

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

Do cultivo a novas estratégias terapêuticas: otimização estatística dos meios de cultura e da susceptibilidade associados à busca de novas moléculas e combinações no combate a micoses pulmonares

LUANA CANDICE GENZ BAZANA

PORTO ALEGRE, 2023

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

Do cultivo a novas estratégias terapêuticas: otimização estatística dos meios de cultura e da susceptibilidade associados à busca de novas moléculas e combinações no combate a micoses pulmonares

Tese apresentada por **Luana Candice Genz Bazana** para obtenção do TÍTULO DE DOUTORA em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Porto Alegre, 2023

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.04.2023, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Karine Rigon Zimmer

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Prof^a. Dr^a Lucélia Santi

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Marilene Henning Vainstein

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Bazana, Luana Candice Genz
Do cultivo a novas estratégias terapêuticas:
otimização estatística dos meios de cultura e da
susceptibilidade associados a busca de novas moléculas
e combinações no combate a micoses pulmonares / Luana
Candice Genz Bazana. -- 2023.
268 f.
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentesfria.

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

1. Micologia. 2. Cryptococcus spp.. 3. Combinação
de antifúngicos. 4. Derivados quinolínicos. 5.
Aspergillus spp.. I. Fuentesfria, Alexandre Meneghello,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria em colaboração ao Laboratório de Síntese Farmacêutica coordenado pelo Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade; Laboratório de Bioquímica e Toxicologia do Instituto Federal de Santa Catarina, em colaboração com o Prof. Dr. Mário Lettieri Teixeira.

Agradecemos aos professores mencionados e instituições parceiras pela colaboração e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro destinado ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu companheiro de vida, Anderson Ramos Carvalho;

A minha mãe, Leila Maris Genz, e minha irmã, Lara Luísa Genz Bazana;

Aos meus avós, Noelli Gauger Genz e Ilson Genz;

Obrigada por dividirem comigo este sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade dada a cada dia de vida. Tua presença me fez não desistir, me possibilitou descobrir a imensidão de ser e viver.

Aos meus pais, Leila e Luís, pelo apoio ao longo dos anos de vida. Minha mãe em especial, pela preocupação, torcida, carinho e compreensão nesta jornada, uma grande inspiração para mim. Agradeço a minha irmã, por ser luz e amor no meu caminho.

Aos meus queridos avós maternos, Noelli e Ilson, a base de nossa família, exemplo de luta, dedicação, honestidade, bondade e amor. Vocês são tudo para mim. Aos meus avós paternos, Loni e João, também sou grata pelo carinho, afeto e cuidado que sempre tiveram comigo. Amo todos vocês.

Ao meu companheiro de vida e de bancada, Anderson, ao qual admiro muito. Tu és um grande presente que a pós-graduação me deu. Obrigada pelo apoio, zelo, carinho, amparo, ensinamentos, crescimento e todo amor que tens comigo.

Aos meus amigos que, perto ou longe, se fizeram presentes nos bons momentos e nas dificuldades. Vocês estão sempre em meu coração!

Aos colegas do LPMA, obrigada por dividirem essa caminhada comigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria pela oportunidade na realização deste sonho e confiança em meu trabalho, meu respeito e consideração. Ao Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade e Dra. Angélica Rocha Joaquim pela síntese e fornecimento das moléculas testada neste trabalho. Muito obrigada pela parceria!

Aos demais colaboradores, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Juntos sempre caminhamos mais longe.

“ Muitas coisas não são realizadas por que o medo vence as pessoas. Vença o medo e verás um mundo de possibilidades desdobrar-se diante de teus olhos. ”

(Augusto Branco)

RESUMO

Do cultivo a novas estratégias terapêuticas: otimização estatística dos meios de cultura e da susceptibilidade associados a busca de novas moléculas e combinações no combate a micoses pulmonares

As micoses pulmonares apresentam sintomas inespecíficos ou são até mesmo assintomáticas, o que impacta no diagnóstico precoce e consequentemente no início da terapia para um bom prognóstico. Pacientes imunodeprimidos são os mais acometidos, nesses indivíduos as taxas de letalidade são altas e o tratamento é prolongado. *Aspergillus* e *Cryptococcus* estão entre os gêneros mais isolados em infecções pulmonares. Poucas opções terapêuticas estão disponíveis para *Cryptococcus* spp., e casos crescentes de resistência são observados para *Aspergillus* spp. mostrando a necessidade da busca por novas alternativas terapêuticas. É importante ressaltar que a taxa de crescimento e outras características de crescimento podem variar amplamente entre diferentes espécies de leveduras, incluindo as do gênero *Cryptococcus* e *Candida*. Essas diferenças podem ter implicações significativas na detecção e tratamento de infecções fúngicas. Esse fato impacta diretamente nos métodos de avaliação de suscetibilidade, crescimento em meios sólidos, entre outras metodologias, sendo necessário a busca pelo pleno crescimento durante ensaios biológicos. Como novas alternativas terapêuticas, esse trabalho avaliou o desempenho de derivados quinolínicos sobre espécies de *Aspergillus* e *Cryptococcus*. Para *Cryptococcus*, os derivados mostraram uma ótima atividade, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) de $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, entre eles, os mais ativos foram clioquinol (CQ) e PH153. Os mecanismos de ação revelam que estes compostos não se ligam ao ergosterol presente na membrana celular fúngica. Entretanto, a presença de 0,8 M de sorbitol influenciou na atividade dos compostos, que por terem características quelantes de metais podem estar retardando o desbalanço osmótico da célula. Em consequência a esse provável mecanismo também foi observada a inibição da síntese de melanina, dependente de metais e um importante fator de virulência. Os testes de curvas de morte, bem como a concentração fungicida mínima (CFM) corroboram o provável mecanismo de ação, uma vez que seu comportamento é fungistático, ocorrendo a morte das leveduras por inanição. No caso de *Aspergillus* spp. os derivados também apresentaram atividade, porém a melhor CIM foi obtida com o CQ. Combinações binárias e ternárias foram realizadas utilizando CQ, anfotericina B (AFB) e itraconazol (ITZ). Misturas de fármacos que apresentaram

sinergismo significativo, como a combinação de CQ+ITZ e AFB+ITZ, permitiram reduzir as concentrações necessárias em mais de seis vezes em relação às CIM dos fármacos quando usados individualmente. Combinações também foram exploradas para espécies de *Cryptococcus* utilizando CQ, AFB, fluconazol (FLZ) e 8-hidroxiquinolina (8HQ). A combinação que obteve o melhor sinergismo foi observada entre FLZ na presença de CQ ou 8HQ, resultando um escore de sinergismo três vezes superior aos encontrado para FLZ+AFB, utilizados no tratamento da criptococose com doses diárias de 400-800 mg e 0,5-1 mg/kg, respectivamente, por dia. A concentração de FLZ foi reduzida de aproximadamente 4 µg/mL (50% de inibição) para 0,125 µg/mL na presença de CQ, inibindo mais de 90% do crescimento fúngico. Além disso, a combinação de FLZ+CQ inibiu a produção de melanina, não apresentou toxicidade aguda em modelo *in vivo* alternativo utilizando larvas de *Tenebrio molitor*, e ausência de irritabilidade nas concentrações testadas constatada através da metodologia de HET-CAM (membrana corioalantóica embrionária de ovos de galinhas). As combinações realizadas, bem como o uso dos derivados sozinhos apresentaram boas estratégias terapêuticas a serem exploradas para o tratamento da aspergilose e criptococose. Embora *Aspergillus* apresente uma condição de crescimento abundante e relativamente rápido, *Cryptococcus* por ser uma levedura apresenta um crescimento sub-ótimo. O estudo realizado através da comparação de métodos de fabricação do meio de cultivo sólido ágar sabouraud dextrose (ASD) mostra que a autoclavagem influencia diretamente no crescimento de *Cryptococcus* em ASD. O tempo prolongado de exposição a altas temperaturas de ASD provoca a degradação de nutrientes, bem como o acúmulo de produtos dessa degradação podem exercer um efeito antimicrobiano. Em meio de cultivo líquido, *Cryptococcus* apresentou melhor crescimento em meio RPMI na presença de 0,0330 M de MOPS, pH 5,5, 2% de glicose e inóculo de aproximadamente 8×10^4 permitindo também a melhor determinação das CIMs para AFB e FLZ. As modificações estudadas neste meio de cultivo representam uma alternativa interessante para a melhor determinação das CIMs e, conseqüentemente, a geração de pontos de corte clínico para outros antifúngicos.

Palavras-chave: *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., Combinação, Derivados Quinolínicos, Antifúngicos, Suscetibilidade, Crescimento fúngico.

ABSTRACT

From cultivation to new therapeutic strategies: Statistical optimization of culture media and susceptibility associated with the search for new molecules and combinations to combat pulmonary mycoses

Pulmonary mycoses have nonspecific symptoms or are even asymptomatic, which impacts early diagnosis and consequently initiation of therapy for a good prognosis. Immunosuppressed patients are the most affected, in these individuals the mortality rates are high and the treatment is prolonged. *Aspergillus* and *Cryptococcus* are among the most isolated genera in pulmonary infections. Few therapeutic options are available for *Cryptococcus* spp., and increasing cases of resistance are observed for *Aspergillus* spp. showing the need to search for new therapeutic alternatives. Importantly, growth rate and other growth characteristics can vary widely between different yeast species, including those of the *Cryptococcus* and *Candida* genera. These differences can have significant implications for the detection and treatment of fungal infections. This fact has a direct impact on the methods of evaluating susceptibility, and growth in solid media, among other methodologies, requiring the search for full growth during biological assays. As new therapeutic alternatives, this work evaluated the performance of quinolinic derivatives on *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. For *Cryptococcus* spp., the derivatives showed excellent activity, with minimum inhibitory concentrations (MIC) of $\leq 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, among them, the most active were clioquinol (CQ) and PH153. The mechanisms of action reveal that these compounds do not bind to the ergosterol present in the fungal cell membrane. However, the presence of 0.8 M of sorbitol influenced the activity of the compounds, which, due to their metal chelating characteristics, may be delaying the osmotic imbalance of the cell. As a result of this probable mechanism, inhibition of melanin synthesis, which is metal-dependent and an important virulence factor, was also observed. The death curve tests, as well as the minimum fungicidal concentration (MFC), corroborate the probable mechanism of action, since its behavior is fungistatic, with the death of yeasts due to starvation. In the case of *Aspergillus* spp. derivatives also showed activity, but the best MIC was obtained with CQ. Binary and ternary combinations were performed using CQ, amphotericin B (AMB), and itraconazole (ITZ). Mixtures of

drugs that showed significant synergism, such as the combination of CQ+ITZ and AMB+ITZ, allowed for a reduction of the necessary concentrations by more than six-times concerning the MIC of the drugs when used individually. Combinations were also explored for *Cryptococcus* species using CQ, AMB, fluconazole (FLZ), and 8-hydroxyquinoline (8HQ). The combination that obtained the best synergism was observed between FLZ in the presence of CQ or 8HQ, resulting in a synergism score three times higher than those found for FLZ+AMB, used in the treatment of cryptococcosis with daily doses of 400-800 mg and 0.5 -1 mg/kg, respectively, per day. FLZ concentration was reduced from approximately 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (50% inhibition) to 0.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the presence of CQ, inhibiting more than 90% of fungal growth. In addition, the combination of FLZ+CQ inhibited melanin production, did not show acute toxicity in an alternative *in vivo* model using *Tenebrio molitor* larvae, and lack of irritability at the tested concentrations verified through the methodology of HET-CAM (embryonic chorioallantoic membrane of chicken eggs). The combinations performed, as well as the use of the derivatives alone, presented good therapeutic strategies to be explored for the treatment of aspergillosis and cryptococcosis. Although *Aspergillus* spp. presents an abundant and relatively fast growth condition, *Cryptococcus* spp., being a yeast, presents a sub-optimal growth. The study carried out through the comparison of manufacturing methods of solid culture medium Sabouraud dextrose agar (SDA) shows that autoclaving directly influences the growth of *Cryptococcus* in SDA. The prolonged time of exposure to high temperatures of SDA causes the degradation of nutrients, as well as the accumulation of products of this degradation that can exert an antimicrobial effect. In liquid culture medium, *Cryptococcus* grew better in RPMI medium in the presence of 0.0330 M MOPS, pH 5.5, 2% glucose, and approximately 8×10^4 inoculum, also allowing better determination of MICs for AMB and FLZ. The modifications studied in this culture medium represent an interesting alternative for better determination of MICs and, consequently, the generation of clinical cutoff points for other antifungals.

