

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR

Emanuel Almeida Moreira de Oliveira

Reposicionamento de fármacos para o tratamento de criptococose

Governador Valadares

2022

Emanuel Almeida Moreira de Oliveira

Reposicionamento de fármacos para o tratamento de criptococose

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* avançado Governador Valadares como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Karen Luise Lang

Governador Valadares

2022

EMANUEL ALMEIDA MOREIRA DE OLIVEIRA

Título: Reposicionamento de fármacos para o tratamento da criptococose.

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 24 de janeiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Doutora Karen Luise Lang - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora - campus Governador Valadares

Doutor Daniel de Assis Santos

Universidade Federal de Minas Gerais

Doutor Felipe Alves de Almeida

Universidade Federal de Juiz de Fora - campus Governador Valadares

Juiz de Fora, 30/11/2021.



Documento assinado eletronicamente por **Karen Luise Lang, Professor(a)**, em 24/01/2022, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Alves de Almeida, Servidor(a)**, em 24/01/2022, às 16:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Usuário Externo**, em 25/01/2022, às 19:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0596656** e o código CRC **5357E09D**.

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Almeida Moreira de Oliveira , Emanuel.

Reposicionamento de fármacos para o tratamento de criptococose / Emanuel Almeida Moreira de Oliveira . -- 2022.

112 p.

Orientadora: Karen Luise Lang

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

1. Cryptococcus. 2. reposicionamento de fármacos. 3. combinação. I. Luise Lang, Karen, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e aos meus irmãos, que me incentivaram nos momentos mais difíceis e ajudaram a superar as incertezas e inseguranças, sempre me fortalecendo nos momentos de desânimo.

À minha orientadora, professora Karen Luise Lang, por todo incentivo e aprendizado, fundamental para realização deste trabalho. Agradeço também à professora Gabriella, cujo apoio foi essencial.

À Mariana que, em meio às dificuldades, esteve sempre presente com amor, sorrisos e palavras de apoio.

À todos meus amigos, que sempre me apoiaram em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório Daniel, Maiara, Queila, Arthur, Janayna e Guilherme meu muito obrigado.

Aos professores e técnicos do PMBqBM por todo apoio e durante essa jornada.

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica provocada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, majoritariamente pelas espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. As alternativas terapêuticas disponíveis atualmente para o tratamento da doença são escassas, possuem elevada toxicidade, alto custo e dificuldades de acesso. O reposicionamento de fármacos (RF), estratégia que consiste na pesquisa de novas aplicações terapêuticas para fármacos ou candidatos a fármacos, constitui uma abordagem promissora para a descoberta de novas alternativas para o tratamento da criptococose. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho consistiu na avaliação do potencial antifúngico de fármacos com estruturas privilegiadas (EP), subestruturas moleculares que possuem propriedades versáteis de interações com diferentes alvos biológicos, para o reposicionamento no tratamento da criptococose. Para tanto, foi criada uma biblioteca com 28 fármacos com EP que foi avaliada frente a linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*. Os fármacos albendazol (ALB), duloxetine (DUL), fembendazol (FEM), flubendazol (FLU), mebendazol (MEB) e paroxetina (PAR), apresentaram atividade anticriptocócica promissora, com concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) entre 0,047 μM e 100 μM . Quando avaliados em combinação com o fluconazol (FLZ) frente *C. neoformans* ATCC H99, nenhum dos fármacos da biblioteca apresentou índice da concentração inibitória fracionária (ICIF) $\leq 0,5$, não sendo, portanto, observado sinergismo. No entanto, foram observados efeitos aditivos para as combinações de FLZ com finasterida (FIN), hidroxizina (HID) e PAR com ICIF igual a 1 para os três fármacos. As combinações e FLZ+FIN, FLZ+HID e FLZ+PAR foram analisadas pelos modelos de referência de Bliss, Loewe, HSA e ZIP, que sugerem efeitos aditivos para as combinações. Foi observado efeito pós-antifúngico (EPAF) para a CIM dos fármacos ALB, DUL, FEM, FLU, MEB e PAR entre 3,5 e 10,5 horas, bem como para as combinações aditivas FLZ+FIN, FLZ+HID e FLZ+PAR com EPAF entre 12 e 22,5 horas. Além disso, para todos os fármacos avaliados foi possível observar impactos morfológicos significativos com redução do diâmetro celular e do tamanho da cápsula em *C. neoformans* ATCC H99 após tratamento com concentrações subinibitórias. Palavras-chave: *Cryptococcus*, reposicionamento de fármacos, combinação, estruturas privilegiadas

ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic mycosis caused by yeasts of the genus *Cryptococcus*, mainly by the species *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. The therapeutic alternatives currently available for the treatment of the disease are scarce, have high toxicity, high cost and limited accessibility. In this sense, drug repositioning (RF), a strategy that consists of researching new therapeutic applications for drugs or drug candidates, constitutes a promising approach for the discovery of new alternatives for the treatment of cryptococcosis. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the antifungal potential of drugs with privileged structures (PE) for repositioning in the treatment of cryptococcosis. For that, a library with 28 drugs with PE was created and evaluated against strains of *C. neoformans* and *C. gattii*. The drugs albendazole (ALB), duloxetine (DUL), fenbendazole (FEM), flubendazole (FLU), mebendazole (MEB) and paroxetine (PAR) showed promising anticryptococcal activity, with minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (CFM) between 0.047 μ M and 100 μ M. When evaluated in combination with fluconazole (FLZ) against *C. neoformans* ATCC H99, none of the drugs in the library showed a fractional inhibitory concentration index (CIIF) ≤ 0.5 , therefore, no synergism was observed. However, additive effects were observed for the combinations of FLZ with FIN, HID and PAR with ICIF equal to 1 for the three drugs. The combinations and FLZ+FIN, FLZ+HID AND FLZ+PAR were analyzed by the reference models of Bliss, Loewe, HSA and ZIP, which suggest additive effects for the combinations. A post-antifungal effect (PAFE) was observed for the MIC of the drugs ALB, DUL, FEM, FLU, MEB and PAR between 3.5 and 10.5 hours, as well as for the additive combinations FLZ+FIN, FLZ+HID and FLZ +PAR with PAFE between 12 and 22.5 hours. Besides that, for all evaluated drugs, it was possible to observe significant morphological impacts with reduced cell diameter and capsule size in *C. neoformans* ATCC H99 after treatment with subinhibitory concentrations. Keywords: *Cryptococcus*, drug repositioning, combination, privileged structures

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Células leveduriformes de <i>C. neoformans</i> coradas com tinta nanquim	16
Quadro 1 – Regimes de tratamentos antifúngicos recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na meningoencefalite criptocócica em indivíduos infectados pelo HIV	22
Figura 2 – Estrutura química da anfotericina B (AmB)	23
Figura 3 – Estrutura química da flucitosina (5-FC), 5-fluorouracil (5-FU), 5-fluorouacil-ribose (5-FUMP) e 5-fluorodesoxiuridílico (5-FdUMP)	26
Figura 4 – Estrutura química do (A) cetoconazol, (B) miconazol, (C) fluconazol e (D) itraconazol	28
Figura 5 – Exemplos de estruturas privilegiadas	34
Figura 6 – Estruturas privilegiadas de fármacos com atividade anticriptocócica	35
Figura 7– Desenho experimental	39
Quadro 2 – Linhagens de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> utilizadas nos experimentos	40
Figura 8 – Esquema das microplacas na triagem dos fármacos da biblioteca a 100 μ M frente a <i>C. neoformans</i> ATCC H99 e <i>C. gattii</i> ATCC R265	43
Figura 9 – Esquema das microplacas na avaliação da concentração inibitória mínima dos fármacos da biblioteca frente a <i>Cryptococcus</i> spp	45
Quadro 3 – Esquema das microplacas na avaliação do efeito combinatório dos fármacos da biblioteca candidatos ao reposicionamento com o fluconazol frente a <i>C. neoformans</i> ATCC H99	48
Figura 10 – Curvas de crescimento para <i>C. neoformans</i> ATCC H99 sob tratamento com a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos albendazol, duloxetine, fembendazol, flubendazol, mebendazol e paroxetina	79
Figura 11 – Curva de morte (A e B) para <i>C. neoformans</i> ATCC H99 sob tratamento com fluconazol + finasterida	81

Figura 12 – Curva de morte (A e B) para <i>C. neoformans</i> ATCC H99 sob tratamento com fluconazol + hidroxizina	82
Figura 13 – Curva de morte (A e B) para <i>C. neoformans</i> ATCC H99 sob tratamento com fluconazol + paroxetina	83
Figura 14 – Gráfico (A) e quadro (B) do efeito pós-antifúngico para os fármacos fluconazol, anfotericina B, albendazol, duloxetina, fembendazol, flubendazol, mebendazol e paroxetina frente a <i>C. neoformans</i> ATCC H99	85
Figura 15 – Gráfico (A) e quadro (B) do efeito pós-antifúngico (EPAF) para os tratamentos com fluconazol (FLZ), fluconazol + finasterida, fluconazol + hidroxizina, fluconazol + paroxetina frente a <i>C. neoformans</i> ATCC H99	86
Figura 16 – Impactos sobre a relação superfície volume (S/V) de células de <i>C. neoformans</i> ATCC H99 após tratamento com concentrações subinibitórias de fluconazol (FLZ), anfotericina B (AmB), albendazol (ALB), duloxetina (DUL), fembendazol (FEM), flubendazol (FLU), mebendazol (MEB) e paroxetina (PAR)	88
Figura 17 – Impactos no tamanho da cápsula de <i>C. neoformans</i> ATCC H99 após tratamento com concentrações subinibitórias de fluconazol (FLZ), anfotericina B (AmB), albendazol (ALB), duloxetina (DUL), fembendazol (FEM), flubendazol (FLU), mebendazol (MEB) e paroxetina (PAR)	89
Figura 18 – Impactos sobre a relação superfície volume (S/V) de <i>C. neoformans</i> ATCC H99 após tratamento com concentrações subinibitórias de fluconazol (FLZ), fluconazol + finasterida (FLZ+FIN), fluconazol + hidroxizina (FLZ+HID), fluconazol + paroxetina (FLZ+PAR)	91
Figura 19 – Impactos no tamanho capsular de <i>C. neoformans</i> ATCC H99 após tratamento com concentrações subinibitórias de fluconazol (FLZ), fluconazol + finasterida (FLZ+FIN), fluconazol + hidroxizina (FLZ+HID), fluconazol + paroxetina (FLZ+PAR)	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química, classe farmacológica, mecanismo de ação e principais alvos dos fármacos da biblioteca	54
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima dos fármacos albendazol, fembendazol, flubendazol, mebendazol, duloxetina, paroxetina, anfotericina B e fluconazol frente a diferentes linhagens de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	69
Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima dos fármacos da biblioteca candidatos ao reposicionamento isolados e combinados com FLZ frente a <i>C. neoformans</i> ATCC H99 e o índice da concentração inibitória fracionada.	74
Tabela 4 – Pontuações de sinergismo pelos modelos Bliss, Loewe, HSA e ZIP para as combinações fluconazol + finasterida (FLZ + FIN), fluconazol + hidroxizina (FLZ + HID), fluconazol + paroxetina (FLZ + PAR)	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC - flucitosina

5-FdUMP - 5-fluorodesoxiuridílico

5-FU - 5-fluorouracil

5-FUMP - 5-fluorouracil-ribose

AAS - ácido acetilsalicílico

ALB - albendazol

AmB - anfotericina B

ASD - ágar sabouraud dextrose

ATCC - *American Type Culture Collection*

BHE - barreira hematoencefálica

CFM - concentração fungicida mínima

CIM - concentração inibitória mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS

DATASUS - departamento de informática do sistema único de saúde

DMSO - dimetilsulfóxido

DN - doença negligenciada

DNA - ácido desoxirribonucleico

DO - densidade ótica

DUL - duloxetina

EP - estruturas privilegiadas

EPAF- efeito pós-antifúngico

EROs - espécies reativas de oxigênio

FBCR - fármaco da biblioteca candidato ao reposicionamento

FEM - fembendazol

FLU - flubendazol

FLZ - fluconazol

FLZ+FIN - fluconazol + finasterida

FLZ+HID - fluconazol + hidroxizina

FLZ+PAR - fluconazol + paroxetina

GalXM - galactoxilomanana

GXM - glucuronoxilomanana

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HSA - *Highest Single Agent*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBPs - inibidores da bomba de próton

ICIF - índice da concentração inibitória fracionária

LCR - líquido cefalorraquidiano

MEB - mebendazol

OMS - Organização Mundial da Saúde

P&D - pesquisa e desenvolvimento

PAR - paroxetina

PRN - peróxinitrito

RF - reposicionamento de fármacos

RNA - ácido ribonucleico

RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute*

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SNC - sistema nervoso central

SUS - Sistema Único de Saúde

TARV - terapia antirretroviral

TNF- α - fator de necrose tumoral

UNAIDS - programa das Nações Unidas para o HIV e a Aids

ZIP - *zero interaction potency*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 <i>Cryptococcus</i>	15
2.2 Ecologia e disseminação	17
2.3 Processo de infecção e estabelecimento da doença	17
2.4 Epidemiologia	19
2.5 Tratamento farmacológico	21
2.5.1 <i>Anfotericina B</i>	23
2.5.2 <i>Flucitosina</i>	25
2.5.3 <i>Azólicos</i>	27
2.6 Reposicionamento de fármacos (RF)	29
2.6.1 <i>Reposicionamento de fármacos no tratamento da criptococose</i>	31
2.6.2 <i>Combinação de fármacos e o reposicionamento</i>	32
2.7. Estruturas privilegiadas (EP)	33
3 JUSTIFICATIVA	36
4 OBJETIVO GERAL	37
4.1 Objetivos específicos	37

5 MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1. Desenho experimental	38
5.2 Criação da biblioteca de fármacos	40
5.3 Micro-organismos	40
5.4 Teste de suscetibilidade antifúngica	40
5.4.1 <i>Preparo do inóculo</i>	40
5.4.2 <i>Triagem da atividade antifúngica dos fármacos</i>	41
5.5 Concentração inibitória mínima (CIM)	43
5.5.1 Concentração fungicida mínima	45
5.6 Avaliação do efeito combinatório dos fármacos da biblioteca com fluconazol	46
5.6.1 <i>Preparo das placas</i>	46
5.6.2 <i>Leitura e interpretação dos resultados</i>	48
5.7 Curva de morte	48
5.7.1 <i>Curva de morte determinada por densidade óptica</i>	49
5.9 Efeito pós-antifúngico	49
5.10 Morfometria	50
5.11. Análise estatística	51

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6.1. Biblioteca de fármacos, triagem da atividade anticriptocócica e determinação da concentração inibitória mínima	52
6.2 Efeitos combinatórios dos fármacos da biblioteca com fluconazol	72
6.2.1 <i>Efeitos combinatórios da finasterida e hidroxizina com fluconazol pelos modelos de Bliss, Loewe, HSA e ZIP</i>	72
6.3 Curva de morte	78
6.5 Efeitos pós-antifúngico	84
6.6. Morfometria	87
7 CONCLUSÃO	94
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um novo fármaco é um processo longo, complexo e oneroso, com estimativa de gasto médio de 1,3 bilhão de dólares, em um período de 10 a 17 anos (WOUTERS *et al.*, 2020). Apesar de dispendiosos investimentos, poucas moléculas alcançam resultados promissores, já que uma parcela significativa dos candidatos a fármacos apresenta falhas durante as etapas iniciais ou avançadas de pesquisa e desenvolvimento (P&D), principalmente por aspectos relacionados à segurança, eficácia ou a ambos (HWANG *et al.*, 2016).

