

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação do perfil proteômico de *Cryptococcus neoformans* quando exposto a
uma molécula com atividade antifúngica**

ALINE GONÇALVES DA SILVA

Porto Alegre, 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação do perfil proteômico de *Cryptococcus neoformans* quando exposto a uma molécula com atividade antifúngica

Dissertação apresentada por **Aline Gonçalves da Silva** para obtenção do GRAU DE MESTRA em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucélia Santi
Co-orientador: Prof. Dr. Walter Orlando Beys da Silva

Porto Alegre, 2023

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29 de junho de 2023, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Eduardo Luis Konrath
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Rafael Lopes da Rosa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Markus Berger Oliveira
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Aline Gonçalves
Avaliação do perfil proteômico de *Cryptococcus*
neoformans quando exposto a uma molécula com atividade
antifúngica / Aline Gonçalves Silva. -- 2023.
169 f.
Orientadora: Lucélia Santi.

Coorientador: Walter Orlando Beys da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2023.

1. Criptococose. 2. Proteômica. 3. Moléculas
antifúngicas. I. Santi, Lucélia, orient. II. Orlando
Beys da Silva, Walter, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteômica do Departamento de Produção de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no *Proteomics Core Facility* do *Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute* na cidade de *San Diego*, Califórnia - EUA, com financiamento da CAPES. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Fabio e Mariulsa, por permanecerem ao
meu lado durante todo o caminho.

AGRADECIMENTOS

O agradecimento que os meus pais, Fabio e Mariulsa, merecem não caberia ao longo das páginas deste trabalho, tampouco pode ser expresso em palavras. Tenho a certeza de que a coragem de continuar até o final foi fruto do exemplo que eles nos passaram, não só em palavras, mas em atos, ao longo da vida. Sempre íntegros, sensíveis, atentos e prestativos.

Em uma extensão desse sentimento as minhas irmãs, Denise e Daniela que, por serem mais velhas que eu, são fonte de inspiração e participaram das decisões mais importantes que eu tomei. Elas acreditaram em mim, nutrindo o sonho de passar no vestibular quando eu ainda nem pensava nesse assunto e, apesar da distância física, comemoramos nossas vitórias juntas.

Ao meu “namorado” Marcelo que, com muita paciência, acompanhou todas as etapas do mestrado proferindo a frase “vai dar certo”. Assumiu, junto comigo, o desafio do convívio diário nessa fase e está constantemente empenhado em me mostrar o próximo degrau que eu posso subir.

A família que me acolheu, Ricardo e Virgínia, pais do Marcelo, pelo carinho, suporte, atenção e cuidado, por acreditarem na “norinha preferida” - a única, pela presença frequente e pelo reconhecimento.

Aos meus amigos que, de longe ou de perto, estavam disponíveis para uma caminhada, dar conselhos, comer algo diferente ou atender uma chamada que, certamente, não seria breve, em especial a Caroline, minha “filha” emprestada.

Aos colegas de laboratório; Yohana que, mesmo sem me conhecer pessoalmente, se dispôs a ajudar de diversas formas; ao Rafael que foi o responsável por me familiarizar com novas ferramentas; e a Renata que, muito prestativa, reservou momentos na sua rotina para ajudar com resultados e dúvidas. Todos contribuíram muito para o andamento do trabalho.

E, com especial relevância, agradeço a eles, meus orientadores, Dr^a. Lucélia e Dr. Walter, por me acolherem no grupo, pela empatia de compreender as mudanças que foram acontecendo ao longo do período, pela flexibilidade, pela paciência e atenção, pelo conhecimento e exemplo transmitido e, principalmente, por possibilitarem que tudo isso fosse possível.

Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.

Leonardo di Ser Piero da Vinci

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente dissertação foi redigida na forma de artigo. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- Introdução;
- Objetivo geral e objetivos específicos;
- Revisão da literatura;
- Capítulo 1
- Discussão;
- Conclusão;
- Referências.

RESUMO

Espécies do gênero *Cryptococcus* lideram casos de letalidade no contexto das doenças fúngicas atualmente. Em humanos a criptococose pode ocorrer pela inalação de leveduras ou esporos dispersos por pombos exóticos e, por ser uma doença oportunista com tropismo pelo sistema nervoso central, pode atravessar a barreira hematoencefálica em pacientes acometidos por HIV e causar meningite criptocócica. O tratamento disponível é cada vez mais limitado e o desenvolvimento de novos medicamentos não acompanhou a evolução dos mecanismos de virulência, tornando o fungo apto a infectar e se reproduzir no hospedeiro. Logo, nota-se a necessidade de exploração e descoberta de novas moléculas bioativas, que podem ligar-se de forma mais específica no seu sítio ativo e, assim, tornarem-se alternativas promissoras ao atual tratamento. Portanto, avaliamos o perfil proteômico da levedura *C. neoformans* var. *grubii*, cepa H99, exposta ou não à molécula espilantol, isolada da planta *Acmella oleracea*. Foram identificadas alterações em importantes fatores de virulência, como a redução da atividade da urease, e alterações estruturais, verificadas experimentalmente com o aumento do extravasamento celular e redução do conteúdo de ergosterol. Perturbações energéticas foram observadas através da diminuição da disponibilidade do piruvato, o que pode causar um descompasso no ciclo do ácido tricarbóxico. Além disso, observou-se acúmulo de espécies reativas de oxigênio que não foram suficientemente neutralizadas, tornando a célula vulnerável à possível ação antifúngica do espilantol.

Palavras-chave: criptococose, proteômica, moléculas antifúngicas.

ABSTRACT

Evaluation of the proteomic profile of *Cryptococcus neoformans* when exposed to a molecule with antifungal activity

Species of the genus *Cryptococcus* lead cases of lethality in the context of fungal diseases today. In humans, cryptococcosis can occur by inhaling yeasts or spores dispersed by exotic pigeons and, as it is an opportunistic disease with tropism for the central nervous system, it can cross the blood-brain barrier in patients affected by HIV and cause cryptococcal meningitis. The available treatment is increasingly limited and the development of new drugs has not accompanied the evolution of virulence mechanisms, making the fungus able to infect and reproduce in the host. Therefore, there is a need to explore and discover new bioactive molecules, which can bind more specifically to their active site and thus become promising alternatives to the current treatment. Therefore, we evaluated the proteomic profile of the yeast *C. neoformans* var. *grubii*, strain H99, exposed or not to the molecule spilanthol, isolated from the plant *Acmella oleracea*. Alterations in important virulence factors were identified, such as the reduction of urease activity, and structural alterations, verified experimentally with the increase of cellular extravasation and reduction of ergosterol content. Energy disturbances have been observed through the decrease in pyruvate availability, which can cause a mismatch in the tricarboxylic acid cycle. Furthermore, there was an accumulation of reactive oxygen species that were not sufficiently neutralized, making the cell vulnerable to the possible antifungal action of spilanthol.

Keywords: cryptococcosis, proteomics, antifungal molecules.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Complexo de espécies <i>C. neoformans</i>	38
Figura 2.	Morfologia microscópica e macroscópica de leveduras do complexo de espécies <i>C. neoformans</i>	40
Figura 3.	Ciclo de infecção de parasitário de <i>C. neoformans</i>	42
Figura 4.	<i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K.Jansen.....	56
Figura 5.	Estrutura do (2E,4E,8Z,10Z)-N-isobutil-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida.....	58
Figura 6.	Estrutura química do spilanthol.....	58

Figuras do Capítulo 1:

Figure 1.	Venn diagram showing the distribution of proteins identified in the proteome of <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 when exposed to spilanthol (SPI).....	77
Figure 2.	Gene Ontology categorization of <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 proteins exposed to spilanthol.....	78
Figure 3.	Effect of the spilanthol in cell membrane extravasation.....	99
Figure 4.	Ergosterol quantification of <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 cells exposed to spilanthol.....	100
Figure 5.	Effect of the spilanthol in urease activity.....	101
Figure 6.	Classification of the metabolic pathways found in the altered proteins of <i>Cryptococcus neoformans</i> exposed to the spilanthol.....	103
Figure 7.	Main metabolic pathways involved in the antifungal effect of spilanthol	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Fatores de virulência de <i>C. neoformans</i> e suas funções.....	44
-----------	---	----

Tabelas do Capítulo 1:

Table 1.	Minimum inhibitory concentration values of the hexanic extract of <i>Acmella oleracea</i> (HEAO) and spilanthol.....	76
Table 2.	Differentially regulated proteins identified in <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 when exposed to spilanthol.....	79
Table 3.	Unique proteins identified in the control sample of <i>Cryptococcus neoformans</i> H99.....	88
Table 4.	Unique proteins identified in <i>Cryptococcus neoformans</i> H99 treated with spilanthol.	91
Table 5.	Metabolic pathways identified as altered during spilanthol exposure. identification was based on KEGG pathways.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

24(28)DHE	24(28)Dihidroergosterol
A _{xxx}	Absorbância em comprimento de onda igual a xxx nanômetros
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACN	Acetonitrile
AGEs	<i>Advanced glycation end products</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BBB	Blood–brain barrier
BCA	Bicinchoninic acid
BHE	Barreira hematoencefálica
BP	Biological processes
C	Controle
CD	Células dendríticas
CO ₂	Dióxido de carbono
cRAP	<i>Common Repository of Adventitious Proteins</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
EHAO	Extrato hexânico de <i>Acmella oleracea</i>
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
FA	Formic Acid
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDR	False discovery rate
FLC	Fluconazol
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPM	<i>Global Proteome Machine</i>
GXM	Glucuronoxilomanano
GXMGal	Glucuronoxilomanogalactano
HCD	<i>Higher-energy C-trap dissociation</i>

HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HOG	Glicerol de alta osmolaridade
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
KCl	Cloreto de Potássio
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LAC1	Lacase
LAMMOP	Laboratório de Microbiologia Molecular e Proteômica
LC-MS/MS	<i>High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MF	<i>Molecular functions</i>
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
m/z	<i>Mass-to-charge ratio</i>
NK	<i>Natural killer</i>
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OD	Optical density
OH ⁻	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Processo biológico
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
Rf	<i>Retention factor</i>
rpm	Rotações por minuto
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SOD	Superóxido dismutase
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	<i>Tricarboxylic acid</i>
TCEP	Tris-2-carboxietil-fosfina
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TRPV1	Receptores transitórios de potencial vanilóide tipo 1

U	<i>Up</i>
VE	Vesículas extracelulares
WHO	<i>World Health Organization</i>
w:v	<i>Weight in volume</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	27
OBJETIVOS	31
Objetivo geral	32
Objetivos específicos	33
REVISÃO DA LITERATURA	35
O complexo de espécies de <i>C. neoformans</i>	37
Reprodução e adaptação ao ambiente	39
Características coloniais	40
Importância médica do complexo <i>Cryptococcus</i>	41
Fisiopatologia da criptococose	41
Fatores de virulência	43
Cápsula polisacarídica	45
Melanina e parede celular	47
Enzimas	48
Crescimento a 37 °C	49
Superóxido dismutases	50
Tratamento	50
Azóis	51
Antimetabólitos	52
Resistência e ineficiência dos tratamentos convencionais	52
Moléculas naturais	54
A Proteômica	59
CAPÍTULO 1	61
DISCUSSÃO	123
Atividade antifúngica do espilantol - MIC	125
Análise proteômica	126
Classificação da ontologia genética	126
Espilantol impacta a síntese de energia em <i>C. neoformans</i>	127

O espilantol desregula importantes fatores de virulência de <i>C. neoformans</i>	127
O espilantol prejudica as proteínas de resposta ao estresse	129
Análise de vias KEGG	130
CONCLUSÃO	133
REFERÊNCIAS	137

INTRODUÇÃO

No contexto epidemiológico atual, a criptococose apresenta-se como a doença fúngica com maior índice de mortalidade (MICELI *et al.*, 2011). Na lista de patógenos fúngicos prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS), o *Cryptococcus neoformans* aparece no grupo de prioridade crítica em função da sua capacidade de causar infecções sistêmicas invasivas resistentes aos medicamentos existentes (WHO, 2022; FISHER; DENNING, 2023). Esse dado tem a sua gravidade intensificada quando observada a característica oportunista dessa patologia, tornando potencialmente letais casos concomitantes com o imunocomprometimento (PERFECT; CASADEVALL, 2002) atribuído ao *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (BICANIC; HARRISON, 2004), onde a segunda principal causa de morte é por meningite criptocócica (RAJASINGHAM *et al.*, 2017) ou câncer (SCHMALZLE *et al.*, 2016), por exemplo.

A contaminação da criptococose ocorre por meio da inalação de esporos e isso pode acontecer, principalmente, em ambientes contaminados, como o solo com excretas de pombos exóticos que habitam o meio urbano, além de árvores e plantas. Essa infecção pode ser favorecida por diversas adaptações que o fungo desenvolveu ao longo do tempo, para melhor adaptar-se e obter sucesso nas infecções (MCCLELLAND *et al.*, 2006). Após a transposição da imunidade inata, composta por barreiras naturais como as mucosas, a colonização do hospedeiro se dá quando a fagocitose passa a ser ineficiente, favorecendo a redução da resposta imune. Esse quadro clínico é típico em pacientes acometidos pelo HIV, onde há um drástico declínio da linfoproliferação (PARK *et al.*, 2009).

A fase de tratamento da doença está atrelada ao problema da resistência ao esquema antifúngico utilizado na clínica (SIONOV *et al.*, 2012). Os diversos fatores que culminaram no agravamento da situação relacionada à resistência podem ser explicados pelo diagnóstico indevido, uso irracional dos medicamentos e abandono do tratamento (BORBA *et al.*, 2018; CHANG; KWON-CHUNG, 1994). Esses fatores conduzem ao desenvolvimento de pressão seletiva e resistência, cenário ideal para o insucesso de qualquer tratamento e, não diferente, a criptococose sofre essas consequências atualmente.

O tratamento farmacológico antifúngico é limitado a três medicamentos que podem ser usados isoladamente ou em associação: anfotericina B; fluconazol e flucitosina (COELHO; CASADEVALL, 2016; PERFECT *et al.*, 2010; SPADARI *et al.*, 2020), embora haja toxicidade e resistência reconhecida e resultem no insucesso do

tratamento (BONGOMIN *et al.*, 2018; CHEONG; MCCORMACK, 2013). Esforços para mudar a realidade do preocupante cenário da criptococose sem tratamento adequado induz a busca por alternativas. A indústria farmacêutica já entendeu o potencial das moléculas bioativas naturais e faz dessa característica um promissor nicho de mercado que tenha a capacidade de locupletar às necessidades terapêuticas atuais oriundas da resistência, principalmente para antimicrobianos (YIĞIT *et al.*, 2009).

Trabalhos da comunidade científica já demonstraram resultados positivos oriundos de extratos vegetais (SOUZA *et al.*, 2003), óleos essenciais (GIORDANI *et al.*, 2004), alcalóides (KLAUSMEYER *et al.*, 2004) e flavonoides (SOHN *et al.*, 2004) com atividade antimicrobiana. Alguns exemplares da flora brasileira são ainda pouco explorados, portanto, o presente trabalho analisou o espilantol, isolado do extrato etanólico de uma planta encontrada na região norte brasileira.

De forma pioneira, esse trabalho avaliou de que forma o espilantol interfere sobre a célula fúngica a nível molecular, utilizando uma abordagem proteômica diferencial. Assim, com o possível mecanismo de ação elucidado, poderá ser possível propor um novo tratamento para o problemático esquema de tratamento atual, visando a atenuar os mecanismos de virulência do *C. neoformans* e melhorar a eficiência do tratamento atual.

A dissertação está apresentada em forma de artigo (Capítulo 1), que avalia, a nível molecular, o efeito do espilantol sobre *C. neoformans*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o perfil proteômico diferencial de *C. neoformans* quando exposto ao espilantol, uma molécula com atividade antifúngica

Objetivos específicos

- Avaliar a susceptibilidade de *C. neoformans* H99 ao espilantol;
- Cultivar e extrair proteínas de *C. neoformans* H99 quando expostas ao espilantol ou não (controle);
- Identificar diferenças na expressão de proteínas dos cultivos em ambas as condições por espectrometria de massas;
- Caracterizar molecularmente as proteínas diferencialmente expressas por ferramentas de bioinformática;
- Validar experimentalmente o proteoma diferencial.

REVISÃO DA LITERATURA

O complexo de espécies de *C. neoformans*

A história desse complexo começa em 1861 pela descrição de Zenker. No entanto, a descrição do italiano Francesco Sanfelice, em 1894, foi a mais aceita. Através do isolamento a partir de suco de pêssego, Sanfelice descreveu, empiricamente, leveduras encapsuladas e, em 1895, a patogenicidade dessas leveduras foi identificada experimentalmente. Inicialmente, as leveduras foram denominadas de *Saccharomyces neoformans* (SANFELICE, 1895).

A taxonomia descreve que as espécies do complexo *C. neoformans* pertencem ao reino Fungi, filo Basidiomycota, ordem Tremellales, família Tremellaceae e gênero *Cryptococcus* (HIBBETT et al., 2007; KURTZMAN et al., 2011). No entanto, já foi estudada e classificada, de forma equivocada, por diversos autores.

Em 1950 recebeu o nome aceito até hoje (BENHAM, 1950), ano em que também foram identificados os seus principais sorotipos: A, B e C (EVANS, 1950). Logo em seguida, em 1951, através de excrementos de pombos exóticos (*Columba livia*) contidos em ninhos de árvores, foi possível reconhecer a procedência ambiental do fungo pela coleta do isolado (EMMONS, 1951). Além dos pombos, o *Cryptococcus* sp. foi descrito também em fezes animais, como morcegos (TENCATE et al., 2012), papagaios (SIQUEIRA et al., 2022) e gatos (PENNISI et al., 2013), por exemplo.

Nos anos de 1990, o *C. neoformans* foi caracterizado em três variedades baseadas na imunogenicidade capsular a soros hiperimunes: *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* (sorotipo AD) (FRANZOT et al., 1999). Com isso, o *Cryptococcus* foi segregado em duas espécies: *C. gattii* e *C. neoformans*, tendo estas duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii* (KWON-CHUNG; VARMA, 2006).

Das mais de 70 espécies que compõem o gênero *Cryptococcus*, a menor parte delas acometem seres humanos (KWON-CHUNG et al., 2014). As análises filogenéticas mais modernas definiram novas espécies e linhagens no gênero (MONTROYA et al., 2021). A nova classificação renomeou o grupo como complexo de espécies *C. neoformans*, que abrange duas espécies: *C. neoformans* (antigamente

conhecida como *C. neoformans* var. *grubii*) e *C. deneoformans* (antigamente chamado de *C. neoformans* var. *neoformans*). Já o complexo de espécies *C. gattii* foi dividido em espécies “irmãs” com os sorotipos B ou C: *C. gattii* (VGI); *C. deuterogattii* (VGII e subtipos VGIIa, VGIIb e VGIIc); *C. bacillisporus* (VGIII); *C. tetragattii* (VGIV) e o *C. decagattii* (VGIIc/VGIV) (FARRER *et al.*, 2019) (Figura 1).

Outra forma de vetorização da levedura é através do papo, bico e pés, que podem oportunizar a inalação de esporos desidratados. Devido à alta temperatura corporal dessas aves, a auto infecção é desfavorecida (LITTMAN; BOROK, 1968). O solo revolvido está presente na maioria das causas das infecções; no entanto, pesquisadores descreveram o isolamento de *C. neoformans* em cascas e troncos de árvores em estágio de decomposição (MITCHELL *et al.*, 2014), sendo também focos potencialmente infectantes. Embora não seja comum, a transmissão também pode se dar através da inoculação direta do fungo em locais de traumas ou transplante de órgãos (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006).