Keywords: *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., Combination, Quinoline Derivatives, Antifungals, Susceptibility, Fungal Growth.

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), a presente tese de doutorado segue a seguinte a sequência:

- 1) Introdução e relevância do tema**
- 2) Objetivos**
- 3) Revisão bibliográfica**
- 4) Capítulos (I a V) - Manuscritos**
- 5) Discussão geral**
- 6) Conclusões e perspectivas**
- 7) Referências Bibliográficas**

Os tópicos **1, 2, 3, 4, 6, e 7** foram formatados conforme os padrões técnicos estabelecidos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), através das NBR 6023/2002; NBR 10520/2002 e NBR 14724/2011. Os capítulos referentes aos manuscritos (publicados, submetidos e a serem submetidos) foram formatados especificamente conforme as regras dos periódicos selecionados e mencionados na apresentação de cada capítulo.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	23
OBJETIVOS.....	29
REVISÃO TEÓRICA GERAL	33
CAPÍTULO I (Manuscrito I) - The influence of the microwave oven on the production of solid culture medium and quality of microbial growth (A influência do forno microondas na produção de meios de cultivo sólido e qualidade do crescimento microbiano).....	51
CAPÍTULO II (Manuscrito II) - Improving susceptibility testing for <i>Cryptococcus</i> spp.: a study of protocols and perspective adaptations (Melhorando teste de susceptibilidade para <i>Cryptococcus</i> spp.: um estudo de protocolos e perspectivas de adaptações).....	83
CAPÍTULO III (Manuscrito III) - Promising anti-cryptococcal activity and melanin production inhibition by quinoline derivatives (Atividade anti-criptocócica promissora e inibição da produção de melanina por derivados de quinolina).....	133
CAPÍTULO IV (Manuscrito IV) - Synergic effect of fluconazole and quinoline derivatives combination against <i>Cryptococcus</i> spp. by response surface modeling (Efeito sinérgico da combinação de fluconazol e derivados de quinolina contra <i>Cryptococcus</i> spp. por modelagem de superfície de resposta).....	167
CAPÍTULO V (Manuscrito V) - Binary and ternary combinations of 8-hydroxyquinoline derivatives and antifungals by mixture statistical design as an alternative for aspergillosis infections (Combinações binárias e ternárias de derivados de 8-hidroxiquinolina e antifúngicos por delineamento estatístico de mistura como alternativa para infecções por aspergilose)	213

DISCUSSÃO GERAL	241
CONCLUSÕES.....	249
PERSPECTIVAS	253
REFERÊNCIAS	257

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA AO TEMA

Infecções fúngicas pulmonares podem ser causadas por vírus, bactérias e algumas vezes por fungos. Embora as infecções pulmonares fúngicas sejam menos frequentes do que as bacterianas e virais, o seu impacto é significativo devido às altas taxas de mortalidade, bem como diagnóstico e tratamento desafiadores (JOSÉ; BROWN, 2016). As modificações epidemiológicas e o crescente número de pacientes imunocomprometidos tornam essas infecções um problema de saúde pública. Embora a epidemiologia das infecções fúngicas pulmonares seja variável de acordo com a sua distribuição mundial, fungos oportunistas como *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Pneumocystis* spp., e outros fungos endêmicos, são as principais fontes desta patologia em humanos (LI et al., 2019; LI; LU; MENG, 2019).

O gênero *Aspergillus* é o mais isolado em grande parte dos estudos ao redor do mundo, e a forma comumente desenvolvida é a aspergilose broncopulmonar alérgica. Os sintomas da aspergilose pulmonar são insidiosos e inespecíficos, e quando ocorrem já indicam um estágio avançado da doença. *Aspergillus* spp. provoca a invasão tecidual, que pode ser observada em tomografia computadorizada de tórax; testes sorológicos também podem ser realizados para a confirmação da infecção, bem como exames histopatológicos e cultura de lavado broncoalveolar (SHERIF & SEGAL, 2010). Embora haja opções para o tratamento das aspergilose pulmonar (triazóis, equinocandinas, polienos), crescentes casos de resistência têm sido relatados (MEIJER et al. 2020; CHOWDHARY et al., 2017; JIMÉNEZ-ORTIGOSA et al., 2017).

Estudos indicam que devido a sua ampla distribuição ambiental, as células de *Aspergillus* spp. encontram-se rotineiramente em contato com fungicidas em lavouras das mais distintas cultivares, sendo que estes fungicidas possuem mecanismos de ação muito similares aos antifúngicos utilizados no tratamento destas infecções. Logo, essa pressão seletiva ambiental faz com que estas células se adaptem à ação dos fungicidas e essa pré-exposição ocasiona a designada resistência cruzada (FRAAIJE et al. 2020; BERGER et al., 2017).

Alguns fatores predisponentes agravam esta infecção, um deles são as cicatrizes ocasionadas pela infecção prévia a *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes recuperados. Essas cicatrizes são locais ótimos para o desenvolvimento de aspergiloma, uma formação massiva de hifas de *Aspergillus*

spp. que ocupam esse espaço deixado pelas cicatrizes, o que torna essa forma de infecção praticamente incurável e uma das únicas alternativas é a remoção cirúrgica da lesão massiva, acompanhada da terapia antifúngica para evitar que a infecção continue e se restabeleça (KOUSHA; TADI; SOUBANI et al., 2011).

Já a criptococose, embora tenha o início do seu processo infeccioso no tecido pulmonar, a disseminação através dos tecidos permite que este atinja o sistema nervoso central (SNC), pelo qual possui tropismo. Assim como *Aspergillus* spp., a sua infecção é caracterizada pela inalação de esporos ou leveduras dissecadas presentes no ambiente. Entretanto, as células inaladas, quando não depuradas pelo sistema imune, permanecem dormentes e podem desencadear a infecção assim que ocorra um quadro de imunossupressão do hospedeiro (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

A causa mais grave da doença e com maior taxa de mortalidade é a meningite criptocócica. A sobrevivência e disseminação das células através dos tecidos pode ocorrer por diversas maneiras que incluem a formação de células gigantes, a modulação da resposta do sistema imunológico e o uso de macrófagos como “cavalo de Troia”. Além disso, *Cryptococcus* spp. conta com diversos fatores de virulência como espessamento da cápsula polissacarídica, a produção de melanina, a produção de urease e formação de biofilme, que impactam sobre o tratamento da infecção (COELHO et al., 2014).

As opções terapêuticas, diferente de *Aspergillus* spp., são muito limitadas. Apenas três fármacos são utilizados hoje no tratamento da criptococose, sendo estes anfotericina B, fluconazol e flucitosina. Entretanto, a flucitosina não está disponível para a comercialização em todos os países, como é o caso do Brasil. Além disso, a monoterapia com fluconazol ou flucitosina são evitados devido à seleção e ao rápido desenvolvimento de cepas resistentes. Dessa forma, a associação entre anfotericina B e fluconazol ou flucitosina é empenhada principalmente em casos de meningite criptocócica. Os demais antifúngicos apresentam problemas como a resistência intrínseca, baixa permeabilidade da membrana hematoencefálica e toxicidade (MOURAD; PERFECT, 2018; IYER et al., 2021).

Outro fator que influencia negativamente o tratamento das infecções por *Cryptococcus* spp. é a ausência de pontos de corte, onde apenas a anfotericina B está disponível no documento de pontos de corte clínicos da EUCAST. Esse fato ocorre devido à dificuldade na padronização dos testes de suscetibilidade e obtenção das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) tendo em vista as características de crescimento lento de *Cryptococcus* spp.. Logo, o estudo das melhores condições de crescimento para a obtenção de CIMs fidedignas e reproduzíveis é essencial não somente para a determinação de pontos de corte, mas também para a pesquisa de novas moléculas e estratégias terapêuticas.

Dessa forma, o presente trabalho aborda a necessidade do estudo de meios de cultivo e melhoria dos testes de suscetibilidade para que proporcionem um crescimento vigoroso de *Cryptococcus* spp. sendo possível a melhor avaliação e identificação de novas moléculas e alternativas terapêuticas. O gênero *Cryptococcus* spp. também foi estudado sobre a atividade de derivados de 8-hidroxiquinolina, prováveis mecanismos de ação, toxicidade e a associação deste a antifúngicos comerciais. Assim como *Cryptococcus* spp., e tão importante patógeno pulmonar quanto, *Aspergillus fumigatus* foi estudado frente a derivados de 8-hidroxiquinolina e sua associação a antifúngicos comerciais. Este estudo traz como abordagem novas estratégias terapêuticas no combate a dois dos principais agentes de infecções pulmonares fúngicas, *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus* spp..

OBJETIVOS

Tendo em vista a problemática envolvida na carência de novos antifúngicos, o crescente número de indivíduos imunossuprimidos e casos de infecções fúngicas resistentes, este trabalho tem como objetivo o estudo de derivados de 8HQ como potencial antifúngico frente aos fungos patogênicos pulmonares *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus* spp., e associações, bem como otimizar os meios de cultivo sólido e líquido na melhor detecção de atividade para *Cryptococcus* spp.. A partir desta proposta geral, os objetivos específicos consistem em:

1. Otimizar o crescimento de *Cryptococcus* spp. em meio de cultivo sólido através da modificação da forma de fabricação do meio de cultivo (Capítulo I).
2. Otimizar o crescimento de *Cryptococcus* spp. em teste de suscetibilidade para a melhor obtenção de CIMs através de fatoriais completos 2^2 e 2^3 (Capítulo II).
3. Avaliar a atividade de derivados de 8HQ sobre espécies de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, possíveis mecanismos de ação, inibição de fatores de virulência e perfil cinético de ação (Capítulo III).
4. Avaliar a associação de derivados de 8HQ a antifúngicos comerciais como estratégias terapêuticas com potencial sinérgico (Capítulo IV).
5. Estimar a atividade antifúngica de derivados de 8HQ sobre espécies de *Aspergillus* bem como associações triplas a antifúngicos comerciais (Capítulo V).

Epidemiologia e distribuição das micoses pulmonares

As infecções pulmonares invasivas oportunistas são de forma geral associadas a altas taxas de mortalidade, uma vez que são tipicamente relatadas em pacientes imunossuprimidos, como transplantados, pacientes com HIV e em tratamento quimioterápico devido a doenças oncológicas. Logo, o aumento no número de indivíduos imunossuprimidos culmina no aumento de micoses pulmonares.

No Brasil, um estudo envolvendo a análise de autópsias realizadas entre os anos de 2000 e 2015 mostra que a principal comorbidade relacionada as infecções fúngicas é a SIDA (29%), seguida de câncer (22%) (DANTAS et al., 2021). Os principais agentes envolvidos foram *Pneumocystis* spp., *Cryptococcus* spp. e *Histoplasma* spp. para SIDA, e *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. para a comorbidade câncer. Além disso, o pulmão foi o órgão mais afetado entre as autópsias com infecções fúngicas identificadas, sendo a prevalência de *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Pneumocystis* spp. e *Cryptococcus* spp. relatadas (DANTAS et al., 2021). Mudanças epidemiológicas também foram vistas de acordo com as décadas mostrando a diminuição de infecções por fungos endêmicos e aumento de fungos oportunistas, indicando a influência do processo de urbanização e avanços na medicina (DANTAS et al., 2021).

Um estudo realizado no Irã avaliou a distribuição das infecções fúngicas em pacientes sintomáticos hospitalizados em unidade de pneumologia entre os anos de 2017 e 2019. Os dados revelam que *Candida albicans* foi o agente mais isolado, e apenas 3,65% corresponde ao gênero *Aspergillus* spp. (RAFAT et al., 2020). Já um estudo observacional conduzido entre 2013 e 2019 na China acerca dos padrões das infecções pulmonares fúngicas mostrou que os gêneros mais isolados foram *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp. e *Talaromyces* spp. (LI et al., 2021).