O processo de desenvolvimento de fármacos pode ser dividido em duas grandes etapas: a pré-clínica e a clínica. Na primeira, desenvolve-se a pesquisa básica, *in vitro* e em modelos animais, cujos principais objetivos estão envolvidos na determinação e validação de um alvo molecular específico, otimização de protótipos, obtenção de uma nova entidade química, conhecimento de seus aspectos farmacológicos e toxicológicos (FDA, 2018; HUGHES *et al.*, 2011; MOHS; GREIG, 2017). A etapa clínica, por sua vez, é realizada em seres humanos e é subdividida em 4 fases (KATZUNG; TREVOR, 2017). A fase I é um estudo preliminar com o objetivo de avaliar a tolerância em indivíduos saudáveis (LORUSSO *et al.*, 2010). A fase II é realizada com um número reduzido de participantes, sendo avaliada a eficácia e a segurança no tratamento de uma patologia específica (MINNECI; DEANS, 2018). Do mesmo modo, a fase III avalia a toxicidade e a segurança, porém em um número maior de indivíduos, além dos testes de eficácia comparativa, no qual o novo fármaco é comparado ao tratamento farmacológico padrão já aprovado (KATZUNG; TREVOR, 2017; MINNECI; DEANS, 2018). Após a aprovação nas três primeiras fases da etapa clínica, ocorre registro e comercialização do novo medicamento e inicia-se a fase IV, denominada farmacovigilância, onde são realizadas avaliações de longo prazo de alguns parâmetros que não foram observados nas fases anteriores (FDA, 2018).

Após um declínio acentuado no início do século XXI, nos últimos anos têm se observado um aumento significativo no número de novos medicamentos aprovados pelas agências regulatórias, provavelmente pela atual disponibilidade de ferramentas científicas e tecnológicas que amparam e impulsionam a P&D de fármacos, garantindo melhor compreensão de vias bioquímicas, fisiológicas e de alvos moleculares (EBIED *et al.*, 2019; MULLARD, 2021; SCHNEIDER, 2018). Alguns exemplos são os avanços em

bioinformática, genômica, proteômica, metabolômica, bancos de dados com estruturas tridimensionais de proteínas, triagem de alto desempenho, sistemas de inteligência artificial, aprendizagem de máquinas, dentre outros (HESSLER; BARINGHAUS, 2018; MUN *et al.*, 2020; OLIVEIRA; LANG, 2018; SCHNEIDER, 2018).

Apesar do aumento no número medicamentos aprovados, existe a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para doenças infecciosas e/ou negligenciadas, pois essas possuem tratamentos restritos, onerosos e diversos mecanismos de resistência (FARHA; BROWN, 2019; KIM *et al.*, 2021; VAN DAELE *et al.*, 2019). Essa necessidade de fármacos seguros e eficazes no tratamento dessas doenças, tem estimulado os programas de *Drug Discovery*, tanto acadêmicos quanto nas companhias farmacêuticas, a investir em estratégias que otimizem o processo de P&D, como por exemplo o reposicionamento de fármacos (RF) (OLIVEIRA; LANG, 2018). Essa estratégia consiste na pesquisa de novas aplicações terapêuticas, distintas da indicação anteriormente aprovada ou pretendida, para fármacos ou candidatos a fármacos que possuem perfil farmacológico e toxicológico conhecido. O RF apresenta diversas vantagens em relação às abordagens clássicas principalmente em relação ao tempo, custo e risco dos processos de P&D (PUSHPAKOM *et al.*, 2019).

Especialmente no que se refere ao desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas (DN), o RF mostra-se como uma alternativa promissora para superar barreiras científicas, econômicas e comerciais, já que tais doenças afetam majoritariamente países com baixo desenvolvimento econômico e social (ANDRADE *et al.*, 2019; OLIVEIRA; LANG, 2018). Dentre essas doenças destaca-se a criptococose que, apesar de apresentar muitos aspectos de DN, como altas taxas de mortalidade, tratamentos escassos e por atingir principalmente populações em vulnerabilidade, esta não é formalmente reconhecida como DN pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (RODRIGUES; NOSANCHUK, 2020).

A criptococose é uma micose sistêmica, grave, provocada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, majoritariamente pelas espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (ALSPAUGH, 2015; CHEN *et al.*, 2014; KWON-CHUNG *et al.*, 2014). A contaminação ocorre pela inalação de leveduras ou basidiósporos que desencadeia uma infecção pulmonar primária sintomática ou assintomática. Dependendo das condições imunológicas do hospedeiro essa infecção pode atingir outros órgãos e tecidos, como por exemplo o cérebro e as meninges, provocando meningoencefalite criptocócica ou meningite criptocócica, que está presente na maioria dos casos de infecções com elevadas taxas de

letalidade (MAY *et al.*, 2016; MAZIARZ; PERFECT, 2016). A criptococose possui distribuição mundial, mas a maioria dos casos ocorrem nos países subdesenvolvidos, principalmente da África subsaariana (PARK *et al.*, 2009). Essa doença é uma das principais causas de infecções oportunistas em pacientes acometidos com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), afetando cerca de 223.100 indivíduos anualmente, com letalidade próxima a 180.000 óbitos anuais (RAJASINGHAM *et al.*, 2017).

A criptococose é listada pelo Fundo Global de Inovação para Doenças Negligenciadas (*G-finder*) como uma das DN que menos recebe financiamento em pesquisa e inovação (RODRIGUES; ALBUQUERQUE, 2018; RODRIGUES; NOSANCHUK, 2020), o que pode ser evidenciado no âmbito da P&D de fármacos, visto que os recursos terapêuticos para tratamento desta doença são escassos. Apenas a anfotericina B (AmB), fluconazol (FLZ) e 5-flucitosina (5-FC), são atualmente preconizados pela OMS no tratamento dessa doença (WHO, 2018). Esses fármacos são utilizados há décadas, possuem elevada toxicidade como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, hematotoxicidade e efeitos adversos como anemia, trombocitopenia, hipocalcemia, mielossupressão, dentre outros (BICANIC *et al.*, 2015; BONGOMIN *et al.*, 2018; GIROIS *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2015).

Além disso, os medicamentos utilizados no tratamento da criptococose apresentam dificuldades relacionadas ao custo e disponibilidade, como por exemplo os elevados valores das formulações lipossomais de AmB, que apresentam menor toxicidade. Estima-se que um tratamento intravenoso de 15 dias com AmB lipossomal custe entre 10.000 e 20.000 euros (OSTERMANN *et al.*, 2014). Existem também problemas de acessibilidade e distribuição da 5-FC que não está disponível no Brasil e em diversos outros países (KNEALE *et al.*, 2016). Adicionalmente, FLZ e outros antifúngicos azólicos são frequentemente associados a falhas terapêuticas, mecanismos de resistência fúngica e importantes interações farmacológicas com fármacos da terapia antirretroviral (TARV) (CHEONG; MCCORMACK, 2013; NAICKER *et al.*, 2020).

Nesse sentido, o RF pode ser uma estratégia importante para a descoberta de novos tratamentos para criptococose, que possui recursos terapêuticos escassos, complexos e com perfil de segurança reduzido. Trabalhos recentes têm apontado promissores candidatos ao RF para o tratamento da criptococose, como o albendazol, mebendazol, flubendazol, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, quetiapina, olanzapina, amiodarona, atorvastatina, nifedipina, omeprazol, sertralina, acetilcisteína, dentre outros (BRILHANTE *et al.*, 2019; MAGALHÃES

et al., 2020; OGUNDEJI *et al.*, 2016; 2017; RIBEIRO *et al.*, 2017; TRUONG *et al.*, 2018; ZHAI *et al.*, 2012).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

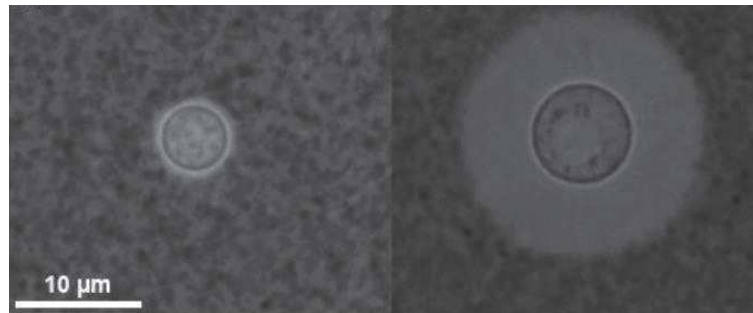
2.1 *Cryptococcus*

Cryptococcus é um gênero de fungos que pertence ao reino Fungi, filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Tremellomycetes, ordem Tremellales e família Tremellaceae (SCHOCH *et al.*, 2020). São descritas aproximadamente 70 espécies para o gênero, das quais destacam-se *C. neoformans* e *C. gattii* pela capacidade de infectar humanos e animais. Outras espécies como *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus curvatus* e *Cryptococcus laurentii*, e são fungos saprofiticos de pequena relevância clínica com raros casos de infecções em mamíferos (CANO *et al.*, 2020; CASTRO-LAINEZ *et al.*, 2019; KURTZMAN *et al.*, 2011).

Os fungos do gênero *Cryptococcus* são facilmente cultivados em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) com colônias de cor branca ou creme, lisas, brilhantes e com consistência mucóide. Desenvolvem-se entre 36 e 72 horas a temperaturas entre 25 e 37°C (KON *et al.*, 2008; KURTZMAN *et al.*, 2011). Esse fungos possuem aspectos morfofisiológicos que os caracterizam como leveduras não fermentadoras, produtoras de urease, assimiladoras de inositol, podendo ou não assimilar o nitrato (KON *et al.*, 2008; TOPLIS *et al.*, 2020; XUE, 2012).

No exame microscópico direto corado com tinta nanquim, esses fungos são visualizados como leveduras, ovaladas ou globosas com 5 a 7 µm de diâmetro, encapsuladas por uma cápsula polissacarídica que envolve toda a célula contrastando com o fundo negro da lâmina, como mostrado na figura 1 (CASADEVALL *et al.*, 2019; MAY *et al.*, 2016). O tamanho da cápsula pode variar entre as linhagens, espécies e local de isolamento, além de representar um fator de virulência fundamental na biologia desses fungos. Essa cápsula é uma estrutura complexa, constituída majoritariamente por glucuronoxilomanana (GXM) (90%), pequenas quantidades de galactoxilomanana (GalXM) (5-8%) e manoproteínas (1%) (CASADEVALL *et al.*, 2019; DECOTE-RICARDO *et al.*, 2019).

Figura 1 – Células leveduriformes de *C. neoformans* coradas com tinta nanquim



Fonte: (Adaptado de CASADEVALL *et al.*, 2019).

As espécies desse gênero podem ser encontradas em diferentes formas morfológicas como leveduras, pseudo-hifas e hifas (KOZUBOWSKI; HEITMAN, 2012). A forma predominante é a leveduriforme, cuja reprodução é assexuada com brotamento unicelular. As pseudo-hifas, por sua vez, são formas assexuadas alternativas com características intermediárias entre as leveduras e as hifas (ZHAO *et al.*, 2019). A terceira forma morfológica é resultado do ciclo de vida sexuado, na qual duas células leveduriformes se fundem levando a formação de hifas, e, conseqüentemente basidiósporos, que podem ser importantes propágulos infecciosos capazes de colonizar os pulmões de hospedeiros (HEITMAN *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2019). Essa característica é proposta em um modelo de virulência por inalação murina e em modelos invertebrados como em *Galleria mellonella* (GILES *et al.*, 2009; VELAGAPUDI *et al.*, 2009). Entretanto, não existe um consenso de que basidiósporos produzidos sexualmente são os propágulos infecciosos efetivos (CHEN *et al.*, 2014; FORSYTHE *et al.*, 2016).

Apesar dessas transições morfológicas, *Cryptococcus* não é considerado por alguns autores um fungo dimórfico, pois a célula leveduriforme é a forma predominante no ambiente e no hospedeiro humano (KOZUBOWSKI; HEITMAN, 2012). Por outro lado, o ciclo de vida sexuado pode contribuir com características relevantes para patogenicidade, pois possibilita variabilidade genotípica e fenotípica das espécies, com o surgimento de novas linhagens e desenvolvimento de mecanismos de virulência (SUN *et al.*, 2019). É provável que essas transições morfológicas não estejam envolvidas diretamente na infecção, pois raramente são descritas hifas e pseudohifas de *Cryptococcus* em tecidos de pacientes infectados. O fator de transcrição Znf2 é um regulador essencial para a transição de crescimento leveduriforme para hifal. Trabalhos que aumentam a expressão desse fator mostram que as hifas induzem uma

resposta imune protetora robusta e podem ser prontamente eliminadas pelos hospedeiros. Provavelmente essa característica pode esclarecer o motivo das morfologias filamentosas serem raramente encontradas nas infecções em mamíferos (MAGDITCH *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2012).

2.2 Ecologia e disseminação

A disseminação do *Cryptococcus* não está completamente elucidada, visto que as espécies residem em vários nichos ecológicos, sendo encontradas em matéria orgânica em decomposição, solo, cascas de árvores e excreta de aves (HERKERT *et al.*, 2017). Estudos em ecoepidemiologia, descrevem que as fezes de pombos selvagens (*Columba livia*) são importantes reservatórios urbanos de *Cryptococcus*, principalmente para o *C. neoformans* que apresenta uma forte associação com esses excrementos (CHOWDHARY *et al.*, 2012; LITVINTSEVA *et al.*, 2011; MAY *et al.*, 2016).

Até o final da década de 1990 o *C. gattii* era considerado fungo nativo de regiões tropicais, porém, essa espécie foi identificada em um surto de criptococose na ilha de Vancouver no Canadá, mostrando que os nichos ecológicos deste fungo podem ser bastante heterogêneos. A ocorrência dessa espécie no país foi associada às variadas árvores da região, que facilitam o estabelecimento e proliferação desse fungo em climas diferentes dos tropicais e subtropicais (ACHESON *et al.*, 2018).

2.3 Processo de infecção e estabelecimento da doença

O processo de infecção por *C. neoformans* e *C. gattii* depende do estado imunológico do hospedeiro, tamanho do inóculo e virulência da cepa que o indivíduo foi exposto. Esse processo inicia-se após a inalação de leveduras ou propágulos infecciosos, que se depositam nos alvéolos pulmonares, desencadeando respostas imunológicas por diferentes mecanismos, como ativação de macrófagos alveolares, produção de citocinas pró-inflamatórias, respostas de células T e B (MAY *et al.*, 2016; MAZIARZ; PERFECT, 2016; WILLIAMSON *et al.*, 2017).