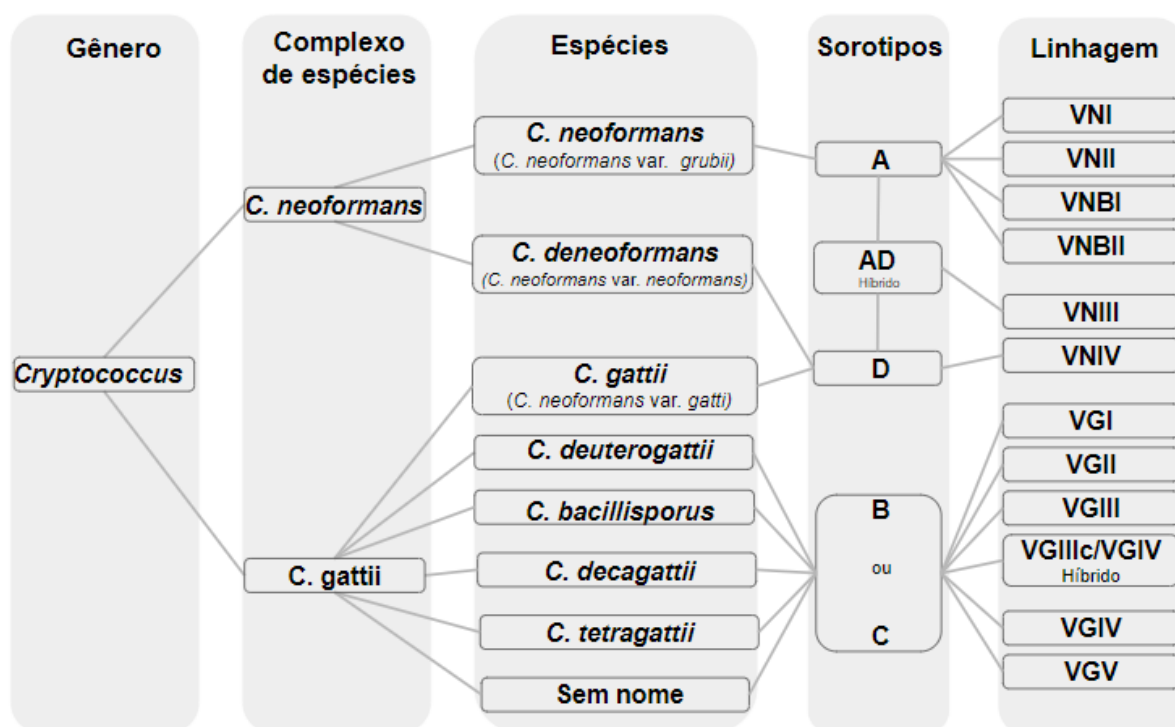


Figura 1. **Complexo de espécies de *Cryptococcus*.** Os isolados são diferenciados pelo complexo de espécies, espécies, sorotipos e linhagem. Adaptado de (MONTROYA *et al.*, 2021).

Ainda na análise ecológica, o *C. neoformans* tem a capacidade de interação com outros organismos presentes no solo, como as amebas, por exemplo. Esse fato corrobora evolutivamente a resistência da levedura aos macrófagos humanos, pela usurpação da maquinaria biológica das amebas (CASADEVALL; PIROFSKI, 2007), gerando uma simbiose que contribui com a promoção dos fatores de virulência (STEENBERGEN *et al.*, 2001).

Reprodução e adaptação ao ambiente

O ciclo de vida do complexo de espécies de *C. neoformans* passa pela fase assexuada (leveduriforme) e sexuada (basidiósporos). A forma de levedura, que se reproduz por brotamento, pode ser encontrada em espécimes clínicos, em cultura laboratorial ou no ambiente contaminado. Durante a fase teleomorfa a reprodução acontece em condições de privação de nutrientes, induzindo a fusão célula-célula (CERIKÇIOĞLU, 2009), possibilitando a troca de genes relacionados à virulência e a resistência a medicamentos antifúngicos e, através dos seus fatores de virulência, o microorganismo se utiliza dessa ferramenta para promover uma redistribuição dos genes envolvidos e, assim, através de novos arranjos, aumentando a resistência e a virulência e a diversidade genética (GRIGG *et al.*, 2001).

O *C. neoformans* é um microrganismo que tem a capacidade de transitar por diversos habitats. Isso requer que o fungo esteja apto a adaptar-se às diversas oscilações metabólicas que irão confrontar-se ao longo do seu ciclo de vida, tanto no hospedeiro quanto na natureza (MORAN *et al.*, 2011).

De forma geral, o seu crescimento ocorre, predominantemente, no ambiente e tem limitações na sua interação com a sua adaptação ao ser humano, tendo mais êxito na infecção em imunocomprometidos. Assim sendo, a sua adaptação fenotípica à sobrevivência do ambiente é mais desenvolvida e tem melhores mecanismos de virulência para hospedeiros não necessariamente humanos, como as amebas (RODRIGUES *et al.*, 1999) que, no ambiente, fazem as vezes de reservatório ambiental de patógenos (PRADEL; EWBANK, 2004) e se alimentam por fagocitose de microrganismos, similarmente ao processo de fagocitose de patógenos feito por humanos (SWANSON; HAMMER, 2000).

Foi descrito que a *Acanthamoeba castellanii* é lisada por *Cryptococcus* após a fagocitose, o que funcionaria com uma adaptação à predação, e uma possível

explicação da evasão de fagócitos em mamíferos observadas *in vitro* (STEENBERGEN *et al.*, 2001). Parte dessas adaptações passou a gerar problemas aos seres humanos, principalmente relacionados com a perda de eficácia dos medicamentos disponíveis para o tratamento, que abordaremos adiante.

Características coloniais

Microscopicamente, as leveduras exibem um crescimento médio de 5 μm de diâmetro, com formato tridimensional esférico e podem apresentar brotamentos. Além disso, é possível notar a cápsula mucopolissacarídica que, na presença de tinta nanquim exibe alto contraste entre o contorno do microorganismo e o restante da cultura (NEGRONI, 2012) (Figura 2A).

Sob o aspecto macroscópico, o *C. neoformans* tem a capacidade de crescer em ágar Sabouraud Dextrose e forma colônias com a cor variando de branca a creme, com brilho característico, aspecto mucóide e margens lisas. O crescimento médio flutua entre 48 a 72h em condições de aerobiose (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006) (Figura 2B).

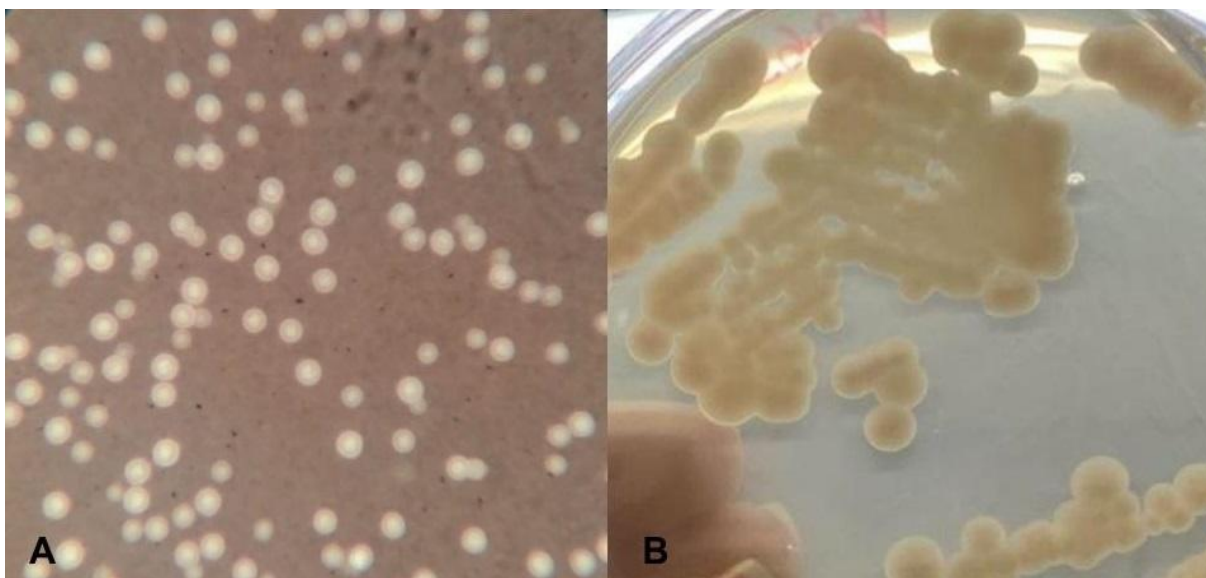


Figura 2. **Morfologia microscópica e macroscópica de leveduras do complexo de espécies de *C. neoformans*.** A) células leveduriformes, evidenciando a cápsula, aumento de 40x; B) Colônia mucóide em ágar Sabouraud. Fonte: Acervo LAMMOP.

Importância médica do complexo *Cryptococcus*

Dentre as doenças que mais causam morte na atualidade, as provocadas por fungos têm especial relevância, principalmente, quando observada a capacidade de infecção e complicações nos seres humanos. A superação de patógenos resistentes aos medicamentos, com o intuito de combater doenças fúngicas, por exemplo, é fundamental para a saúde pública global (MUSELIUS *et al.*, 2021). A prevalência de infecções fúngicas oportunistas (MICELI *et al.*, 2011) mostra um aumento contínuo na história recente e, por serem frequentemente associadas a outras doenças, tornam-se ainda mais graves.

A *WHO Fungal Priority Pathogens List* (WHO, 2021) classificou o *C. neoformans* como um patógeno do grupo de prioridade crítica baseado na sua capacidade de desenvolver infecções sistêmicas e a sua resistência aos medicamentos disponíveis (WHO, 2022). Diante do dramático aumento da população com imunocomprometimento nas últimas décadas, as micoses sistêmicas representam uma ameaça à saúde pública (RAJASINGHAM *et al.*, 2017). Pacientes em condições de imunocomprometimento, normalmente atribuído ao *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (BICANIC; HARRISON, 2004) ou câncer (SCHMALZLE *et al.*, 2016), são alvos de *C. neoformans*.

Dados atuais dão conta de que a criptococose está distribuída mundialmente (SORRELL *et al.*, 2014), com uma incidência de, aproximadamente, 220.000 novos casos por ano e a taxa de mortalidade é de, aproximadamente, 180.000 mortes por ano (MAYER; KRONSTAD, 2020). Isso torna os casos de criptococose foco de atenção entre pesquisadores tanto pela gravidade, quanto pela extensão do problema.

Fisiopatologia da criptococose

O caminho que o *C. neoformans* percorre para promover a infecção começa pela inalação de partículas do ambiente (ZARAGOZA, 2019) e esbarra, durante a colonização dos alvéolos (CHANG *et al.*, 2004; SETIANINGRUM *et al.*, 2019), na resposta imune pulmonar especializada (MARTIN; FREVERT, 2005). Os alvéolos são dotados de macrófagos, recebem a contribuição de linfócitos CD4 e CD8, além de células dendríticas (ZARAGOZA, 2019). A resposta imune pulmonar, apesar de

eficaz para criptococose em pacientes com imunocomprometimento de células T, no entanto, não é capaz de evitar a disseminação extrapulmonar, com especial predileção pelo SNC (DRIVER *et al.*, 1995; VELAGAPUDI *et al.*, 2009) (Figura 3).

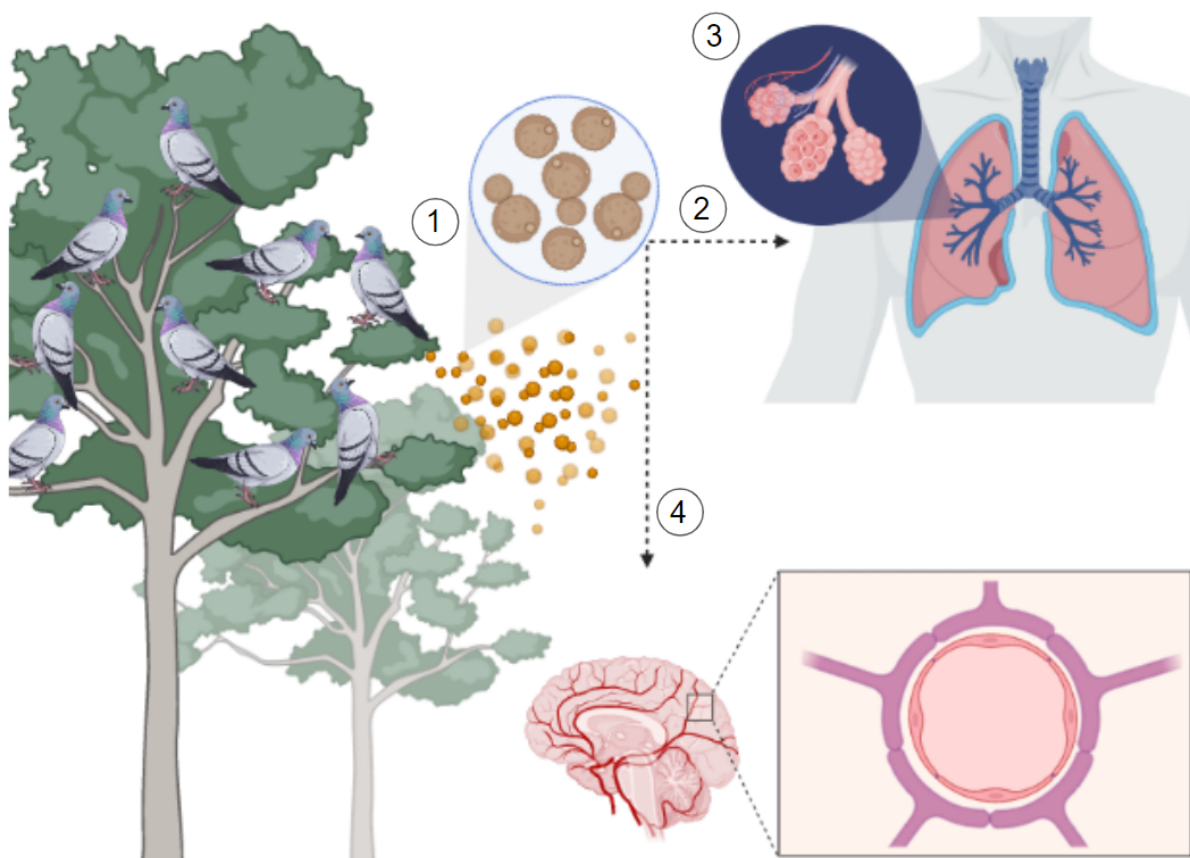


Figura 3. **Ciclo de infecção de *C. neoformans*.** Leveduras ou esporos suspensos em ambientes onde há excretas de pombos (1) são inalados por hospedeiros humanos e atingem a região pulmonar (2). Nos alvéolos (3), pode ocorrer a fagocitose e a reprodução fúngica em macrófagos. Em casos mais graves, o fungo pode atingir a corrente sanguínea e atravessar a barreira hematoencefálica, causando meningite criptocócica (4), que pode ser fatal.

Durante o processo de infecção, os alvéolos pulmonares acometidos podem apresentar uma infecção latente assintomática ou progredir para o estado de criptococose ativa. Com o auxílio de fatores de virulência e em estado de imunocomprometimento do indivíduo acometido, o *C. neoformans* pode ascender do pulmão até o SNC, podendo desencadear um quadro de meningoencefalite (KWON-CHUNG KYUNG J. *et al.*, 2017). O vírus da AIDS é, preponderantemente, o requisito mais comum para os casos de meningoencefalite por criptococose, que tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), arquitetada de

forma a dificultar esse trajeto (CHANG *et al.*, 2004), e se adaptar facilmente aos baixos níveis de oxigênio e nutrientes do cérebro (CHANG *et al.*, 2007; DROMER *et al.*, 2011).

Tentando descrever o processo de infecção através da BHE, três potenciais mecanismos foram descritos. O primeiro deles, a travessia transcelular, já descrita para outros microrganismos, como *Escherichia coli* (HUANG *et al.*, 1995) e *Candida albicans* (JONG *et al.*, 2001), é caracterizada pela penetração dos patógenos pelas células endoteliais microvasculares, localizadas no cérebro. O segundo processo, denominado de penetração paracelular, é característico do protozoário *Trypanosoma* sp. (LONSDALE-ECCLES; GRAB, 2002) e ocorre através de um gradiente de concentração, onde o patógeno pode atravessar por entre as células epiteliais (Vu *et al.* 2013). Já o terceiro mecanismo descrito, o cavalo de Tróia, é observado em patógenos virais como o HIV (DALLASTA *et al.*, 1999; SANTIAGO-TIRADO *et al.*, 2017) e é caracterizado pela usurpação de células imunes, como os monócitos e macrófagos, para viabilizar a travessia do patógeno pela BHE, sendo o mais aceito para *C. neoformans* atualmente (ERLANDER, 1995; ZARAGOZA, 2019).

Além de bombas de efluxo (WIRTH *et al.*, 2018), a BHE é disposta em junções estreitas de, aproximadamente, 20 Å, limitando a difusão de substâncias, como a anfotericina B (ASHLEY, 2019), ao SNC que, além disso, precisam ter características lipofílicas. Diante dessas restrições as opções de tratamento são reduzidas, aumentando a letalidade dos casos de infecção do SNC (HAKIM *et al.*, 2000; SPADARI *et al.*, 2020).

Fatores de virulência

O grau de virulência de *C. neoformans* é determinado por diversos fatores e pode ser influenciado pelas mutações adaptativas que podem ocorrer durante o processo de infecção. Nesses casos, há adaptações que promovem a sobrevivência e proliferação do fungo no hospedeiro (KRONSTAD *et al.*, 2011). Essas adaptações são os fatores de virulência que promovem subterfúgios para o fungo evadir o sistema imune do hospedeiro (ESHER *et al.*, 2018).

Diversos fatores de virulência já foram descritos através da sua relação com diferentes infecções, identificadas ao longo de muitos anos (Tabela 1). Os mais

comuns são cápsula polissacarídica, melanina, secreção de enzimas, como a urease e crescimento a 37 °C (ALSPAUGH, 2015). Um aspecto interessante sobre os fatores de virulência diz que mutantes que não exibem alguns fatores de transcrição podem representar características desfavoráveis à infecção, aumentando ou diminuindo um fator de virulência (ARRAS *et al.*, 2017).

Tabela 1. **Fatores de virulência de *Cryptococcus neoformans* e suas funções.** Adaptado de (DIXIT *et al.*, 2009).

Fator de virulência	Ação
Cápsula polissacarídica	Evasão da fagocitose; redução da apresentação de antígeno; redução da produção de citocinas; indução de células T supressoras e consequente inibição da imunidade mediada por células; inibição da resposta das células T pela GXM; inibição da migração de leucócitos a sítios de inflamação e resistência a ROS
Melanina	Proteção contra raios UV; proteção contra radicais livres e contribuição no tropismo pelo SNC
Manitol	Sugestivo de aumento na pressão intracranial; proteção contra estresse e proteção contra radicais livres
Proteases extracelulares	Atividade proteolítica e contribuição com a degradação de proteínas envolvidas na integridade tecidual e imunidade do hospedeiro
Produtos da rota da lacase	Oxidação de difenol; síntese de melanina e degradação de lignina da madeira
Superóxido-dismutase	Proteção contra estresse oxidativo e proteção contra ruptura oxidativa produzida por células imune efectoras
Fosfolipases	Invasão tecidual pela degradação de lipídeos de membrana dos mamíferos e surfactante pulmonar

Fator de virulência	Ação
Urease	Crescimento em pH do hospedeiro e pode agir na transferência de <i>Cryptococcus</i> para o SNC
Crescimento à temperatura fisiológica (37°C)	Sobrevivência e persistência no hospedeiro
Tolerância a pH baixo e tolerância a níveis elevados de sal	Sobrevivência e persistência no ambiente
Mudança fenotípica	Mudança no tamanho da cápsula – variante mucóide mais virulenta, variante mais lisa supostamente capaz de ultrapassar a BHE

Cápsula polisacarídica

De todos os fatores de virulência que *C. neoformans* dispõe, a cápsula polissacarídica é o elemento principal na interação patógeno-hospedeiro, contribuindo em, aproximadamente, 25% da virulência (MCCLELLAND *et al.*, 2006). É importante não só na proteção, mas na adaptação ao sistema imune hospedeiro (WANG *et al.*, 2021). Essa estrutura é constituída majoritariamente por água (MAXSON *et al.*, 2007), é encontrada na superfície da levedura e é sustentada pela parede celular (CORDERO *et al.*, 2011), que exibe uma arquitetura complexa com glucanos, quitina, quitosana e glicoproteínas (DOERING, 2009). Já foi demonstrado que mutantes acapsulares são considerados não virulentos (CHANG; KWON-CHUNG, 1994) e o *Cryptococcus* é o único patógeno humano eucariótico detentor de uma cápsula polissacarídica, que tem sua composição o glucuronoxilomanano (GXM) e o glucuronoxilomanogalactano (GXMGal) (MCFADDEN, D. *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2011).