Nos Estados Unidos uma análise retrospectiva de base de dados foi realizada durante o ano de 2018 para identificar a prevalência de infecções pulmonares fúngicas em pacientes hospitalizados diagnosticados com leucemia aguda ou linfoma agressivo. Esses dados mostram a prevalência de aspergilose (80% dos casos), seguida por candidíase, mucormicose e criptococose (AYUK

et al., 2021). Embora variações na distribuição de espécies e gêneros isolados nas infecções pulmonares sejam encontradas de acordo com a localização geográfica, comorbidades, idade dos pacientes, os fungos de maior frequência apresentados pelos estudos epidemiológicos acerca das infecções pulmonares são *Aspergillus* spp., *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp..

Recentemente relatos de caso têm apresentado aspergilose pulmonar associada a pacientes com COVID-19 (aspergilose pulmonar associada à COVID-19 - CAPA), bem como já havia sido associada a infecções por influenza. Essas coinfeções pioram o curso da doença acarretando no aumento das taxas de mortalidade que normalmente já são elevadas (KOEHLER et al., 2021; VERWEIJ et al., 2020). Assim como a aspergilose, a infecção por *Cryptococcus* spp. associada a COVID-19 (CACI) também tem sido relatada, culminando na morte do paciente na maioria dos casos (GIL et al., 2021; ALEGRE-GONZÁLEZ et al., 2021; THYAGARAJAN et al., 2021; REGALLA et al., 2022; SHARMA et al., 2022).

Uma hipótese que explica a coinfeção de *Cryptococcus* spp. e o vírus da síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) em pacientes HIV-negativos é a presença de esporos em estágio latente no pulmão destes pacientes, tornando-se ativos por uma possível supressão do sistema imune à administração de corticosteroides durante o manejo da infecção por SARS-CoV-2 (BEARDSLEY, et al., 2016; GIL, et al., 2021; KHATIB et al. 2020). Dessa forma, a micologia médica mostra a importância do diagnóstico correto e terapia adequada no desfecho clínico, bem como a vigilância epidemiológica que por muitas vezes acaba sendo negligenciada.

Agente etiológico *Cryptococcus*, distribuição, formas de infecção e fatores de virulência

Segundo estudos epidemiológicos realizados em um hospital universitário brasileiro, 85% dos pacientes acometidos pela criptococose são imunocomprometidos, sendo meningoencefalite a manifestação clínica mais comum (AGUIAR et al., 2017). Os complexos de espécies *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*, são os mais isolados nos casos de criptococose (AGUIAR

et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2021). A África do Sul é considerada uma região endêmica e apresenta o maior número de casos comparada aos demais continentes (GOVENDER et al., 2019).

Um estudo epidemiológico retrospectivo realizado no Hospital Universitário de Ribeirão Preto coletou dados de pacientes que receberam assistência médica entre os anos de 2000 e 2016, não infectados pelo HIV, e os complexos de espécies isolados. 66,7% amostras foram identificadas como complexo *C. neoformans* (sendo 100% identificados como genótipo VNI, *C. neoformans*) e 33,3% ao *C. gattii* (86% genótipo VGII, *C. deuterogattii*, e 17% VGI, *C. gattii*). Destes 36 pacientes, 72,3% apresentavam comorbidades e 27,7% eram imunocompetentes aparentemente saudáveis (NASCIMENTO et al., 2021). Outro estudo de coorte retrospectivo avaliou pacientes diagnosticados com criptococose por cultura positiva entre 1995 e 2013 de 5 centros na América do Norte e Austrália, mostrando que 63,8% dos isolados pertencem ao complexo *C. neoformans* e 36,2 ao complexo *C. gattii*. Os sítios de infecção mais acometidos foram SNC, pulmão e corrente sanguínea, sendo o pulmão mais afetados pelas espécies de *C. gattii* em comparação a *C. neoformans* (60,7% e 32,1%, respectivamente) (BADDLEY et al., 2021).

Um fator que auxilia na disseminação das espécies de *Cryptococcus* é o turismo e apresenta um papel importante na sua epidemiologia. Locais até então não acessados por humanos e que passam a ser visitados e pode resultar na dispersão de espécies para demais localidades (LINDBERG et al., 2017). As espécies estão presentes dentro de complexos, onde *C. neoformans* inclui quatro genótipos que correspondem a VNI e VNII (var. *grubii*, sorotipo A), VNIII (sorotipo híbrido AD), VNIV (var. *neoformans*, sorotipo D), e quatro genótipos de *C. gattii*: VGI, VGII (sorotipos B), VGIII e VGIV (sorotipos C) (HAGEN et al., 2015).

Além das diferenças genóticas, *C. neoformans* e *C. gattii* são encontrados em nichos ecológicos distintos, como por exemplo, *C. neoformans* é comumente encontrado em excrementos de pombos e mundialmente distribuído, entretanto *C. gattii* é encontrado em plantas altas (predominantemente isolados em eucaliptos) em regiões de climas subtropicais, tropicais e temperadas (OLIVEIRA et al., 2021). Em termos epidemiológicos

também são encontradas distinções entre as espécies, tendo em vista que *C. neoformans* é comumente associado a infecções (meningoencefalites) em paciente imunocomprometidos infectados pelo HIV e *C. gattii* tem maior incidência (infecção pulmonar) em pacientes imunocompetentes (HURTADO et al., 2019). Outra importante diferença entre as espécies ocorre a nível bioquímico, sendo *C. gattii* capaz de utilizar a glicina como fontes de carbono, nitrogênio e é resistente a L-canavanina, enquanto *C. neoformans* utiliza glicina apenas como fonte de nitrogênio e é sensível a L-canavanina (CHANG et al., 2015).

A apresentação da doença ocorre desde lesões pulmonares assintomáticas até infecções disseminadas. A principal via de infecção de *Cryptococcus* spp. ocorre pela inalação de esporos ou leveduras dissecadas presentes no ambiente. Em indivíduos imunossuprimidos, *Cryptococcus* spp. inicia o processo infeccioso nos pulmões ocasionando pneumonia. Em indivíduos imunocompetentes, essas células fúngicas são depuradas pelo sistema de defesa do hospedeiro, ou podem estabelecer uma infecção assintomática latente que raramente progride à patologia (COELHO et al., 2014). Suspeita-se que ocorra um primeiro contato com o patógeno ocorra na primeira infância, quando crianças estão em contato com ambientes contaminados (ao brincarem ou durante os primeiros passos), onde essas células permanecem dormentes nos tecidos pulmonares durante anos de vida, ou uma pequena reação similar a virose tenha ocorrido e passado despercebida (GOLDMAN et al., 2001). Quando algum evento significativo ocasiona a supressão do sistema imunológico, essas células dormentes/em baixa atividade metabólica são reativadas, se proliferam, e infectam os demais tecidos, atingindo a corrente sanguínea e conseqüentemente o SNC (ALANIO, 2020).

Cryptococcus spp. é considerado um patógeno que possui tropismo pelo SNC, entretanto a elucidação completa desse trajeto de migração pulmão-SNC ainda permanece pouco esclarecida devido a lacunas no entendimento da sua disseminação a partir do sítio primário de infecção até o SNC (VU et al., 2013). Entretanto há três formas amplamente descritas na literatura sobre a invasão do SNC pelas leveduras. A primeira forma de entrada de *Cryptococcus* spp. pode ocorrer pela permeação forçada das células fúngicas através das junções

celulares do tecido endotelial (DENHAM & BROWN, 2018). Esse processo é conhecido como paracitose, onde proteases como Mpr1 auxiliam na promoção da migração transendotelial, bem como a secreção da enzima urease que por sua vez enfraquece a área de ação sobre a parede do vaso favorecendo o acesso das células fúngicas (SANTIAGO-TIRADO et al., 2017; OKURUT et al., 2020). A segunda via de penetração é a transcitose, onde *Cryptococcus* spp. liga-se à proteína CD44 de células endoteliais microvasculares do cérebro humano através da proteína C quinase. Essa ligação possibilita o engolfamento da célula fúngica (JONG et al., 2008). E como terceira via, é conjecturada a entrada de *Cryptococcus* spp. através da barreira hematoencefálica no interior de macrófagos, sendo este mecanismo também conhecido como “cavalo de Troia” (SANTIAGO-TIRADO et al., 2017).

O gênero *Cryptococcus* também possui a capacidade de infectar várias espécies animais além de humanos (DANESI et al., 2021). *Cryptococcus* spp. tem sido relatado no interior de microrganismos predadores de vida livre tais como amebas, onde as células sobreviventes mostram que essa associação favorece adaptações fenotípicas e genéticas, permitindo a expressão de fatores de virulência (FU et al., 2021). A sobrevivência de *Cryptococcus* spp. a fagocitose de amebas é uma hipótese de sua evolução na capacidade de se replicar no interior de células fagocitárias de vertebrados e o sucesso no estabelecimento da infecção em humanos e animais (STEENBERGEN et al., 2001).

Os fatores de virulência expressos por *Cryptococcus* spp. são substanciais à sua patogenicidade. A cápsula polissacarídica presente neste microrganismo é primariamente constituída por polissacarídeos glucuronoxilomanana, galactoxilomanana e uma menor porção de manoproteínas. Essa cápsula é responsável por proteger as células de desidratação, bem como demonstra propriedades antifagocíticas que consequentemente reduzem a produção de células T e processos de apresentação de antígenos aos macrófagos (MONARI et al., 2006). Entretanto, no início da infecção *Cryptococcus* spp. utiliza a fagocitose para a sua replicação no interior das células, logo, opsoninas e interação das fibras polissacarídicas aos receptores fagocitários viabilizam seu desenvolvimento. Dessa forma, os

efeitos imunomoduladores favorecem a sua evasão ao sistema imune (MONARI et al., 2006; ZARAGOZA et al., 2009).

Outra importante mudança morfológica realizada são as células “titãs”, ou células gigantes, que possuem diâmetros superiores a 12 μm (não contando a cápsula) com elevado conteúdo de quitina, resistentes a ação de macrófagos e as microcélulas com diâmetros entre 2 e 4 μm , aparentemente adaptadas para a sobrevivência no interior de macrófagos apresentando-se de forma relativamente inativa metabolicamente, favorecendo a permanência destas células em estágios latentes da infecção (ALANIO et al., 2015).

Cryptococcus spp. possui um importante complexo fotorreceptor Bwc1-Bwc2, responsável por controlar a resposta fúngica à luz. Na ausência de luz, Bwc1 e Bwc2 ligam-se ao DNA suprimindo os genes envolvidos na filamentação. Já na presença de luz, essa inibição é revertida possibilitando a sua filamentação e regulação das vias de resistência aos raios ultravioleta, como por exemplo a produção de melanina. Esse mecanismo permite às células de *Cryptococcus* spp. a detecção da ausência de luz na infecção ao hospedeiro, impedindo o seu crescimento na forma de filamentos, o que tornaram a resposta imune do hospedeiro mais potente facilitando a depuração das células fúngicas (MAY et al., 2016).

A produção de melanina também possui função de proteção das células de oxidantes liberados pelas células do hospedeiro na contenção da infecção. *Cryptococcus* spp. produz a eumelanina, oligômeros ou polímeros de catecolaminas ciclizadas produzidos na presença de substratos como 3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) e outros compostos di/polifenólicos, e transportada em pequenas vesículas chamadas melanossomas que são transportadas e depositadas dentro da parede celular (EISENMAN et al., 2009). A melanina é caracterizada por uma coloração marrom escura, sendo insolúveis a maioria dos solventes. Quando presentes no ambiente, a melanina contida nas células de *Cryptococcus* spp. protegem sua estrutura da radiação UV, dessecação e predação por outros microrganismos (BAKER et al., 2022).

Quando está presente em hospedeiros mamíferos, a melanina induz a alteração da produção de citocinas, confere proteção às espécies reativas de

oxigênio e reduz a fagocitose (WANG & CASADEVALL, 1994; JACOBSON & TINNELL, 1993; MEDNICK et al., 2005; TAJIMA et al., 2019). Há relatos na literatura mostrando que a melanina também pode exercer efeito protetor à ação de agentes antifúngicos como anfotericina B (IKEDA et al., 2013; VAN DUIN et al., 2002) e caspofungina (VAN DUIN et al., 2002) reduzindo a atividade antifúngica. Além disso, o SNC apresenta uma variedade de catecolaminas (dopamina, epinefrina e norepinefrina) que podem ser utilizadas como precursores na produção de melanina por *Cryptococcus* spp. (BAKER et al., 2022).

