈ N ₆ O ₅ S ₂)		<ul style="list-style-type: none"> • Antirretroviral 	VGII
71. Saquinavir (C ₃₈ H ₅₀ N ₆ O ₅)		<ul style="list-style-type: none"> • Antirretroviral 	VGII
72. Secnidazol (C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₃)		<ul style="list-style-type: none"> • Antiparasitário 	VGII

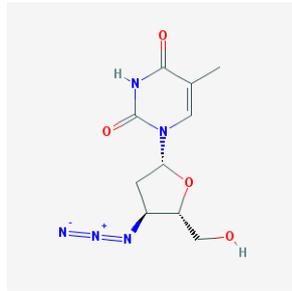
73. Teofilina
(C₇H₈N₄O₂)



• Vasodilatador

VGII

74. Zidovudina
(C₁₀H₁₃N₅O₄)



• Antirretroviral

VGII

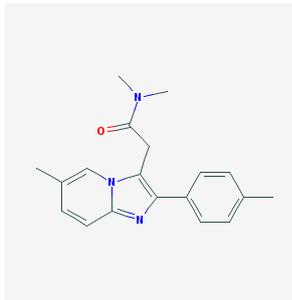
Nome e fórmula

Estrutura

Ação farmacológica

Tipo molecular

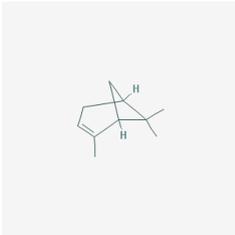
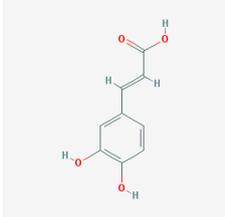
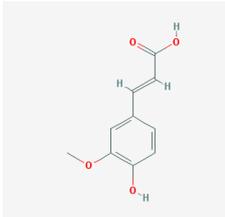
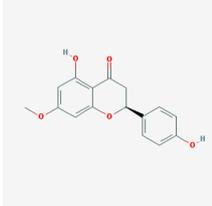
75. Zolpidem
(C₁₉H₂₁N₃O)



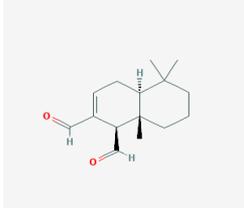
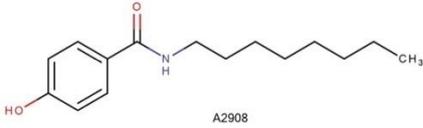
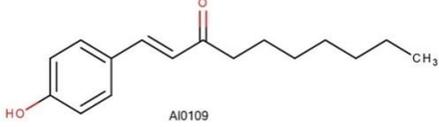
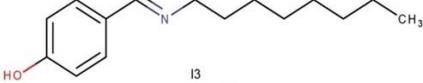
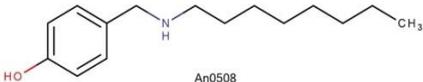
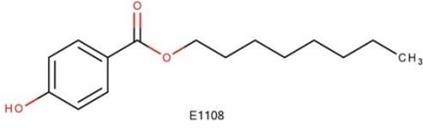
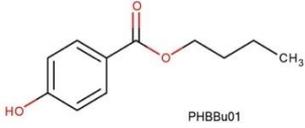
• Hipnótico
• Sedativo

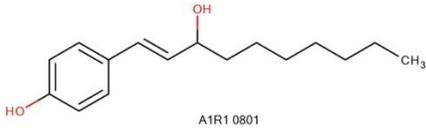
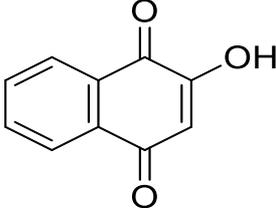
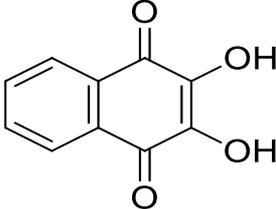
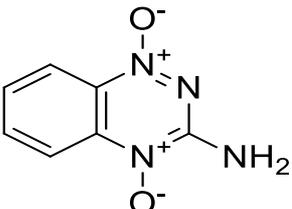
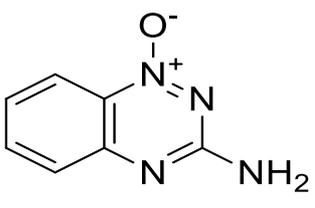
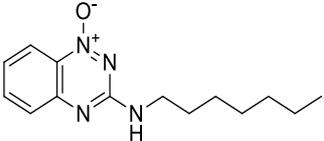
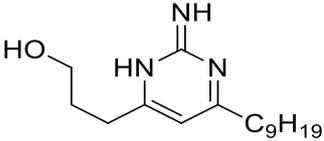
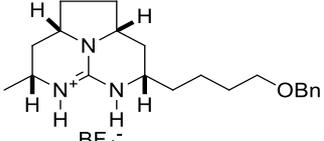
VNI