O GXM, principal polissacarídeo capsular, formado por um esqueleto de $\alpha(1,3)$ manose e substituições de $\beta(1,2)$ e $\beta(1,4)$ xilose e ácido $\beta(1,2)$ glucurônico

(KUTTEL *et al.*, 2020), representa cerca de 90% da estrutura da cápsula e é liberado extracelularmente, exercendo efeitos antifagocitose, na migração de leucócitos durante a infecção e na liberação de citocinas (DOERING, 2009; MCFADDEN, D. C. *et al.*, 2006; MONARI *et al.*, 2006). Já o GXMGal apresenta uma estrutura mais complexa e extensa, representando cerca de 10% da estrutura capsular (VAISHNAV *et al.*, 1998; O'MEARA; ALSPAUGH, 2012). Além disso, o GXM foi descrito como um componente promissor no estudo de vacinas para criptococose (DATTA; PIROFSKI, 2006), mostrando resultados animadores no desenvolvimento precoce de uma resposta imune protetora mediada por células T $\gamma\delta$ e produção de IFN γ e IL-17A através de receptores *toll-like* (NORMILE *et al.*, 2022) e como alvo de terapia com anticorpos monoclonais (SALVATOR *et al.*, 2022).

Entendendo a estrutura capsular, supõe-se que GDP-manose, UDP-glucuronato, UDP xilose, UDP-galactofuranose e UDP-galactopiranosose sejam doadores de açúcar e que, na ausência dos mesmos, haverá uma redução da virulência pela redução da cápsula (DING *et al.*, 2016). Experimentos *in vivo* mostraram que, quando células dendríticas fagocitaram um mutante acapsular de *C. neoformans*, as quantidades de TNF- α foram maiores, quando comparados com o microorganismo capsulado (SABIITI *et al.*, 2012), indicando que a cápsula torna o fungo "invisível" ao sistema imune humano. As variações nessas condições recrutam vias metabólicas fundamentais para o fornecimento da energia para a biossíntese dos precursores dessa estrutura (O'MEARA; ALSPAUGH, 2012), que parece estar associado à função mitocondrial e à fase G1 do ciclo celular (ZARAGOZA *et al.*, 2010).

O *C. neoformans* é capaz de modular a extensão e a antigenicidade da cápsula conforme os estímulos ambientais ou em resposta a sinais do hospedeiro (BAKER *et al.*, 2007), facilitando a evasão imunitária (BOSE *et al.*, 2003). Essa resposta varia conforme a fisiopatologia da infecção (GARCIA-HERMOSO *et al.*, 2004). Durante a infecção criptocócica, a cápsula pode sofrer modificações na sua arquitetura, de forma a aumentar o seu tamanho, incrementando a sua capacidade protetiva contra EROs e fagocitose (ZARAGOZA *et al.*, 2008). Isso pode ser atribuído ao aumento da concentração de dióxido de carbono (CO₂), redução da concentração de ferro (KRONSTAD *et al.*, 2013) e aumento de pH (ZARAGOZA *et al.*, 2003). Um estudo sugeriu que o aumento do tamanho da cápsula seja uma

defesa inespecífica em resposta a estresse ou algum outro fator que represente uma ameaça ao fungo (CHRISMAN *et al.*, 2011).

Melanina e parede celular

Os esporos presentes no ambiente, quando inalados, são recebidos pelos macrófagos alveolares. Uma das ferramentas antifagocíticas é a melanina, promovendo a disseminação do microrganismo (IDNURM *et al.*, 2005). A melanina, um fator de virulência bastante comum em diversas espécies de fungos, é um pigmento encontrado ancorado à quitina da parede celular que confere proteção ao estresse externo, como radiação ultravioleta (UV), por exemplo (O'MEARA *et al.*, 2010). O *C. neoformans* produz melanina (eumelanina) majoritariamente através da 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) (EISENMAN *et al.*, 2011), sendo a enzima lacase a responsável pela metabolização dos substratos e transformação em melanina, depositando-a na parede celular do fungo (WATERMAN *et al.*, 2007).

A melanina foi descrita como sendo um tampão redox fúngico, tendo a capacidade de neutralizar oxidantes danosos, oriundos de células efectoras do sistema imune (FRAZÃO *et al.*, 2020), e a importância foi confirmada com estudos envolvendo mutantes de deleção do gene da lacase (*LAC1*), que em expressão reduzida, resultaram em redução da disseminação fúngica e letalidade em modelos murinos (TROFA *et al.*, 2014).

Em pacientes com meningite criptocócica com uma alta carga fúngica no líquido cefalorraquidiano (LCR) e, em amostras isoladas, houve uma alta atividade da lacase para produção de melanina, e esses isolados apresentaram mais resistência à terapia antifúngica (MYLONAKIS *et al.*, 2002). Isso se deve pela particularidade do *C. neoformans* em recrutar precursores de catecolaminas exógenas (EISENMAN *et al.*, 2011), que são neurotransmissores, explicando o neurotropismo (CASADEVALL *et al.*, 2000).

As vesículas extracelulares (VE) são um fator de virulência produzido por cerca de 14 gêneros de fungos (RIZZO *et al.*, 2020), incluindo o *C. neoformans*, onde foram caracterizadas pela primeira vez (RODRIGUES *et al.*, 2007). Essas VEs são importantes na patogênese fúngica e são compostas por proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (RODRIGUES *et al.*, 2014). Além disso, peptídeos vesiculares nas VEs podem proteger um hospedeiro invertebrado, como a *Galleria mellonella*, do

Cryptococcus gattii, sugerindo que as VEs fúngicas podem exercer um papel imunogênico (REIS *et al.*, 2021).

Interessantemente, estas estruturas vêm sendo chamadas de “bolsa de virulência” e contém polissacarídeos retidos para agirem diretamente na sobrevivência do fungo, na manutenção da patogenicidade (OLIVEIRA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2008) e na abertura de caminhos viáveis para o fungo atingir a BHE, alterando a sua estrutura (CHANG *et al.*, 2004; JONG *et al.*, 2008). Além disso, pequenas vesículas contendo polissacarídeos parecem emergir de fagossomas criptocócicos e se acumulam no citoplasma do macrófago, indicando que a permanência intracelular do *C. neoformans* pode modular a fisiologia destas células (FELDMESSER *et al.*, 2000). Nesse contexto, o *C. neoformans* é capaz de superar a fagocitose e sobreviver, proliferar dentro do macrófago e, ainda, retardar a maturação do fagossomo, possibilitando a sua fuga por exocitose sem danificar a célula do hospedeiro (JOHNSTON; MAY, 2013).

Enzimas

C. neoformans conta com algumas enzimas de degradação comprovadamente relacionadas à virulência. Isso pode ocorrer através da promoção da infecção e modulação do sistema imune (SANTANGELO *et al.*, 2004; WRIGHT *et al.*, 2007) ou disseminação da infecção fúngica entre os pulmões e o cérebro (KONG *et al.*, 2017). A urease, enzima catalisadora da reação da hidrólise da uréia em dióxido de carbono e amônia (CALLAHAN *et al.*, 2005; ZIMMER, 2000), é liberada pelo *C. neoformans* e é considerada um fator de virulência bastante relevante (COX *et al.*, 2000). Atua no aumento da permeabilidade da BHE e, conseqüentemente, promovendo a propagação da levedura no SNC (KONG *et al.*, 2017). Isso ocorre pelo transporte das células fúngicas dentro de macrófagos, por um mecanismo similar ao "cavalo de Tróia", um dos processos mais aceitos para a invasão do SNC (OSTERHOLZER *et al.*, 2009). Os fagolisossomos contidos dentro dos macrófagos lançam EROs nos patógenos intracelulares e essas EROs podem ser o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (NICOLA *et al.*, 2008). Acredita-se que o *C. neoformans* tenha sistemas que o defendam do estresse oxidativo capazes de neutralizar danos (COX *et al.*, 2003).

Sabendo que o *C. neoformans*, após ser incorporado pelos macrófagos do hospedeiro, tem a capacidade de sobreviver no fagolisossomo (DE LEON-RODRIGUEZ *et al.*, 2018; FU *et al.*, 2018), a amônia liberada nessa situação tem a função de aumentar o pH dentro do fagolisossomo, favorecendo a sobrevivência fúngica e retardando a replicação da levedura no interior dos macrófagos. O responsável por evitar a acidificação dos fagolisossomos é a atividade da urease (FU *et al.*, 2018). A consequência direta disso é a redução do número de macrófagos com a membrana fagolisossomal permeável e menor lise da célula do hospedeiro (FU *et al.*, 2018).

Outra enzima importante para a invasão dos tecidos é a fosfolipase B que tem a capacidade de aumentar a adesão entre as células epiteliais pulmonares e as fúngicas, compondo o cenário perfeito para um quadro de criptococose pulmonar (CHAYAKULKEEREE *et al.*, 2011; EISENMAN *et al.*, 2009). Na disseminação cerebral, a fosfolipase B é quem fomenta a sobrevivência dentro dos macrófagos (SIAFAKAS *et al.*, 2007; WRIGHT *et al.*, 2007) sendo que, uma vez alocada na superfície celular, essa enzima tem a capacidade de hidrolisar ligações éster dos fosfolipídios de membrana das células hospedeiras, aumentando a capacidade de penetração tissular no hospedeiro (CHEN, S. *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 1997; EVANS *et al.*, 2015).

Trabalhos que usaram cepas com a deleção do gene da fosfolipase B ratificaram sua importância na virulência (CHEN, S. C. *et al.*, 2000; COX *et al.*, 2001), condicionando-a ao aumento da espessura capsular de, aproximadamente, 25 μm (CHRISMAN *et al.*, 2011; EVANS *et al.*, 2015). Outro estudo mostrou que a deficiência desta enzima pode gerar instabilidade na parede celular, facilitando a exposição aos fagócitos (EVANS *et al.*, 2015). Esses dados mostram que a fosfolipase B age, fundamentalmente, em modificações no tamanho e na sobrevivência de células criptocócicas nos fagócitos do hospedeiro.

Crescimento a 37 °C

Para *C. neoformans* estabelecer e progredir com a infecção em humanos é imprescindível para sua sobrevivência que ele seja adaptável à temperatura média corporal (PERFECT, 2006) mas insuficiente para o sucesso da infecção por si só

(ARAUJO *et al.*, 2012). Para tanto, o acionamento de outros mecanismos é necessário.

Em diferentes microorganismos a calcineurina está relacionada com morfogênese, resposta ao estresse, tolerância a substâncias químicas, integridade da parede celular e virulência (PARK *et al.*, 2019). Para *C. neoformans*, esta proteína é decisiva para a virulência (CHOW *et al.*, 2017), regulando a forma filamentosa do fungo e, assim, mantendo a sua viabilidade em um evento estressor (KOZUBOWSKI *et al.*, 2011; STEMPINSKI *et al.*, 2022). A mutação da calcineurina gera a perda da virulência (CRUZ *et al.*, 2001).

Superóxido dismutases

Durante o início da infecção na corrente sanguínea, o patógeno precisa adaptar-se às altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) nos macrófagos e nos neutrófilos. O estresse oxidativo, proveniente de fagócitos do hospedeiro, prejudica a patogênese do fungo (BAHN; JUNG, 2013). Para sua defesa, o *C. neoformans* dispõe de um arsenal de enzimas detoxificantes, como superóxido dismutase (SOD), catalases, glutatona e peroxidases (BROWN *et al.*, 2007).

A SOD é uma metaloenzima que detoxifica os radicais de oxigênio (Fridovich 1995), e sua função primordial é proteger as células do ânion superóxido, que é gerado de forma endógena e por células fagocíticas (COX *et al.*, 2003). Em outros microorganismos, como bactérias, a SOD exerce um papel relevante na virulência e entende-se que a redução da virulência promove um aumento da susceptibilidade às células fagocíticas (LYNCH; KURAMITSU, 2000).

Tratamento

O tratamento de infecções fúngicas têm se tornado um desafio para os órgãos de saúde devido à limitação de fármacos antifúngicos que sejam eficazes, que causem menos toxicidade e que não estejam comprometidos pela resistência (GEDDES-MCALISTER; SHAPIRO, 2019). Em 2010, foi publicada uma versão atualizada do “*Practice Guidelines for Management of Cryptococcal Disease*”

(PERFECT *et al.*, 2010) pela *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), levando em consideração a individualidade do paciente, com variações de uso entre os medicamentos estabelecidos, de acordo com as características de base, como gestantes ou transplantados, por exemplo. O tratamento para criptococose em portadores do HIV é baseado em apenas três medicamentos (anfotericina B; flucitosina e fluconazol) (PERFECT *et al.*, 2010) e é dividido em três fases: indução, (anfotericina B + flucitosina) por 2 semanas; consolidação, (fluconazol) por 8 semanas e manutenção, (fluconazol) de 6 a 12 meses (MOURAD; PERFECT, 2018).

Os polienos agem na permeabilidade celular, ligando-se ao ergosterol, gerando perturbações na membrana da célula fúngica (LIU *et al.*, 2017; WILCOCK *et al.*, 2013). São usados para casos moderados a graves (MCCARTHY *et al.*, 2017). A anfotericina B, considerada o padrão-ouro para criptococose (JEZEWSKI *et al.*, 2023), tem importância clínica em infecções invasivas, abrangendo grande parte dos fungos. No entanto, por não ter forma farmacêutica de uso oral e, geralmente, necessitar de hospitalização, seu uso exibe altas taxas de toxicidade. Uma desvantagem é a necessidade de administração intravenosa para contornar a toxicidade no hospedeiro e a sua limitada distribuição em diversos países (MUSELIUS *et al.*, 2021). Além disso, a anfotericina B pode gerar um acúmulo de EROs, aumentando danos no DNA, proteínas e membranas (MESA-ARANGO *et al.*, 2012).

Azóis

Os azóis apresentam toxicidade seletiva e garantem o efeito fungicida através da inibição da enzima lanosterol 14 α -desmetilase, inibindo a síntese do ergosterol (BHATTACHARYA *et al.*, 2018; CANNON *et al.*, 2009; VAN DAELE *et al.*, 2019). O fluconazol tem a capacidade de atingir o LCR e é recomendado entre 200 a 800mg, por dia, na fase de consolidação e manutenção da doença (WHO, 2018). No entanto, essa estratégia parece não ser a mais efetiva (BICANIC *et al.*, 2006).

Uma desvantagem dessa terapia é a necessidade de monitoramento terapêutico devido a sua farmacocinética não linear (QU *et al.*, 2013) e hepatotoxicidade associadas ao prolongamento do intervalo QTc, evidenciado em exames de eletrocardiograma (THOMPSON *et al.*, 2009). Outro problema está

relacionado com o tempo de tratamento, que varia entre 6 a 12 meses, favorecendo a não adesão e ocorrência de resistência (MUSELIUS *et al.*, 2021).

Antimetabólitos

A flucitosina é um medicamento análogo da pirimidina e age na síntese de ácidos nucleicos, interferindo diretamente na atividade fúngica (PERFECT, 2017). Embora tenha apresentação oral disponível, o que era uma limitação em outras classes, tem como principal efeito adverso a mielotoxicidade (SPADARI *et al.*, 2020). Dentre os medicamentos antifúngicos disponíveis no Brasil, a flucitosina não está elencada (ALMEIDA-APOLONIO *et al.*, 2018) e seu uso é, geralmente, restrito a pacientes graves e sem doença hematológica prévia (SCHWARZ *et al.*, 2007).

Desde de a década de 1960, a anfotericina B foi elencada como o principal fármaco usado na meningoencefalite criptocócica (MUSELIUS *et al.*, 2021; SAROSI *et al.*, 1969), podendo ser usada em regime de monoterapia ou em associação com a flucitosina (BENNETT *et al.*, 1979). Em 1990, com o advento do fluconazol, o seu uso passou a admitir o esquema previamente conhecido, acrescido desse novo antifúngico em caráter de manutenção (PERFECT *et al.*, 2010).

Resistência e ineficiência dos tratamentos convencionais

As relações ecológicas entre o microrganismo e o hospedeiro são capazes de gerar adaptações fenotípicas que instauram, através da superação do sistema imune humano, a infecção pelo *C. neoformans* (MONTROYA *et al.*, 2021). A resistência aos medicamentos antimicrobianos é uma realidade inerente às condições atuais dos sistemas de saúde e está intimamente ligada aos mecanismos de virulência, configurando a gravidade da infecção fúngica (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020).

A falha na terapia não pode ser imputada somente ao uso prolongado dos fármacos, mas a má adesão ao tratamento (PFALLER, 2012), uso indiscriminado ou diagnóstico equivocado também são causas da pressão seletiva (MALIEHE *et al.*, 2020). Além disso, há de se levar em consideração a heterorresistência, descrita como mecanismo de resistência alternativo (CHEONG; MCCORMACK, 2013),

embora tanto a resistência, quanto a heterorresistência aos medicamentos seja associada à virulência (SIONOV *et al.*, 2009).

No âmbito da resistência antifúngica em criptococose, o fluconazol é o medicamento mais comum (SIONOV *et al.*, 2012) devido ao tratamento prolongado em casos de AIDS (BONGOMIN *et al.*, 2018), somado ao fato de relatos do envolvimento de bombas de efluxo na membrana plasmática (BASSO *et al.*, 2015; VENKATESWARLU *et al.*, 1997). Valores mais elevados da concentração inibitória mínima (CIM), indicando resistência, estão relacionados a maus prognósticos, onde há insucesso na terapia, podendo levar à morte (ALLER *et al.*, 2000).

Em *C. neoformans*, três bombas de efluxo foram caracterizadas: Afr1; Afr2 e Mdr1. Essas bombas diminuem a concentração dos fármacos no meio intracelular (BASSO *et al.*, 2015; SANGLARD *et al.*, 1998; SHENG *et al.*, 2009) através de transportadores do tipo *ATP-binding cassette* (ABC) (DEL SORBO *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2022), sendo um importante mecanismo de resistência (SHAPIRO *et al.*, 2011) que culmina na persistência da infecção e falha na eliminação do patógeno.

A baixa concentração de glicose no pulmão e no SNC é um desafio que *C. neoformans* enfrenta durante a infecção (BAHN *et al.*, 2006; BLOOM *et al.*, 2013; CHABRIER-ROSELLÓ *et al.*, 2013). Essa condição de exposição ao estresse gerada pela privação de glicose, foi relatada como um propulsor de tolerância ao fluconazol (LIU, 2019), pois provoca aumento da atividade da bomba de Afr1, alterações mitocondriais, acúmulo de EROs e aumento da produção de ATP (BHATTACHARYA *et al.*, 2021). Além disso, o envelhecimento das células, acima de 10 gerações, também é uma característica que foi relacionada ao *C. neoformans* como fator de tolerância ao antifúngico fluconazol (BHATTACHARYA *et al.*, 2020; ORNER *et al.*, 2019). O envelhecimento replicativo foi associado a divisões celulares irregulares que acumulam mutações fenotípicas, relacionando-se com transportadores ABC (ELDAKAK *et al.*, 2010) e resistência aumentada à fagocitose (ORNER *et al.*, 2019).