Além da melanina, *Cryptococcus* spp. produz diversas enzimas de degradação, entre elas estão a fosfolipase B1 (Plb1) e urease, amplamente estudadas como importantes e determinantes mecanismos de virulência envolvidos na patogenicidade deste microrganismo (ALMEIDA et al., 2015). A Plb1 é transportada para a superfície celular através de vesículas e permite o aumento da adesão das células criptocócica às células epiteliais pulmonares, essencial ao início da infecção pulmonar. Essa enzima também é responsável por romper as ligações éster dos fosfolípidios presentes na membrana das células hospedeiras permitindo assim a sua penetração (EVANS et al., 2015). Plb1 permite que as células de *Cryptococcus* spp. sobrevivam no interior de macrófagos, uma vez que Plb1 é necessária a liberação de ácido araquidônico através dos fosfolípidios para a produção de eicosanoides criptocócicos envolvidos na regulação negativa das funções de macrófagos durante a infecção pulmonar (NOVERR et al., 2003). Esse processo é chave para a possível disseminação de *Cryptococcus* spp. para o SNC.

A atividade da urease é um dos principais fatores de virulência de *Cryptococcus* spp., desempenha um papel importante na sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. A urease é uma enzima extracelular que catalisa a hidrólise da ureia em dióxido de carbono e amônia (ALMEIDA et al., 2015; COX et al., 2000). A atividade ureolítica aumenta a invasão de *C. neoformans* no sistema nervoso central, promovendo o sequestro de leveduras dentro dos leitos microcapilares da barreira hematoencefálica (OLSZEWSKI et al., 2004). Um estudo demonstrou que a urease perturba o ajuste interno do fagossoma de mamíferos elevando o pH, promovendo assim uma exocitose não

lítica, atraso na replicação intracelular e redução os danos à membrana fagolisossomal. Dessa forma, esse cenário pode auxiliar a disseminação das células fúngicas transportadas no interior de macrófagos (FU et al., 2018).

Diagnóstico e tratamento da criptococose

Os sintomas pulmonares da infecção por *Cryptococcus* spp. são inespecíficos e comumente confundidos com uma síndrome gripal. Já a meningite criptocócica ocasiona dores de cabeça, tontura, desorientação, vômito, sinalizando desordem neurológica (PESCADOR; THAPA, 2022). A maior incidência ocorre em pacientes soropositivos na forma de meningite. Estima-se que 15% do total de mortes de pacientes HIV-positivos no mundo são ocasionadas pela meningite criptocócica, sendo $\frac{3}{4}$ correspondentes à África-subsaariana. Infecções pulmonares, teciduais ou disseminadas ocorrem com frequência muito menor neste público (OMS, 2018).

Para o diagnóstico, procede-se com a punção lombar para coleta e análise do líquido cefalorraquidiano (LCR), que é encaminhado para o teste rápido de antígeno (aglutinação em látex, enzimaímunoensaio, imunocromatográficos), exame micológico direto utilizando a coloração em tinta nanquim e cultura para identificação da espécie (OMS, 2018).

O uso de testes rápidos para detecção de antígeno no LCR, soro, plasma ou sangue total possuem a vantagem de não requerer altas habilidades profissionais para a punção lombar, rápido resultado de fácil interpretação e pode ser conduzido em locais com mínima infraestrutura laboratorial. São recomendados para o diagnóstico inicial, quando a punção lombar não é acessível ou é contraindicada. Entretanto, o uso de testes rápidos não substitui o exame de punção para análise de LCR (OMS, 2018).

Para adultos e adolescentes HIV-positivos com contagens de CD4 <100 cel./mm³ é recomendado a pesquisa de antígeno para *Cryptococcus* spp. antes da iniciação ou reiniciação da terapia com antirretrovirais. Indivíduos que apresentam positividade para o antígeno e os respectivos sinais e sintomas,

devem receber o tratamento com antifúngicos juntamente com a punção lombar para análise e alívio da pressão intracraniana (OMS, 2018).

O tratamento é baseado em terapia combinada. A fase de indução recomendada para adultos: 1 mg/kg/dia de anfotericina B desoxicolato e 100 mg/kg/dia de flucitosina, seguida de 1 semana de fluconazol 1200 mg/kg/dia. Como alternativa a indisponibilidade de algum fármaco usa-se as opções de duas semanas de fluconazol 1200 mg/kg/dia + 100 mg/kg/dia de flucitosina ou duas semanas de anfotericina B desoxicolato 1 mg/kg/dia + 1200 mg/g/dia de fluconazol. Nessa fase é recomendado o monitoramento de possíveis efeitos tóxicos que podem ser ocasionados pela anfotericina B e flucitosina. A fase de consolidação segue a fase de indução e consiste em 8 semanas de 800 mg/dia para adultos. Após a fase de consolidação inicia-se a fase de manutenção, também chamada de profilaxia secundária com a administração de 200 mg/dia de fluconazol. A fase de manutenção pode ser descontinuada quando o paciente encontra-se estável em ambas terapias, antirretroviral e antifúngica, por no mínimo 1 ano e contagens de células CD4 ≥ 200 cél./mm³ (OMS, 2018).

Agente etiológico *Aspergillus* spp., distribuição, formas de infecção e fatores de virulência

Aspergillus spp., assim como *Cryptococcus* spp., é um fungo ubíquo, presente no solo, água, matéria vegetativa e ar. Entretanto, *Aspergillus* spp. possui a capacidade de se desenvolver em ambientes inóspitos como concreto, mármore, materiais de madeira, materiais têxteis, produtos alimentícios, e ambientes hospitalares (ROJAS et al., 2012; CHAUDHURI et al., 2020; PARJO et al., 2016; SUBRAMANIAM et al., 2016; SHEIKH-ALI et al., 2014; TAGHIYARI et al., 2018; OETARI et al., 2018; NGO et al., 2021; WARRIS et al., 2001), fazendo deste fungo um patógeno inevitável e de difícil controle. A espécie mais envolvida em infecções clínicas é *Aspergillus fumigatus*, seguida por *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus*. Porém, essa distribuição pode variar de acordo com as diferenças regionais de umidade e temperatura (CADENA et al., 2021).

Estima-se que cerca de 100 a 1.000 conídios de *Aspergillus* spp. sejam inalados por dia, dependendo da carga do ambiente, sendo a grande maioria

removida pelas células epiteliais ciliares e macrófagos alveolares (VAN DE VEERDONK et al., 2017). *Aspergillus* spp. pode ocasionar infecções em indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos. Em imunocompetentes, a sua infecção é comumente associada a formas não invasivas como processos alérgicos de hipersensibilidade (aspergilose broncopulmonar alérgica) observados em pacientes com asma ou fibrose cística (BARNES; MARR, 2006). Entretanto, em imunossuprimidos *Aspergillus* spp. ocasiona infecções invasivas (aspergilose pulmonar invasiva), principalmente em pacientes com neutropenia severa, em ventilação mecânica. Novos fatores de risco continuam a surgir, como por exemplo as infecções virais tais como influenza A, influenza B, e mais recentemente a SARS-CoV-2 (CRUM-CIANFLONE, 2016; BORMAN et al., 2020; ZOU et al., 2020).

Um estudo retrospectivo populacional avaliou a incidência de formas pulmonares, e outras, de aspergilose em pacientes hospitalizados na Polônia durante os anos de 2009-2016. A média de incidência anual para aspergilose pulmonar invasiva foi de 4,0 por milhão (IC 95%: 3,0-5,0). Além disso foi possível observar que as taxas de hospitalizações por aspergilose pulmonar estão em ascendência (TARKA et al., 2019). Uma coleta de dados realizada em um hospital na Coreia do Sul entre janeiro 2016 a abril de 2018 mostra uma incidência de 1,3 casos/1.000 pacientes-dia e as espécies mais isoladas correspondentes as seções *Fumigati* (*A. fumigatus*) seguida por *Nigri* (*A. awamori*) (CHO et al., 2019).

No Brasil, uma análise retrospectiva de prontuários de pacientes atendidos no serviço de doenças respiratórias foi realizada entre o período de janeiro de 2018 a dezembro de 2019, mostrou que 53,8% dos pacientes com aspergilose pulmonar apresentavam histórico de tuberculose prévia e/ou tabagismo (61,5%). A espécie mais isolada foi *A. fumigatus* (53,8%) e a forma crônica da infecção é a mais recorrente (WESTPHAL et al., 2020). Ainda no Brasil, um estudo transversal foi realizado em duas instituições de referência em tuberculose no estado do Amazonas, onde 7% dos pacientes que apresentaram baciloscopia negativa foram positivos para micoses pulmonares, das quais 66,6% eram aspergilose (100% dos isolados correspondentes a *A. fumigatus*) (MATSUDA et al., 2021).

Os fatores de virulência desempenhados por *Aspergillus* spp. são divididos em imunoevasivos e não-imunoevasivos. Os não-imunoinvasivos incluem componentes de sua estrutura celular como a parede, enzimas, proteínas e alérgenos. A parede celular fúngica é crucial para a sua sobrevivência no ambiente e dispersão através do ar. Possui receptores de superfície essenciais para a sua penetração no tecido hospedeiro. Embora a parede celular tenha sido caracterizada como não-imunoevasiva, a galactosaminogalactano da parede celular é capaz de inibir citocinas pró-inflamatórias Th1 e Th17 de monócitos humanos, conferindo uma estratégia imunoevasiva (GRESNIGT et al., 2014). *Aspergillus* spp. também secreta enzimas proteolíticas, como serinoprotease, metaloprotease e aspartatoprotease, que induzem a degradação do tecido hospedeiro para invasão e captação de nutrientes (CHOTIRMALL et al., 2014).

Os principais fatores de virulência imunoevasivos desenvolvidos por *Aspergillus* spp. são o revestimento do esporo e DHN-melanina. O revestimento de seus conídios apresenta hidrofobinas que possibilitam dispersão e fixação no ambiente. No hospedeiro esse revestimento mascara as β -1,3-glucanas impedindo a detecção pelo sistema imune. DHN-melanina é o principal pigmento responsável pela coloração verde-acinzentada, conferindo proteção ao estresse oxidativo gerado por fagócitos, regula respostas de citocinas pró-inflamatórias, interfere na acidificação de fagolisossomas e protege o conídio da luz ultravioleta (CHOTIRMALL et al., 2014; ABAD et al., 2010).

Diagnóstico e tratamento da aspergilose

O diagnóstico da aspergilose pulmonar é baseado na anamnese do paciente, juntamente a exames de imagem, citologia e sanguíneos. Teste de detecção de β -(1,3)-D-glucana é recomendado para o diagnóstico de aspergilose invasiva para pacientes de alto risco, porém não é específica para *Aspergillus*, podendo apresentar reação cruzada com outros gêneros. O teste de detecção de galactomanana é recomendado como um bom marcador para a aspergilose invasiva, entretanto não é indicado para pacientes que estejam recebendo tratamento com antifúngicos (PATTERSON et al., 2016).

O exame de imagem mais recomendado para o diagnóstico da aspergilose é a tomografia computadorizada, sendo esta, importante no acompanhamento da evolução da terapia antifúngica (mínimo de 2 semanas após o início do tratamento). A broncoscopia é indicada juntamente ao lavado broncoalveolar, sendo essa amostra encaminhada para exames de rotina para cultura, citologia (presença do agente etiológico nos tecidos) e detecção de antígeno (galactomanana). Testes de biologia molecular como reação em cadeia de polimerase (PCR) podem ser conduzidos, entretanto essa técnica pode variar de acordo com a metodologia utilizada, logo seus resultados devem sempre ser analisados em conjunto com outros testes para dar suporte ao diagnóstico (PATTERSON et al., 2016).

O tratamento da aspergilose pulmonar invasiva é baseado em três principais classes: polienos, triazóis e equinocandinas. A primeira linha de tratamento para a aspergilose é voriconazol 200-300 mg 12/12h. Anfotericina B deoxicolato e suas derivações lipídicas (3–5 mg/kg/dia intravenoso) são uma opção quando o uso de voriconazol não é indicado ou está indisponível. Formulações de anfotericina aerossolizadas são opções de profilaxia para pacientes com neutropenia prolongada. As equinocandinas embora disponíveis e efetivas, não são recomendadas como tratamento primário da aspergilose, sendo utilizadas quando os poliênos ou triazóis estão indisponíveis ou seu uso é inviável (PATTERSON et al., 2016).