A intensidade das respostas imunológicas desencadeia, na maioria das vezes, uma infecção pulmonar assintomática e autolimitada, evoluindo espontaneamente para cura ou mantendo-se quiescente em linfonodos ou em granulomas pulmonares (ZAVALA; BADDLEY, 2020). Os casos sintomáticos são caracterizados por pneumonia com tosse

produtiva, dor ventilatório-dependente, febre, perda de peso e em casos mais graves falência respiratória. Geralmente, a criptococose pulmonar apresenta evolução lenta com manifestações clínicas semelhantes à tuberculose ou câncer de pulmão (CHANG *et al.*, 2015; MAZIARZ; PERFECT, 2016; SETIANINGRUM *et al.*, 2019).

As células criptocócicas possuem mecanismos de sobrevivência às respostas do sistema imune. Vários fatores de virulência criptocócica, como a síntese de cápsula, melanização e secreção de urease, combinam-se para proteger o fungo do ambiente hostil das células fagocitárias, neutralizando pH e as espécies reativas de oxigênio, permitindo que as células fúngicas sobrevivam e se proliferem no interior das células do sistema imune (COELHO *et al.*, 2014; MAY *et al.*, 2016; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Além da capacidade de sobrevivência no interior das células fagocitárias, *Cryptococcus* possui mecanismos de escape dessas células. Um exemplo é a vomocitose ou exocitose, que promove a expulsão das células fúngicas que foram previamente fagocitadas sem lise celular (MAY *et al.*, 2016; SEOANE; MAY, 2020). Outro fenômeno de escape do sistema imunológico relacionado com a vomocitose é a transferência lateral, na qual as células criptocócicas internalizadas são transferidas de um macrófago infectado para outro sem lise celular. Trata-se da combinação de exocitose não lítica seguido por fagocitose por um macrófago próximo, evitando exposição das células criptocócica ao sistema imunológico do hospedeiro (ALVAREZ; CASADEVALL, 2006; DRAGOTAKES *et al.*, 2019; MAY *et al.*, 2016).

Observa-se em momentos de imunossupressão que os casos quiescentes podem evoluir com estabelecimento da criptococose pulmonar, com possibilidade de disseminação hematogênica, atingindo outros órgãos como cérebro, ossos, olhos, pele, próstata e fígado (MAZIARZ; PERFECT, 2016; NOGUCHI *et al.*, 2019). A meningoencefalite ou meningite criptocócica é a forma mais grave da doença, com elevadas taxas de letalidade, principalmente nos indivíduos acometidos com SIDA (BONGOMIN *et al.*, 2017; RAJASINGHAM *et al.*, 2017). Os principais sintomas incluem dor de cabeça, febre, convulsões, letargia, perda de memória, sinais de irritação meníngea, comprometimento neurológico e coma (BICANIC; HARRISON, 2004; ZAVALA; BADDLEY, 2020).

O mecanismo de disseminação para outros órgãos ainda não está completamente elucidado, mas existem evidências a respeito do modo de penetração de *Cryptococcus* na barreira hematoencefálica (BHE) (MAY *et al.*, 2016). Um exemplo é a paracitose, onde as

células fúngicas forçam as junções das células endoteliais, usando metaloproteases, como a Mpr1, para promover a migração através do endotélio. Além disso, a secreção de enzimas como a urease auxilia esse processo, enfraquecendo localmente a parede dos vasos endoteliais e facilitando a entrada do fungo no sistema nervoso central (SNC) (MAY *et al.*, 2016; OLSZEWSKI *et al.*, 2004; VU *et al.*, 2018). A disseminação pode ocorrer também pelo mecanismo de transcitose, no qual o ácido hialurônico presente na superfície da célula criptocócica liga-se ao CD44 no endotélio luminal, conectando o fungo à célula hospedeira. Essa interação induz uma remodelação na actina dependente de proteína quinase C, desencadeando a internalização das células fúngicas pelas células do hospedeiro (JONG *et al.*, 2008; MAY *et al.*, 2016; MAZIARZ; PERFECT, 2016). Acredita-se que o inositol presente no cérebro atue positivamente neste processo, aumentando a produção de ácido hialurônico pelo fungo (LIU *et al.*, 2013). Além disso, o estabelecimento das formas neurológicas da criptococose pode ocorrer pela hipótese do “cavalo de Tróia”, onde as células fúngicas conseguem migrar para tecidos distantes no interior das células fagocitárias sem serem expostas ao sistema imune. Acredita-se que as células fagocíticas atravessem a BHE e no interior do SNC ocorre exocitose dos fungos com o estabelecimento das formas neurológicas da doença (CHARLIER *et al.*, 2009; SEOANE; MAY, 2020).

2.4 Epidemiologia

A criptococose é uma micose emergente de distribuição mundial com elevada morbidade e mortalidade, principalmente em indivíduos imunossuprimidos e em vulnerabilidade socioeconômica (RODRIGUES; ALBUQUERQUE, 2018). Park e colaboradores (2009) estimam que ocorra mundialmente cerca de 1 milhão de casos de meningite criptocócica por ano entre os pacientes acometidos com a SIDA, provocando cerca de 600.000 mortes anuais. A maioria desses casos ocorre em países da África subsaariana, onde mais de 25 milhões de pessoas vivem com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (PARK *et al.*, 2009).

Em um trabalho mais recente, são descritas novas estimativas da carga global de meningite criptocócica associada ao HIV com base nos dados do Programa das Nações Unidas para o HIV e a AIDS (UNAIDS) de 2014 e de diversos estudos de prevalência da antigenemia criptocócica de pacientes ambulatoriais infectados com HIV de 1989 a 2016 em países de diferentes continentes (RAJASINGHAM *et al.*, 2017). Através das análises foram

estimados globalmente cerca de 223.100 casos de meningite criptocócica por ano, com aproximadamente 180.000 óbitos anuais. O maior número de casos ocorre nos países da África subsaariana com 162.500 casos, seguido pelo continente asiático com 43.200 casos. O terceiro maior número de casos ocorre em países da América Latina, com estimativa de 5.300 casos e cerca de 2.400 óbitos por ano. O Brasil é o país latino americano com maior incidência de criptococose com 2.500 casos estimados, seguido por Argentina e México com 501 a 1.000 casos. Os demais casos são descritos no Caribe, Norte da África, Oriente Médio e Europa (FIRACATIVE *et al.*, 2018; RAJASINGHAM *et al.*, 2017).

As estimativas de Park e colaboradores (2009) e Rajasingham e colaboradores (2017) possuem uma expressiva relevância, pois poucos estudos determinaram o número global de casos de criptococose. As diferenças observadas nesses estudos devem-se ao fato de que o trabalho de Park e colaboradores (2009) foi realizado com bases em estudos coortes publicadas antes da expansão do TARV, que quando expandida resultou na redução do número de casos anuais, contudo a proporção de mortalidade é semelhante nessas duas estimativas globais.

O perfil epidemiológico dos indivíduos acometidos pela criptococose no Brasil é semelhante, independente da região do país, com a prevalência de pacientes do sexo masculino, com infecção simultânea com HIV, sendo a meningite/menigeoencefalite criptocócica a manifestação clínica de maior prevalência (AGUIAR *et al.*, 2017; GIACOMAZZI *et al.*, 2016; LINDENBERG *et al.*, 2008; NUNES *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2013; VIDAL *et al.*, 2012).

Em um estudo epidemiológico descritivo da mortalidade por doenças infecciosas no Brasil entre 2000 e 2012, a criptococose encontra-se na décima terceira posição em número de óbitos. A mortalidade por criptococose como causa básica, isto é, doença que iniciou a cadeia de eventos patológicos que conduziram diretamente à morte, foi igual a 6,19/milhão de habitantes, enquanto a mortalidade como causa associada, condição patológica que teve efeito desfavorável e contribuiu para o óbito, foi de 25,19/milhão de habitantes (SOARES *et al.*, 2019).

Segundo Soares e colaboradores (2019) as maiores taxas de mortalidade por criptococose no Brasil ocorrem nos estados da região sul, como Santa Catarina (70,41/milhão de habitantes) e Rio Grande do Sul (64,40/milhão de habitantes), seguida das regiões centro-oeste e sudeste. As regiões norte e nordeste possuem as menores taxas de mortalidade,

porém esses resultados podem ser devido à subnotificação, uma vez que essas regiões ainda possuem altas proporções de óbitos por causas não definidas, que podem ocultar a letalidade tanto da criptococose quanto de outras causas infecciosas relacionadas à SIDA (SOARES *et al.*, 2019).

É importante observar que todos os trabalhos realizados no Brasil foram executados antes da inclusão da criptococose na lista de doenças e agravos de notificação compulsória em saúde pública, por meio da Portaria nº 264 de 2020, que poderá proporcionar melhor compilação dos dados e permitirá definir a real situação epidemiológica da doença no país (BRASIL, 2020).

2.5 Tratamento farmacológico

A disponibilidade de tratamentos farmacológicos para a criptococose é restrita a poucos agentes antifúngicos, com eficácia limitada, reduzido espectro de ação e elevada toxicidade. Os antifúngicos atualmente disponíveis são AmB, 5-FC, FLZ e outros azólicos como itraconazol e voriconazol (MAZIARZ; PERFECT, 2016; MOLLOY *et al.*, 2018). Os antifúngicos da classe das equinocandinas como caspofungina e micafungina não apresentam atividade adequada contra isolados de *Cryptococcus* e não são recomendados no tratamento da criptococose (MALIGIE; SELITRENNIKOFF, 2005).

A escolha farmacoterapêutica depende da disponibilidade de antifúngicos, das manifestações clínicas e das características de cada indivíduo, tais como condição imunológica e doenças de base preexistentes. A OMS preconiza como terapia antifúngica na meningoencefalite criptocócica associada ao HIV os fármacos AmB, 5-FC e FLZ, organizados em protocolos de tratamentos combinados, divididos em três fases: indução, consolidação e manutenção (Quadro 1) (WHO, 2018).

Quadro 1 – Regimes de tratamentos antifúngicos recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na meningoencefalite criptocócica em indivíduos infectados pelo HIV

Fase	Regimes de tratamento
Indução	1 semana AmB (1 mg/kg/dia) + 5-FC (100 mg/kg/dia), seguido de 1 semana de FLZ (1200 mg/kg/dia para adultos ou 12 mg/kg/dia para crianças e adolescentes).
	Alternativas recomendadas na indisponibilidade de uso de AmB ou 5-FC
	2 semanas de FLZ (1200 mg/kg/dia para adultos ou 12mg/kg/dia para crianças e adolescentes) + 5-FC (100 mg/kg/dia); 2 semanas de AmB (1 mg/kg/dia) + FLZ (1200 mg/kg/dia para adultos ou 12 mg/kg/dia para crianças e adolescentes).
Consolidação	FLZ (800 mg/dia para adultos, 6-12 mg/kg/dia para crianças e adultos) por 8 semanas após a fase de indução.
Manutenção	FLZ (200 mg/dia para adultos, 6 mg/kg/dia para adolescentes e crianças).

Fonte: próprio autor (2022).

A fase de indução tem como objetivo principal reduzir de maneira rápida e eficiente a carga fúngica no SNC, buscando atividade fungicida precoce com alta taxa de depuração de leveduras do líquido cefalorraquidiano (LCR). Nessa fase é preconizada a combinação de AmB e 5-FC durante uma semana, seguido por uma semana de FLZ. Essas recomendações e diretrizes foram baseadas principalmente nas evidências observadas na meta-análise de Tenforde e colaboradores (2018), que avaliaram o melhor protocolo de tratamento para pacientes com meningite criptocócica associada ao HIV. Nesse trabalho foi demonstrado que a fase de indução com uma semana de AmB combinada 5-FC seguida de FLZ é capaz de reduzir o potencial de toxicidade dos fármacos, custos do tratamento e riscos de mortalidade (TENFORDE *et al.*, 2018; WHO, 2018).

Devido à eventual dificuldade de acesso a AmB e 5-FC a OMS recomenda regimes de indução alternativos com duas semanas de FLZ combinado com 5-FC, quando AmB não está disponível ou não pode ser administrada com segurança, ou duas semanas de AmB

combinado com FLZ, quando a 5-FC não está disponível (Quadro 1) (WHO, 2018). Uma meta-análise realizada por Li e colaboradores (2020) avaliou regimes de indução alternativos seguros e eficazes quando 5-FC não está disponível. Foi demonstrado que duas semanas de AmB combinada com FLZ ou uma semana de AmB combinada com FLZ seguido por mais uma semana de FLZ, são alternativas apropriadas ao regime de indução principal (LI *et al.*, 2020).

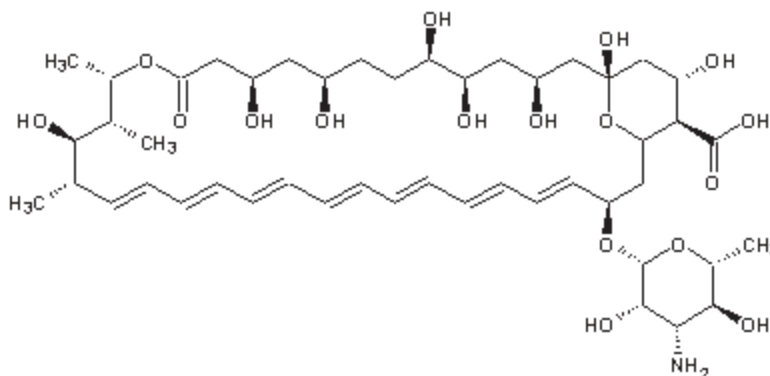
Após a fase de indução, inicia-se a consolidação, que tem como objetivo a normalização dos parâmetros clínicos e a manutenção da cultura do LCR negativa. Essa fase é realizada em monoterapia com administração de altas doses FLZ durante oito semanas (BICANIC *et al.*, 2015; MOURAD; PERFECT, 2018; WHO, 2018).

A última fase é a manutenção, onde recomenda-se a continuidade da monoterapia com FLZ por até 12 meses dependendo das condições imunológicas dos pacientes (WHO, 2018). A fase de manutenção é realizada devido às elevadas taxas de recidiva de meningoencefalite criptocócica, principalmente nos indivíduos acometidos com SIDA (PERFECT, 2017; WHO, 2018; ZAVALA; BADDLEY, 2020).

2.5.1 Anfotericina B

AmB é um antimicrobiano poliênico, macrocíclico, anfipático e insolúvel em meio aquoso (Figura 2). É administrado por via intravenosa em formulações com o solubilizante deoxicolato de sódio ou com uma variedade de carreadores lipídicos (CAROLUS *et al.*, 2020; MOURAD; PERFECT, 2018; PERFECT, 2017). Esse fármaco é utilizado no tratamento de diversas infecções fúngicas como candidíase, aspergilose, histoplasmose, blastomicose, coccidiomicose, esporotricose, dentre outras. No tratamento da criptococose, o fármaco é utilizado há mais de meio século, apesar dos seus efeitos adversos e toxicidade acentuada (BICANIC *et al.*, 2015; GIROIS *et al.*, 2005).