Recentemente, um estudo sobre a evolução da resistência aos antifúngicos ratificou que o *Cryptococcus* já exhibe resistência contra todas as classes de antifúngicos disponíveis, dificultando o manejo dos casos (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020). Em busca de alternativas para atenuar este problema, um estudo utilizou um modelo alternativo com *G. mellonella*, adequado

para doenças disseminadas pela corrente sanguínea (MAURER *et al.*, 2019), para entender se a atividade antifúngica do fluconazol poderia ser incrementada com a coadministração do anti-histamínico Astemizol. Nesse caso, a associação se mostrou superior (VU; GELLI, 2010)..

Embora haja um notável desafio devido à estreita relação evolutiva e sobreposição de perfis de citotoxicidade entre humanos e fungos (GEDDES-MCALISTER; SHAPIRO, 2019), o desenvolvimento de novos antifúngicos requer o conhecimento da contribuição dos possíveis alvos, os fatores de virulência, na patogênese da criptococose (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020).

Em 2021, em uma análise da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde, o Ministério da Saúde projetou que o esquema de tratamento de duas semanas para meningite criptocócica, com anfotericina B e flucitosina, de 2021 a 2025, custaria para o SUS cerca de R\$ 150.000.000,00 até o final do período. Esse dado ratifica a necessidade de otimização do tratamento, visto que os medicamentos existentes exibem diversos inconvenientes para os pacientes e geram custos muito altos ao SUS. Essas características corroboram sinergicamente para que haja concentração científica focada na prospecção e exploração de novas moléculas para, assim, locupletar as lacunas existentes na clínica, relacionadas ao tratamento da criptococose. Isso refletiria em novos medicamentos antifúngicos, com novos mecanismos de ação, maior espectro de atividade, menor tempo de tratamento e menos efeitos colaterais (KHONKARN *et al.*, 2015).

Moléculas naturais

O hábito de utilizar extratos de origem vegetal no tratamento ou prevenção de doenças remonta a tempos muito antigos. No contexto médico-farmacêutico, muitos pacientes estão em risco iminente de sofrerem consequências graves devido às infecções fúngicas. Isso prevê que haja uma união de esforços a fim de entender que os medicamentos antifúngicos disponíveis já não são capazes de acompanhar a velocidade de desenvolvimento e especialização dos mecanismos de resistência, justificando a exploração de novas alternativas, como as de origem vegetal (LIN, 2009; VINCHE *et al.*, 2020).

Derivados de produtos naturais tem o potencial de desempenhar um importante papel na pesquisa de desenvolvimento que conduz a descobertas no âmbito farmacêutico. Novos compostos farmacologicamente ativos oriundos de plantas medicinais são promissores para o tratamento de doenças fúngicas atuais (MEDEIROS *et al.*, 2020). Bioativos naturais encontrados em microrganismos marinhos, por exemplo, já estão sendo explorados (KELECOM, 2002). Além disso, o fomento de pesquisas em torno da variedade molecular de substâncias advindas de plantas é de grande interesse farmacêutico (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2013; RISHTON, 2008; YIĞIT *et al.*, 2009), tornando possível, por exemplo, o desenvolvimento de medicamentos a partir de isolados oriundos de quinina para malária, e o dicumarol, um anticoagulante (ACHAN *et al.*, 2011; PHILLIPSON, 1994; SUN *et al.*, 2020).

Trabalhos já identificaram plantas com atividade antimicrobiana advindas de extratos (SOUZA *et al.*, 2003), óleos essenciais (GIORDANI *et al.*, 2004), moléculas isoladas, como alcalóides (KLAUSMEYER *et al.*, 2004) e flavonoides (SOHN *et al.*, 2004), sendo assim, descritos como possíveis “incrementadores de antibióticos” ou “redutores de virulência” pela possibilidade de atuação sinérgica com medicamentos usuais (GONZÁLEZ-LAMOTHE *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2016).

Um triterpenóide, o ácido ursólico, foi estudado para uso em infecções criptocócicas e exibiu excelente eficácia antifúngica contra *C. neoformans*, através do aumento da permeabilidade de membrana celular devido ao seu rompimento, além da redução da espessura da cápsula polissacarídica e queda abrupta de melanina (WANG *et al.*, 2022). Outro estudo, com liriodenina, um alcalóide, mostrou atividade antifúngica contra *C. neoformans*, sugerindo danos ao RNA e à biossíntese de dopamina (VINCHE *et al.*, 2020). Triptantrinas se mostraram efetivas, através da interferência no ciclo celular e em vias de sinalização de *C. neoformans* (Lin *et al.*, 2020), assim como a *Eremophila alternifolia*, que demonstrou atividade anti criptocócica comparável à anfotericina B (HOSSAIN *et al.*, 2019).

As *N*-alquilamidas provenientes da *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (JANSEN, 1985) (sin. *Spilanthes acmella* var. *oleracea* (L.) Baker; *Spilanthes acmella* var. *oleracea* (L.) C.B. Clarke ex Hook. f. e bas. *Spilanthes oleracea* L.) (Figura 4) são usadas pela indústria farmacêutica e proporcionam uma ampla aplicabilidade em diversos segmentos (WYNENDAELE *et al.*, 2018). Entre as diferentes atividades, foi observado efeito antifúngico contra *Aspergillus niger*, *A.*

parasiticus, *Fusarium moniliformis* e *F. oxysporium* (RANI; MURTY, 2009). Nas infecções fúngicas oportunistas, foi observado efeito inibitório do extrato da planta inteira contra *Microsporium gypseum* e *C. neoformans* (PHONGPAICHIT et al., 2005), sugerindo que o espilantol seja um dos responsáveis pela ação antifúngica (NAKATANI; NAGASHIMA, 1992).



Figura 4. *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen. Fonte: Adobe Stock.

Popularmente conhecida como Jambu e pertencente à família Asteraceae, a *A. oleracea* é comumente encontrada na região norte do Brasil, onde é muito utilizada na culinária local por conferir sabor pungente e ação sialagoga a pratos típicos, tornando o seu uso popular (PAULRAJ; GOVINDARAJAN; PALPU, 2013). Além disso, essa planta é dotada de diversos componentes bioativos como triterpenos (KIM et al., 2018; RONDANELLI et al., 2020), cumarinas (PRACHAYASITTIKUL et al., 2009) e ácidos fenólicos (BELLUMORI et al., 2022; DUBEY et al., 2013; RAMSEWAK et al., 1999; SHARMA; ARUMUGAM, 2021). Um importante aspecto da *A. oleracea* é a diversidade de aplicabilidade do seu extrato e

seus isolados, abrangendo desde propósitos estéticos até doenças graves. No entanto, a ação de alguns isolados pode ser mais evidente e mais direcionada que os efeitos de outros isolados, o que poderia minimizar ou tornar insignificante a ação dos demais.

O composto mais potente da planta, o espilantol, isolado em 1945 pela extração da flor de *S. acmella* com etanol (EtOH) (GOKHALE; BHIDE, 1945), pode ser utilizado em cosméticos (ARTARIA *et al.*, 2011; SUT *et al.*, 2020), em tratamentos na cavidade bucal (DUBEY *et al.*, 2013; SUT *et al.*, 2020), assim como analgésico (RATNASOORIYA; PIERIS, 2005), diurético (GERBINO *et al.*, 2016; RATNASOORIYA *et al.*, 2004), antipirético e anestésico local (CHAKRABORTY *et al.*, 2010) e anti-inflamatório (STEIN *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2008). Além da atividade antifúngica (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2013; RANI; MURTY, 2009), também tem ação antimalárica (BAE *et al.*, 2010), anti-helmíntica (LALTHANPUII; LALCHHANDAMA, 2020), inseticida (JONDIKO, 1986; RAMSEWAK *et al.*, 1999) e larvicida (SHARMA; ARUMUGAM, 2021).

A atividade anti-inflamatória do espilantol foi explorada por um estudo que descreveu a interação de proteases pró-inflamatórias, postulando que esta molécula inibe enzimas, como a quimase e quimotripsina (STEIN *et al.*, 2021). Outro estudo demonstrou que o espilantol é capaz de permear a mucosa oral apresentar efeito tanto local quanto sistêmico (BOONEN *et al.*, 2010) e, o (2E,4E,8Z,10Z)-N-isobutil-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida (Figura 5), de estrutura semelhante ao espilantol, foi capaz de transpor a BHE (WOELKART *et al.*, 2009) e exercer efeito no SNC.

Os efeitos causados pelo espilantol, principalmente em alimentos e bebidas, levaram ao estabelecimento do consumo máximo diário de 24 µg a fim de garantir a segurança dos consumidores (EFSA, 2015). Embora apresente pouca toxicidade em estudos pré-clínicos, o uso do espilantol em concentrações maiores ainda não foi testado em ensaios clínicos, portanto, não há demonstração de segurança nesses casos (RIOS; OLIVO, 2014).

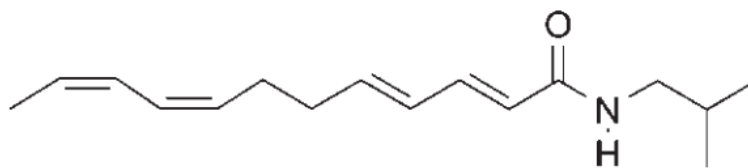


Figura 5: **Estrutura do (2E,4E,8Z,10Z)-N-isobutil-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida.**

Motivados pelo seu potencial efeito antifúngico em *C. neoformans* e pela tendência da indústria farmacêutica em prospectar novos fármacos a partir de biomoléculas naturais, isolamos o espilantol (2E, 6Z, 8E)-N_isobutilamida-2,6,8-decatrienamida (Figura 6), uma N-alquilamida, derivado de um extrato de *A. oleracea* (Jambu), encontrada na região norte brasileira, com atividade já descrita, recentemente, contra *C. albicans*, reduzindo a atividade metabólica da levedura, integridade da parede celular, rompimento da membrana celular, ligação ao ergosterol e extravasamento de nucleotídeos (FABRI *et al.*, 2021). Com a intenção de registro de patente, o grupo detém o nome dessa molécula em sigilo.

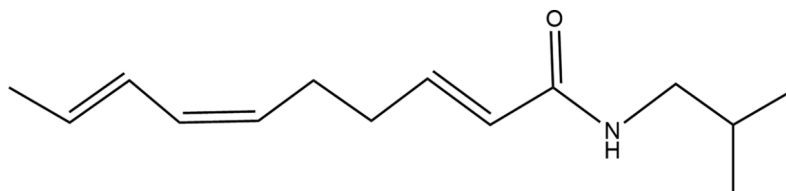


Figura 6: **Estrutura química do espilantol.** Também conhecida como “affinin” (V. Prachayasittikul *et al.* 2013), conta com uma amida e um acil graxo menos polar. Pode ser extraído com metanol, etanol ou hexano e purificado em HPLC. A molécula é uma N-alquilamida com um isobutil na cadeia lateral, $C_{14}H_{23}NO$ e massa molar 221,34 g/mol, com nome IUPAC (2E, 6Z, 8E)-N_isobutilamida-2,6,8-decatrienamida (MOLINA-TORRES *et al.*, 2004; PUBCHEM, 2021).

Sendo o espilantol um agente antifúngico, podemos prever que o seu mecanismo de ação pode agir através da inativação do fungo pelo bloqueio ou dano da estrutura e função de membranas e organelas, podendo interferir, ainda, na síntese de proteínas (JAGER; JAGER, 2014). Logo, há mecanismos e componentes que são sensíveis a alterações, e que podem ser preditos por análises moleculares e validados experimentalmente. Portanto, visando a compreender molecularmente

de que forma o spilanthol modifica a expressão de proteínas em *C. neoformans* e quais poderiam ser as perturbações causadas na a célula fúngica, a proteômica se mostra uma ferramenta importante para verificar a expressão de proteínas em um microorganismo (WASHBURN *et al.*, 2001).

A Proteômica

Baseada na espectrometria de massas, a proteômica abastece, de forma robusta e sensível, informações que permitam identificar proteínas e vias que são pertinentes para a análise da patogênese de um fungo e como ocorre a resposta imune do hospedeiro, pleiteando melhores estratégias de tratamento (BALL *et al.*, 2019). Essa ferramenta permite entender as diferenças na abundância de proteínas expressas em células, por exemplo, frente a uma situação específica, como a exposição a um agente antifúngico, e a quantificação de remodelamento celular durante a infecção e entre espécies patogênicas (AEBERSOLD; MANN, 2016).

A contribuição da proteômica em produções científicas sobre os mecanismos de virulência do *Cryptococcus* (MUSELIUS *et al.*, 2021; SANTI *et al.*, 2014) são relevantes para conduzir ao melhor alvo de tratamento ou como será a resposta a certos medicamentos (ZHU *et al.*, 2021). Assim, transpondo para este trabalho, a análise proteômica de *C. neoformans* traz detalhes do que aconteceu com a célula durante a exposição ao espilantol.

CAPÍTULO 1

O texto completo do capítulo 1, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 63– 122, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição da resposta a nível molecular do *Cryptococcus neoformans* frente a uma molécula com atividade antifúngica.

DISCUSSÃO

As complicações em pacientes imunocomprometidos infectados pelo *C. neoformans* estão relacionadas com diversos obstáculos que favorecem a progressão da infecção (MOLLOY *et al.*, 2017). Além disso, por ser uma doença negligenciada (ARMSTRONG-JAMES *et al.*, 2014; MOLLOY *et al.*, 2017), não há conscientização, informação ou prevenção de novos casos por parte das autoridades de saúde pública (ALMEIDA-APOLONIO *et al.*, 2018). Embora exista um protocolo de tratamento, apenas duas drogas estão disponíveis no Brasil: o fluconazol, que sucumbe à heterorresistência (VARMA; KWON-CHUNG, 2010) e a anfotericina B, que apresenta toxicidade (COELHO; CASADEVALL, 2016; LANIADO-LABORÍN; CABRALES-VARGAS, 2009).

O elevado número de casos, agravado pela crise de antifúngicos disponíveis, expõe a necessidade urgente de busca de alternativas. O uso de plantas medicinais é cada vez mais promissor, sendo uma alternativa aos tratamentos que vigoram na indústria farmacêutica atual (D'AGOSTINO *et al.*, 2019; KUMARI *et al.*, 2017). Aqui, descrevemos a atividade antifúngica do espilantol e seu efeito, a nível molecular, usando uma abordagem proteômica. A *A. oleracea*, planta que contém o espilantol, teve o seu potencial testado e comprovado para o desenvolvimento de fármacos devido a sua composição com alto valor terapêutico (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2009). A identificação de proteínas impactadas permite estudar, detalhadamente, o mecanismo de ação dessa molécula e a proposição de novos alvos.

Atividade antifúngica do espilantol - MIC

Já havíamos identificado anteriormente o extrato hexânico com atividade antifúngica, e sua molécula isolada, o espilantol. O extrato bruto hexânico de *A. oleracea* contém vários compostos que foram extraídos das inflorescências, folhas e caules, sendo o espilantol a molécula majoritária (RODRIGUES *et al.*, 2023; YUSUDA *et al.*, 1980). Conforme previamente observado por bioautografia, apenas o espilantol apresentou atividade antifúngica (dados não apresentados).

O valor da CIM do espilantol de 500 µg/mL é fungistática e o extrato hexânico, 2,5 vezes maior, é fungicida. Recentemente, o espilantol foi avaliado *in vivo* e *in vitro* para o tratamento de *C. albicans*, apresentando uma CIM de 200 µg/mL (FABRI *et al.*, 2021). Outras sete alquilamidas com atividade antifúngica contra *Saccharomyces*

cerevisiae foram avaliadas, exibindo CIM variando de 170 a 890 $\mu\text{g/mL}$ (CRUZ *et al.*, 2014). Curiosamente, as alquilamidas Alk2b e Alk3a causaram ruptura da parede celular (valores CIM entre 170 a 590 $\mu\text{g/mL}$).

Análise proteômica

A caracterização proteômica mostrou o comportamento de *C. neoformans* quando exposto ao espilantol. A análise identificou um total de 2141 proteínas, sendo 1935 proteínas comuns a ambas condições. Dentre estas, 171 proteínas foram consideradas diferencialmente reguladas, 145 (6,77%) proteínas foram identificadas exclusivamente em células expostas ao espilantol e 61 (2,85%) proteínas no controle. Das 171 proteínas reguladas diferencialmente, o valor positivo de *fold-change* (FC) indica 100 proteínas reguladas positivamente e o valor negativo de FC mostra 71 proteínas reguladas negativamente. Isso torna possível identificar os alvos com base no mecanismo de ação dessa molécula e propor o alvo para desenvolvimento de novos medicamentos (BLUM *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2021).

Classificação da ontologia genética

A categorização da ontologia gênica das proteínas, de acordo com os processos biológicos (BP) e funções moleculares (MF), mostrou diminuição da expressão de proteínas relacionadas ao processo metabólico de carboidratos, processo de modificação de proteínas, processo metabólico e transporte de aminoácidos celulares, e também o aumento da expressão de proteínas relacionadas ao transporte transmembrana, organização mitocondrial e processo metabólico de proteínas podem predizer que o tratamento de células criptocócicas ao espilantol compõem um cenário de exposição a agente químico nocivo que induz vulnerabilidade e toxicidade (DEL POETA, 2004), com alterações metabólicas e/ou moleculares (SEIDER *et al.*, 2010) para contornar o efeito antifúngico do espilantol.

Espilantol impacta a síntese de energia em *C. neoformans*

A proteína mais regulada positivamente foi a *Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit β* (J9VJC0) (+3,86 *fold*). Essa proteína possui atividade oxidorreductase e está envolvida no metabolismo do piruvato, favorecendo o fornecimento de energia ao fungo (KOIVURANTA *et al.*, 2018). Curiosamente, a proteína mais regulada negativamente foi a *urate oxidase* (J9VS03) (-5,016 *fold*) que participa da produção de cápsula e urease através do catabolismo do ácido úrico em *C. neoformans* (LEE *et al.*, 2013). No complexo I da cadeia transportadora de elétrons, a *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 5* (J9W0I3) (+2,465 *fold*), (assim como as *subcomplex 2* (J9VWL5); *Fe-S protein 4* (J9VVE1) e a *subcomplex 6* (J9VJC3)), são cruciais para a respiração celular em fungos (KIM *et al.*, 2013). O aumento da expressão dessas proteínas pode afetar a produção de ATP (BÜSCHGES *et al.*, 1994; CHANG; DOERING, 2018; HORIANOPOULOS *et al.*, 2020; MERRYMAN *et al.*, 2020).

Algumas proteínas foram exclusivamente identificadas no controle, como a *NADH kinase* (T2BLV3) e *sarcosine oxidase* (J9VRS5). O acúmulo de sarcosina diminui a disponibilidade de glicina e pode causar mudanças no metabolismo energético celular (SÁ *et al.*, 2017). Assim, a função antifúngica do espilantol parece afetar a atividade dessas enzimas e, conforme descrito anteriormente, alterar a funcionalidade de cadeia transportadora de elétrons (KIM *et al.*, 2013), sugerindo impacto na produção de ATP.

O espilantol desregula importantes fatores de virulência de *C. neoformans*

A busca por moléculas que inibam os fatores de virulência é uma estratégia atraente, pois espera-se diminuir a pressão evolutiva para o desenvolvimento de resistência a drogas (LI *et al.*, 2019). Aqui, de acordo com a análise proteômica, o espilantol parece interferir com, pelo menos, três fatores de virulência bem conhecidos do *C. neoformans*: cápsula, urease e melanina.

A formação da cápsula parece ser afetada pelo tratamento com espilantol. A *calnexin* (J9VLH0) (+2.102 *fold*) pode exercer uma ação positiva na síntese da cápsula para proteger a célula de danos externos (FOLORUNSO; SEBOLAI, 2023;

HORIANOPOULOS *et al.*, 2021; TREVIJANO-CONTADOR *et al.*, 2018), assim como a *alpha-mannosidase* (J9VMA8), que também atua na maquinaria responsável pela arquitetura capsular, controlando a interação entre as células e o hospedeiro durante a infecção, diminuindo a fagocitose e prejudicando a resposta imune (ALMEIDA *et al.*, 2015; MACEKOVÁ *et al.*, 2006). Além disso, a proteína *myo-inositol 2-dehydrogenase* (J9VWA5), relacionada à estrutura da cápsula e a *Ran GTPase activated protein 1* (J9VNF9), relacionada à produção de melanina e biossíntese da parede celular (MACKENZIE; KLIG, 2008; WANG *et al.*, 2021; XUE, 2012), foram exclusivamente identificadas na amostra tratada com espilantol. Juntas, essas proteínas revelam impactos na cápsula e na integridade da célula.