Novos fármacos, reposicionamento e combinações de antifúngicos

Mesmo com o avanço da medicina e pesquisas acerca do tratamento da criptococose e aspergilose, estes seguem sendo limitados por diversos fatores já citados anteriormente, mostrando a importância da busca e desenvolvimento de novos fármacos. Novas moléculas descobertas com atividade antifúngica e em estágio avançado de pesquisa são APX001 (inibidor da âncora de manoproteínas pela glicosilfosfatidilinositol (GPI)), em testes clínicos para criptococose, aspergilose e candidíase (SHAW et al., 2018; ZHAO et al., 2019).

VT-1598 inibe a enzima CYP51 desestabilizando a rota de síntese do ergosterol, possui ação de amplo espectro incluindo espécies de *Cryptococcus*

e *Aspergillus*, também em estágio de estudos clínicos (GARVEY et al., 2019; GARVEY et al., 2018). APX879 possui como alvo a proteína Hsp90, apresentando efetividade em modelos de infecção contra a criptococose, mas não para aspergilose, candidíase e mucormicose (IYER et al., 2021).

Derivados quinolínicos como 8-hidroxiquinolina e clioquinol são reportados devido a sua ampla aplicação terapêutica como neuroprotetora, anti-inflamatória, anticâncer e antimicrobiana (MAO et al., 2009; CHERDTRAKULKIAT et al., 2016; KASSEM et al., 2012; SAADEH et al., 2020; WANG et al., 2014; CHAN et al., 2012; INSUASTY et al., 2019). Artigos já descreveram a atividade antifúngica destas moléculas sobre espécies de *Cryptococcus*, *Candida* e *Aspergillus* (YOU et al., 2018, PIPPI et al., 2019; YAAKOV et al., 2017). A 8-hidroxiquinolina é considerada uma estrutura privilegiada para a realização de modificações estruturais e desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (SONG et al., 2015; JOAQUIM et al., 2021; KASSEM et al., 2012; SAADEH et al., 2020).

O reposicionamento de fármacos tem sido amplamente estudado e sugerido como uma alternativa à demanda por novas moléculas antifúngicas, uma vez que a burocracia e o baixo interesse das indústrias farmacêuticas atrasam ainda mais esse processo (KIM et al., 2019). Sertralina e tamoxifeno são exemplos de medicamentos reposicionados e testados para o tratamento da criptococose em ensaios clínicos, entretanto não foram observadas evidências expressivas de benefícios terapêuticos em relação à terapia padrão (RHEIN et al., 2019; NGAN et al., 2019). Para *Aspergillus* spp., fármacos como clozapina, tacrolimus, ciclosporina, haloperidol, dissulfiram, clorpromazina e auranofina já foram relatados na literatura, porém sem estudos clínicos (PEYCLITT et al., 2021).

A terapia combinada é utilizada para o tratamento da criptococose, e também tem sido explorada para o tratamento da aspergilose. Combinações utilizando voriconazol e anidulafungina foram testadas em coreanos e não coreanos, mostrando que o desempenho da combinação apresentou melhor evolução clínica quando comparado aos fármacos sozinho (administrados junto a placebo) para indivíduos coreanos (LEE et al., 2019). Essa diferença de resposta terapêutica entre grupos étnicos ocorre devido a cerca de 23% da

população asiática possuir um polimorfismo na CYP2C19 que resulta na metabolização fraca de voriconazol (DEAN, 2019). A combinação entre caspofungina e voriconazol também foi estudada, resultando em aumento nas taxas de sobrevivência comparadas a monoterapia com voriconazol (MARR et al., 2004).

Embora a combinação entre anfotericina B e fluconazol seja utilizada no tratamento para a criptococose, seu desempenho ainda é considerado abaixo do ideal uma vez que as taxas de mortalidade continuam sendo elevadas (DAY et al., 2013). Uma justificativa a este cenário tem sido associada aos mecanismos de ação envolvidos na atividade destes fármacos, uma vez que ambos possuem um alvo em comum, o ergosterol (SANTOS et al., 2012). Fluconazol inibe a enzima 14- α -demetilase interrompendo a conversão de lanosterol à ergosterol, consequentemente diminuindo a sua disponibilidade na membrana celular (ZERVOS e MEUNIER, 1993). Entretanto, o principal mecanismo de ação da anfotericina B é a ligação ao ergosterol presente na membrana celular fúngica, culminando na formação de poros e extravasamento celular (NOOR & PREUSS, 2022).

Vários estudos são apresentados na literatura utilizando combinações, como por exemplo anfotericina B e terbinafina (REICHERT-LIMA et al., 2016), voriconazol e anfotericina B lipossomal (FUJIOKA et al., 2019), anfotericina B e voriconazol (SILVA et al., 2012), posaconazol e flucitosina (BARCHIESI et al., 2001), posaconazol e anfotericina B (BARCHIESI et al., 2004). A maioria destes estudos, embora utilizem testes *in vitro* ou modelos alternativos de infecção, mostra que as associações possuem desempenho superior à monoterapia, representando um campo de conhecimento a ser explorado.

A importância do crescimento fúngico e desempenho dos testes suscetibilidade

O crescimento de microrganismos é essencial para a microbiologia. Na micologia, observamos que diferentes gêneros possuem características de desenvolvimento e metabolismo distintos, o que torna o seu crescimento mais rápido, lento, mais abundante ou mais escasso. Neste sentido o controle de

qualidade de meios de cultura, bem como a sua constituição e fabricação estão diretamente relacionados ao desempenho dos testes realizados na rotina. Um artigo avaliou a recuperação de *Haemophilus influenzae* em placas de ágar sangue de carneiro comerciais e produzidas em laboratório. As placas comerciais não apresentaram crescimento do microrganismo, enquanto as placas confeccionadas em laboratório foram capazes de suportar o crescimento de *H. influenzae* (CANTARELLI et al., 2003). Esse efeito pode ocorrer devido a uma série de fatores como a qualidade da matéria prima utilizada, pH, gelificação e processo de fabricação.

O processo de fabricação dos meios de cultivo inclui a esterilização, onde a autoclavagem é o mais utilizado. Entretanto, a autoclavagem pode degradar os constituintes dos meios de cultivo devido ao calor excessivo atingido durante o processo de esterilização (SHAREEF et al., 2019; BASU; PAL; DESAI, 2005). A degradação dos constituintes dos meios de cultivo que são ricos em aminoácidos e açúcares pode ocasionar a formação de melanoidinas, produtos na reação de Maillard (WANG et al., 2011). Esses produtos já foram relatados devido a atividade antimicrobiana, logo a sua presença em meios de cultivo sólidos pode prejudicar diretamente o crescimento dos microrganismos (KIM et al., 2003; RURIÁN-HENARES; MORALES, 2008; RURIÁN-HENARES; MORALES, 2007) podendo mascarar resultados de contagem de colônias, dificultar o isolamento de patógenos de amostras clínicas e interferir em testes de suscetibilidade por disco-difusão (FERNANDEZ-TORRES et al., 2006; WANG; HSIAO, 1995).

Assim como nos meios de cultivo sólidos, o crescimento robusto dos microrganismos também deve ser atingido para testes realizados em meios de cultivo líquido. Um dos principais testes utilizando o meio de cultivo líquido na microbiologia são os testes de suscetibilidade. Logo, um crescimento fraco pode culminar na dificuldade de leitura do teste e determinação errônea das concentrações inibitórias mínimas. Embora testes de suscetibilidade tenham sido estudados durante anos visando a atualização e padronização de protocolos, muitos microrganismos com diferentes características de crescimento apresentam desempenhos subótimos e necessitam de estudos

atuais que busquem o melhor desempenho (PEANO et al., 2017; ZARAGOZA et al., 2011).

CAPÍTULO I – The influence of the microwave oven on the production of solid culture medium and quality of microbial growth

Nota: Manuscrito publicado na revista *Anais da Academia Brasileira de Ciências*.

DOI: 10.1590/0001-3765202220211104

O Capítulo 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 53-82.

Bazana LCG, Carvalho ÂR, Mace M, Fuentefria AM. The influence of the microwave oven on the production of solid culture medium and quality of microbial growth. *An Acad Bras Ciênc.* 2022;94(3):e20211104. doi:10.1590/0001-3765202220211104

CAPÍTULO II – Improving susceptibility testing for *Cryptococcus*: a study of protocols and perspective adaptations

Nota: Manuscrito a ser submetido ao periódico *Mycopathologia*.

O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 85 – 132, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da avaliação de diferentes fatores que impactam no crescimento e susceptibilidade fúngica utilizando delineamento experimental para *Cryptococcus* spp..

CAPÍTULO III – Promising anti-cryptococcal activity and melanin production inhibition by quinoline derivatives

Nota: Manuscrito a ser submetido ao periódico *Mycoses*.

O texto completo do capítulo 3, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 135 – 165, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da atividade anti-criptocócica de derivados quinolínicos, mecanismos de ação, toxicidade e irritabilidade.

CAPÍTULO IV – Synergic effect of fluconazole and quinoline derivatives combination against *Cryptococcus* spp. by response surface modeling

Nota: Manuscrito a ser submetido ao periódico *Journal of Medical Microbiology*.

O texto completo do capítulo 4, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 169 – 211, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da atividade anti-criptocócica de combinações de derivados quinolínicos a antifúngicos comerciais, inibição de fatores de virulência, curvas de tempo de morte, toxicidade e irritabilidade.

CAPÍTULO V – Binary and ternary combinations of 8-hydroxyquinoline derivatives and antifungals by mixture statistical design as an alternative for aspergillosis infections

Nota: Manuscrito a ser submetido ao periódico *Medical Mycology*.

O texto completo do capítulo 5, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 215 – 239, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da avaliação de combinações duplas e triplas de derivados quinolínicos a antifúngicos comerciais sobre cepas de *Aspergillus* spp..

DISCUSSÃO GERAL

A criptococose e a aspergilose são duas das principais infecções fúngicas pulmonares, ambas com suas particularidades relacionadas a formas de infecção e tratamento. Porém, em comum, apresentam altas taxas de mortalidade, crescentes relatos de desenvolvimento de resistência aos antifúngicos, sendo consideradas infecções de difícil tratamento. Ambos gêneros acometem majoritariamente pacientes imunossuprimidos em suas formas mais graves, como a aspergilose pulmonar invasiva e a meningite criptocócica.

A carência de estudos epidemiológicos nacionais recentes e robustos sobre as infecções fúngicas se deve principalmente por não serem doenças de notificação compulsória, logo não são objetos de vigilância epidemiológica. Entretanto, a portaria Nº 264 do dia 17 de fevereiro de 2020 faz a inserção de esporotricose, criptococose e paracoccidioidomicose como infecções fúngicas de notificação compulsória. Embora essa inserção seja recente, o acompanhamento irá permitir que dados sejam coletados revelando as características dessas infecções no Brasil. Entretanto, as demais infecções fúngicas, como a aspergilose, permanecem fora desta lista, dificultando o seu acompanhamento e comportamento ao longo dos anos.

Mundialmente, estima-se que aproximadamente 4,8 milhões de pessoas são afetadas pela aspergilose broncopulmonar alérgica e 400.000 apresentem aspergilose pulmonar crônica (DENNING; PLEUVRY; COLE, 2013). Estima-se que aproximadamente 15.000 hospitalizações por aspergilose ocorreram nos Estado Unidos em 2014, com um gasto estimado em 1 bilhão de dólares (BENEDICT et al., 2019). Um estudo realizado em 2010, em um hospital universitário da cidade de Porto Alegre mostrou que *Aspergillus* foi o fungo filamentosos mais isolado em doenças fúngicas invasivas, sendo responsável por metade das infecções em pacientes com desordens hematológicas e taxa de mortalidade de 35,3% (AQUINO et al., 2010). Já em 2011 um estudo realizado com base nos dados coletados através do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) mostrou 6.832 casos de meningite criptocócica e 1.010.465 casos de aspergilose (GIACOMAZZI et al., 2016).