Figura 2 – Estrutura química da anfotericina B (AmB)



Fonte: DrugBank (2021).

O mecanismo de ação primário da AmB ocorre pela interação da porção hidrofóbica do fármaco com o ergosterol, principal esteroide da membrana citoplasmática fúngica, originando poros transmembrana que alteram a permeabilidade celular. A formação dos poros favorece o extravasamento de componentes citoplasmáticos, água, íons potássio, amônio e fosfato, culminando com a morte celular (CAVASSIN *et al.*, 2021; MESA-ARANGO *et al.*, 2012). Apesar de ocorrer em menor intensidade, esse mecanismo também pode ser observado em células de mamíferos, provocando efeitos adversos significativos. Vale destacar que a interação de AmB com o ergosterol resulta em danos metabólicos para as células fúngicas, visto que esse esteroide é essencial para diversos processos celulares, como endocitose, fusão de vacúolos e estabilização de proteínas na membrana citoplasmática (CAVASSIN *et al.*, 2021; GRELA *et al.*, 2019; KAMIŃSKI, 2014).

Existem também mecanismos secundários intracelulares de AmB que não estão completamente elucidados. Esses estão relacionados com a indução de estresse oxidativo e nitrosativo, com consequentes danos em proteínas, lipídeos e DNA (MESA-ARANGO *et al.*, 2012). Em uma análise do perfil da expressão gênica em resposta a agentes antifúngicos em *Candida albicans*, foi demonstrado que AmB não só afeta a expressão de genes envolvidos na síntese de ergosterol, mas também promove a expressão de genes relacionados ao estresse celular como por exemplo *YHB1*, *CTA1*, *AOX1* e *SOD2* (LIU *et al.*, 2005; MESA-ARANGO *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram observados no proteoma de *C. albicans* em resposta a AmB, com aumento da expressão de vários genes que codificam proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (HOEHAMER *et al.*, 2010).

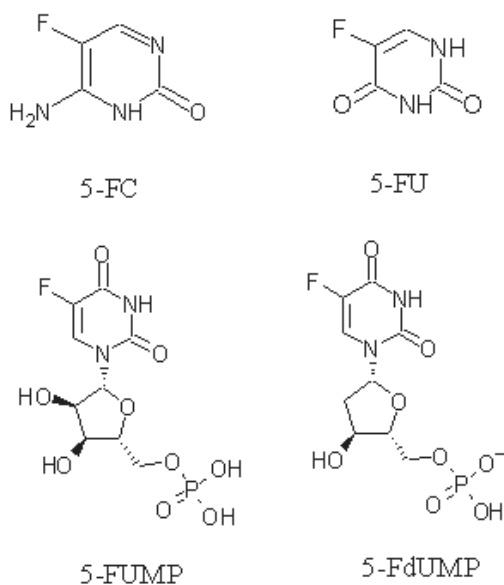
Além da expressão de genes envolvidos no estresse celular, esses mecanismos têm sido observados pelo aumento da peroxidação lipídica, aumento de espécies reativas de oxigênio, produção de peroxinitrito e aumento da atividade de sistemas enzimáticos antioxidantes nos fungos (FERREIRA *et al.*, 2013; GUIRAO-ABAD *et al.*, 2017; MESA-ARANGO *et al.*, 2012; SHEKHOVA *et al.*, 2017). Acredita-se que, em *C. neoformans*, AmB provoca danos intracelulares mediados pela produção de radicais livres antes dos danos na membrana celular (SANGALLI-LEITE *et al.*, 2011).

AmB apresenta efeitos adversos relacionados à administração intravenosa como calafrios, náuseas, vômitos, cefaleia, mialgia, artralgia, taquipneia e hipotensão, além de efeitos adversos de maior gravidade, que podem levar à descontinuação do tratamento em indivíduos com infecções fúngicas de elevado risco de vida. Esses efeitos adversos graves estão relacionados principalmente à hematotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (HAMILL, 2013; MESA-ARANGO *et al.*, 2012). Em uma meta-análise sobre o tratamento da meningite criptocócica com AmB, são descritas incidências de hipocalemia entre 0% e 35% e de nefrotoxicidade entre 1% e 38%. A nefrotoxicidade foi um dos principais efeitos adversos graves relacionados com descontinuação do tratamento com AmB (GIROIS *et al.*, 2006). Bicanic e colaboradores (2015) descreveram resultados semelhantes em uma análise de seis ensaios clínicos randomizados, onde um terço dos indivíduos avaliados desenvolveu anemia de grau III ou IV, 5,6% desenvolveram hipocalemia, 9,5% tiveram elevação nos níveis de creatinina e 6% interromperam o tratamento precocemente (BICANIC *et al.*, 2015).

2.5.2 Flucitosina

5-FC é um análogo sintético fluorado da citosina, inicialmente desenvolvido como antineoplásico. Trata-se de um pró-fármaco e único antifúngico da classe dos antimetabólitos aprovado para uso clínico (GHANNOUM; PERFECT, 2019). Inicialmente, quando internalizada pelas células fúngicas, 5-FC é convertida em 5-fluorouracil (5-FU) pela citosina desaminase e, em seguida, em monofosfato de 5-fluorouracil-ribose (5-FUMP). 5-FUMP pode ser incorporado erroneamente ao RNA em formação, causando o término prematuro da cadeia ou pode ser convertido em monofosfato ácido 5-fluorodesoxiuridílico (5-FdUMP), um potente inibidor da enzima timidilato sintase, envolvida na síntese de DNA (Figura 3) (GHANNOUM; PERFECT, 2019; LOYSE *et al.*, 2013; MAZIARZ; PERFECT, 2016).

Figura 3 – Estrutura química de flucitosina (5-FC), 5-fluorouracil (5-FU), 5-fluorouracil-ribose (5-FUMP) e 5-fluorodesoxiuridílico (5-FdUMP)



Fonte: DrugBank (2021).

5-FC possui espectro de ação restrito a leveduras do gênero *Cryptococcus* e *Candida*, já que fungos filamentosos e células de mamíferos não são capazes de metabolizar o fármaco, pois não possuem a enzima citosina desaminase. No entanto, alguns micro-organismos da microbiota intestinal humana são capazes de converter 5-FC em 5-FU, provocando efeitos adversos como depressão da medula óssea, hepatotoxicidade e distúrbios gastrointestinais (HARRIS *et al.*, 1986; VERMES *et al.*, 2003). A depressão de medula óssea e, conseqüentemente, a neutropenia é o efeito adverso mais impactante de 5-FC. Alguns trabalhos relataram neutropenia de grau IV, em pacientes que receberam 100 mg/kg/dia de 5-FC, logo, é recomendado o monitoramento dos níveis séricos desse fármaco e avaliação das funções hematológicas (BROUWER *et al.*, 2007; LOYSE *et al.*, 2013; MILEFCHIK *et al.*, 2008).

Em relação à resistência fúngica, a monoterapia com 5-FC não é recomendada devido à possibilidade de desenvolvimento rápido de resistência (WHO, 2018). O desenvolvimento de resistência ocorre principalmente por mutações que levam à redução da síntese das enzimas necessárias para o metabolismo do fármaco e pelo aumento da expressão de pirimidinas que competem com os antimetabólitos ativos (LOYSE *et al.*, 2013; VU *et al.*, 2018).

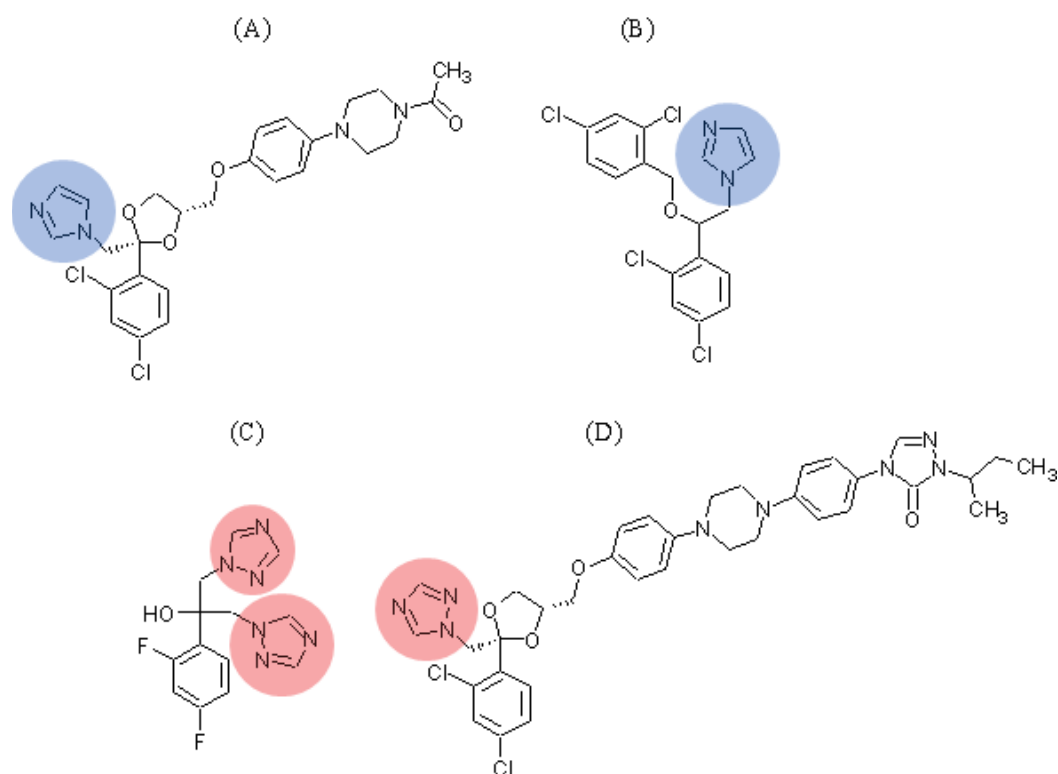
Existem ainda problemas relacionados à assistência farmacêutica para 5-FC. Esse fármaco não está aprovado por agências regulatórias em pelo menos 89 países e não está disponível comercialmente em pelo menos 94. Aproximadamente 40% da população mundial, não têm acesso à 5-FC para o tratamento da meningite criptocócica, em especial os países da África subsaariana e outros em desenvolvimento, como o Brasil (KNEALE *et al.*, 2016). Recentemente, a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC) deliberou uma consulta pública com recomendação preliminar favorável à incorporação de 5-FC no tratamento de pacientes com meningite criptocócica e demais formas de neurocriptococose no SUS (BRASIL, 2021).

2.5.3 Azólicos

Os fármacos azólicos fazem parte da maior classe de agentes antifúngicos atualmente disponíveis, sendo definidos como compostos heterocíclicos nitrogenados. Os fármacos dessa classe são subdivididos em dois grupos conforme o anel nitrogenado presente na estrutura: os imidazólicos que possuem o anel imidazol, como por exemplo cetoconazol e miconazol; e os fármacos triazólicos possuem o anel triazol, como por exemplo FLZ e itraconazol (Figura 4) (CAMPOY; ADRIO, 2017; IYER *et al.*, 2021; PETROU *et al.*, 2021).

O mecanismo de ação desses fármacos ocorre pela a inibição da síntese de ergosterol - o principal esteroide da membrana celular fúngica, além do bloqueio da enzima lanosterol 14- α -demetilase (CYP51), uma metaloenzima que faz parte do complexo de proteínas do citocromo P450 fúngico (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). Essa inibição enzimática compromete a formação da membrana celular fúngica com desestabilização dos seus lipídios e conseqüentemente, alterações na permeabilidade celular que impacta diretamente na sobrevivência e crescimento fúngico (EMAMI *et al.*, 2017; IYER *et al.*, 2021; THOMSON *et al.*, 2017). Além disso, têm-se acúmulo dos precursores dessa via, principalmente o 14- α -metil lanosterol, que é metabolizado pela enzima Δ -5,6-desaturase em um esteroide tóxico para células fúngicas (MONK *et al.*, 2020; THOMSON *et al.*, 2017).

Figura 4 – Estrutura química dos fármacos cetoconazol (A), miconazol (B), fluconazol (C) e itraconazol (D)



Nota – Destaque em vermelho anel triazol; destaque em azul anel imidazol. Fonte: próprio autor (2022).

Os fármacos azólicos apresentam efeitos adversos moderados ou discretos quando comparados com AmB, a maioria deles relacionados ao bloqueio das enzimas do citocromo P450 responsáveis pela biossíntese de colesterol em mamíferos, que possuem isoformas enzimáticas semelhantes à CYP51 fúngica. Além disso, a capacidade dos azólicos de interagir com as enzimas do citocromo P450 em humanos resulta em interações medicamentosas com diversos fármacos como rifampicina, fenobarbital, carbamazepina, benzodiazepínicos e fármacos da TARV (BRÜGGEMANN *et al.*, 2009; IYER *et al.*, 2021).

O uso indiscriminado de azólicos exerce pressão positiva na seleção de cepas fúngicas resistentes. Os mecanismos envolvidos na resistência a esses fármacos são principalmente associados às bombas de efluxo, que reduzem a concentração dos fármacos azólicos no interior das células fúngicas (NAICKER *et al.*, 2020; SMITH *et al.*, 2015). Destaca-se também que mutações nos genes *ERG11* desencadeiam a produção da enzima 14- α -demetilase com alterações no sítio de ligação dos fármacos azólicos ou aumentam as

enzimas responsáveis pela biossíntese de ergosterol, bem como a substituição por outros esteróis como o fecosterol (VILLASMIL *et al.*, 2020).

Uma revisão sistemática que avaliou a prevalência de resistência ao FLZ em *Cryptococcus*, mostrou que a resistência a esse azólico é comum em isolados de recidivas. Esse trabalho avaliou estudos de 1988 a 2017 e demonstrou que a resistência média de *Cryptococcus* ao FLZ foi de 10,6% para os isolados incidentes e 24,1% para os isolados de recidivas (BONGOMIN *et al.*, 2018). Em um estudo retrospectivo que comparou falhas no tratamento e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do FLZ frente a isolados de pacientes com criptococose, não observou correlação entre esses parâmetros. Ainda, foi destacado que a CIM elevada para FLZ não pode ser usada como um critério único para descartar esse fármaco como agente terapêutico na fase de consolidação. Além disso, aponta-se a necessidade de um consenso internacional sobre o melhor método para avaliar os padrões de susceptibilidade do *Cryptococcus* frente aos fármacos antifúngicos, principalmente o FLZ (VENA *et al.*, 2019).