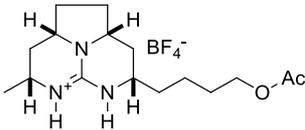
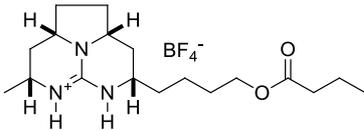
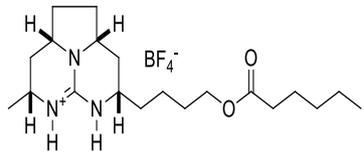
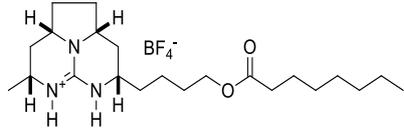
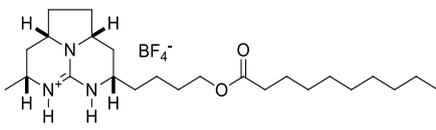
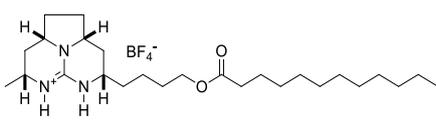
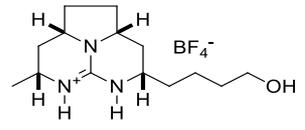
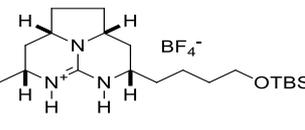
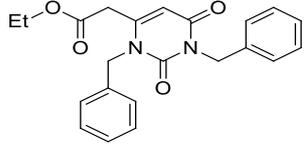
APÊNDICE 2

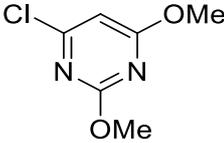
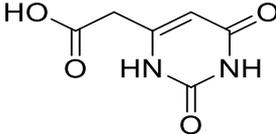
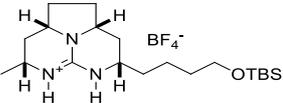
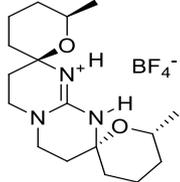
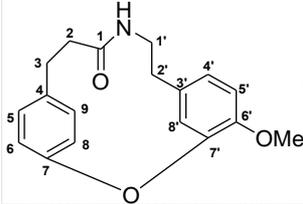
Compostos naturais	Estrutura	Tipo molecular
1. AC 10-1	E	VNI
2. AC 5-1-1	E	VNI
3. AC 7-2	E	VNI
4. AC 8-1	E	VNI
5. AC 8-2	E	VNI
6. AC 9-1	E	VNI
7. Alfa-pineno		VNI
8. Ácido cafeico (C ₉ H ₈ O ₄)		VNI
9. Ácido firúlico (C ₁₀ H ₁₀ O ₄)		VNI
10. Sakuranetina		VNI
11. Alcalóide AGFK	E	VGII

E: em fase de elucidação estrutural

Compostos naturais	Estrutura	Tipo molecular
12. Poligodial		VNI
13. L2EH3 pr1	E	VGII
14. L2EH6 pr1	E	VGII
15. L2EH9 pr2	E	VGII
16. Dimendiol	E	VNI
17. Acetato de dimendriol	E	VNI
18. A2908		VGII/VNI
19. Al0109		VGII/VNI
20. I3		VGII
21. An 0508		VGII/VNI
22. E1108		VGII
23. PHB Bu01		VGII

Compostos naturais	Estrutura	Tipo molecular
24. AB Bab	E	VGII
25. A1R1 0801	 <p style="text-align: center;">A1R1 0801</p>	VGII
26. PHM-1		VGII
27. PMH-2		VGII
28. PMH-3		VGII/VNI
29. PHM-4		VGII
30. PHM-5		VGII
31. PHM-6		VGII/VNI
32. EB-3		VGII

Compostos naturais	Estrutura	Tipo molecular
33. 6B-N8	E	VGII
34. BA2		VGII
35. BA6		VGII
36. BA11		VGII
37. BA13		VGII/VNI
38. BA18		VGII/VNI
39. BA22		VGII/VNI
40. BA25		VGII
41. BA30		VGII/VNI
42. HSAF1		VGII

Compostos naturais	Estrutura	Tipo molecular
43. HSAF3		VGII
44. HSAF5		VGII
45. PJM1		VGII
46. PJM2		VGII
47. CM7	E	VGII
48. 2A/106/1	E	VGII/VNI
49. Levicarpina		VGII

APÊNDICE 3

Compostos naturais	Estrutura	Tipo molecular
1. Amino 1Q-etanol	E	VGII
2. Amino Q	E	VGII
3. Amino Q-metanol	E	VGII
4. BUA-F	E	VNI
5. ISA 001		VGII
6. ISA 002		VGII
7. ISA 003		VGII
8. ISA 004		VGII
9. ISA 005		VGII

E: em fase de elucidação estrutural

Compostos naturais	Estrutura	Tipo molecular
10. ISA 006		VGII
11. ISA 007		VGII
12. ISA 14		VGII
13. ISA 16		VGII
14. ISA 17		VGII
15. ISA 18		VGII
16. ISA 19		VGII

Compostos naturais	Estrutura	Tipo molecular
17. ISA 20		VGII
18. ISA 23		VGII
19. ISA 24		VGII
20. ISA 25		VGII
21. ISA 27		VGII
22. ISA 28		VGII

Compostos naturais	Estrutura	Tipo molecular
23. ISA 31		VGII
24. ISA 34		VGII
25. ISA 35		VGII
26. ISA 37		VGII
27. ISA 38		VGII
28. ISA 39		VGII

Compostos naturais	Estrutura	Tipo molecular
29. ISA 40		VGII
30. ISA 41		VGII