Tendo em vista o cenário geral de complicações das infecções causadas por *Cryptococcus* e *Aspergillus*, novas estratégias terapêuticas devem ser desenvolvidas a fim de aumentar o arsenal terapêutico e combater o

desenvolvimento de resistência. Para isso, os derivados quinolínicos estudados nos **capítulos III e V** apresentaram importantes resultados. 8HQ, CQ, PH151, PH160, PH179 e PH304 apresentaram atividade para ambos gêneros. Entretanto, 8HQ, PH304 e PH179 mostraram um perfil de suscetibilidade de *Aspergillus* inferior ao encontrado para *Cryptococcus*. CQ apresentou a melhor atividade entre os derivados testados para todos os isolados e cepas de *Aspergillus* e *Cryptococcus*. Na literatura clioquinol também apresenta amplo espectro de ação com concentrações muito baixas atingindo a ordem de nanogramas (PIPPI et al., 2017; LASKARIS et al., 2016; OLALEYE et al., 2021; YOUSFI et al., 2020; YOU et al., 2018). Além disso, CQ inibiu a produção de melanina em todas as concentrações testadas. Já as moléculas PH151, PH153, e 8HQ inibiram a produção de melanina de acordo com a dose testada para *C. neoformans* e *C. gattii*, importante fator de virulência relacionado à sua patogenicidade.

8HQ representa uma estrutura privilegiada que permite inúmeras reações químicas e modificações estruturais. Além disso, a presença da hidroxila e proximidade ao nitrogênio heterocíclico faz que estas moléculas sejam bons agentes quelantes bidentados (SAADEH et al., 2020). Esta é uma das hipóteses de mecanismos de ação para a sua atividade biológica mais difundida (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013; JOAQUIM et al., 2021; HESEL et al., 2017) e trazida por estudos anteriores realizados com os derivados apresentados neste trabalho (JOAQUIM et al., 2021), porém não testados para os gêneros *Aspergillus* e *Cryptococcus* até então.

Estudos de combinação de CQ a antifúngicos são escassos na literatura (DA COSTA et al., 2021; DE CHAVES et al., 2020; DA COSTA et al., 2020), e inexistente para os agentes causadores da criptococose e aspergilose, apresentando uma oportunidade que foi explorada no **capítulo IV e capítulo V**. A busca por associações envolvendo 8HQ e CQ foram baseadas nas evidências encontradas através dos testes de mecanismos de ação realizados e suporte da literatura que indicam um efeito quelantes destas moléculas sobre os microrganismos (YOU; ZHANG; RAN., 2020). Logo, a associação destas moléculas a antifúngicos comerciais (FLZ, AMB, ITZ) que possuem mecanismos bem elucidados e diferentes sítios de ação revelaram significativo sinergismo

para *Cryptococcus* e *Aspergillus*. A combinação de FLZ e CQ para *Cryptococcus* demonstrou uma grande redução na concentração de fluconazol (0,125 µg/mL, com inibição superior a 90% do crescimento fúngico) e inibição da produção de melanina por *C. neoformans* e *C. gattii*.

Um estudo com *Cryptococcus* relatou que a deficiência na captação de ferro por cepas mutantes para o gene *CFO1* (ferroxidase) ocasiona o aumento da suscetibilidade ao fluconazol bem como a redução de *ERG11*, gene responsável pela via de biossíntese do ergosterol (KIM et al., 2012). A depleção deste gene é possivelmente atrelada ao fato de *ERG11p* ser uma enzima dependente da ativação da proteína de ligação à heme, *Dap1* (HOSOGAYA et al., 2013). Outros metais também podem estar relacionados à atividade de azóis, porém sem um mecanismo completamente elucidado (HUNSAKER: FRANZ, 2019).

No caso de *Aspergillus*, a atividade de CQ mostrou ser fortemente inibida pela adição de 1 mM de FeSO_4 ao meio de cultivo, e uma pequena perda de efeito na presença de ZnCl_2 (LASKARIS et al., 2016). Em estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa a atividade de CQ e PH160 na presença e ausência de metais foi analisada, ZnCl_2 culminou na ausência de atividade para PH160 testada para *Candida* e fungo dermatofíticos e CQ diminuiu fracamente a sua atividade, em concordância com o estudo citado anteriormente (JOAQUIM et al., 2021). Portanto a cadeia lateral da pirimidina presente na posição 7 do anel quinolínico da molécula PH160 proporcionou maior afinidade/seletividade na ligação de ZnCl_2 comparado a CQ. O que também justifica a inibição da melanina pelos derivados, uma vez que os metais são essências para a rota de biossíntese.

Embora escassos, um estudo envolvendo a combinação entre CQ e antifúngicos já foi testada para fungos dermatofíticos (DA COSTA et al., 2020). Outro estudo foi desenvolvido associando 8HQ e AFB sobre *Leishmania martiniquensis*, apresentando um efeito sinérgico em formas amastigotas intracelulares e promastigotas, não apresentando efeito tóxico sobre as células hospedeiras (CHANMOL et al., 2022). Quelantes como ácido etilenodiaminotetracético, deferoxamina, deferiprona, deferasirox, ciclopirox olamina e lactoferrina foram combinados aos antifúngicos AFB, FLZ, ITZ,

voriconazol e caspofungina. Apenas a combinação entre AFB e lactoferrina apresentou um efeito sinérgico para todas as cepas testadas (LAI et al., 2016).

A busca por novas alternativas terapêuticas é de grande importância tanto para a criptococose como para a aspergilose. A metodologia básica utilizada na triagem de novos agentes terapêuticos são testes de suscetibilidade. Além da busca por novos antifúngicos, os testes de suscetibilidade são essenciais na detecção de isolados clínicos resistentes. A microdiluição em caldo é um dos métodos mais utilizados para a avaliação da atividade biológica, entretanto, é a base para diversos outros testes como citotoxicidade, ensaios de combinação, mecanismos de ação e até mesmo curvas de tempo de morte. Logo, a identificação de fatores que influenciam no crescimento dos microrganismos e padronização é determinante para a qualidade dos resultados obtidos, estudados nos **capítulos I e II**.

No **capítulo I** deste trabalho, mostramos a diferença substancial de crescimento de microrganismos cultivados em meio de cultura sólido fabricado por autoclavagem e uso de forno micro-ondas. Podemos perceber claramente que microrganismos de crescimento lento, como *Cryptococcus* e *Microsporium* mostram menor desenvolvimento nos meios de cultivo confeccionados na autoclave e como os produtos da degradação desse meio de cultivo ao calor podem exercer uma atividade antimicrobiana (KUKUMINATO; KOYAMA; KOSEKI, 2021; DIAZ-MORALES et al., 2022). Esse efeito pode impactar diretamente nos resultados de testes que utilizam a contagem de unidades formadoras de colônias, bem como dificultar o isolamento de fungos em amostras clínicas, principalmente quando estes apresentam características de crescimento fastidioso.

Uma vez que os diferentes gêneros fúngicos apresentam diferentes padrões de crescimento em meio de cultivo sólido, alguns gêneros apresentam também resultados subótimos para os protocolos de suscetibilidade em meio líquido existentes e conseqüentemente não possuem pontos de corte clínico, como por exemplo *Malassezia*, *Rhodotorula*, dermatófitos, entre outros (ZARAGOZA et al., 2011; PEANO et al., 2017; MELETIADIS et al., 2001). Esta problemática foi alvo de estudo no **capítulo II** mostrando a diferença de crescimento de *Cryptococcus* de acordo com diferentes meios de cultivo líquidos

e inóculo, bem como diferentes padrões de suscetibilidade. Este trabalho mostra que RPMI em pH 5,5, 2% de glicose e 0,0330 M de MOPS apresentou a melhor densidade ótica e conseqüentemente as melhores leituras das CIM's comparadas aos protocolos CLSI e EUCAST. Entretanto o pH de 5,5 pode modificar as CIM's de AFB, passando de sensíveis a resistentes.

Um dos principais problemas encontrados quando o crescimento destes microrganismos não é adequado para o teste de suscetibilidade é a dificuldade na leitura e interpretação dos resultados (BELLANGER et al., 2020). De forma geral, o inóculo é ajustado utilizando três principais formas, o ajuste por contagem de células em câmara de Neubauer, ajuste de turbidez utilizando a escala de McFarland e o ajuste utilizando a leitura espectrofotométrica baseada na escala McFarland (ABERKANE et al., 2002). Porém, todos os métodos possuem uma grande margem de erro na quantidade de células medidas. Além disso, técnicas que utilizam a análise turbidimétrica acabam por não levar em consideração o tamanho celular dos diferentes gêneros (ex.: *Candida* e *Cryptococcus*).

Tamanhos celulares distintos ocasionam dispersões distintas da luz, logo é preciso padronizar essa medida de acordo com a variação entre os gêneros. Em estudo anterior nosso grupo mostrou que a padronização do inóculo usando a contagem em câmara de Neubauer e a leitura espectrofotométrica possibilita a redução da variabilidade no número de células em suspensão. Por exemplo, para atingir uma densidade celular de 5×10^6 cél./mL de *Candida* spp. a absorbância correspondente é de aproximadamente 0.130 – 0.140 nm (CARVALHO et al., 2021), e para atingir uma a mesma densidade celular de *Cryptococcus* é necessário o ajuste da absorbância em aproximadamente 0.350 – 0.360 nm. Para isso, a padronização do inóculo e meio de cultivo é essencial para que *Cryptococcus* atinja uma massa celular suficiente possibilitando a leitura e interpretação dos resultados.

CONCLUSÕES

- O cultivo adequado e o crescimento abundante de microrganismos são essenciais para a microbiologia clínica no isolamento de patógenos e testes de suscetibilidade antimicrobiana. O processo de fabricação do meio sólido de ágar Sabouraud dextrose mostrou a sua influência no crescimento de *Cryptococcus* e fungos dermatofíticos. Logo, o forno micro-ondas como alternativa à autoclave no preparo do meio de cultura evita a exposição prolongada ao calor e a degradação exacerbada das fontes de nutrientes contidas no meio de cultura, possibilitando resultados mais fidedignos para testes microbiológicos.
- A obtenção de pontos de corte para antimicrobianos é essencial no tratamento adequado dos pacientes. Devido a vasta diferença de metabolismo e crescimento entre os diversos gêneros de fungos. Essas diferenças resultam em desempenhos variáveis na obtenção da suscetibilidade. Dessa forma, a adaptação do meio de cultura e inóculo para o melhor desenvolvimento de *C. neoformans* e *C. gattii* são fatores determinantes para a aquisição de concentrações inibitórias mínimas fidedignas.
- A criptococose é considerada uma doença de difícil tratamento devido à gravidade, localização da infecção (meningite, SNC) e opções terapêuticas escassas. Os derivados quinolínicos estudados mostram uma promissora atividade antifúngica sobre *C. neoformans* e *C. gattii*, com concentrações $\leq 2 \mu\text{g/mL}$. Além disso, seu provável mecanismo de ação mostra um amplo espectro devido a ação quelante de metais, os quais são essenciais às funções vitais de microrganismos, bem com a inibição do importante fator de virulência melanina. As curvas de tempo de morte indicam que CQ consegue manter sua ação até 72h dependente de concentração, não apresentando irritabilidade, demonstrando ser uma possível opção terapêutica no tratamento da criptococose.
- A associação de fármacos é uma estratégia que permite avaliar a potencialização do efeito antimicrobiano, bem como a diminuição de doses e efeitos adversos como a toxicidade. O uso de derivados quinolínicos como 8HQ e CQ em combinação com FLZ desempenharam um efeito sinérgico relevante sobre *C. neoformans* e *C. gattii*, com redução de dose de FLZ à $0,125 \mu\text{g/mL}$ e inibição da produção de

melanina. Os testes de irritabilidade e toxicidade mostram que a combinação de CQ e FLZ não ocasionaram danos significativos quando comparados aos controles entre as concentrações testadas. Além disso, mecanismo de ação dependentes (FLZ e AFB) ou com mesmo princípio de atuação (clioquinol e 8-hidroxiquinolina) demonstram um efeito de baixo sinergismo, indiferente ou até mesmo antagônico. Dessa forma, a associação de quelantes (CQ e 8HQ) à inibidores da biossíntese de ergosterol (FLZ) representa uma associação viável para o tratamento da criptococose.

- Assim como associações duplas entre fármacos antifúngicos são empregadas na terapia de infecções como a criptococose, associações triplas podem representar uma alternativa a ser estudada no tratamento da aspergilose. Os resultados encontrados mostram que combinações duplas entre itraconazol e anfotericina B/clioquinol apresentaram efeito sinérgico significativo, conseguindo inibir até 70% do crescimento fúngico com doses reduzidas em mais de seis vezes a concentração de inibição do antifúngico sozinho. Neste caso, a associação ternária não se mostrou mais efetiva em relação às associações binárias, indicando que mecanismos de ação similares podem estar competindo pelo alvo.
- É de grande necessidade que a análise racional de combinações seja realizada de forma a evitar associação de fármacos com mecanismos de ação muito similares que possam afetar o seu desempenho. O uso de técnicas que possibilitam uma análise com rigor estatístico, além de superfícies de resposta, promove uma melhor visualização de efeito destas interações até então impossíveis de serem avaliadas na leitura visual.