No entanto, a diminuição da proteína *1,3-beta-glucan synthase component FKS1* (O93927) (-2.053 *fold*) pode induzir um efeito negativo na cápsula, uma vez que seu envolvimento na síntese de β -glucana é fundamental para a composição da parede celular (FELDMESSER *et al.*, 2000) e já foi demonstrado que a inibição desta proteína culmina na morte da célula fúngica (MALIGIE; SELITRENNIKOFF, 2005). Assim, mesmo havendo uma regulação positiva de proteínas relacionadas à cápsula, sem uma estrutura de parede celular consolidada, a cápsula pode enfrentar dificuldades para fixar-se. Portanto, o efeito do espilantol na cápsula requer uma avaliação mais aprofundada.

Para avaliar experimentalmente se o espilantol provoca alterações na integridade da membrana, o ensaio de extravasamento, durante as 4h de tratamento, mostrou um aumento variando entre 1,7 a 2,75 vezes maior, quando comparado ao controle (não tratado). Esse efeito é ratificado pelo nosso resultado de diminuição da quantidade de ergosterol na célula fúngica, ao longo de 20h de tratamento com espilantol. Há relatos anteriores de danos provocados pelo espilantol à membrana celular em *C. albicans* (FABRI *et al.*, 2021), reduzindo a taxa de crescimento, quando comparado ao controle, corroborando nossa análise. Recentemente, derivados de quinolina apresentaram efeitos semelhantes contra *Candida* spp. e dermatófitos (PIPPI *et al.*, 2019). Portanto, podemos sugerir que a membrana fúngica é um possível local de ação do espilantol, provavelmente causando uma diminuição no teor de ergosterol.

A *urease* (O13465) (-2,75 *fold*), um importante fator de virulência que é essencial para a difusão do fungo no SNC do hospedeiro (FU *et al.*, 2018), foi regulada negativamente durante a exposição ao espilantol. Um ensaio enzimático foi

realizado para atestar este dado e, como esperado, observamos uma diminuição da atividade da urease ao longo das 6h de tratamento, diminuindo quase 5 e 2 vezes nas células expostas ao espilantol em 4 e 6h, respectivamente, quando comparadas ao controle (não tratado).

A atividade do espilantol contra fatores de virulência, como a urease, é muito atrativa, uma vez que esta molécula pode ser utilizada isoladamente ou em associação com antifúngicos comumente utilizados no tratamento da infecção criptocócica. Pelo fato de que esta enzima não é encontrada em humanos, a urease torna-se um bom alvo terapêutico (RUTHERFORD, 2014). Essa característica já foi sugerida em um derivado 9a da Sampangina, com efeito antifúngico, no qual a substância foi capaz de permear a barreira hematoencefálica (BHE) em modelo murino, inibindo a urease e a melanina e, assim, reduzir a carga fúngica cerebral (LI *et al.*, 2019).

O espilantol prejudica as proteínas de resposta ao estresse

A expressão de proteínas que afetam a resposta ao estresse do fungo parece desempenhar um papel importante no efeito antifúngico do espilantol. Várias proteínas com atividade oxidoredutase e/ou envolvidas na resposta EROs foram identificadas: *thioredoxin* (J9VWM2), *glutathione S-transferases* (J9VZJ8), *catalases* (J9VH55, J9VJW0 e J9VLB9), *succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP+)* (J9VTS1) e *alcohol dehydrogenase, propanol-preferring* (J9VUE6).

Outras proteínas com atividade oxidoredutase foram reguladas positivamente, e incluíram a *isocitrate dehydrogenase NAD-dependent* (J9VXW3) (+3,26 *fold*), que catalisa a formação de α -cetoglutarato a partir do isocitrato, permitindo a compartimentalização da produção de NADPH (BROWN *et al.*, 2010; CONTRERAS-SHANNON; MCALISTER-HENN, 2004) que, na presença da catalase, poderia neutralizar as EROs (GILES *et al.*, 2006), e a *thioredoxin reductase* (J9VRX9) (+2.122 *fold*), que confere proteção contra o estresse oxidativo e tem sido descrita como alvo antifúngico, uma vez que o gene *trr1* que codifica essa proteína é presente apenas em patógenos fúngicos e ausente em humanos, diminuindo as chances de toxicidade (ABADIO *et al.*, 2011; CAPOCI *et al.*, 2019).

A via do metabolismo da cisteína e metionina mostra relevância na síntese de glutatona em *C. neoformans*, uma vez que a glutatona protege a célula contra o

estresse oxidativo. Com a identificação de algumas proteínas reguladas negativamente nesta via, pode-se sugerir a indução de dano de membrana e aumento de ROS, diminuindo a virulência do fungo e sua capacidade de sobrevivência (GAI *et al.*, 2021)

A cisteína é um precursor do ácido pantotênico, essencial para a síntese da coenzima A que, se pouco disponível, reduz a virulência fúngica (DIETL *et al.*, 2018; HOMMEL *et al.*, 2019). Portanto, a depleção de glutathione reforça a condição de estresse imposta pelo espilantol. Esses resultados também sugerem que as células podem estar expostas ao aumento das EROs pelo Spilanthol, da mesma forma que estão alterando o metabolismo, como observado anteriormente em *A. fumigatus*, quando exposto a antifúngicos comuns (SHEKHOVA *et al.*, 2017) e em leveduras e protozoários submetidos à ação da artemisinina (WANG *et al.*, 2010).

Os danos ainda podem refletir no acúmulo de H₂O₂. Esse processo pode levar à apoptose, conforme relatado anteriormente em *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *C. gatti* (BELENKY *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2013; GUIRAO-ABAD *et al.*, 2017; MESA-ARANGO *et al.*, 2014; SANGALLI-LEITE *et al.*, 2011) e danos à membrana por peroxidação lipídica, destruindo a arquitetura da membrana (SHEKHOVA *et al.*, 2017). Nossos resultados, somados aos achados anteriores, suportam nossa sugestão de que o espilantol pode induzir estresse oxidativo e prejudicar as funções mitocondriais em *C. neoformans*.

Análise de vias KEGG

A regulação da homeostase celular envolve um intrincado equilíbrio entre proteínas e vias para manter a função celular adequada e, assim, retardar ou prevenir danos e morte celular. Uma proteína pode ser regulada positivamente em uma parte da via e pode compensar outra proteína regulada negativamente. Isso denota expressão diferencial para atingir um certo nível de homeostase.

A análise das vias metabólicas KEGG foi fundamental para identificar alterações no metabolismo causadas pelo espilantol. Identificamos 38 vias com proteínas alteradas, sendo 10 comuns em ambos os tratamentos. Notavelmente, as vias envolvidas no metabolismo de aminoácidos representaram o maior número, com 11 reguladas negativamente e uma regulada positivamente (biossíntese de valina, leucina e isoleucina).

A regulação da homeostase celular envolve um intrincado equilíbrio entre proteínas e vias para manter a função celular adequada e, assim, retardar ou prevenir danos e morte celular. Uma proteína pode ser regulada positivamente em uma parte da via e pode compensar outra proteína regulada negativamente. Isso denota expressão diferencial para atingir um certo nível de homeostase.

A análise das vias metabólicas KEGG foi fundamental para identificar alterações no metabolismo causadas pelo espilantol. Identificamos 38 vias com proteínas alteradas, sendo 10 comuns em ambos os tratamentos. Notavelmente, as vias envolvidas no metabolismo de aminoácidos representaram o maior número, com 11 reguladas negativamente e uma regulada positivamente (biossíntese de valina, leucina e isoleucina).

Na via de biossíntese e degradação da lisina, algumas proteínas como *ARO8*, *pyridoxal-phosphate* e *L-pipecolate oxidase* são reguladas negativamente. Conforme já descrito, esta via é decisiva para o crescimento e sobrevivência de *C. neoformans* (DE GONTIJO *et al.*, 2014; NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2012; ZABRISKIE; JACKSON, 2000) e o comportamento dessas proteínas diminui a disponibilidade de precursores energéticos e a formação capsular (BAHN; JUNG, 2013; JIN *et al.*, 2020). Portanto, a diminuição da expressão dessas proteínas pela exposição ao espilantol parece reduzir o aporte energético e a virulência do fungo.

A redução de serina e glicina leva a um declínio no metabolismo do piruvato, gerando um acúmulo de metilglioxal, um subproduto da glicólise, altamente glicante e precursor de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que exercem um efeito deletério na célula (CHRISTGEN; BECKER, 2019; DAS *et al.*, 2021; FOLORUNSO; SEBOLAI, 2023; GAI *et al.*, 2019). Em *Schizosaccharomyces pombe*, o metilglioxal mostrou a capacidade de ativar a cascata de sinalização da proteína quinase ativada por estresse (TAKATSUME *et al.*, 2006) e já foi demonstrado que seu acúmulo em bactérias prejudica seu crescimento e culmina na parada do ciclo celular (CHOI *et al.*, 2008). O mesmo poderia ser sugerido para *C. neoformans*, pois há acúmulo de metilglioxal e piruvato reduzido. O comportamento dessas proteínas durante a exposição ao espilantol parece ser uma tentativa do fungo de se reorganizar morfológicamente para sobreviver às ameaças iminentes.

Em geral, observamos alterações que corroboram uma investigação anterior que descreveu os efeitos da anfotericina B sobre o *C. neoformans* (SANGALLI-LEITE *et al.*, 2011). Há indícios de que está ocorrendo uma sequência

de eventos na célula criptocócica, submetida ao espilantol, que começa com uma diminuição gradual da atividade metabólica antes de perder efetivamente a integridade da membrana. Além disso, a concentração de EROs pode favorecer o ambiente necessário para danos à membrana, como peroxidação lipídica e, em última análise, possível abertura de poros.

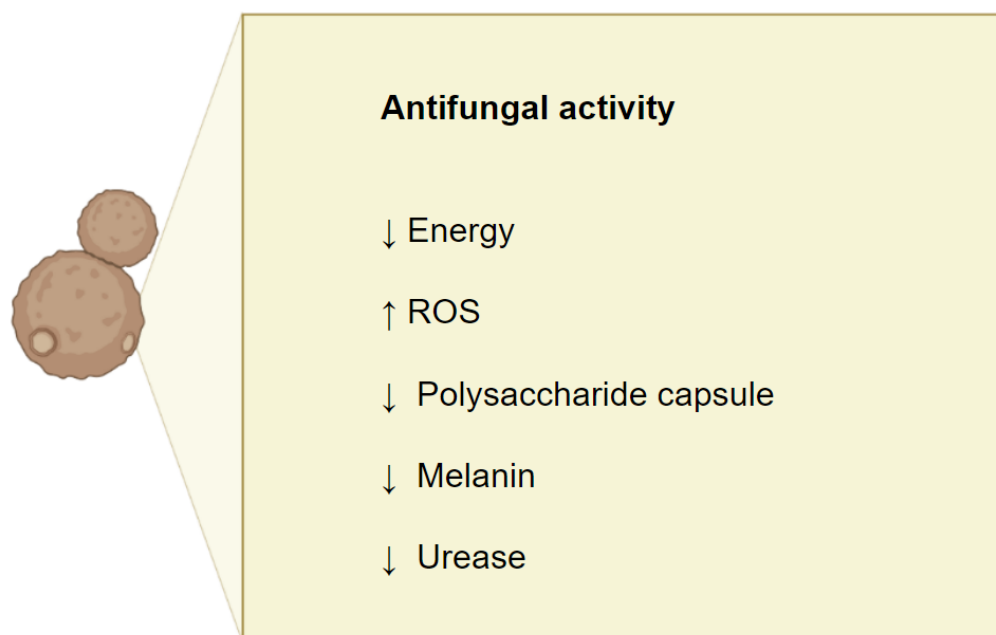


Figura 6: **Possível mecanismo de ação do espilantol.** Com o acúmulo de ROS, redução de energia e fatores de virulência, a célula fúngica apresenta dificuldades e incapacidade de controlar a ação de substâncias tóxicas.

CONCLUSÃO

A análise proteômica de células de *C. neoformans* expostas à molécula bioativa espilantol identificou alterações nas estruturas que envolvem a célula, confirmado experimentalmente por extravasamento celular e diminuição de ergosterol, bem como na redução da atividade de urease, importante fator de virulência da levedura. Além disso, a redução da melanina também corrobora com a hipótese de dano estrutural. A alteração de proteínas no ciclo do citrato, como a redução do piruvato, parece causar uma redução de energia, na forma de ATP e acúmulo de ROS. O aparente acúmulo de acetil-CoA pode indicar que o piruvato está sendo esgotado, prejudicando a produção de energia no ciclo do TCA. Isso abre um caminho promissor para o estabelecimento de novas alternativas e alvos para o tratamento da criptococose.

REFERÊNCIAS

ABADIO, A. K. R.; KIOSHIMA, E. S.; TEIXEIRA, M. M.; MARTINS, N. F.; MAIGRET, B.; FELIPE, M. S. S. Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. **BMC genomics**, v. 12, p. 75, 27 jan. 2011.

ACHAN, J.; TALISUNA, A. O.; ERHART, A.; YEKA, A.; TIBENDERANA, J. K.; BALIRAINÉ, F. N.; ROSENTHAL, P. J.; D'ALESSANDRO, U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria journal**, v. 10, p. 144, 24 maio 2011.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 347–355, 15 set. 2016.

ALDEN, K. M.; JEZEWSKI, A. J.; BEATTIE, S. R.; FOX, D., 3rd; KRYSAN, D. J. Genetic Interaction Analysis Reveals that *Cryptococcus neoformans* Utilizes Multiple Acetyl-CoA-Generating Pathways during Infection. **mBio**, v. 13, n. 4, p. e0127922, 30 ago. 2022.

ALLER, A. I.; MARTIN-MAZUELOS, E.; LOZANO, F.; GOMEZ-MATEOS, J.; STEELE-MOORE, L.; HOLLOWAY, W. J.; GUTIÉRREZ, M. J.; RECIO, F. J.; ESPINEL-INGROFF, A. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1544–1548, jun. 2000.

ALMEIDA-APOLONIO, A. A.; CUPOZAK-PINHEIRO, W. J.; BERRES, V. M.; DANTAS, F. G. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; OLIVEIRA, K. M. P.; CHANG, M. R. Control of *Cryptococcus Gattii* Biofilms by an Ethanolic Extract of *Cochlospermum Regium* (Schrank) Pilger Leaves. **TheScientificWorldJournal**, v. 2018, p. 5764187, 6 jun. 2018.

ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 14, n. 12, p. 1173–1185, dez. 2015.

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 78, p. 55–58, maio 2015.

ARAUJO, G. DE S. *et al.* Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e29561, 12 jan. 2012.

ARMSTRONG-JAMES, D.; MEINTJES, G.; BROWN, G. D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 3, p. 120–127, mar. 2014.

ARRAS, S. D. M.; CHITTY, J. L.; WIZRAH, M. S. I.; ERPF, P. E.; SCHULZ, B. L.; TANURDZIC, M.; FRASER, J. A. Sirtuins in the phylum Basidiomycota: A role in virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Scientific reports**, v. 7, p. 46567, 21 abr. 2017.

ARTARIA, C.; MARAMALDI, G.; BONFIGLI, A.; RIGANO, L.; APPENDINO, G. Lifting

properties of the alkamide fraction from the fruit husks of *Zanthoxylum bungeanum*. **International journal of cosmetic science**, v. 33, n. 4, p. 328–333, ago. 2011.

ASHLEY, E. D. Antifungal Drugs: Special Problems Treating Central Nervous System Infections. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 5, n. 4, 11 out. 2019.

BAE, S. S.; EHRMANN, B. M.; ETTEFAGH, K. A. A validated liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. **Phytochemical analysis: PCA**, 2010.

BAHN, Y.-S.; JUNG, K.-W. Stress signaling pathways for the pathogenicity of *Cryptococcus*. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 12, p. 1564–1577, dez. 2013.

BAHN, Y.-S.; KOJIMA, K.; COX, G. M.; HEITMAN, J. A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular biology of the cell**, v. 17, n. 7, p. 3122–3135, jul. 2006.

BAKER, L. G.; SPECHT, C. A.; DONLIN, M. J.; LODGE, J. K. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 5, p. 855–867, maio 2007.

BALL, B.; BERMAS, A.; CARRUTHERS-LAY, D.; GEDDES-MCALISTER, J. Mass Spectrometry-Based Proteomics of Fungal Pathogenesis, Host-Fungal Interactions, and Antifungal Development. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 5, n. 2, 17 jun. 2019.

BASSO, L. R., Jr; GAST, C. E.; BRUZUAL, I.; WONG, B. Identification and properties of plasma membrane azole efflux pumps from the pathogenic fungi *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 70, n. 5, p. 1396–1407, maio 2015.

BELENKY, P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J. J. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. **Cell reports**, v. 3, n. 2, p. 350–358, 21 fev. 2013.

BELLUMORI, M.; ZONFRILLO, B.; MAGGINI, V.; BOGANI, P.; GALLO, E.; FIRENZUOLI, F.; MULINACCI, N.; INNOCENTI, M. *Acemella oleracea* (L.) R.K. Jansen: Alkylamides and phenolic compounds in aerial parts and roots of in vitro seedlings. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 220, p. 114991, 25 out. 2022.

BENHAM, R. W. Cryptococcosis and blastomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 50, n. 10, p. 1299–1314, set. 1950.

BENNETT, J. E. *et al.* A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. **The New England journal of medicine**, v. 301, n. 3, p. 126–131, 19 jul. 1979.

BERMAS, A.; GEDDES-MCALISTER, J. Combatting the evolution of antifungal

resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 114, n. 5, p. 721–734, nov. 2020.

BHATTACHARYA, S.; BOUKLAS, T.; FRIES, B. C. Replicative Aging in Pathogenic Fungi. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 1, 25 dez. 2020.

BHATTACHARYA, S.; ESQUIVEL, B. D.; WHITE, T. C. Overexpression or Deletion of Ergosterol Biosynthesis Genes Alters Doubling Time, Response to Stress Agents, and Drug Susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. **mBio**, v. 9, n. 4, 24 jul. 2018.

BHATTACHARYA, S.; OLIVEIRA, N. K.; SAVITT, A. G.; SILVA, V. K. A.; KRAUSERT, R. B.; GHEBREHIWET, B.; FRIES, B. C. Low Glucose Mediated Fluconazole Tolerance in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 6, 18 jun. 2021.

BICANIC, T.; HARRISON, T.; NIEPIEKLO, A.; DYAKOPU, N.; MEINTJES, G. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 43, n. 8, p. 1069–1073, 15 out. 2006.

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

BLOOM, A. L. M.; SOLOMONS, J. T. G.; HAVEL, V. E.; PANEPINTO, J. C. Uncoupling of mRNA synthesis and degradation impairs adaptation to host temperature in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 89, n. 1, p. 65–83, jul. 2013.

BLUM, B. C.; MOUSAVI, F.; EMILI, A. Single-platform “multi-omic” profiling: unified mass spectrometry and computational workflows for integrative proteomics-metabolomics analysis. **Molecular omics**, v. 14, n. 5, p. 307–319, 8 out. 2018.

BONGOMIN, F.; OLADELE, R. O.; GAGO, S.; MOORE, C. B.; RICHARDSON, M. D. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, v. 61, n. 5, p. 290–297, maio 2018.

BOONEN, J.; BAERT, B.; BURVENICH, C.; BLONDEEL, P.; DE SAEGER, S.; DE SPIEGELEER, B. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 53, n. 3, p. 243–249, 2 nov. 2010.