Espinell-Ingroff e colaboradores (2012) descreveram valores de corte epidemiológicos para CIM de alguns azólicos frente ao complexo de espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, com base nos dados de vários laboratórios de diferentes países. Os resultados demonstram que para FLZ a CIM é de 8 a 32 µg/mL, itraconazol 0,25 a 1 µg/mL, posaconazol 0,25 a 0,50 µg/mL e voriconazol 0,12 a 0,25 µg/mL. Estudos como esse podem auxiliar na caracterização da suscetibilidade dessas espécies e monitorar o surgimento de cepas com mutações que podem levar à redução da suscetibilidade aos agentes antifúngicos.

2.6 Reposicionamento de fármacos (RF)

O RF é uma estratégia de desenvolvimento de fármacos que busca novas aplicações terapêuticas, distintas da indicação anteriormente aprovada ou pretendida, para fármacos ou candidatos a fármacos que possuem perfil farmacológico e toxicológico conhecido (PUSHPAKOM *et al.*, 2019). Essa estratégia apresenta diversas vantagens em relação às abordagens clássicas, principalmente no que se refere a tempo, custo e risco (ASHBURN; THOR, 2004). Estima-se que para a aprovação de um novo fármaco são investidos em P&D, através das abordagens tradicionais, entre 10 e 17 anos, enquanto a estimativa para aprovação de uma nova indicação terapêutica através da estratégia de RF é de 3 a 12 anos (ASHBURN; THOR, 2004; FARHA; BROWN, 2019; PUSHPAKOM *et al.*, 2019).

A redução no tempo de pesquisa para o RF ocorre em virtude da quantidade de dados prontamente disponíveis. No início de um projeto de reposicionamento os candidatos já foram submetidos a algumas fases de P&D como a otimização estrutural, as avaliações farmacológicas e toxicológicas, ensaios pré-clínicos e/ou clínicos, além da possibilidade de ser um fármaco já aprovado, tendo seu perfil de segurança clínica que é a principal limitação na descoberta de fármacos (LOW *et al.*, 2020; OLIVEIRA; LANG, 2018; PUSHPAKOM *et al.*, 2019). Em vista disso, os candidatos ao reposicionamento podem saltar fases dos processos de P&D, muitas vezes iniciando diretamente os ensaios clínicos de fase II ou fase III, proporcionando redução dos onerosos investimentos e aumento das possibilidades de sucesso (BALLARD *et al.*, 2020; FARHA; BROWN, 2019).

O RF pode ser classificado pelo perfil dos alvos farmacológicos nas novas indicações terapêuticas em *on target* e *off target* (PARIN *et al.*, 2016; PARISI *et al.*, 2020). No perfil *on target*, o mecanismo farmacológico conhecido de um fármaco é aplicado a novas indicações terapêuticas, porém no mesmo alvo biológico. Um exemplo de perfil *on target* é o reposicionamento da finasterida, inicialmente desenvolvida para o tratamento da hiperplasia prostática, reposicionada para o tratamento da alopecia androgênica. Seu mecanismo de ação se dá pela inibição da enzima 5- α -redutase, que leva à redução na biodisponibilidade da di-hidrotestosterona, metabólito biologicamente ativo da testosterona, responsável pelo crescimento da próstata. No entanto, em baixas doses a finasterida é capaz de reduzir a concentração de di-hidrotestosterona no couro cabeludo, impedindo que esse metabólito provoque a miniaturização do folículo piloso, visto que a di-hidrotestosterona faz parte da fisiopatologia da alopecia androgênica (HUANG *et al.*, 2019; OLIVEIRA; LANG, 2018; PARISI *et al.*, 2020).

Já no perfil de reposicionamento *off target*, os fármacos agem sobre novos alvos em novas indicações terapêuticas (PALVE *et al.*, 2021). De maneira geral, em sistemas biológicos os fármacos realizam interações farmacológicas com diversas macromoléculas. Algumas dessas interações são conhecidas e estão relacionadas com os efeitos terapêuticos ou biológicos esperados, enquanto outras ocorrem em alvos não intencionais e muitas vezes desconhecidos (GARON *et al.*, 2017; PALVE *et al.*, 2021). Interações não intencionais podem estar associadas aos efeitos adversos ou por vezes provocarem efeitos benéficos inesperados, revelando a possibilidade de novas indicações terapêuticas fora do escopo inicialmente aprovado ou pretendido (KUENZI *et al.*, 2019; PALVE *et al.*, 2021). Um exemplo de

reposicionamento *off target* é a queda e ascensão do uso da talidomida, que foi reposicionada décadas depois do seu trágico uso nos anos 1960. Àquela época, a talidomida foi comercializada como antiemético no alívio de enjoos matinais em gestantes, resultando no nascimento de crianças com deformidades congênitas devido ao seu efeito teratogênico, o que levou a sua retirada do mercado ainda na década de 1960. No entanto, na década de 1990 esse fármaco foi reposicionado para o tratamento do eritema nodoso hansênico, uma doença grave e debilitante associada à hanseníase. A talidomida desempenha um papel essencial na inibição seletiva do fator de necrose tumoral (TNF- α), que é encontrado em níveis elevados em pacientes com hanseníase e relacionado por essa condição debilitante (AMARE *et al.*, 2020; SAMPAIO *et al.*, 1991). Além disso, recentemente a talidomida foi reposicionada no tratamento do mieloma múltiplo refratário à quimioterapia, com uso aprovado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2013; JOURDAN *et al.*, 2020).

2.6.1 Reposicionamento de fármacos no tratamento da criptococose

O RF pode ser uma estratégia promissora para a descoberta de novas alternativas terapêuticas para a criptococose. Diversos trabalhos têm descrito atividade anticriptocócica para fármacos de diferentes classes farmacológicas como albendazol, mebendazol, flubendazol, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, quetiapina, olanzapina, haloperidol, amiodarona, atorvastatina, nifedipina, omeprazol, pioglitazona, sertralina, acetilcisteína, dentre outros (BRILHANTE *et al.*, 2019; MAGALHÃES *et al.*, 2020; OGUNDEJI *et al.*, 2016; 2017; RIBEIRO *et al.*, 2017; TRUONG *et al.*, 2018; ZHAI *et al.*, 2012).

Um exemplo importante é o promissor reposicionamento do tamoxifeno, modulador seletivo do receptor de estrogênio utilizado no tratamento do câncer de mama, que tem demonstrado atividade fungicida *in vitro* e *in vivo* frente a *Cryptococcus* spp. (BUTTS *et al.*, 2014; DOLAN *et al.*, 2009; HAI *et al.*, 2019). Esse fármaco possui baixo custo e perfil farmacocinético com expressiva distribuição no tecido cerebral, tornando-o atrativo como agente anticriptocócico. Atualmente, o tamoxifeno encontra-se em estudos clínicos de fase II como adjuvante no tratamento da meningite criptocócica associada ou não à SIDA (NGAN *et al.*, 2019).

Alguns anti-inflamatórios não esteroidais apresentaram atividade *in vitro* frente ao *Cryptococcus* spp.. O ácido acetilsalicílico e ibuprofeno apresentam CIM de 1 mM frente a

diferentes linhagens de *C. neoformans* e *C. gatti*, com baixo impacto na viabilidade de macrófagos. Além disso, foram observados efeitos sinérgicos do ibuprofeno com FLZ e AmB, e impactos significativos na membrana celular fúngica mediados por espécies reativas de oxigênio (OGUNDEJI *et al.*, 2016).

Antiparasitários benzimidazólicos como albendazol, mebendazol, flubendazol e fembendazol foram descritos como potenciais candidatos ao reposicionamento no tratamento da criptococose por Joffe e colaboradores (2017). Esses fármacos apresentam potente atividade antifúngica, *in vitro*, frente a *C. neoformans* e *C. gattii*, com impacto significativo em biofilmes, redução das dimensões capsulares e da taxa de proliferação intracelular (JOFFE *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2020; TRUONG *et al.*, 2018). No entanto, esses antiparasitários apresentam problemas farmacocinéticos quando avaliados em modelos animais, pois após administração oral sofrem rápida metabolização e seus metabólitos possuem baixa atividade antifúngica, além de limitada distribuição no SNC (HARDIN *et al.*, 1997; NIXON *et al.*, 2018). Oliveira e colaboradores (2020) relataram os efeitos da administração intranasal do fembendazol em camundongos infectados com *C. neoformans*, com taxas de sobrevivência semelhantes às de AmB administrada por via intraperitoneal, sugerindo que ao evitar o metabolismo de primeira passagem, os antiparasitários benzimidazólicos possam ser fármacos promissores no tratamento da meningite criptocócica.

Os inibidores da bomba de prótons (IBPs) omeprazol, esomeprazol, rabeprazol, pantoprazol e lansoprazol apresentam discreta atividade *in vitro* frente a *Cryptococcus* spp., porém mostram impactos significativos na produção de melanina, possivelmente pela inibição da enzima lacase ou do transportador Cu-ATP. A inibição da produção desse pigmento diminui a virulência desses fungos, pois a melanina protege o *Cryptococcus* spp. dos danos oxidativos das células do sistema imune, podendo facilitar a disseminação e infecção do SNC (BRILHANTE *et al.*, 2019).

2.6.2. Combinação de fármacos e o reposicionamento

A combinação entre fármacos é uma modalidade de reposicionamento utilizada para tentar superar a baixa potência dos fármacos nas novas indicações terapêuticas (SUN *et al.*, 2016). O uso de terapias combinadas podem aumentar as perspectivas de sucesso no reposicionamento, pois sugere que os fármacos podem ser mais eficazes quando atuam em vários alvos de maneira concomitante, estratégia conhecida como *multitarget* (ACHESON *et*

al., 2018; CHENG *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2018). A combinação de fármacos apresenta benefícios como o aumento do espectro de ação, prevenção do desenvolvimento de resistência aos antifúngicos, além da redução da dose e, conseqüentemente, da toxicidade de tratamentos como os fármacos AmB e 5-FC (SUN *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2018).

Alguns trabalhos têm demonstrado a associação de fármacos é uma estratégia de reposicionamento que pode melhorar o desempenho nas novas indicações terapêuticas, funcionando como terapias adjuvantes na criptococose (MAGALHÃES *et al.*, 2020; OGUNDEJI *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2019). A combinação de atorvastatina com FLZ, por exemplo, demonstrou potencial antifúngico capaz de reduzir fatores de virulência e proliferação intracelular. Além disso, em modelo de criptococose em camundongos C57BL/6 essa combinação aumentou a sobrevida dos animais, com melhora das condições clínicas e redução da carga fúngica nos pulmões e cérebro (RIBEIRO *et al.*, 2017).

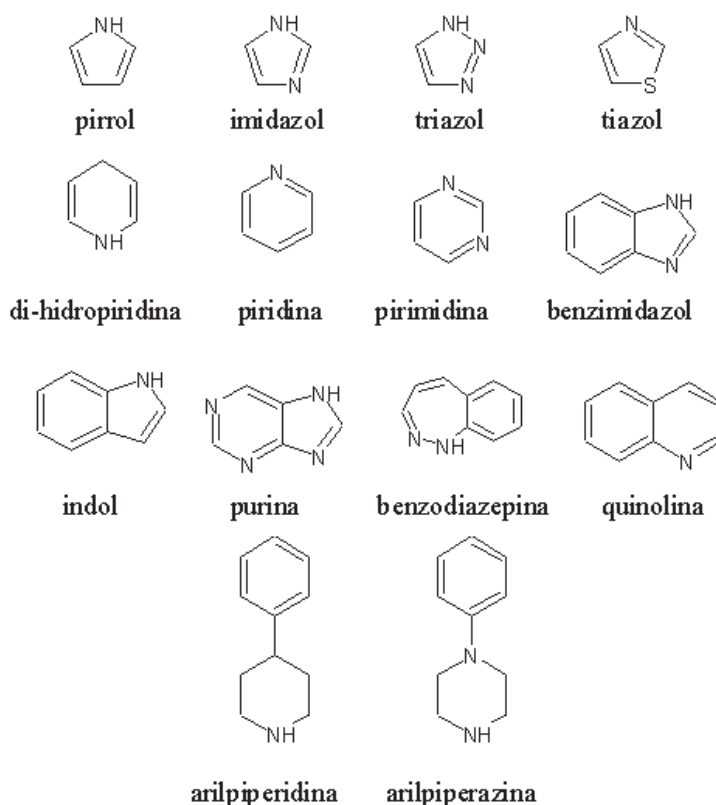
Recentemente, Ribeiro e colaboradores (2019) destacaram o promissor reposicionamento da pioglitazona, fármaco hipoglicemiante que, combinado com AmB, impactou na redução da dose deste antifúngico, com atenuação da nefrotoxicidade e dos mecanismos de virulência fúngica, em modelos de criptococose murina. Outro exemplo é descrito em uma triagem de sinergismo de diferentes fármacos com AmB frente a *C. neoformans* e *Candida spp.*, onde foi identificado potencial efeito sinérgico, *in vitro*, de AmB com eritromicina, nortriptilina, riluzol, quenodiol, nisoldipina, promazina, clorciclizina, cloperastina e glimepirida (ROSSI *et al.*, 2020)

Magalhães e colaboradores (2020), destacam o promissor reposicionamento da N-acetilcisteína (NAC), fármaco mucolítico, combinado com AmB no tratamento da criptococose. Isoladamente, o fármaco não apresentou atividade *in vitro* frente a diferentes linhagens de *C. gattii* com CIM superior 512 µg/mL. No entanto, a combinação de NAC com AmB, foi capaz de reduzir marcadores de toxicidade hepática e renal em camundongos C57/BL6, além de apresentar melhor desempenho que AmB isolada no aumento da sobrevida e na redução da morbidade por criptococose desses animais. Além disso, foi observada redução significativa da carga fúngica nos pulmões e no cérebro e menor concentração de citocinas pró-inflamatórias nos pulmões dos camundongos avaliados.

2.7. Estruturas privilegiadas (EP)

Estruturas privilegiadas (EP) são subestruturas moleculares que possuem propriedades versáteis de interações com diferentes alvos biológicos. De maneira geral, são constituídas por sistemas de anéis conectados, que resultam em estruturas relativamente rígidas, capazes de suportar diversos grupos funcionais anexados (DESIMONE *et al.*, 2004; KALARIA *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2019). As EP compreendem uma porção significativa do tamanho molecular dos fármacos e são essenciais para as interações intermoleculares com diferentes alvos biológicos relacionados com diversas patologias. Alguns exemplos de núcleos considerados privilegiados podem ser observados na Figura 5. As EP são bastante utilizadas nas estratégias tradicionais de P&D de fármacos, pois permitem alterações e otimizações moleculares nos grupos funcionais conectados. Aparentemente, a função principal dessas estruturas é a correta ancoragem de grupos funcionais em posições definidas para auxiliar na interação intermolecular com os alvos biológicos (DESIMONE *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2020).