PERSPECTIVAS



- Realizar estudos *in vivo* de tratamento e efeito protetor da molécula PH153, bem como de combinações propostas utilizando modelos alternativos como *Caenorhabditis elegans*.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das combinações entre CQ e 8HQ à FLZ utilizando leucócitos humanos para *C. neoformans* e *C. gattii*.
- Estudar o potencial dos derivados de 8HQ e combinações sobre a prevenção e inibição de biofilme de *C. neoformans* e *C. gattii*.
- Investigar a ação de derivados de 8HQ e combinações sobre a inibição de demais fatores de virulência como da produção de cápsula e fosfolipase para *C. neoformans* e *C. gattii*.

REFERÊNCIAS

ABAD, A. et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 27, n. 4, p. 155-82, 2010.

ABERKANE, A. et al. Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 719–722, 2002.

AGUIAR, P.A.D.F. et al. The epidemiology of cryptococcosis and the characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated in a Brazilian University Hospital. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, p. e13, 2017.

ALANIO, A. Dormancy in *Cryptococcus neoformans*: 60 years of accumulating evidence. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 7, p. 3353-3360, 2020.

ALANIO, A. et al. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. **mBio**, v. 6, n. 2, p. e02580-14, 2015.

ALEGRE-GONZÁLEZ, D. et al. Disseminated *Cryptococcus neoformans* infection associated to COVID-19. **Medical mycology case reports**, v. 34, p. 35-37, 2021.

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

AQUINO, V. R. et al. Distribution of filamentous fungi causing invasive fungal disease at the haematological unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n 3, p. 277-280, 2010.

AYUK, A. C. et al. Prevalence and predictors of pulmonary fungal infections in patients with acute leukemia and aggressive lymphomas: Implications for cancer care in developing countries. **The Journal of the Pan African Thoracic Society**, v. 2, p. 154-60, 2021.

BADDLEY, J.W. et al. MSG07: An International Cohort Study Comparing Epidemiology and Outcomes of Patients With *Cryptococcus neoformans* or *Cryptococcus gattii* Infections. **Clinical infectious diseases**, v. 73, n. 7, p. 1133-1141, 2021.

BAKER, R.P. et al. *Cryptococcus neoformans* melanization incorporates multiple catecholamines to produce polytypic melanin. **J Biol Chem**, v. 298, n. 1, p. 101519, 2022.

BARCHIESI, F., et al. Interactions of posaconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 1355–1359, 2001.

BARCHIESI, F., et al. Posaconazole and amphotericin B combination therapy against *Cryptococcus neoformans* infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3312–3316, 2004.

BARNES, P. D.; MARR, K. A. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. **Infectious disease clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 545–vi, 2006.

BASU, S.; PAL, A.; DESAI, P. Quality control of culture media in a microbiology laboratory. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 159–163, 2005.

BEARDSLEY, J. et al., Adjunctive Dexamethasone in HIV-Associated Cryptococcal Meningitis. **The New England journal of medicine**, v. 374, n. 6, p. 542-54, 2016.

BELLANGER, A.P. et al. Antifungal susceptibility testing practices in mycology laboratories in France, 2018. **Journal of Medical Mycology**, v. 30, n. 2, p.100970, 2020.

BENEDICT, K. et al . Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. **Clinical infectious diseases**, v. 68, n. 11, p. 1791–1797, 2019.

BERGER, S. et al. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1024, 2017.

BORMAN, A. M. et al. COVID-19-Associated Invasive Aspergillosis: Data from the UK National Mycology Reference Laboratory. **Journal of clinical microbiology**, v. 59, n. 1, p. e02136-20, 2020.

CADENA, J.; THOMPSON, G. R.; PATTERSON, T. F. Aspergillosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 415–434, 2021.

CANTARELLI, V. V., et al. Quality control for microbiological culture media: Is it enough to follow the NCCLS M22-A2 procedures? **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 8–10, 2003.

CARVALHO, Â. R. et al. Curve fitting and linearization of UV–Vis spectrophotometric measurements to estimate yeast in inoculum preparation. **Analytical Biochemistry**, v. 625, p. 114216, 2021.

CHAN, S. H., et al. Synthesis of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Novel Antitumor Agents. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 2, p. 170–174, 2012.

CHANG, Y.C. et al. Differences between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in the Molecular Mechanisms Governing Utilization of D-Amino Acids as the Sole Nitrogen Source. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0131865, 2015.

CHANMOL, W. et al. In vitro anti-*Leishmania* activity of 8-hydroxyquinoline and its synergistic effect with amphotericin B deoxycholate against *Leishmania martiniquensis*. **PeerJ**, v. 10, p. e12813, 2022.

CHAUDHURI, A., et al. In vitro deterioration study of concrete and marble by *Aspergillus tamarii*. **Journal of Building Engineering**, v. 32, p.101774, 2020.

CHERDTRAKULKIAT, R. et al. Derivatives (halogen, nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 6, p. 135-141, 2016.

CHO, S.Y. et al. Epidemiology and Antifungal Susceptibility Profile of *Aspergillus* Species: Comparison between Environmental and Clinical Isolates from Patients with Hematologic Malignancies. **Journal of clinical microbiology**, v. 57, n. 7, p. e02023-18, 2019.

CHOTIRMALL, S. H et al. Immuno-evasive *Aspergillus* virulence factors. **Mycopathologia**, v. 178, n. 5-6, p. 363-70, 2014.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J.F. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. **Journal of infectious diseases**, v. 216, n. 3, p. S436-S444, 2017.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Advances in applied microbiology**, v. 87, p. 1–41, 2014.

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

CRUM-CIANFLONE, N. F. Invasive Aspergillosis Associated With Severe Influenza Infections. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. ofw171, 2016.

DA COSTA, B. et al. Evaluation of activity and toxicity of combining clioquinol with ciclopirox and terbinafine in alternative models of dermatophytosis. **Mycoses**, v. 64, n. 7, p. 727–733, 2021.

DA COSTA, B. et al. In vitro antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopirox and terbinafine. **Mycoses**, v. 63, n. 9, p. 993-1001, 2020.

DA COSTA, B. et al. In vitro antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopirox and terbinafine. **Mycoses**, v. 63, n. 9, p. 993–1001, 2020.

DANESI, P. et al. *Cryptococcus* in Wildlife and Free-Living Mammals. **Journal of fungi**, v. 6-7, n. 1, p. 26, 2021.

DANTAS, K. C. et al. A single-centre, retrospective study of the incidence of invasive fungal infections during 85 years of autopsy service in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3943, 2021.

DAY, J. N. et al. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 14, p. 1291–1302, 2013.

DE CHAVES, M.A. et al. Synergistic association of clioquinol with antifungal drugs against biofilm forms of clinical *Fusarium* isolates. **Mycoses**, v. 63, n. 10, p. 1069-1082, 2020.

DEAN L. Voriconazole Therapy and CYP2C19 Genotype. In V. M. Pratt (Eds.) et. al., *Medical Genetics Summaries*. National Center for Biotechnology Information (US). (US); 2019.

DENHAM, S.T.; BROWN, J.C.S. Mechanisms of Pulmonary Escape and Dissemination by *Cryptococcus neoformans*. **J Fungi** (Basel), v. 4, n. 1, p. 25, 2018.

DENNING, D. W.; PLEUVRY, A.; COLE, D. C. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 361–370, 2013.

DIAZ-MORALES, N. et al. Antimicrobial properties and volatile profile of bread and biscuits melanoidins. **Food chemistry**, v. 373, p. 131648, 2022.

EISENMAN, H.C. et al. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 155, n. 12, p. 3860-3867, 2009.

EVANS, R.J. et al. 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, 2015.

FERNANDEZ-TORRES, B. et al. Effect of Culture Medium on the Disk Diffusion Method for Determining Antifungal Susceptibilities of Dermatophytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2222–2224, 2006.

FRAAIJE, B. et al. The Multi-Fungicide Resistance Status of *Aspergillus fumigatus* Populations in Arable Soils and the Wider European Environment. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 599233, 2020.

FU, M. S. et al. Amoeba Predation of *Cryptococcus neoformans* Results in Pleiotropic Changes to Traits Associated with Virulence. **mBio**, v. 12, n. 2, p. e00567-21, 2021.

FU, M.S. et al. *Cryptococcus neoformans* urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 6, p. e1007144, 2018.

FUJIOKA, K. ,et al. Successful treatment with voriconazole combined with amphotericin B-liposome for fluconazole-resistant pulmonary cryptococcosis after renal transplantation. **CEN case reports**, v. 8, n. 4, p. 261–265, 2019.

GARVEY, E. P. et al. The novel fungal CYP51 inhibitor VT-1598 displays classic dose-dependent antifungal activity in murine models of invasive aspergillosis. **Medical Mycology**, v. 58, n. 4, p. 505–513, 2019.

GARVEY, E. P. et al. The novel fungal CYP51 inhibitor VT-1598 is efficacious alone and in combination with liposomal amphotericin B in a murine model of cryptococcal meningitis. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 73, n. 10, p. 2815-2822, 2018.

GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145–150, 2016.

GIL, Y. et al. The Emergence of Cryptococemia in COVID-19 Infection: A Case Report. **Cureus**, v. 13, n. 11, p. e19761, 2021.

GOLDMAN, D. L. et al. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. E66, 2001.

GOVENDER, N. P. et al. Southern African HIV Clinicians Society guideline for the prevention, diagnosis and management of cryptococcal disease among HIV-infected persons: 2019 update. **Southern African journal of HIV medicine**, v. 20, n. 1, p. 1030, 2019.

GRESNIGT, M. S. et al. A polysaccharide virulence factor from *Aspergillus fumigatus* elicits anti-inflammatory effects through induction of Interleukin-1 receptor antagonist. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1003936, 2014.

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

HELSEL, M. E. et al. Chemical and functional properties of metal chelators that mobilize copper to elicit fungal killing of *Cryptococcus neoformans*. **Metallomics**, v. 9, n. 1, p. 69–81, 2017.

HOSOGAYA, N. et al. The heme-binding protein Dap1 links iron homeostasis to azole resistance via the P450 protein Erg11 in *Candida glabrata*. **FEMS yeast research**, v. 13, n. 4, p. 411–421, 2013.

HUNSAKER, E. W.; FRANZ, K. J. Copper potentiates azole antifungal activity in a way that does not involve complex formation. **Dalton Transactions**, v. 48, p. 9654-9662, 2019.

HURTADO, J.C. et al. Mortality due to *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in low-income settings: an autopsy study. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 7493, 2019.

IKEDA, R. et al. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiology and immunology**, v. 47, n. 4, p. 271-277, 2013.

INSUASTY, D., et al. Antimicrobial Activity of Quinoline-Based Hydroxyimidazolium Hybrids. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 239, 2019.

IYER, K. R., et al. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 454–466, 2021.

IYER, K. R. et al. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 454–466, 2021.

JACOBSON, E.S.; TINNELL, S.B. Antioxidant function of fungal melanin. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 7102-7104, 1993.

JIMÉNEZ-ORTIGOSA, C. et al. Emergence of Echinocandin Resistance Due to a Point Mutation in the *fks1* Gene of *Aspergillus fumigatus* in a Patient with Chronic Pulmonary Aspergillosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 12, p. e01277-17, 2017.

JOAQUIM, A. R. et al. Novel Antimicrobial 8-Hydroxyquinoline-Based Agents: Current Development, Structure-Activity Relationships, and Perspectives. **Journal of medicinal chemistry**, v. 64, n. 22, p. 16349-16379, 2021.

JONG, A., et al. Invasion of *Cryptococcus neoformans* into human brain microvascular endothelial cells requires protein kinase C- α activation. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 1854–1865, 2008.

JOSÉ, R. J.; BROWN, J. S. Opportunistic bacterial, viral and fungal infections of the lung. **Medicine**, v. 44, n. 6, p. 378–383, 2016.

KASSEM, E. M et al. Synthesis, antimicrobial, and antiviral activities of some new 5-sulphonamido-8-hydroxyquinoline derivatives. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 6, p. 955-64, 2012.