BORBA, H. H. L.; STEIMBACH, L. M.; RIVEROS, B. S.; TONIN, F. S.; FERREIRA, V. L.; BAGATIM, B. A. DE Q.; BALAN, G.; PONTAROLO, R.; WIENS, A. Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. **Mycoses**, v. 61, n. 10, p. 754–763, out. 2018.

BOSE, I.; REESE, A. J.; ORY, J. J.; JANBON, G.; DOERING, T. L. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 4, p.

655–663, ago. 2003.

BROWN, S. M.; CAMPBELL, L. T.; LODGE, J. K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 4, p. 320–325, ago. 2007.

BROWN, S. M.; UPADHYA, R.; SHOEMAKER, J. D.; LODGE, J. K. Isocitrate dehydrogenase is important for nitrosative stress resistance in *Cryptococcus neoformans*, but oxidative stress resistance is not dependent on glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 6, p. 971–980, jun. 2010.

BÜSCHGES, R.; BAHRENBERG, G.; ZIMMERMANN, M.; WOLF, K. NADH: ubiquinone oxidoreductase in obligate aerobic yeasts. **Yeast**, v. 10, n. 4, p. 475–479, abr. 1994.

CALLAHAN, B. P.; YUAN, Y.; WOLFENDEN, R. The burden borne by urease. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 31, p. 10828–10829, 10 ago. 2005.

CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; BARET, P. V.; KENIYA, M. V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A.; MONK, B. C. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 2, p. 291–321, Table of Contents, abr. 2009.

CAPOCI, I. R. G.; FARIA, D. R.; SAKITA, K. M.; RODRIGUES-VENDRAMINI, F. A. V.; BONFIM-MENDONÇA, P. DE S.; BECKER, T. C. A.; KIOSHIMA, É. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; MAIGRET, B. Repurposing approach identifies new treatment options for invasive fungal disease. **Bioorganic chemistry**, v. 84, p. 87–97, mar. 2019.

CASADEVALL, A.; COELHO, C.; CORDERO, R. J. B.; DRAGOTAKES, Q.; JUNG, E.; VIJ, R.; WEAR, M. P. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 822–831, dez. 2019.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L.-A. Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 12, p. 2169–2174, dez. 2007.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Current opinion in microbiology**, v. 3, n. 4, p. 354–358, ago. 2000.

CERIKÇIOĞLU, N. [Mating types, sexual reproduction and ploidy in fungi: effects on virulence]. **Mikrobiyoloji bulteni**, v. 43, n. 3, p. 507–513, jul. 2009.

CHABRIER-ROSELLÓ, Y.; GERIK, K. J.; KOSELYNY, K.; DIDONE, L.; LODGE, J. K.; KRYSAN, D. J. *Cryptococcus neoformans* phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) ortholog is required for stress tolerance and survival in murine phagocytes. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 1, p. 12–22, jan. 2013.

CHAKRABORTY, A.; DEVI, B. R. K.; SANJEBAM, R.; KHUMBONG, S.; THOKCHOM, I. S. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. **Indian journal of pharmacology**, v. 42, n. 5, p. 277–279, out. 2010.

CHANETON, B. *et al.* Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. **Nature**, v. 491, n. 7424, p. 458–462, 15 nov. 2012.

CHANG, A. L.; DOERING, T. L. Maintenance of Mitochondrial Morphology in *Cryptococcus neoformans* Is Critical for Stress Resistance and Virulence. **mBio**, v. 9, n. 6, 6 nov. 2018.

CHANG, Y. C.; BIEN, C. M.; LEE, H.; ESPENSHADE, P. J.; KWON-CHUNG, K. J. Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 64, n. 3, p. 614–629, maio 2007.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 7, p. 4912–4919, jul. 1994.

CHANG, Y. C.; STINS, M. F.; MCCAFFERY, M. J.; MILLER, G. F.; PARE, D. R.; DAM, T.; PAUL-SATYASEELA, M.; KIM, K. S.; KWON-CHUNG, K. J. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 4985–4995, set. 2004.

CHASKES, S.; CAMMER, M.; NIEVES, E.; CASADEVALL, A. Pigment production on L-tryptophan medium by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. **PLoS one**, v. 9, n. 4, p. e91901, 15 abr. 2014.

CHAYAKULKEEREE, M. *et al.* SEC14 is a specific requirement for secretion of phospholipase B1 and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1088–1101, maio 2011.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 507–44, v–vi, set. 2006.

CHAYAKULKEEREE, M.; RUDE, T. H.; TOFFALETTI, D. L.; PERFECT, J. R. Fatty acid synthesis is essential for survival of *Cryptococcus neoformans* and a potential fungicidal target. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3537–3545, out. 2007.

CHEN, S. C.; WRIGHT, L. C.; GOLDING, J. C.; SORRELL, T. C. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochemical Journal**, v. 347, n. Pt 2, p. 431–439, 15 abr. 2000.

CHEN, S. C.; WRIGHT, L. C.; SANTANGELO, R. T.; MULLER, M.; MORAN, V. R.;

KUCHEL, P. W.; SORRELL, T. C. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 65, n. 2, p. 405–411, fev. 1997.

CHEN, S.; SORRELL, T.; NIMMO, G.; SPEED, B.; CURRIE, B.; ELLIS, D.; MARRIOTT, D.; PFEIFFER, T.; PARR, D.; BYTH, K. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31, n. 2, p. 499–508, ago. 2000.

CHEONG, J. W. S.; MCCORMACK, J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 51, n. 3, p. 261–269, abr. 2013.

CHOI, C.-H.; PARK, S.-J.; JEONG, S.-Y.; YIM, H.-S.; KANG, S.-O. Methylglyoxal accumulation by glutathione depletion leads to cell cycle arrest in *Dictyostelium*. **Molecular microbiology**, v. 70, n. 5, p. 1293–1304, dez. 2008.

CHOW, E. W. L.; CLANCEY, S. A.; BILLMYRE, R. B.; AVERETTE, A. F.; GRANER, J. A.; MIECZKOWSKI, P.; CARDENAS, M. E.; HEITMAN, J. Elucidation of the calcineurin-Crz1 stress response transcriptional network in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS genetics**, v. 13, n. 4, p. e1006667, abr. 2017.

CHRISMAN, C. J.; ALBUQUERQUE, P.; GUIMARAES, A. J.; NIEVES, E.; CASADEVALL, A. Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002047, maio 2011.

CHRISTGEN, S. L.; BECKER, D. F. Role of Proline in Pathogen and Host Interactions. **Antioxidants & redox signaling**, v. 30, n. 4, p. 683–709, 1 fev. 2019.

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

CONTRERAS-SHANNON, V.; MCALISTER-HENN, L. Influence of compartmental localization on the function of yeast NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenases. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 423, n. 2, p. 235–246, 15 mar. 2004.

COORDINATION, G.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; ORGANIZATION, W. H.; ORGANIZATION, W. H.; OTHERS. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. 2022.

CORDERO, R. J. B.; PONTES, B.; GUIMARÃES, A. J.; MARTINEZ, L. R.; RIVERA, J.; FRIES, B. C.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; VIANA, N. B.; CASADEVALL, A. Chronological aging is associated with biophysical and chemical changes in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 79,

n. 12, p. 4990–5000, dez. 2011.

COX, G. M.; HARRISON, T. S.; MCDADE, H. C.; TABORDA, C. P.; HEINRICH, G.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infection and immunity**, v. 71, n. 1, p. 173–180, jan. 2003.

COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; LEIDICH, S. D.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 39, n. 1, p. 166–175, jan. 2001.

COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and immunity**, v. 68, n. 2, p. 443–448, fev. 2000.

CRUZ, I.; CHEETHAM, J. J.; ARNASON, J. T.; YACK, J. E.; SMITH, M. L. Alkamides from Echinacea disrupt the fungal cell wall-membrane complex. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 21, n. 4, p. 435–442, 15 mar. 2014.

CRUZ, M. C.; FOX, D. S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. **The EMBO journal**, v. 20, n. 5, p. 1020–1032, 1 mar. 2001.

CUI, G.; HUANG, C.; BI, X.; WANG, Y.; YIN, K.; ZHU, L.; JIANG, Z.; CHEN, B.; DENG, Y. Z. Aminotransferase SsAro8 Regulates Tryptophan Metabolism Essential for Filamentous Growth of Sugarcane Smut Fungus *Sporisorium scitamineum*. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 4, p. e0057022, 31 ago. 2022.

D'AGOSTINO, M.; TESSE, N.; FRIPPIAT, J. P.; MACHOUART, M.; DEBOURGOGNE, A. Essential Oils and Their Natural Active Compounds Presenting Antifungal Properties. **Molecules**, v. 24, n. 20, 15 out. 2019.

DALLASTA, L. M.; PISAROV, L. A.; ESPLIN, J. E.; WERLEY, J. V.; MOSES, A. V.; NELSON, J. A.; ACHIM, C. L. Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. **The American journal of pathology**, v. 155, n. 6, p. 1915–1927, dez. 1999.

DAS, M.; DEWAN, A.; SHEE, S.; SINGH, A. The Multifaceted Bacterial Cysteine Desulfurases: From Metabolism to Pathogenesis. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 7, 23 jun. 2021.

DATTA, K.; PIROFSKI, L.-A. Towards a vaccine for *Cryptococcus neoformans*: principles and caveats. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 4, p. 525–536, jun. 2006.

DE LEON-RODRIGUEZ, C. M.; ROSSI, D. C. P.; FU, M. S.; DRAGOTAKES, Q.; COELHO, C.; GUERRERO ROS, I.; CABALLERO, B.; NOLAN, S. J.; CASADEVALL, A. The Outcome of the *Cryptococcus neoformans*-Macrophage Interaction Depends

on Phagolysosomal Membrane Integrity. **Journal of immunology** , v. 201, n. 2, p. 583–603, 15 jul. 2018.

DEL POETA, M. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 3, n. 5, p. 1067–1075, out. 2004.

DEL SORBO, G.; SCHOONBEEK, H.; DE WAARD, M. A. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 30, n. 1, p. 1–15, jun. 2000.

DIETL, A.-M.; MEIR, Z.; SHADKCHAN, Y.; OSHEROV, N.; HAAS, H. Riboflavin and pantothenic acid biosynthesis are crucial for iron homeostasis and virulence in the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 1036–1049, 2018.

DING, H.; MAYER, F. L.; SÁNCHEZ-LEÓN, E.; S ARAÚJO, G. R. DE; FRASES, S.; KRONSTAD, J. W. Networks of fibers and factors: regulation of capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. **F1000Research**, v. 5, 22 jul. 2016.

DIXIT, A.; CARROLL, S. F.; QURESHI, S. T. *Cryptococcus gattii*: An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2009, p. 840452, 25 maio 2009.

DOERING, T. L. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 223–247, 2009.

DRIVER, J. A.; SAUNDERS, C. A.; HEINZE-LACEY, B.; SUGAR, A. M. Cryptococcal pneumonia in AIDS: is cryptococcal meningitis preceded by clinically recognizable pneumonia? **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: official publication of the International Retrovirology Association**, v. 9, n. 2, p. 168–171, 1 jun. 1995.

DROMER, F.; SORRELL, T.; PERFECT, J.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans*: Latency and Disease. *Em: Cryptococcus*. [s.l.] American Society of Microbiology, 2011. p. 431–439.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2013, p. 423750, 26 nov. 2013.

EFSA PANEL ON FOOD CONTACT MATERIALS, ENZYMES, FLAVOURINGS AND PROCESSING AIDS (CEF). Scientific opinion on flavouring group evaluation 303, revision 1 (FGE.303Rev1): Spilanthal from chemical group 30. **EFSA journal** v. 13, n. 1, p. 3995 , jan. 2015.

EISENMAN, H. C.; CHOW, S.-K.; TSÉ, K. K.; MCCLELLAND, E. E.; CASADEVALL, A. The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. **Virulence**, v. 2, n. 4, p. 329–336, 1 jul. 2011.

EISENMAN, H. C.; FRASES, S.; NICOLA, A. M.; RODRIGUES, M. L.;

CASADEVALL, A. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 12, p. 3860–3867, dez. 2009.

ELDAKAK, A.; RANCATI, G.; RUBINSTEIN, B.; PAUL, P.; CONAWAY, V.; LI, R. Asymmetrically inherited multidrug resistance transporters are recessive determinants in cellular replicative ageing. **Nature cell biology**, v. 12, n. 8, p. 799–805, ago. 2010.

EMMONS, C. W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. **Journal of bacteriology**, v. 62, n. 6, p. 685–690, dez. 1951.

ERLANDER, S. R. The solution to the seven mysteries of AIDS: the “Trojan horse”. **Medical hypotheses**, v. 44, n. 1, p. 1–9, jan. 1995.

ESHER, S. K.; ZARAGOZA, O.; ALSPAUGH, J. A. Cryptococcal pathogenic mechanisms: a dangerous trip from the environment to the brain. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. e180057, 16 abr. 2018.

EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. **Journal of immunology**, v. 64, n. 5, p. 423–430, maio 1950.

EVANS, R. J.; LI, Z.; HUGHES, W. S.; DJORDJEVIC, J. T.; NIELSEN, K.; MAY, R. C. Cryptococcal phospholipase B1 is required for intracellular proliferation and control of titan cell morphology during macrophage infection. **Infection and immunity**, v. 83, n. 4, p. 1296–1304, abr. 2015.

FABRI, R. L. *et al.* Spilanthol as a promising antifungal alkylamide for the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 59, n. 12, p. 1210–1224, 3 dez. 2021.

FARRER, R. A. *et al.* A New Lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) Discovered in the Central Zambezian Miombo Woodlands. **mBio**, v. 10, n. 6, 12 nov. 2019.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; MEDNICK, A.; CASADEVALL, A. The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 6, p. 1791–1795, dez. 2000.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; NOVIKOFF, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4225–4237, jul. 2000.

FERNANDES, J. D. S.; MARTHO, K.; TOFIK, V.; VALLIM, M. A.; PASCON, R. C. The Role of Amino Acid Permeases and Tryptophan Biosynthesis in *Cryptococcus neoformans* Survival. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132369, 10 jul. 2015.

FERNANDEZ, J.; MARROQUIN-GUZMAN, M.; WILSON, R. A. Mechanisms of nutrient acquisition and utilization during fungal infections of leaves. **Annual review**

of **phytopathology**, v. 52, p. 155–174, 16 maio 2014.

FERREIRA, G. F.; BALTAZAR, L. DE M.; SANTOS, J. R. A.; MONTEIRO, A. S.; FRAGA, L. A. DE O.; RESENDE-STOIANOFF, M. A.; SANTOS, D. A. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1801–1811, ago. 2013.

FISHER, M. C.; DENNING, D. W. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. **Nature reviews. Microbiology**, p. 1–2, 6 fev. 2023.

FOLORUNSO, O. S.; SEBOLAI, O. M. **Hydrolytic Enzymes, Proteases, Permeases, and Transporters as *Cryptococcus neoformans* Weapons in Human Infections**. 24 jan. 2023a. Disponível em: <<https://www.preprints.org/manuscript/202301.0420>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

_____. **Transcription factors and intracellular proteins orchestrate phenotypic adaptation in *Cryptococcus neoformans* for survival and human infections**. 26 jan. 2023b. Disponível em: <<https://www.preprints.org/manuscript/202301.0461>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 3, p. 838–840, mar. 1999.

FRAZÃO, S. DE O.; SOUSA, H. R. DE; SILVA, L. G. DA; FOLHA, J. D. S.; GORGONHA, K. C. DE M.; OLIVEIRA, G. P. DE, Jr; FELIPE, M. S. S.; SILVA-PEREIRA, I.; CASADEVALL, A.; NICOLA, A. M.; ALBUQUERQUE, P. Laccase Affects the Rate of *Cryptococcus neoformans* Nonlytic Exocytosis from Macrophages. **mBio**, v. 11, n. 5, 8 set. 2020.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, v. 64, p. 97–112, 1995.

FU, M. S.; COELHO, C.; DE LEON-RODRIGUEZ, C. M.; ROSSI, D. C. P.; CAMACHO, E.; JUNG, E. H.; KULKARNI, M.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007144, jun. 2018.

GAI, Y.; LI, L.; MA, H.; RIELY, B. K.; LIU, B.; LI, H. The critical role of MetR/MetB/MetC/MetX in cysteine and methionine metabolism, fungal development and virulence of *Alternaria alternata*. **Applied and environmental microbiology**, v. 87, n. 4, 1 mar. 2021.

GAI, Y.; LIU, B.; MA, H.; LI, L.; CHEN, X.; MOENGA, S.; RIELY, B.; FAYYAZ, A.; WANG, M.; LI, H. The methionine biosynthesis regulator AaMetR contributes to oxidative stress tolerance and virulence in *Alternaria alternata*. **Microbiological research**, v. 219, p. 94–109, fev. 2019.

GARCIA-HERMOSO, D.; DROMER, F.; JANBON, G. *Cryptococcus neoformans*

capsule structure evolution in vitro and during murine infection. **Infection and immunity**, v. 72, n. 6, p. 3359–3365, jun. 2004.

GEDDES-MCALISTER, J.; SHAPIRO, R. S. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1435, n. 1, p. 57–78, jan. 2019.

GERBINO, A.; SCHENA, G.; MILANO, S.; MILELLA, L.; BARBOSA, A. F.; ARMENTANO, F.; PROCINO, G.; SVELTO, M.; CARMOSINO, M. Spilanthol from *Acmella Oleracea* Lowers the Intracellular Levels of cAMP Impairing NKCC2 Phosphorylation and Water Channel AQP2 Membrane Expression in Mouse Kidney. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0156021, 23 maio 2016.

GILES, S. S.; STAJICH, J. E.; NICHOLS, C.; GERRALD, Q. D.; ALSPAUGH, J. A.; DIETRICH, F.; PERFECT, J. R. The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 9, p. 1447–1459, set. 2006.

GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; MIKAİL, C.; ABOU, L.; PORTUGAL, H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. **Phytotherapy research: PTR**, v. 18, n. 12, p. 990–995, dez. 2004.

GOKHALE, V. G.; BHIDE, B. V. Chemical investigation of *Spilanthes acmella*. **Journal of the Indian Chemical Society**, [1945].

GONTIJO, F. A. DE; PASCON, R. C.; FERNANDES, L.; MACHADO, J., Jr; ALSPAUGH, J. A.; VALLIM, M. A. The role of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway in *Cryptococcus neoformans* high temperature growth and virulence. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 70, p. 12–23, set. 2014.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R.; MITCHELL, G.; GATTUSO, M.; DIARRA, M. S.; MALOUIN, F.; BOUARAB, K. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 8, p. 3400–3419, 31 jul. 2009.

GRIFFITHS, E. J.; HU, G.; FRIES, B.; CAZA, M.; WANG, J.; GSPONER, J.; GATES-HOLLINGSWORTH, M. A.; KOZEL, T. R.; DE REPENTIGNY, L.; KRONSTAD, J. W. A defect in ATP-citrate lyase links acetyl-CoA production, virulence factor elaboration and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 86, n. 6, p. 1404–1423, dez. 2012.

GRIGG, M. E.; BONNEFOY, S.; HEHL, A. B.; SUZUKI, Y.; BOOTHROYD, J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, v. 294, n. 5540, p. 161–165, 5 out. 2001.

Guidelines for the Diagnosis, Prevention and Management of Cryptococcal Disease in HIV-Infected Adults, Adolescents and Children: Supplement to the 2016 Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection. World Health Organization, 2018.

GUIRAO-ABAD, J. P.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R.; ALBURQUERQUE, B.; HERNÁNDEZ, J. A.; ARGÜELLES, J.-C. ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 307, n. 4-5, p. 241–248, jun. 2017.

HAKIM, J. G.; GANGAIDZO, I. T.; HEYDERMAN, R. S.; MIELKE, J.; MUSHANGI, E.; TAZIWA, A.; ROBERTSON, V. J.; MUSVAIRE, P.; MASON, P. R. Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients. **AIDS**, v. 14, n. 10, p. 1401–1407, 7 jul. 2000.