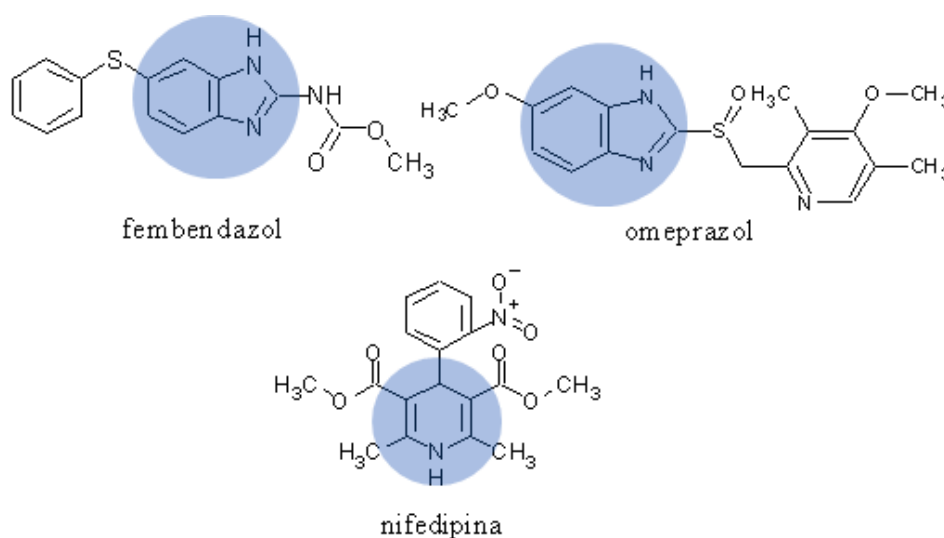
Figura 5 – Exemplos de estruturas privilegiadas



Fonte: próprio autor (2022).

A presença de EP pode ser utilizada como critério na seleção de fármacos para reposicionamento, pois pode ser encontrada na estrutura de grande parte das moléculas em uso clínico, apresentando atividades biológicas fora do escopo da indicação inicialmente aprovada ou pretendida. A presença de EP pode ser observada em fármacos com potencial para reposicionamento no tratamento da criptococose, como por exemplo nos antiparasitários benzimidazólicos, como fembendazol, nos inibidores de bomba de prótons, como omeprazol, (BRILHANTE *et al.*, 2019; JOFFE *et al.*, 2017; TRUONG *et al.*, 2018) e em bloqueadores de canais de cálcio, como nifedipina (SAMANTARAY *et al.*, 2016; TRUONG *et al.*, 2018) (figura 6). Bloqueadores de canais de cálcio apresentam atividade antifúngica frente a diferentes linhagens de *Cryptococcus* e *Candida glabrata* com CIM entre 5 e 40 µg/mL. Essa atividade aparentemente se relaciona com a estrutura química desses fármacos, pois todos possuem anel di-hidropiridina, uma estrutura privilegiada (TRUONG *et al.*, 2018).

Figura 6 – Estruturas privilegiadas de fármacos com atividade anticriptocócica



Nota – Em destaque estruturas privilegiadas benzimidazóis e di-hidropiridinas. Fonte: próprio autor (2022).

Diante do exposto, observa-se que as EP podem servir como ponto de partida favorável no desenvolvimento de projetos de RF para o tratamento da criptococose, pois podem exercer atividades farmacológicas versáteis em alvos moleculares distintos dos aprovados ou pretendidos.

3 JUSTIFICATIVA

A criptococose afeta desproporcionalmente indivíduos em vulnerabilidade socioeconômica e é listada como uma das DN que menos recebe financiamento em pesquisa e inovação, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de novos fármacos (RODRIGUES; ALBUQUERQUE, 2018). Estima-se que ocorram cerca de 180.000 mortes por ano em decorrência da meningite criptocócica, sendo a segunda causa de morbidade e mortalidade em indivíduos com SIDA (RAJASINGHAM *et al.*, 2017).

O aumento de populações imunocomprometidas tem evidenciado a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da criptococose, uma vez que o arsenal terapêutico disponível é escasso, possui alta prevalência de insucesso terapêutico, alto custo, toxicidade e diversos mecanismos de resistência já desenvolvidos (WHO, 2018).

Nesse sentido, novas estratégias terapêuticas vêm sendo avaliadas e fármacos de diferentes classes farmacológicas têm demonstrado atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* frente a *C. neoformans* e *C. gattii*, confirmando o potencial do RF como estratégia promissora para a descoberta de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da criptococose.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antifúngico de fármacos com estruturas privilegiadas para o reposicionamento no tratamento da criptococose.

4.1 Objetivos específicos

- Criar uma biblioteca de fármacos que contenham em sua estrutura núcleos privilegiados como benzimidazol, pirrol, imidazol, pirazol, tiazol, indol, dentre outros;
- Realizar a triagem da atividade antifúngica da biblioteca de fármacos frente a *C. gattii* e *C. neoformans*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos que apresentarem atividade antifúngica na triagem, frente a *C. gattii* e *C. neoformans*;
- Determinar o efeito fungicida ou fungistático dos fármacos da biblioteca com melhor atividade antifúngica;
- Avaliar a combinação *in vitro* dos fármacos da biblioteca com o antifúngico fluconazol (FLZ);
- Determinar a curva de morte das células de *C. neoformans* ATCC H99 expostas aos fármacos da biblioteca e às combinações com FLZ;
- Avaliar o efeito pós-antifúngico dos fármacos com atividade antifúngica e das combinações com FLZ frente a *C. neoformans* ATCC H99;
- Avaliar alterações no tamanho do diâmetro celular, cápsula e relação superfície/volume das células de *C. neoformans* ATCC H99 tratadas com os fármacos com atividade antifúngica e as combinações com FLZ.

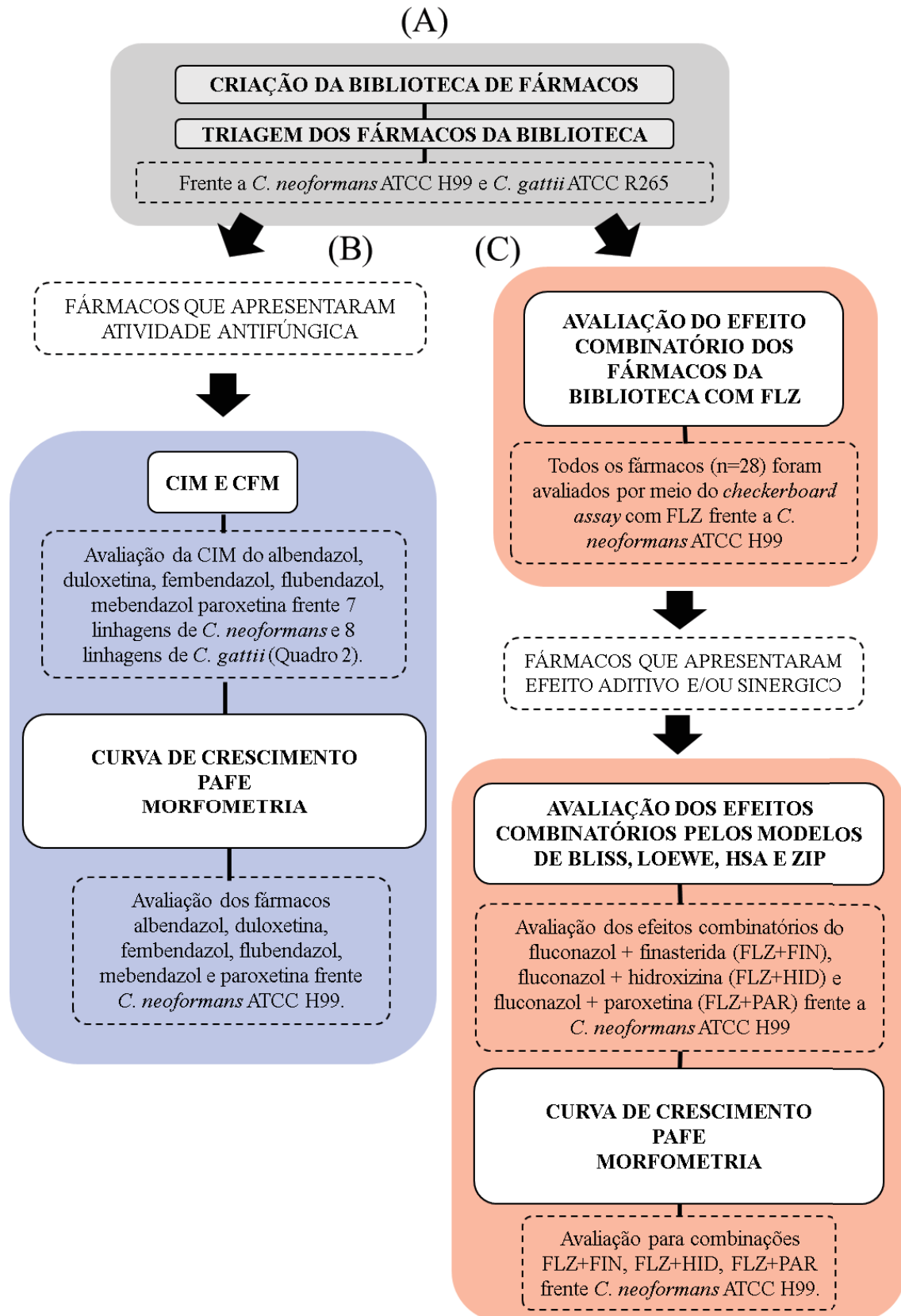
5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Desenho experimental

Inicialmente, foi criada uma biblioteca de fármacos com EP e realizada uma triagem da atividade antifúngica com todos os fármacos frente a *C. neoformans* ATCC H99 e *C. gattii* ATCC R265 (Figura 7A). A determinação da CIM e CFM foi realizada frente a 7 linhagens de *C. neoformans* e 8 linhagens de *C. gattii* (Quadro 2) para os fármacos que apresentaram atividade antifúngica $\leq 100 \mu\text{M}$ na etapa inicial. Para esses fármacos, foram realizados ensaios de curva de crescimento fúngico, efeito pós-antifúngico (EPAF) e morfometria, frente a *C. neoformans* ATCC H99 (Figura 7B).

Na sequência, foram avaliados os efeitos combinatórios de todos os fármacos da biblioteca com FLZ por meio do *checkerboard assay* (ensaio tabuleiro de xadrez) frente a *C. neoformans* ATCC H99. Os fármacos que apresentaram efeitos combinatórios aditivos, como a finasterida, hidroxizina e paroxetina, foram escolhidos para avaliação do efeito combinatórios através dos modelos de interação nula de Loewe, Bliss, *Highest Single Agent* (HSA) e *Zero Interaction Potency* (ZIP). Para essas combinações aditivas também foram realizados ensaios de curva de crescimento fúngico, EPAF e morfometria, frente a *C. neoformans* ATCC H99 (Figura 7C).

Figura 7– Desenho experimental



Fonte: próprio autor (2022).

5.2 Criação da biblioteca de fármacos

Foram realizadas buscas nas bases de dados Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) por fármacos com estruturas N-heterocíclicas e outros núcleos privilegiados, os quais foram adquiridos através de doações.

5.3 Micro-organismos

Neste trabalho foram utilizadas 7 linhagens de *C. neoformans* e 8 linhagens de *C. gattii* (Quadro 2), pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Micologia, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), gentilmente cedidas pelo professor Dr. Daniel Assis Santos. Essas linhagens são mantidas em caldo Sabouraud (Kasvi, Brasil) no ultra-freezer a -80 °C e em ASD (Kasvi, Brasil) a 4 °C. Para a realização dos experimentos, todas as linhagens de *Cryptococcus* foram repicadas em ASD e cultivadas por 72 horas a 35 °C.

Quadro 2 – Linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* utilizadas nos experimentos

Linhagens <i>C. neoformans</i>	Genótipo/Sorotipo	Linhagens <i>C. gattii</i>	Genótipo/Sorotipo
ATCC 24067	ND/ D	ATCC 32608	VG III / C
ATCC 28957	ND/ D	ATCC R265	VG IIa / B
ATCC 62066	ND/A	ATCC WM 161	VG IIa / B
ATCC H99	VN I / A	ATCC WM 178	VG II / B
ATCC WM 626	VN II / A	ATCC WM 179	VG I / B
ATCC WM 629	VN IV / D	ICB 181 ^A	ND
ATCC WM148	VN I / A	L27/01 ^C	VG II
		L28/02 ^C	ND

Nota: ATCC - *American Type Culture Collection*; ND - Não determinado; C - isolados clínicos; A - Isolados ambientais. Fonte: Fonte: próprio autor (2022).

5.4 Teste de suscetibilidade antifúngica

5.4.1 Preparo do inóculo

Para todos os testes, o preparo do inóculo foi realizado seguindo as orientações propostas no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) protocolo M27-A3 com modificações (CLSI, 2008).

Previamente, as linhagens de *Cryptococcus* foram cultivadas em ASD a 35°C por 72 h. Em seguida, 5 colônias foram coletadas e suspensas em solução salina estéril (NaCl 0,85%), obtendo concentração celular de aproximadamente 10⁶ células/mL, pelo ajuste da transmitância no espectrofotômetro (Analyser, Brasil) em comprimento de onda de 530 nm. Essas suspensões de células foram diluídas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640; Sigma, EUA) até a obtenção da concentração celular de uso entre 1 x 10³ e 5 x 10³ células/mL (CLSI, 2008).