KIM, J. et al. A defect in iron uptake enhances the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to azole antifungal drugs. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 11, p. 955–966, 2012.

KIM, J. H. et al. High Efficiency Drug Repurposing Design for New Antifungal Agents. **Methods and protocols**, v. 2, n. 2, p. 31, 2019.

KIM, K. W.; LEE, S. B. Inhibitory effect of Maillard reaction products on growth of the aerobic marine hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4325–4328, 2003.

KOEHLER, P.. et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 21, n. 6, p. e149-e162, 2021.

KOUSHA, M.; TADI, R.; SOUBANI, A. O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. **European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society**, v. 20, n. 121, p. 156–174, 2011.

KUKUMINATO, S.; KOYAMA, K.; KOSEKI, S. Antibacterial Properties of Melanoidins Produced from Various Combinations of Maillard Reaction against Pathogenic Bacteria. **Microbiology spectrum**, v. 9, n. 3, p. e0114221, 2021.

LAI, Y. W. et al. Synergy and antagonism between iron chelators and antifungal drugs in *Cryptococcus*. **International journal of antimicrobial agents**, 48(4), 388–394, 2016.

LASKARIS, P. et al. Administration of Zinc Chelators Improves Survival of Mice Infected with *Aspergillus fumigatus* both in Monotherapy and in Combination with

Caspofungin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n.10, p. 5631–5639, 2016.

LEE, D. et al. Efficacy and safety of combination antifungal therapy in Korean haematological patients with invasive aspergillosis. **Mycoses**, v. 62, n. 10, p. 969–978, 2019.

LI, Z. et al. Trends of pulmonary fungal infections from 2013 to 2019: an AI-based real-world observational study in Guangzhou, China. **Emerging microbes & infections**, v. 10, n. 1, p. 450–460, 2021.

LI, Z.; LU, G.; MENG, G. Pathogenic Fungal Infection in the Lung. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1524, 2019.

LI, Z.; LU, G.; MENG, G. Pathogenic Fungal Infection in the Lung. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

LINDBERG, J., et al. *Cryptococcus gattii* risk for tourists visiting Vancouver Island, Canada. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 178–179, 2007.

MAO, X. et al. Clioquinol inhibits the proteasome and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. **Leukemia**, v. 23, n. 3, p. 585–90, 2009.

MARR, K. A. et al. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis. **Clinical infectious diseases**, v. 39, n. 6, p. 797–802, 2004.

MATSUDA, J.D.S. et al. Prevalence of pulmonary mycoses in smear-negative patients with suspected tuberculosis in the Brazilian Amazon. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 38, n. 3, p. 111–118, 2021.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106–117, 2016.

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

MEDNICK, A.J. et al. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 2012–2019, 2005.

MEIJER, E.F.J. et al. Azole-Resistant COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis in an Immunocompetent Host: A Case Report. **Journal of fungi**, v. 6, n. 2, p. 79, 2020.

MELETIADIS, J. et al. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 2, p. 478–484, 2001.

MONARI, C. et al. Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 4, p. 537–542, 2006.

MOURAD, A.; PERFECT, J. R. Present and Future Therapy of *Cryptococcus* Infections. **Journal of fungi**, v. 4, n. 3, p. 79, 2018.

NASCIMENTO et al. Cryptococcosis by *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* Species Complexes in non-HIV-Infected Patients in Southeastern Brazil. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 54, p. e0169-2021, 2021.

NASCIMENTO, E. et al. Cryptococcosis by *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* Species Complexes in non-HIV-Infected Patients in Southeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. e01692021, 2021.

NGAN, N. et al. A randomized open label trial of tamoxifen combined with amphotericin B and fluconazole for cryptococcal meningitis. **Wellcome open research**, v. 4, n. 8, 2019.

NGO, N. et al. Identification of Fungal Community Associated with Deterioration of Optical Observation Instruments of Museums in Northern Vietnam. **Applied Sciences**, v. 11, n. 12, p. 5351, 2021.

NOOR, A.; PREUSS, C. V. Amphotericin B. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

NOVERR, M.C. et al. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1538-1547, 2003.

OETARI, A., et al. Fungal deterioration of old manuscripts of European paper origin. **AIP Conference Proceedings**, v. 2023, n. 1, n. 020156, 2018.

OKURUT, S. et al. Landmark clinical observations and immunopathogenesis pathways linked to HIV and *Cryptococcus* fatal central nervous system co-infection. **Mycoses**, v. 63, n. 8, p. 840-853, 2020.

OLALEYE, O. A. et al. Discovery of Clioquinol and analogues as novel inhibitors of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 infection, ACE2 and ACE2 - Spike protein interaction in vitro. **Heliyon**, v. 7, n. 3, p. e06426, 2021.

OLIVEIRA, L.S.S. et al. Comparison of *Cryptococcus gattii/neoformans* Species Complex to Related Genera (*Papiliotrema* and *Naganishia*) Reveal Variances in Virulence Associated Factors and Antifungal Susceptibility. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 642658, 2021.

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

Organização Mundial da Saúde (OMS). 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. 2018.

PARJO, U. K. et al. The *Aspergillus niger* growth on the treated concrete substrate using variable antifungals. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 160, p. 012051, 2016.

PATTERSON, T. F et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 63, n. 4, p. e1-e60, 2016.

PEANO, A. et al. Methodological Issues in Antifungal Susceptibility Testing of *Malassezia pachydermatis*. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 3, p. 37, 2017.

PEANO, A., et al. Methodological Issues in Antifungal Susceptibility Testing of *Malassezia pachydermatis*. **Journal of fungi**, v. 3, n. 3, p. 37, 2017.

PESCADOR R. M. A, THAPA B. Cryptococcal Meningitis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

PEYCLIT, L. et al. Drug Repurposing in Medical Mycology: Identification of Compounds as Potential Antifungals to Overcome the Emergence of Multidrug-Resistant Fungi. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 5, p. 488, 2021.

PIPPI, B. et al. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 27, n. 1, p. 41-48, 2019.

PIPPI, B., et al. Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. **Medical mycology**, v. 55, n. 7, p. 763–773, 2017.

PRACHAYASITTIKUL, V. et al. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. **Drug design, development and therapy**, v. 7, p. 1157–1178, 2013.

RAFAT, Z. et al. Fungal Isolates of the Respiratory Tract in Symptomatic Patients Hospitalized in Pulmonary Units: A Mycological and Molecular Epidemiologic Study. **Journal of Multidisciplinary Healthcare**, v. 13, p. 661-669, 2020.

REGALLA, D. et al. COVID-19-associated *Cryptococcus* infection (CACI): a review of literature and clinical pearls. **Infection**, v. 50, n. 4, p. 1007-1012, 2022.

REICHERT-LIMA, F., et al. Evaluation of antifungal combination against *Cryptococcus* spp. **Mycoses**, v. 59, n. 9, p. 585–593, 2016.

RHEIN, J. et al. Adjunctive sertraline for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised, placebo-controlled, double-blind phase 3 trial. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 19, n. 8, p. 843-851, 2019.

ROJAS, T. I., et al. Fungal biodeterioration in historic buildings of Havana (Cuba). **Grana**, v. 51, n. 1, p. 44–51, 2012.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. **Food Research International**, v. 40, n. 8, p. 995–1002, 2007.

RURIÁN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane-damage mechanism. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 7, p. 2357–2362, 2008.

SAADEH, H. A.; SWEIDAN, K. A.; MUBARAK, M. S. Recent Advances in the Synthesis and Biological Activity of 8-Hydroxyquinolines. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4321, 2020.

SAADEH, H. A.; SWEIDAN, K. A.; MUBARAK, M. S. Recent Advances in the Synthesis and Biological Activity of 8-Hydroxyquinolines. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4321, 2020.

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

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

SHAREEF, S. A. et al. Sterilization of Culture Media for Microorganisms Using a Microwave Oven Instead of Autoclave. **Rafidain Journal of Science**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2019.

SHARMA, S. et al. COVID-19-associated Pulmonary Cryptococcosis: A Rare Case Presentation. **Indian journal of critical care medicine**, v. 26, n. 1, p. 129-132, 2022.

SHAW, K. J. et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of APX001A/APX001 and Other Gwt1 Inhibitors against *Cryptococcus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 8, p. e00523-18, 2018.

SHEIKH-ALI, S. I. et al. The potential hazards of *Aspergillus* sp. in foods and feeds, and the role of biological treatment: a review. **Journal of microbiology**, v. 52, n. 10, p. 807-18, 2014.

SHERIF, R.; SEGAL, B. H. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 16, n. 3, p. 242–250, 2010.

SILVA, E. G., et al. Voriconazole, combined with amphotericin B, in the treatment for pulmonary cryptococcosis caused by *C. neoformans* (serotype A) in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). **Mycopathologia**, v. 173, n. 5-6, p. 445–449, 2012.

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

SUBRAMANIAM, M., et al. The Growth of *Aspergillus Niger* on a Wood Based Material with 4 Types of Wall Finishing. **MATEC Web of Conferences**, v. 47, p. 05007, 2016.

TAGHIYARI, H. R et al. Wollastonite to hinder growth of *Aspergillus niger* fungus on cotton textile. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 90, n. 3, p. 2797-2804, 2018.

TAJIMA, K. et al. Solubilized melanin suppresses macrophage function. **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 4, p. 791-800, 2019.

TARKA, P. et al. Epidemiology of Pulmonary Aspergillosis in Hospitalized Patients in Poland During 2009-2016. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1160, p. 73-80, 2019.

THYAGARAJAN, R. V. et al. *Cryptococcus neoformans* blood stream infection in severe COVID-19 pneumonia. **IDCases**, v. 26, p. e01274, 2021.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. **Nature reviews. Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 661-674, 2017.

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

VERWEIJ, P. E et al. Review of influenza-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients and proposal for a case definition: an expert opinion. **Intensive care medicine**, v. 46, n. 8, p. 1524-1535, 2020.

VU, K. et al. *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. 3139-47, 2013.

WANG, H.Y.; QIAN, H.; YAO, W. R. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. **Food Chemistry**, v. 128, n. 3, p. 573–584, 2011.

WANG, X.-J.; HSIAO, K.-C. Sugar degradation during autoclaving: Effects of duration and solution volume on breakdown of glucose. **Physiologia Plantarum**, v. 94, n. 3, p. 415–418, 1995.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. **Infection and immunity**, v. 62, n. 7, p. 3004-3007, 1994.

WANG, Z., et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Multitarget-Directed Selenium-Containing Clioquinol Derivatives for the Treatment of Alzheimer's Disease. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 10, p. 952–962, 2014.

WARRIS, A. et al. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 47, n. 2, p. 143–148, 2001.

WESTPHAL, F. et al. Clinical characteristics of patients with pulmonary aspergillosis in a respiratory medicine service in southern Brazil. **European Respiratory Journal**, v. 56, p. 2312, 2020.

YAAKOV, D. B. et al. The quinoline bromoquinol exhibits broad-spectrum antifungal activity and induces oxidative stress and apoptosis in *Aspergillus fumigatus*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2263-2272, 2017.

YOU, Z et al. Clioquinol, an alternative antimicrobial agent against common pathogenic microbe. **Journal de mycologie medicale**, v. 28, n. 3, p. 492-501, 2018.

YOU, Z.; ZHANG, C.; RAN, Y. The effects of clioquinol in morphogenesis, cell membrane and ion homeostasis in *Candida albicans*. **BMC microbiology**, v. 20, n. 1, p. 165, 2020.

YOUSFI, H. et al. Identification of repositionable drugs with novel antimycotic activity by screening Prestwick Chemical Library against emerging invasive molds. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 314-320, 2020.

ZARAGOZA, O. et al. Process Analysis of Variables for Standardization of Antifungal Susceptibility Testing of Nonfermentative Yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1563–1570, 2011.

ZARAGOZA, O. et al. Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of nonfermentative yeasts. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1563–1570, 2011.

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

ZERVOS, M.; MEUNIER, F. Fluconazole (Diflucan®): a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 3, n. 3, p. 147–170, 1993.

ZHAO, M. et al. APX001 Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Target Determination against *Aspergillus fumigatus* in an In Vivo Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. e02372-18, 2019.

ZOU, P. et al. Invasive Pulmonary Aspergillosis in Adults With Avian Influenza A (H7N9) Pneumonia in China: A Retrospective Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 221, n. 2, p. S193–S197, 2020.