HEALY, M. E.; DILLAVOU, C. L.; TAYLOR, G. E. Diagnostic medium containing inositol, urea, and caffeic acid for selective growth of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of clinical microbiology**, v. 6, n. 4, p. 387–391, out. 1977.

HIBBETT, D. S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, n. Pt 5, p. 509–547, maio 2007.

HOMMEL, B. *et al.* *Cryptococcus neoformans* resists to drastic conditions by switching to viable but non-culturable cell phenotype. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 7, p. e1007945, jul. 2019.

HORIANOPOULOS, L. C.; HU, G.; CAZA, M.; SCHMITT, K.; OVERBY, P.; JOHNSON, J. D.; VALERIUS, O.; BRAUS, G. H.; KRONSTAD, J. W. The Novel J-Domain Protein Mrj1 Is Required for Mitochondrial Respiration and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 11, n. 3, 9 jun. 2020.

HORIANOPOULOS, L. C.; LEE, C. W. J.; HU, G.; CAZA, M.; KRONSTAD, J. W. Dnj1 Promotes Virulence in *Cryptococcus neoformans* by Maintaining Robust Endoplasmic Reticulum Homeostasis Under Temperature Stress. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 727039, 10 set. 2021.

HOSSAIN, M. A.; BIVA, I. J.; KIDD, S. E.; WHITTLE, J. D.; GRIESSER, H. J.; COAD, B. R. Antifungal Activity in Compounds from the Australian Desert Plant *Eremophila alternifolia* with Potency Against *Cryptococcus* spp. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 2, 31 mar. 2019.

HUANG, S. H.; WASS, C.; FU, Q.; PRASADARAO, N. V.; STINS, M.; KIM, K. S. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. **Infection and immunity**, v. 63, n. 11, p. 4470–4475, nov. 1995.

IDNURM, A.; BAHN, Y.-S.; NIELSEN, K.; LIN, X.; FRASER, J. A.; HEITMAN, J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753–764, out. 2005.

JAGER, S. H. F. A. K.; JAGER, S. H. F. A. **Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms—A Review Medicinal & Aromatic Plants**, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000154>>

JANSEN, R. K. The Systematics of *Acmella* (Asteraceae-Heliantheae). **Systematic botany monographs: monographic series of the American Society of Plant Taxonomists**, v. 8, p. 1–115, 1985.

JEZEWSKI, A. J. *et al.* Structural Characterization of the Reaction and Substrate Specificity Mechanisms of Pathogenic Fungal Acetyl-CoA Synthetases. **ACS chemical biology**, v. 16, n. 8, p. 1587–1599, 20 ago. 2021.

JEZEWSKI, A. J.; RISTOW, L. C.; KRYSAN, D. J. Carbon Dioxide Potentiates Flucytosine Susceptibility in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology spectrum**, p. e0478322, 31 jan. 2023.

JIN, J.-H. *et al.* Genome-wide functional analysis of phosphatases in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 4212, 24 ago. 2020.

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 3, p. 403–411, mar. 2013.

JONDIKO, I. J. O. A mosquito larvicide in *Spilanthes mauritiana*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 10, p. 2289–2290, 1 jan. 1986.

JONG, A.; WU, C.-H.; SHACKLEFORD, G. M.; KWON-CHUNG, K. J.; CHANG, Y. C.; CHEN, H.-M.; OUYANG, Y.; HUANG, S.-H. Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1313–1326, jun. 2008.

JONG, A. Y.; STINS, M. F.; HUANG, S. H.; CHEN, S. H.; KIM, K. S. Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier in vitro. **Infection and immunity**, v. 69, n. 7, p. 4536–4544, jul. 2001.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211–224, 18 jun. 2009.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 1, p. 151–170, mar. 2002.

KHONKARN, R.; OKONOJI, S.; KITTIPONGPATANA, O. S.; BOASOUNG, V. Antifungal effect of *Hyptis suaveolens* oil microemulsion based carboxymethyl mungbean gel for topical delivery. **International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, 1 jan. 2015.

KIM, J. H.; HAFF, R. P.; FARIA, N. C. G.; MARTINS, M. DE L.; CHAN, K. L.; CAMPBELL, B. C. Targeting the mitochondrial respiratory chain of *Cryptococcus* through antifungal chemosensitization: a model for control of non-fermentative pathogens. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 8873–8894, 25 jul. 2013.

KIM, K. H.; KIM, E. J.; KWUN, M. J.; LEE, J. Y.; BACH, T. T.; EUM, S. M.; CHOI, J. Y.; CHO, S.; KIM, S.-J.; JEONG, S.-I.; JOO, M. Suppression of lung inflammation by the methanol extract of *Spilanthes acmella* Murray is related to differential regulation of NF- κ B and Nrf2. **Journal of ethnopharmacology**, v. 217, p. 89–97, 10 maio 2018.

KLAUSMEYER, P.; CHMURNY, G. N.; MCCLOUD, T. G.; TUCKER, K. D.; SHOEMAKER, R. H. A novel antimicrobial indolizinium alkaloid from *Aniba panurensis*. **Journal of natural products**, v. 67, n. 10, p. 1732–1735, out. 2004.

KOIVURANTA, K.; CASTILLO, S.; JOUHTEN, P.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M.; WIEBE, M. G. Enhanced Triacylglycerol Production With Genetically Modified *Trichosporon oleaginosus*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1337, 21 jun. 2018.

KONG, A. T.; LEPREVOST, F. V.; AVTONOMOV, D. M.; MELLACHERUVU, D.; NESVIZHSKII, A. I. MSFragger: ultrafast and comprehensive peptide identification in mass spectrometry-based proteomics. **Nature methods**, v. 14, n. 5, p. 513–520, maio 2017.

KOZUBOWSKI, L.; ABOOBAKAR, E. F.; CARDENAS, M. E.; HEITMAN, J. Calcineurin colocalizes with P-bodies and stress granules during thermal stress in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 11, p. 1396–1402, nov. 2011.

KRONSTAD, J. W. *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 193–203, mar. 2011.

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

KUMARI, P.; MISHRA, R.; ARORA, N.; CHATRATH, A.; GANGWAR, R.; ROY, P.; PRASAD, R. Antifungal and Anti-Biofilm Activity of Essential Oil Active Components against *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus laurentii*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2161, 7 nov. 2017.

KUMAR, P.; YANG, M.; HAYNES, B. C.; SKOWYRA, M. L.; DOERING, T. L. Emerging themes in cryptococcal capsule synthesis. **Current opinion in structural biology**, v. 21, n. 5, p. 597–602, out. 2011.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. [s.l.] Elsevier, 2011.

KUTTEL, M. M.; CASADEVALL, A.; OSCARSON, S. *Cryptococcus neoformans* Capsular GXM Conformation and Epitope Presentation: A Molecular Modelling Study. **Molecules**, v. 25, n. 11, 7 jun. 2020.

KWON-CHUNG, K. J.; BOEKHOUT, T.; WICKES, B. L.; FELL, J. W. Systematics of the genus *Cryptococcus* and its type species *C. neoformans*. *Em: Cryptococcus*.

Washington, DC, USA: ASM Press, 2014. p. 1–15.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS yeast research**, v. 6, n. 4, p. 574–587, jun. 2006.

KWON-CHUNG KYUNG J. *et al.* The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. e00357–16, 1994.

LALTHANPUII, P. B.; LALCHHANDAMA, K. Chemical composition and broad-spectrum anthelmintic activity of a cultivar of toothache plant, *Acmella oleracea*, from Mizoram, India. **Pharmaceutical biology**, v. 58, n. 1, p. 393–399, dez. 2020.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista iberoamericana de micología**, v. 26, n. 4, p. 223–227, 31 dez. 2009.

LEE, I. R.; YANG, L.; SEBETSO, G.; ALLEN, R.; DOAN, T. H. N.; BLUNDELL, R.; LUI, E. Y. L.; MORROW, C. A.; FRASER, J. A. Characterization of the complete uric acid degradation pathway in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. e64292, 7 maio 2013.

LIAN, T.; SIMMER, M. I.; D’SOUZA, C. A.; STEEN, B. R.; ZUYDERDUYN, S. D.; JONES, S. J. M.; MARRA, M. A.; KRONSTAD, J. W. Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1452–1472, mar. 2005.

LIN, C.-J.; CHANG, Y.-L.; YANG, Y.-L.; CHEN, Y.-L. Natural alkaloid tryptanthrin exhibits novel anticryptococcal activity. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, 21 ago. 2020.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 401–416, jul. 2009.

LITTMAN, M. L.; BOROK, R. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 35, n. 3, p. 329–345, 14 out. 1968.

LIU, M.; CHEN, M.; YANG, Z. Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy. **Drug delivery**, v. 24, n. 1, p. 1–9, nov. 2017.

LIU, X. Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions and Their Significance. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1141, p. 241–291, 2019.

LI, Z.; LIU, N.; TU, J.; JI, C.; HAN, G.; SHENG, C. Discovery of Simplified Sampangine Derivatives with Potent Antifungal Activities against Cryptococcal Meningitis. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 8, p. 1376–1384, 9 ago. 2019.

LONSDALE-ECCLES, J. D.; GRAB, D. J. Trypanosome hydrolases and the blood-brain barrier. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 1, p. 17–19, jan. 2002.

LYNCH, M.; KURAMITSU, H. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 2, n. 10, p. 1245–1255, ago. 2000.

MACEKOVÁ, D.; FARKAS, V.; KISHIDA, E.; TAKEO, K. Ecto-glycanases and metabolic stability of the capsule in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of basic microbiology**, v. 46, n. 6, p. 470–479, 2006.

MACKENZIE, E. A.; KLIG, L. S. Computational modeling and in silico analysis of differential regulation of myo-inositol catabolic enzymes in *Cryptococcus neoformans*. **BMC molecular biology**, v. 9, p. 88, 14 out. 2008.

MALIEHE, M.; NTOI, M. A.; LAHIRI, S.; FOLORUNSO, O. S.; OGUNDEJI, A. O.; POHL, C. H.; SEBOLAI, O. M. Environmental Factors That Contribute to the Maintenance of *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 28 jan. 2020.

MALIGIE, M. A.; SELITRENNIKOFF, C. P. *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3)beta-glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2851–2856, jul. 2005.

MARTIN, T. R.; FREVERT, C. W. Innate immunity in the lungs. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 2, n. 5, p. 403–411, 2005.

MAURER, E.; HÖRTNAGL, C.; LACKNER, M.; GRÄSSLE, D.; NASCHBERGER, V.; MOSER, P.; SEGAL, E.; SEMIS, M.; LASS-FLÖRL, C.; BINDER, U. *Galleria mellonella* as a model system to study virulence potential of mucormycetes and evaluation of antifungal treatment. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 57, n. 3, p. 351–362, 1 abr. 2019.

MAXSON, M. E.; COOK, E.; CASADEVALL, A.; ZARAGOZA, O. The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 44, n. 3, p. 180–186, mar. 2007.

MAYER, F. L.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus neoformans*. **Trends in microbiology**, v. 28, n. 2, p. 163–164, fev. 2020.

MCCARTHY, M. W.; KONTOYIANNIS, D. P.; CORNELLY, O. A.; PERFECT, J. R.; WALSH, T. J. Novel Agents and Drug Targets to Meet the Challenges of Resistant Fungi. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl_3, p. S474–S483, 15 ago. 2017.

MCCLELLAND, E. E.; BERNHARDT, P.; CASADEVALL, A. Estimating the relative contributions of virulence factors for pathogenic microbes. **Infection and immunity**, v. 74, n. 3, p. 1500–1504, mar. 2006.

MCFADDEN, D. C.; DE JESUS, M.; CASADEVALL, A. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 4, p. 1868–1875, 27 jan. 2006.

MCFADDEN, D.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 11, p. 497–505, nov. 2006.

MEDEIROS, DAIANNE. Isoeugenol and Hybrid Acetamides against *Candida albicans* Isolated from the Oral Cavity. **Pharmaceuticals** v. 13, n. 10, 3 out. 2020.

MERRYMAN, M.; CRIGLER, J.; SEIPELT-THIEMANN, R.; MCCLELLAND, E. A mutation in *C. neoformans* mitochondrial NADH dehydrogenase results in increased virulence in mice. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 1366–1378, dez. 2020.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 286, 8 ago. 2012.

MESA-ARANGO, A. C.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; ROMÁN, E.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R.; CASAS, C.; HERRERO, E.; ARGÜELLES, J. C.; PLA, J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O. 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. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, nov. 2014.

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

MITCHELL, T. G.; CASTAÑEDA, E.; NIELSEN, K.; WANKE, B.; LAZÉRA, M. S. Environmental Niches for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Em: Cryptococcus*. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014. p. 235–259.

MOLINA-TORRES, J.; SALAZAR-CABRERA, C. J.; ARMENTA-SALINAS, C.; RAMÍREZ-CHÁVEZ, E. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4700–4704, 28 jul. 2004.

MOLLOY, S. F. *et al.* Cryptococcal meningitis: A neglected NTD? **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005575, jun. 2017.

MONARI, C.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 4, p. 537–542, jun. 2006.

MONTOYA, M. C.; MAGWENE, P. M.; PERFECT, J. R. Associations between *Cryptococcus* Genotypes, Phenotypes, and Clinical Parameters of Human Disease: A Review. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 4, 30 mar. 2021.

MORAN, G. P.; COLEMAN, D. C.; SULLIVAN, D. J. Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 1, p. 34–42, jan. 2011.

MOURAD, A.; PERFECT, J. R. Present and Future Therapy of Cryptococcus Infections. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 3, 3 jul. 2018.

MÜLLER, F. **Interaction between CO₂/HCO₃⁻ and the iron homeostasis in *Corynebacterium glutamicum*** Universität Stuttgart, , 2020. Disponível em: <<http://elib.uni-stuttgart.de/handle/11682/11201>>. Acesso em: 3 abr. 2023

MUSELIUS, B.; DURAND, S.-L.; GEDDES-MCALISTER, J. Proteomics of *Cryptococcus neoformans*: From the Lab to the Clinic. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 22, 17 nov. 2021.

MYLONAKIS, E.; AUSUBEL, F. M.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J.; CALDERWOOD, S. B. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15675–15680, 26 nov. 2002.

NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent Alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 56, n. 5, p. 759–762, jan. 1992.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599–609, Nov-Dec 2012.

NGAMSKULRUNGROJ, P.; CHANG, Y.; ROH, J.; KWON-CHUNG, K. J. Differences in nitrogen metabolism between *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*, the two etiologic agents of cryptococcosis. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e34258, 27 mar. 2012.

NICOLA, A. M.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D. L. Fungal killing by mammalian phagocytic cells. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 4, p. 313–317, ago. 2008.

NORMILE, T. G.; CHU, T. H.; SHERIDAN, B. S.; DEL POETA, M. Vaccine protection by *Cryptococcus neoformans* Δ sgl1 is mediated by $\gamma\delta$ T cells via TLR2 signaling. **Mucosal immunology**, v. 15, n. 6, p. 1416–1430, jun. 2022.

NOSANCHUK, J. D.; OVALLE, R.; CASADEVALL, A. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 7, p. 1093–1099, 1 abr. 2001.

OLIVEIRA, D. L.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L. Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. **Infection and immunity**, v. 78, n. 4, p. 1601–1609, abr. 2010.

OLIVEIRA, N. K.; BHATTACHARYA, S.; GAMBHIR, R.; JOSHI, M.; FRIES, B. C. Novel ABC Transporter Associated with Fluconazole Resistance in Aging of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 7, 28 jun. 2022.

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 3, p. 387–408, jul. 2012.

O'MEARA, T. R.; NORTON, D.; PRICE, M. S.; HAY, C.; CLEMENTS, M. F.; NICHOLS, C. B.; ALSPAUGH, J. A. Interaction of *Cryptococcus neoformans* Rim101 and protein kinase A regulates capsule. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 2, p. e1000776, 19 fev. 2010.

ORNER, E. P.; BHATTACHARYA, S.; KALENJA, K.; HAYDEN, D.; DEL POETA, M.; FRIES, B. C. Cell Wall-Associated Virulence Factors Contribute to Increased Resilience of Old *Cryptococcus neoformans* Cells. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2513, 7 nov. 2019.

ORNER, E. P.; ZHANG, P.; JO, M. C.; BHATTACHARYA, S.; QIN, L.; FRIES, B. C. High-Throughput Yeast Aging Analysis for *Cryptococcus* (HYAAC) microfluidic device streamlines aging studies in *Cryptococcus neoformans*. **Communications biology**, v. 2, p. 256, 10 jul. 2019.

OSTERHOLZER, J. J.; SURANA, R.; MILAM, J. E.; MONTANO, G. T.; CHEN, G.-H.; SONSTEIN, J.; CURTIS, J. L.; HUFFNAGLE, G. B.; TOEWS, G. B.; OLSZEWSKI, M. A. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 3, p. 932–943, mar. 2009.

PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525–530, 20 fev. 2009.

PARK, H.-S.; LEE, S. C.; CARDENAS, M. E.; HEITMAN, J. Calcium-Calmodulin-Calcineurin Signaling: A Globally Conserved Virulence Cascade in Eukaryotic Microbial Pathogens. **Cell host & microbe**, v. 26, n. 4, p. 453–462, 9 out. 2019.

PAULRAJ, Jayaraj; GOVINDARAJAN, Raghavan; PALPU, Pushpangadan. The genus *Spilanthes* ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological properties: a review. **Advances in pharmacological sciences** v. 2013, p. 510298, 26 dez. 2013.

PENNISI, M. G. *et al.* Cryptococcosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 15, n. 7, p. 611–618, jul. 2013.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS yeast**

research, v. 6, n. 4, p. 463–468, jun. 2006.

_____. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 1 fev. 2010.

_____. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, set. 2017.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 837–74, v–vi, dez. 2002.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American journal of medicine**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S3–13, jan. 2012.

PHILLIPSON, J. D. Natural products as drugs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88 Suppl 1, p. S17–9, jun. 1994.

PHONGPAICHIT, S.; SUBHADHIRASAKUL, S.; WATTANAPIROMSAKUL, C. Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. **Mycoses**, v. 48, n. 5, p. 333–338, set. 2005.

PIPPI, B.; LOPES, W.; REGINATTO, P.; SILVA, F. É. K.; JOAQUIM, A. R.; ALVES, R. J.; SILVEIRA, G. P.; VAINSTEIN, M. H.; ANDRADE, S. F.; FUENTEFRIA, A. M. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. **Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 27, n. 1, p. 41–48, jan. 2019.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v. 14, n. 2, p. 850–867, 19 fev. 2009.

PRACHAYASITTIKUL, V.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. **EXCLI journal**, v. 12, p. 291–312, 4 abr. 2013.

PRADEL, E.; EWBANK, J. J. Genetic Models in Pathogenesis. **Annual review of genetics**, v. 38, n. 1, p. 347–363, 1 dez. 2004.

PRAMANIK, B.; CHEN, G.; GROSS, M. L. **Protein and Peptide Mass Spectrometry in Drug Discovery**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2011.

PRICE, M. S.; BETANCOURT-QUIROZ, M.; PRICE, J. L.; TOFFALETTI, D. L.; VORA, H.; HU, G.; KRONSTAD, J. W.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans* requires a functional glycolytic pathway for disease but not persistence in the host. **mBio**, v. 2, n. 3, p. e00103–11, 7 jun. 2011.

PUBCHEM. **Spilanthol**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spilanthol>>. Acesso em: 12 mar. 2023.

QU, Y.; FANG, M.; GAO, B.; AMOUZADEH, H. R.; LI, N.; NARAYANAN, P.; ACTON, P.; LAWRENCE, J.; VARGAS, H. M. Itraconazole decreases left ventricular contractility in isolated rabbit heart: mechanism of action. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 113–122, 15 abr. 2013.