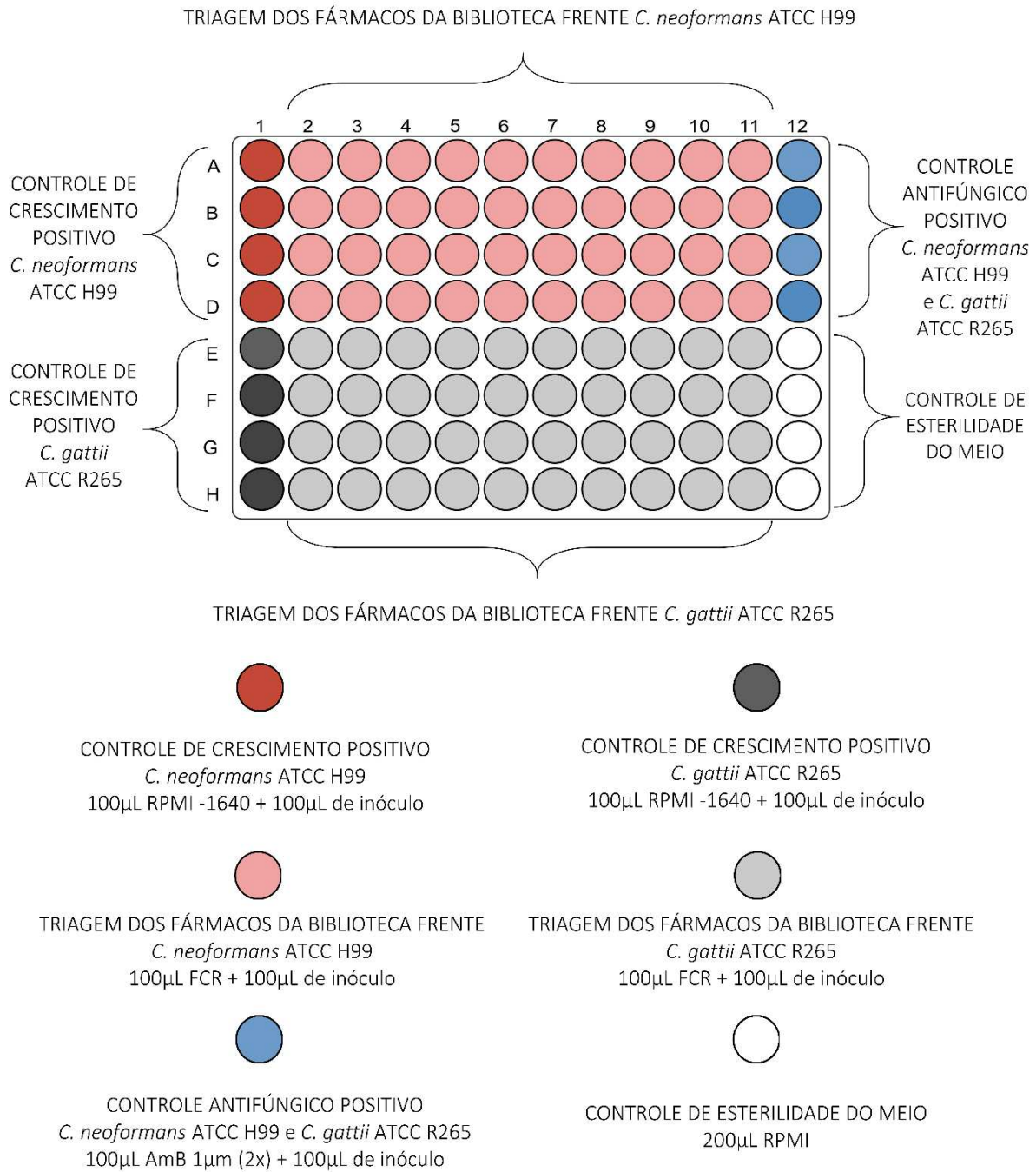
5.4.2 Triagem da atividade antifúngica dos fármacos

Primeiramente, foram preparadas soluções estoques para todos os fármacos a 10 mM com dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma, EUA) e soluções de uso para cada fármaco foram obtidas pela diluição em meio RPMI-1640 de modo que a concentração final de DMSO permanecesse menor que 1% e a concentração final dos fármacos fosse igual a 100 µM. Essas soluções de uso foram adicionadas em placas de 96 poços de fundo redondo (Kasvi, Brasil) (Figura 8), sendo a coluna 12 o controle antifúngico positivo com 100 µL de AmB a 1 µM em meio RPMI-1640 juntamente com 100 µL de inóculo com *C. neoformans* ATCC H99 e *C. gattii* ATCC R265, bem como, o controle de esterilidade do meio com 200 µL de RPMI-1640. Na coluna 1 foi realizado o controle de crescimento fúngico positivo, adicionando nos poços 1A, 1B, 1C e 1D 100 µL de meio RPMI-1640 e 100 µL de inóculo com *C. neoformans* ATCC H99. Do mesmo modo, em 1E, 1F, 1G e 1H foi realizado o controle de crescimento positivo para *C. gattii* ATCC R265.

Entre as colunas 2 e 11 foram adicionados 100 µL de cada fármaco e 100 µL de inóculo com *C. neoformans* ATCC H99 e *C. gattii* ATCC R265, sendo avaliado um fármaco por poço com concentração final de 100 µM. A leitura das placas foi realizada visualmente sendo considerados fármacos com promissora atividade antifúngica aqueles que inibiram

100% do crescimento fúngico em relação aos controles de crescimento positivo. Todos os procedimentos foram realizados em duplicatas e em três experimentos independentes.

Figura 8 – Esquema das microplacas na triagem dos fármacos da biblioteca a 100 μ M frente a *C. neoformans* ATCC H99 e *C. gattii* ATCC R265.



Fonte: próprio autor (2022).

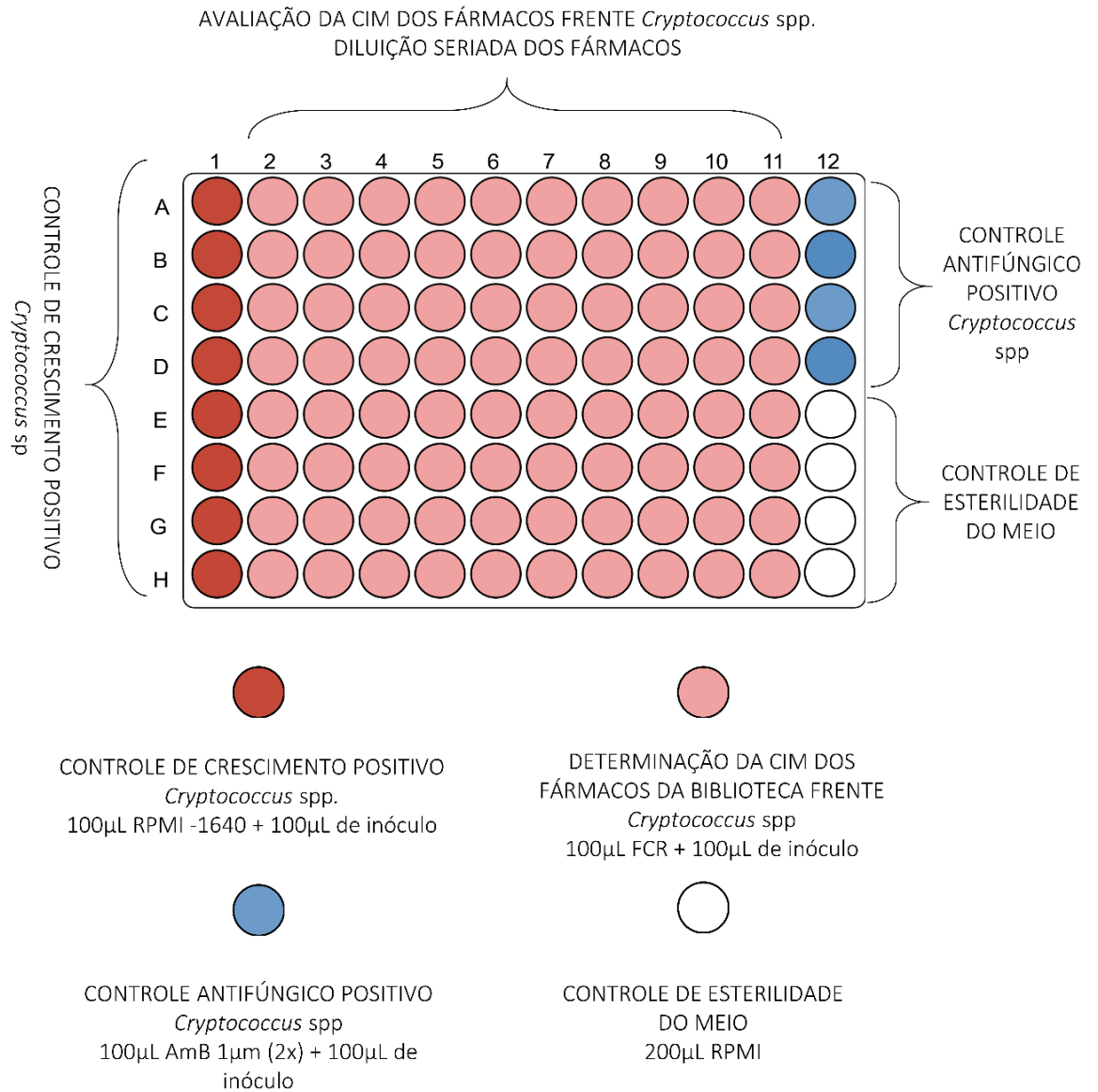
5.5 Concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada para 7 linhagens de *C. neoformans* e 8 linhagens de *C. gatti* (Quadro 2), para os fármacos da biblioteca que inibiram 100% do crescimento fúngico em relação aos controles de crescimento positivo, seguindo as orientações de preparo de inóculo propostas pelo CLSI protocolo M27-A3, descrito no item 5.4.1 (CLSI, 2008).

Inicialmente, foram preparadas diluições seriadas em meio RPMI-1640 dos fármacos que apresentam atividade antifúngica na triagem inicial, com concentrações entre 0,195 μM e 100 μM . Em seguida, 100 μL dessas diluições foram adicionados nos orifícios das placas de 96 poços juntamente com 100 μL dos inóculos de cada linhagem de *Cryptococcus* descrita no Quadro 2 (figura 9). Para o fembendazol as diluições avaliadas foram entre 0,024 μM e 12,5 μM , pois esse fármaco apresentou CIM menor que 0,195 μM . Também foram determinadas a CIM para FLZ e AmB para todas as linhagens do quadro 2. Em todas as placas foi realizado controle de esterilidade do meio com 200 μL de meio RPMI-1640 e controle de crescimento positivo com 100 μL de RPMI-1640 e 100 μL de cada inóculo fúngico.

Todas as placas foram incubadas por 72 horas a 35°C. A leitura dos resultados foi realizada visualmente, sendo considerada CIM a menor concentração dos fármacos que inibiu 100% do crescimento fúngico ao comparar com os controles de crescimento positivo. A CIM foi determinada em triplicatas realizadas em três experimentos independentes.

Figura 9 – Esquema das microplacas na avaliação da concentração inibitória mínima dos fármacos da biblioteca frente a *Cryptococcus* spp.



Fonte: Próprio autor (2022).

5.5.1 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada para todos fármacos da biblioteca que apresentaram atividade antifúngica na triagem inicial e para o antifúngico AmB, frente todas as linhagens *Cryptococcus* descritas no Quadro 2. Assim, alíquotas de 30 μ L foram retiradas dos orifícios sem crescimento fúngico visível no ensaio de determinação da CIM e inoculadas na superfície de ASD em placas Petri pela técnica de microgotas, sendo em seguida subcultivadas a 35 °C por 72 horas. A CFM foi definida como a menor concentração do fármaco em que nenhuma colônia foi observada após 72 horas.

5.6 Avaliação do efeito combinatório dos fármacos da biblioteca com fluconazol

O efeito combinatório da biblioteca de fármacos com FLZ foi avaliado por meio do ensaio tabuleiro de xadrez. O efeito desses fármacos foi avaliado frente a *C. neoformans* ATCC H99, seguindo as orientações de preparo de inóculo descritas no CLSI protocolo M27-A3, descrito no item 5.4.1 (CLSI, 2008).

5.6.1 Preparo das placas

Foram preparadas diluições seriadas de cada fármaco da biblioteca de forma que as concentrações finais permanecem entre 0,20 μM e 100 μM , e, do FLZ com concentrações finais entre 0,25 e 16 $\mu\text{g/mL}$. Cada um dos fármacos foi adicionado em placas de 96 poços distribuídos nos orifícios de forma isolada e combinada, como representado no Quadro 3.

FLZ foi avaliado isoladamente nos orifícios da coluna 1, inserindo 100 μL de cada concentração da diluição seriada e 100 μL de inóculo com *C. neoformans* ATCC H99. Os fármacos da biblioteca foram distribuídos de forma isolada nas linhas A de cada placa, adicionando 100 μL de cada concentração das diluições seriadas, acompanhado de 100 μL de inóculo com *C. neoformans* ATCC H99 (Quadro 3).

As combinações entre os fármacos da biblioteca e FLZ foram avaliadas entre os poços das colunas B2-H2 até B11-H11. Nas linhas foram inseridos 50 μL das diluições seriadas do FLZ, e nas colunas foram adicionados 50 μL de cada concentração dos fármacos da biblioteca, juntamente com 100 μL do inóculo de *C. neoformans* ATCC H99 (Quadro 3). Todas as placas foram incubadas por 72 horas a 35°C. Esse experimento foi realizado em triplicata, em três experimentos independentes.

Quadro 3 – Esquema das placas na avaliação do efeito combinatório dos fármacos da biblioteca candidatos ao reposicionamento com fluconazol (FLZ) frente a *C. neoformans*

ATCC H99

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 µM (FBCR) + 0 µM (FLZ)	0,20 µM (FBCR)	0,39 µM (FBCR)	0,78 µM (FBCR)	1,56 µM (FBCR)	3,125 µM (FBCR)	6,25 µM (FBCR)	12,5 µM (FBCR)	25 µM (FBCR)	50 µM (FBCR)	100 µM (FBCR)	C+
B	0,25 µg/mL (FLZ)	0,20 µM (FBCR) + 0,25 µg/mL (FLZ)	0,39 µM (FBCR) + 0,25 µg/mL (FLZ)	0,78 µM (FBCR) + 0,25 µg/mL (FLZ)	1,56 µM (FBCR) + 0,25 µg/mL (FLZ)	3,125 µM (FBCR) + 0,25 µg/mL (FLZ)	6,25 µM (FBCR) + 0,25 µg/mL (FLZ)	12,5 µM (FBCR) + 0,25 µg/mL (FLZ)	25 µM (FBCR) + 0,25 µg/mL (FLZ)	50 µM (FBCR) + 0,25 µg/mL (FLZ)	100 µM (FBCR) + 0,25 µg/mL (FLZ)	C+
C	0,50 µg/mL (FLZ)	0,20 µM (FBCR) + 0,50 µg/mL (FLZ)	0,39 µM (FBCR) + 0,50 µg/mL (FLZ)	0,78 µM (FBCR) + 0,50 µg/mL (FLZ)	1,56 µM (FBCR) + 0,50 µg/mL (FLZ)	3,125 µM (FBCR) + 0,50 µg/mL (FLZ)	6,25 µM (FBCR) + 0,50 µg/mL (FLZ)	12,5 µM (FBCR) + 0,50 µg/mL (FLZ)	25 µM (FBCR) + 0,50 µg/mL (FLZ)	50 µM (FBCR) + 0,50 µg/mL (FLZ)	100 µM (FBCR) + 0,50 µg/mL (FLZ)	C+
D	1 µg/mL (FLZ)	0,20 µM (FBCR) + 1 µg/mL (FLZ)	0,39 µM (FBCR) + 1 µg/mL (FLZ)	0,78 µM (FBCR) + 1 µg/mL (FLZ)	1,56 µM (FBCR) + 1 µg/mL (FLZ)	3,125 µM (FBCR) + 1 µg/mL (FLZ)	6,25 µM (FBCR) + 1 µg/mL (FLZ)	12,5 µM (FBCR) + 1 µg/mL (FLZ)	25 µM (FBCR) + 1 µg/mL (FLZ)	50 µM (FBCR) + 1 µg/mL (FLZ)	100 µM (FBCR) + 1 µg/mL (FLZ)	C+
E	2 µg/mL (FLZ)	0,20 µM (FBCR) + 2 µg/mL (FLZ)	0,39 µM (FBCR) + 2 µg/mL (FLZ)	0,78 µM (FBCR) + 2 µg/mL (FLZ)	1,56 µM (FBCR) + 2 µg/mL (FLZ)	3,125 µM (FBCR) + 2 µg/mL (FLZ)	6,25 µM (FBCR) + 2 µg/mL (FLZ)	12,5 µM (FBCR) + 2 µg/mL (FLZ)	25 µM (FBCR) + 2 µg/mL (FLZ)	50 µM (FBCR) + 2 µg/mL (FLZ)	100 µM (FBCR) + 2 µg/mL (FLZ)	C-
F	4 µg/mL (FLZ)	0,20 µM (FBCR) + 4 µg/mL (FLZ)	0,39 µM (FBCR) + 4 µg/mL (FLZ)	0,78 µM (FBCR) + 4 µg/mL (FLZ)	1,56 µM (FBCR) + 4 µg/mL (FLZ)	3,125 µM (FBCR) + 4 µg/mL (FLZ)	6,25 µM (FBCR) + 4 µg/mL (FLZ)	12,5 µM (FBCR) + 4 µg/mL (FLZ)	25 µM (FBCR) + 4 µg/mL (FLZ)	50 µM (FBCR) + 4 µg/mL (FLZ)	100 µM (FBCR) + 4 µg/mL (FLZ)	C-
G	8 µg/mL (FLZ)	0,20 µM (FBCR) + 8 µg/mL (FLZ)	0,39 µM (FBCR) + 8 µg/mL (FLZ)	0,78 µM (FBCR) + 8 µg/mL (FLZ)	1,56 µM (FBCR) + 8 µg/mL (FLZ)	3,125 µM (FBCR) + 8 µg/mL (FLZ)	6,25 µM (FBCR) + 8 µg/mL (FLZ)	12,5 µM (FBCR) + 8 µg/mL (FLZ)	25 µM (FBCR) + 8 µg/mL (FLZ)	50 µM (FBCR) + 8 µg/mL (FLZ)	100 µM (FBCR) + 8 µg/mL (FLZ)	C-
H	16 µg/mL (FLZ)	0,20 µM (FBCR) + 16 µg/mL (FLZ)	0,39 µM (FBCR) + 16 µg/mL (FLZ)	0,78 µM (FBCR) + 16 µg/mL (FLZ)	1,56 µM (FBCR) + 16 µg/mL (FLZ)	3,125 µM (FBCR) + 16 µg/mL (FLZ)	6,25 µM (FBCR) + 16 µg/mL (FLZ)	12,5 µM (FBCR) + 16 µg/mL (FLZ)	25 µM (FBCR) + 16 µg/mL (FLZ)	50 µM (FBCR) + 16 µg/mL (FLZ)	100 µM (FBCR) + 16 µg/mL (FLZ)	C-