RAJASINGHAM, R.; SMITH, R. M.; PARK, B. J.; JARVIS, J. N.; GOVENDER, N. P.; CHILLER, T. M.; DENNING, D. W.; LOYSE, A.; BOULWARE, D. R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 8, p. 873–881, ago. 2017.

RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J.; NAIR, M. G. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 729–732, jul. 1999.

RANI, S.; MURTY, S. Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. **African journal of biomedical research: AJBR**, v. 9, n. 1, 8 dez. 2009.

RATNASOORIYA, W. D.; PIERIS, K. P. P. Attenuation of Persistent Pain and Hyperalgesia by *Spilanthus acmella*. Flowers in Rats. **Pharmaceutical biology**, v. 43, n. 7, p. 614–619, 1 jan. 2005.

RATNASOORIYA, W. D.; PIERIS, K. P. P.; SAMARATUNGA, U.; JAYAKODY, J. R. A. C. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 91, n. 2-3, p. 317–320, abr. 2004.

REIS, F. C. G.; COSTA, J. H.; HONORATO, L.; NIMRICHTER, L.; FILL, T. P.; RODRIGUES, M. L. Small Molecule Analysis of Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus gattii*: Identification of a Tripeptide Controlling Cryptococcal Infection in an Invertebrate Host Model. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 654574, 16 mar. 2021.

RIOS, María Yolanda; OLIVO, Horacio F. Chapter 3 - Natural and Synthetic Alkamides: Applications in Pain Therapy. In: ATTA-UR-RAHMAN (Org.). **Studies in Natural Products Chemistry**. [S.l.]: Elsevier, 2014. 43 v. p. 79–121.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American journal of cardiology**, v. 101, n. 10A, p. 43D–49D, 22 maio 2008.

RIZZO, J.; RODRIGUES, M. L.; JANBON, G. Extracellular Vesicles in Fungi: Past, Present, and Future Perspectives. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 346, 15 jul. 2020.

RODRIGUES, E. T. *et al.* Pharmacological Characteristics of the Hydroethanolic Extract of *Acmella oleracea* (L) R. K. Jansen Flowers: ADME/Tox In Silico and In Vivo Antihypertensive and Chronic Toxicity Evaluation. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2023, p. 1278720, 29 abr. 2023.

RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 1, n. 4, p. 293–301, abr. 1999.

RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; ALMEIDA, I. C.; NIMRICHTER, L. The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. **Journal of proteomics**, v. 97, p. 177–186, 31 jan. 2014.

RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; OLIVEIRA, D. L.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUK, J. D.; ALMEIDA, I. C.; CASADEVALL, A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58–67, jan. 2008.

RODRIGUES, M. L.; NIMRICHTER, L.; OLIVEIRA, D. L.; 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**, v. 6, n. 1, p. 48–59, jan. 2007.

RONDANELLI, M. *et al.* *Acmella oleracea* for pain management. **Fitoterapia**, v. 140, p. 104419, jan. 2020.

RUTHERFORD, J. C. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004062, maio 2014.

SABIITI, W.; MAY, R. C.; PURSALL, E. R. Experimental models of cryptococcosis. **International journal of microbiology**, v. 2012, p. 626745, 2012.

SALVATOR, H.; CHENG, A.; ROSEN, L. B.; WILLIAMSON, P. R.; BENNETT, J. E.; KASHYAP, A.; DING, L.; KWON-CHUNG, K. J.; NAMKOONG, H.; ZERBE, C. S.; HOLLAND, S. M. Neutralizing GM-CSF autoantibodies in pulmonary alveolar proteinosis, cryptococcal meningitis and severe nocardiosis. **Respiratory research**, v. 23, n. 1, p. 280, 11 out. 2022.

SANFELICE, F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. **Annali di igiene: medicina preventiva e di comunita**, 1894.

SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; MESA-ARANGO, A. C.; CASAS, C.; HERRERO, E.; GIANINNI, M. J. S. M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ZARAGOZA, O. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 13, n. 5, p. 457–467, maio 2011.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; KOYMANS, L.; BILLE, J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 241–253, fev. 1998.

SÁ, N. P. DE; LIMA, C. M. DE; LINO, C. I.; BARBEIRA, P. J. S.; BALTAZAR, L. DE M.; SANTOS, D. A.; OLIVEIRA, R. B. DE; MYLONAKIS, E.; FUCHS, B. B.; JOHANN, S. Heterocycle Thiazole Compounds Exhibit Antifungal Activity through Increase in the Production of Reactive Oxygen Species in the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* Species Complex. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 8, ago. 2017.

SANTANGELO, R.; ZOELLNER, H.; SORRELL, T.; WILSON, C.; DONALD, C.; DJORDJEVIC, J.; SHOUNAN, Y.; WRIGHT, L. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infection and immunity**, v. 72, n. 4, p. 2229–2239, abr. 2004.

SANTIAGO-TIRADO, F. H.; ONKEN, M. D.; COOPER, J. A.; KLEIN, R. S.; DOERING, T. L. Trojan Horse Transit Contributes to Blood-Brain Barrier Crossing of a Eukaryotic Pathogen. **mBio**, v. 8, n. 1, 31 jan. 2017.

SANTI, L.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; BERGER, M.; CALZOLARI, D.; GUIMARÃES, J. A.; MORESCO, J. J.; YATES, J. R., 3rd. Proteomic profile of *Cryptococcus neoformans* biofilm reveals changes in metabolic processes. **Journal of proteome research**, v. 13, n. 3, p. 1545–1559, 7 mar. 2014.

SAROSI, G. A.; PARKER, J. D.; DOTO, I. L.; TOSH, F. E. Amphotericin B in cryptococcal meningitis. Long-term results of treatment. **Annals of internal medicine**, v. 71, n. 6, p. 1079–1087, dez. 1969.

SCHMALZLE, S. A.; BUCHWALD, U. K.; GILLIAM, B. L.; RIEDEL, D. J. *Cryptococcus neoformans* infection in malignancy. **Mycoses**, v. 59, n. 9, p. 542–552, set. 2016.

SCHWARZ, P.; JANBON, G.; DROMER, F.; LORTHOLARY, O.; DANNAOUI, E. Combination of amphotericin B with flucytosine is active in vitro against flucytosine-resistant isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 383–385, jan. 2007.

SEIDER, K.; HEYKEN, A.; LÜTTICH, A.; MIRAMÓN, P.; HUBE, B. Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 4, p. 392–400, ago. 2010.

SETIANINGRUM, F.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; DENNING, D. W. Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 57, n. 2, p. 133–150, 1 fev. 2019.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 75, n. 2, p. 213–267, jun. 2011.

SHARMA, R.; ARUMUGAM, N. **N-alkylamides of *Spilanthes* (syn: *Acmella*): Structure, purification, characterization, biological activities and applications –**

a review **Future Foods**, 2021. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100022>>

SHEFFIELD, D. A.; JEPSEN, M. R.; FEENEY, S. J.; BERTUCCI, M. C.; SRIRATANA, A.; NAUGHTIN, M. J.; DYSON, J. M.; COPPEL, R. L.; MITCHELL, C. A. The myotubularin MTMR4 regulates phagosomal phosphatidylinositol 3-phosphate turnover and phagocytosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 294, n. 45, p. 16684–16697, 8 nov. 2019.

SHEKHOVA, E.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A. A. Induction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production by Itraconazole, Terbinafine, and Amphotericin B as a Mode of Action against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 11, nov. 2017.

SHENG, C.; MIAO, Z.; JI, H.; YAO, J.; WANG, W.; CHE, X.; DONG, G.; LÜ, J.; GUO, W.; ZHANG, W. Three-dimensional model of lanosterol 14 alpha-demethylase from *Cryptococcus neoformans*: active-site characterization and insights into azole binding. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3487–3495, ago. 2009.

SIAFAKAS, A. R.; SORRELL, T. C.; WRIGHT, L. C.; WILSON, C.; LARSEN, M.; BOADLE, R.; WILLIAMSON, P. R.; DJORDJEVIC, J. T. Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 52, p. 37508–37514, 28 dez. 2007.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; GARRAFFO, H. M.; DOLAN, M. A.; GHANNOUM, M. A.; KWON-CHUNG, K. J. Identification of a *Cryptococcus neoformans* cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (Erg11) residue critical for differential susceptibility between fluconazole/voriconazole and itraconazole/posaconazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1162–1169, mar. 2012.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; GARRAFFO, H. M.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 2804–2815, jul. 2009.

SIQUEIRA, N. P.; FAVALESSA, O. C.; MARUYAMA, F. H.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; HAGEN, F.; HAHN, R. C. Domestic Birds as Source of *Cryptococcus deuterogattii* (AFLP6/VGII): Potential Risk for Cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 187, n. 1, p. 103–111, fev. 2022.

SOHN, H.-Y.; SON, K. H.; KWON, C.-S.; KWON, G.-S.; KANG, S. S. **Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai** **Phytomedicine**, 2004. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.005>>

SORRELL, T. C.; CHEN, S. C.-A.; PHILLIPS, P.; MARR, K. A. Clinical Perspectives

on *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: Implications for Diagnosis and Management. *Em: Cryptococcus*. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014. p. 595–606.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A. DE; FERRI, P. H.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G. DE; SOUZA JÚNIOR, A. H. DE; FERNANDES, O. DE F. L.; SILVA, M. DO R. R. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 963–965, out. 2003.

SPADARI, C. DE C.; WIRTH, F.; LOPES, L. B.; ISHIDA, K. New Approaches for Cryptococcosis Treatment. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, 23 abr. 2020.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, p. 15245–15250, 18 dez. 2001.

STEIN, R.; BERGER, M.; SANTANA DE CECCO, B.; MALLMANN, L. P.; TERRACIANO, P. B.; DRIEMEIER, D.; RODRIGUES, E.; BEYS-DA-SILVA, W. O.; KONRATH, E. L. Chymase inhibition: A key factor in the anti-inflammatory activity of ethanolic extracts and spilanthol isolated from *Acmella oleracea*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 270, p. 113610, 24 abr. 2021.

STEMPINSKI, P. R.; GOUGHENOUR, K. D.; PLOOY, L. M. DU; ALSPAUGH, J. A.; OLSZEWSKI, M. A.; KOZUBOWSKI, L. The *Cryptococcus neoformans* F1c1 Homologue Controls Calcium Homeostasis and Confers Fungal Pathogenicity in the Infected Hosts. **mBio**, v. 13, n. 5, p. e0225322, 26 out. 2022.

SUN, C.; ZHAO, W.; WANG, X.; SUN, Y.; CHEN, X. A pharmacological review of dicoumarol: An old natural anticoagulant agent. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 160, p. 105193, out. 2020.

SUT, S.; FERRARESE, I.; SHRESTHA, S. S.; KUMAR, G.; SLAVIERO, A.; SELLO, S.; ALTISSIMO, A.; PAGNI, L.; GATTESCO, F.; DALL'ACQUA, S. Comparison of Biostimulant Treatments in *Acmella oleracea* Cultivation for Alkylamides Production. **Plants**, v. 9, n. 7, 29 jun. 2020.

SWANSON, M. S.; HAMMER, B. K. *Legionella Pneumophila* Pathogenesis: A Fateful Journey from Amoebae to Macrophages. **Annual review of microbiology**, v. 54, n. 1, p. 567–613, 1 out. 2000.

TAKATSUME, Y.; IZAWA, S.; INOUE, Y. Methylglyoxal as a signal initiator for activation of the stress-activated protein kinase cascade in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 14, p. 9086–9092, 7 abr. 2006.

TENCATE, L. N.; TÁPARO, C. V.; CARVALHO, C. DE; MORAES GIMENES BOSCO, S. DE; QUEIROZ, L. H.; SILVA, D. C. DA; PERRI, S. H. V.; MARINHO, M. Study of

gastrointestinal fungal flora of bats (Mammalia, Chiroptera) of the northwest region of São Paulo state: zoonotic potential. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 2, p. 146–152, 3 abr. 2012.

THOMPSON, G. R., 3rd; CADENA, J.; PATTERSON, T. F. Overview of antifungal agents. **Clinics in chest medicine**, v. 30, n. 2, p. 203–15, v, jun. 2009.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; OLIVEIRA, H. C. DE; GARCÍA-RODAS, R.; ROSSI, S. A.; LLORENTE, I.; ZABALLOS, Á.; JANBON, G.; ARIÑO, J.; ZARAGOZA, Ó. *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 5, p. e1007007, maio 2018.

TROFA, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanin: Structure, Function, and Biosynthesis in *Cryptococcus*. *Em: Cryptococcus*. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014. p. 55–66.

UTHPALA, T. G. G.; NAVARATNE, S. B. *Acmella oleracea* Plant; Identification, Applications and Use as an Emerging Food Source – Review. **Food Reviews International**, v. 37, n. 4, p. 399–414, 19 maio 2021.

VAISHNAV, V. V.; BACON, B. E.; O'NEILL, M.; CHERNIAK, R. Structural characterization of the galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans* Cap67. **Carbohydrate research**, v. 306, n. 1-2, p. 315–330, jan. 1998.

VAN DAELE, R.; SPRIET, I.; WAUTERS, J.; MAERTENS, J.; MERCIER, T.; VAN HECKE, S.; BRÜGGEMANN, R. Antifungal drugs: What brings the future? **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 57, n. Supplement_3, p. S328–S343, 1 jun. 2019.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2303–2311, jun. 2010.

VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y.-P.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J. R.; HEITMAN, J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 10, p. 4345–4355, out. 2009.

VENKATESWARLU, K.; TAYLOR, M.; MANNING, N. J.; RINALDI, M. G.; KELLY, S. L. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 748–751, abr. 1997.

VINCHE, A. D. L.; CHACÓN, I. DE-LA-CRUZ-; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; SILVA, J. DE F. DA; FERREIRA, G.; DOS SANTOS, D. C.; GARCES, H. G.; OLIVEIRA, D. V. M. DE; MARÇON, C.; CAVALCANTE, R. DE S.; MENDES, R. P. Antifungal activity of liriodenine on agents of systemic mycoses, with emphasis on the genus *Paracoccidioides*. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 26, p. e20200023, 28 out. 2020.

VU, K.; EIGENHEER, R. A.; PHINNEY, B. S.; GELLI, A. *Cryptococcus neoformans* promotes its transmigration into the central nervous system by inducing molecular

and cellular changes in brain endothelial cells. **Infection and immunity**, v. 81, n. 9, p. 3139–3147, set. 2013.

VU, K.; GELLI, A. Astemizole and an analogue promote fungicidal activity of fluconazole against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 48, n. 2, p. 255–262, mar. 2010.

WANG, J.; HUANG, L.; LI, J.; FAN, Q.; LONG, Y.; LI, Y.; ZHOU, B. Artemisinin directly targets malarial mitochondria through its specific mitochondrial activation. **PLoS one**, v. 5, n. 3, p. e9582, 8 mar. 2010.

WANG, W.-J.; LIU, C.-C.; LI, Y.-T.; LI, M.-Q.; FU, Y.-T.; LI, X.-C.; JIE-KANG; QIAN, W.-D. Antifungal and Antibiofilm In Vitro Activities of Ursolic Acid on *Cryptococcus neoformans*. **Current microbiology**, v. 79, n. 10, p. 293, 16 ago. 2022.

WANG, Y.; WEAR, M.; KOHLI, G.; VIJ, R.; GIAMBERARDINO, C.; SHAH, A.; TOFFALETTI, D. L.; YU, C.-H. A.; PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A.; XUE, C. Inositol Metabolism Regulates Capsule Structure and Virulence in the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 12, n. 6, p. e0279021, 21 dez. 2021.

WANG, Y.; YANG, H.; GEERTS, C.; FURTOS, A.; WATERS, P.; CYR, D.; WANG, S.; MITCHELL, G. A. The multiple facets of acetyl-CoA metabolism: Energetics, biosynthesis, regulation, acylation and inborn errors. **Molecular genetics and metabolism**, v. 138, n. 1, p. 106966, jan. 2023.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 242–247, mar. 2001.

WATERMAN, S. R.; HACHAM, M.; PANEPINTO, J.; HU, G.; SHIN, S.; WILLIAMSON, P. R. Cell wall targeting of laccase of *Cryptococcus neoformans* during infection of mice. **Infection and immunity**, v. 75, n. 2, p. 714–722, fev. 2007.

WILCOCK, B. C.; ENDO, M. M.; UNO, B. E.; BURKE, M. D. C2'-OH of amphotericin B plays an important role in binding the primary sterol of human cells but not yeast cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 23, p. 8488–8491, 12 jun. 2013.

WIRTH, F.; AZEVEDO, M. I. DE; PILLA, C.; AQUINO, V. R.; NETO, G. W.; GOLDANI, L. Z. Relationship between intracranial pressure and antifungal agents levels in the CSF of patients with cryptococcal meningitis. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 56, n. 3, p. 257–262, 1 abr. 2018.

WOELKART, K.; FRYE, R. F.; DERENDORF, H.; BAUER, R.; BUTTERWECK, V. Pharmacokinetics and tissue distribution of dodeca-2E,4E,8E,10E/Z-tetraenoic acid isobutylamides after oral administration in rats. **Planta medica**, v. 75, n. 12, p. 1306–1313, out. 2009.

WRIGHT, L. C.; SANTANGELO, R. M.; GANENDREN, R.; PAYNE, J.; DJORDJEVIC, J. T.; SORRELL, T. C. Cryptococcal lipid metabolism: phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 1, p. 37–47, jan. 2007.

WU, L.-C.; FAN, N.-C.; LIN, M.-H.; CHU, I.-R.; HUANG, S.-J.; HU, C.-Y.; HAN, S.-Y. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 7, p. 2341–2349, 9 abr. 2008.

WYNENDAELE, Evelien *et al.* Regulatory status of N-alkylamide containing health products. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP** v. 98, p. 215–223, out. 2018.

XUE, C. Cryptococcus and beyond–inositol utilization and its implications for the emergence of fungal virulence. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 9, p. e1002869, set. 2012.

XUE, C.; LIU, T.; CHEN, L.; LI, W.; LIU, I.; KRONSTAD, J. W.; SEYFANG, A.; HEITMAN, J. Role of an expanded inositol transporter repertoire in *Cryptococcus neoformans* sexual reproduction and virulence. **mBio**, v. 1, n. 1, 18 maio 2010.

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**, v. 1, n. 4, p. 263–273, 14 jun. 2007.

YANG, X.; SHA, K.; XU, G.; TIAN, H.; WANG, X.; CHEN, S.; WANG, Y.; LI, J.; CHEN, J.; HUANG, N. Subinhibitory Concentrations of Allicin Decrease Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Biofilm Formation, Adhesion Ability, and Swimming Motility. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 7, 29 jun. 2016.

YIĞIT, D.; YIĞIT, N.; OZGEN, U. An investigation on the anticandidal activity of some traditional medicinal plants in Turkey. **Mycoses**, v. 52, n. 2, p. 135–140, mar. 2009.

ZABRISKIE, T. M.; JACKSON, M. D. Lysine biosynthesis and metabolism in fungi. **Natural product reports**, v. 17, n. 1, p. 85–97, fev. 2000.

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

ZARAGOZA, O.; CHRISMAN, C. J.; CASTELLI, M. V.; FRASES, S.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CASADEVALL, A. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043–2057, out. 2008.

ZARAGOZA, O.; FRIES, B. C.; CASADEVALL, A. Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. **Infection and immunity**, v. 71, n. 11, p. 6155–6164, nov. 2003.

ZARAGOZA, O.; GARCÍA-RODAS, R.; NOSANCHUK, J. D.; CUENCA-ESTRELLA,

M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CASADEVALL, A. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 6, p. e1000945, 17 jun. 2010.

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

ZHU, Y.; AEBERSOLD, R.; MANN, M.; GUO, T. SnapShot: Clinical proteomics. **Cell**, v. 184, n. 18, p. 4840–4840.e1, 2 set. 2021.

ZIMMER, M. Molecular mechanics evaluation of the proposed mechanisms for the degradation of urea by urease. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 17, n. 5, p. 787–797, abr. 2000.

YUSUDA; I. The Geometric Structure of Spilanthol. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. 7, p. 2251–2253, 1980.