Nota: As concentrações dos fármacos da Biblioteca Candidatos ao Reposicionamento (FBCR) estão distribuídas nas colunas e representados na cor azul. As concentrações de fluconazol (FLZ) estão distribuídas pelas linhas e representadas pela cor vermelha. Os controles de crescimento positivo estão representados por C+ e os controles de esterilidade do meio (crescimento negativo) estão representados por C-. Fonte: próprio autor (2022).

5.6.2 Leitura e interpretação dos resultados

Após incubação, todas as placas foram analisadas visualmente e por densidade óptica (DO) no espectrofotômetro de placa, em comprimento de onda 530 nm. Foi observada a menor concentração de cada fármaco da biblioteca que inibiu o crescimento fúngico de maneira isolada e combinada com FLZ. Foram consideradas inibição do crescimento fúngico as concentrações que atingiram 90% de inibição em relação aos controles de crescimento positivo.

O efeito sinérgico dos fármacos foi avaliado pelo Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) com soma da CIM de cada fármaco combinado com FLZ dividido pela CIM de cada fármaco isolado, com a CIM do FLZ combinado com cada fármaco da biblioteca dividido pela CIM do FLZ isolado (equação 1). As combinações consideradas sinérgicas foram aquelas com $ICIF \leq 0,5$, aditivas quando $ICIF > 0,5$ e $\leq 1,0$, indiferente quando $ICIF > 1$ e ≤ 4 e antagonista quando $ICIF > 4,0$ (MOR *et al.*; TRUONG *et al.*, 2018).

$$ICIF = \frac{CIM \text{ do fármaco COMBINADO}}{CIM \text{ do fármaco ISOLADO}} + \frac{CIM \text{ do FLZ COMBINADO}}{CIM \text{ do FLZ ISOLADO}} \quad (\text{Equação 1})$$

Com os resultados de DO foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento do fúngico para os fármacos da biblioteca que apresentaram ICIF sugestivo de efeitos aditivos ou sinérgicos (equação 2).

$$\% \text{ de inibição} = \left(1 - \left(\frac{DO_{\text{poço}} - DO_{\text{meio RPMI-1640}}}{DO_{\text{Controle de crescimento positivo}} - DO_{\text{meio RPMI-1640}}} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Em seguida, foram construídas matrizes com as porcentagens de inibição do crescimento fúngico, e analisadas no *SynergyFinder* as pontuações de sinergismo através dos modelos, Loewe, Bliss, HSA e ZIP. Para esses modelos as pontuações inferiores a -10 descrevem efeitos antagonísticos, entre -10 e +10 as interações dos fármacos provavelmente é aditiva e as pontuações superiores a +10 descrevem interações sinérgicas (ZHENG *et al.*, 2021).

5.7 Curva de morte

A determinação da curva de morte foi realizada para as combinações com efeito aditivo finasterida (50 μM) + FLZ (2 $\mu\text{g/mL}$), hidroxizina (50 μM) + FLZ (2 $\mu\text{g/mL}$) e paroxetina (50 μM) + FLZ (2 $\mu\text{g/mL}$) frente a *C. neoformans* ATCC H99. Primeiramente,

essa linhagem foi cultivada em ASD a 35°C por 72 horas, e, em seguida, preparado inóculo com base nas orientações da CLSI descritas no item 5.4.1.

Em placas de 96 poços foram adicionados 100 µL das combinações avaliadas juntamente com 100 µL inóculo de *C. neoformans* ATCC H99. Também foi realizado controle de crescimento negativo com 200 µL de meio RPMI-1640, e controle crescimento positivo com 100 µL de inóculo e 100 µL de meio RPMI-1640.

As placas de 96 poços foram incubadas a 35 °C por 72 h e nos intervalos de 0, 6, 12, 24, 36, 48, 54 e 72 h alíquotas de 30 µL foram removidas de cada poço, plaqueadas na superfície do ASD em placas de Petri e incubadas novamente a 35 °C por 72 h. Após o período de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e construídas as curvas de morte em função do número de UFC recuperadas.

5.7.1 Curva de morte determinada por densidade óptica

A determinação da curva de morte de *C. neoformans* ATCC H99 por DO foi realizada durante a exposição das células fúngicas à CIM dos fármacos FLZ (4 µg/mL), AmB (0,25 µM), albendazol (1,56 µM), duloxetina (100 µM), fembendazol (0,047µM), flubendazol (3,125 µM), mebendazol (0,78 µM) e paroxetina (100 µM), bem como as combinações finasterida (50 µM) + FLZ (2 µg/mL), hidroxizina (50 µM) + FLZ (2 µg/mL) e paroxetina (50 µM) + FLZ (2 µg/mL). Para isso, foi preparado inóculo de *C. neoformans* ATCC H99, seguindo as orientações de preparo de inóculo descritas no item 5.7, e adicionado 100 µL nos orifícios das placas de 96 poços, juntamente com 100 µL de cada fármaco e das combinações com FLZ. Estas microplacas foram incubadas no espectrofotômetro de placa a 35 °C durante 72 horas, com leituras realizadas em comprimento de onda de 600 nm com intervalos de 1 hora a cada leitura. O incremento na DO de cada poço é proporcional ao aumento da população fúngica exposta aos fármacos e às combinações avaliadas. Foram realizados três experimentos independentes (ROSSI *et al.*, 2016).

5.9 Efeito pós-antifúngico

O efeito pós-antifúngico (EPAF) foi determinado para os fármacos da biblioteca que apresentam atividade anticriptocócica menor ou igual a 100 µM, e para as combinações com FLZ que apresentaram efeito aditivo ou sinérgico no ensaio tabuleiro de xadrez. Foram preparadas placas de 96 poços com inóculo de células fúngicas de *C. neoformans* ATCC H99

expostas a CIM dos fármacos FLZ (4 µg/mL), AmB (0,25 µM), albendazol (1,56 µM), duloxetina (100 µM), fembendazol (0,047µM), flubendazol (3,125 µM), mebendazol (0,78 µM) e paroxetina (100 µM) por 1 hora a 35 °C. O mesmo foi realizado para as combinações finasterida (50 µM) + FLZ (2 µg/mL), hidroxizina (50 µM) + FLZ (2 µg/mL) e paroxetina (50 µM) + FLZ (2 µg/mL). Também foi realizado um controle de crescimento com o mesmo inóculo de células fúngicas de *C. neoformans* ATCC H99 em meio RPMI-1640 sem adição de nenhum fármaco.

Após o período de exposição foi realizada a remoção dos fármacos por meio da centrifugação das placas a 1800 g por 30 minutos. Em seguida foi retirado o sobrenadante de cada poço e as placas foram lavadas duas vezes com tampão tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,2) e, adicionados 200 µL de meio RPMI-1640 fresco livre de fármacos. Essas placas foram incubadas no espectrofotômetro de placa por 72 horas a 35 °C com leituras de DO a cada 30 minutos a 600 nm.

Desse modo, o EPAF foi estabelecido, *in vitro*, por método espectrofotométrico usando a equação $EPAF = T - C$, descrito anteriormente por Ellepola e colaboradores (2015), onde: T = tempo para suspensões de células de *C. neoformans* ATCC H99 tratadas com os fármacos, atingirem o valor de DO de 0,05 a 600 nm; C = tempo para as suspensões de células de *C. neoformans* ATCC H99 sem tratamento atingirem o valor de DO de 0,05 a 600 nm. Logo, a diferença entre T e C indica a duração em horas do EPAF, que determina se os fármacos foram capazes de atenuar o crescimento de *C. neoformans* ATCC H99 após uma breve exposição (ERNST *et al.*, 2000; ELLEPOLA *et al.*, 2015).

5.10 Morfometria

Células de *C. neoformans* ATCC H99 foram incubadas a 35 °C por 48 horas na superfície do ASD suplementado com 0,5 x CIM dos fármacos FLZ, AmB, albendazol, duloxetina, fembendazol, flubendazol, mebendazol e paroxetina. O mesmo foi realizado para as combinações finasterida (25 µM) + FLZ (1 µg/mL), hidroxizina (25 µM) + FLZ (1 µg/mL) e paroxetina (25 µM) + FLZ (1 µg/mL). Como controle, as células de *C. neoformans* ATCC H99 foram incubadas na superfície do ASD sem a suplementação de nenhum fármaco (FERREIRA *et al.*, 2015).

Após o período de incubação, as células foram suspensas em tinta de nanquim e posteriormente, visualizadas no microscópio óptico com aumento de 400 vezes e registradas

em fotografias. O diâmetro total das células, diâmetro dos corpos celulares e o tamanho das cápsulas foram mensurados em aproximadamente 100 células usando o ImageJ 1.40 g (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health (NIH); Bethesda, MD). O tamanho total da célula foi definido como o diâmetro da célula completa incluindo a cápsula, e, para obter o somente o tamanho da cápsula, foi subtraído do tamanho total da célula pelo diâmetro do corpo celular. Também foi determinada a relação superfície/volume usando a equação $3/r$, onde r é o raio das células avaliadas.

5.11. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, USA). O tipo de análise estatística foi determinado após a avaliação da normalidade dos dados. Para os ensaios de morfometria foi utilizado o Teste T não pareado. Para as análises foi adotado o intervalo de confiança de 95% ($p > 0,05$).

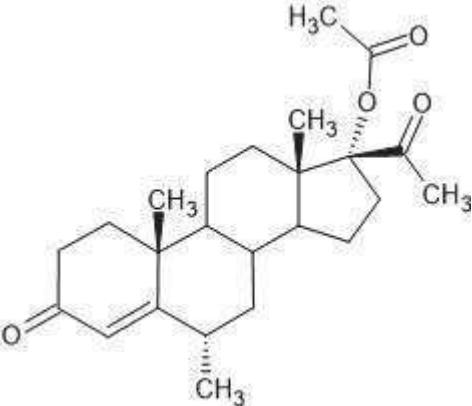
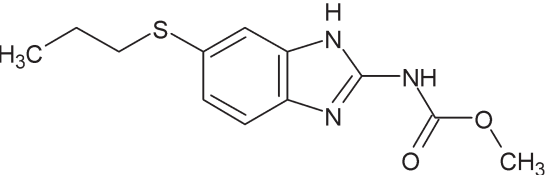
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Biblioteca de fármacos, triagem da atividade anticriptocócica e determinação da concentração inibitória mínima

Foi criada uma biblioteca de 28 fármacos com EP pertencentes a 14 classes farmacológicas diferentes: anti-histamínicos (n=5), antidepressivos (n=4) antiparasitários (n=5), antiulcerosos (n=2) antieméticos (n=2), inibidores de fosfodiesterase (n=2), relaxante muscular (n=1), hormônio esteroidal (n=1), anorexígeno (n=1), anti-inflamatório (n=1), antiandrogênico (n=1), vasodilatador (n=1) e anti-hipertensivo (n=1) (Tabela 1).

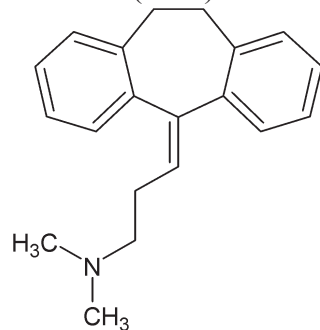
Todos os fármacos selecionados para a biblioteca possuem estruturas privilegiadas, que são caracterizadas pela capacidade de atuar como ligantes em diversos receptores biológicos e, portanto, podem aumentar as chances de novas atividades fora do escopo inicialmente aprovado (LEITE *et al.*, 2019; YET, 2018). A maioria dos fármacos da biblioteca possui em suas estruturas n-heterocíclis privilegiados, como benzimidazol, pirrol, indol, dentre outros.

Tabela 1 - Estrutura química, classe farmacológica, mecanismo de ação e principais alvos dos fármacos da biblioteca

Fármaco	Classe farmacológica	Mecanismo de ação	Principais alvos farmacológicos
Acetato de medroxiprogesterona (AMP) 	Hormônio esteroidal (contraceptivo hormonal)	É estruturalmente relacionado ao hormônio progesterona endógeno e inibe a produção de gonadotrofina, impedindo a maturação folicular e a ovulação.	Receptor de progesterona; Receptor de estrogênio alfa; P-glicoproteína 1; Receptor GABA (A).
Albendazol (ALB) 	Antiparasitário	Liga-se à tubulina inibindo sua polimerização e consequentemente a montagem dos microtúbulos.	Cadeia de tubulina alfa-1 (Humana); Cadeia beta-2 da tubulina (Helmíntica).

Amitriptilina

(AMI)



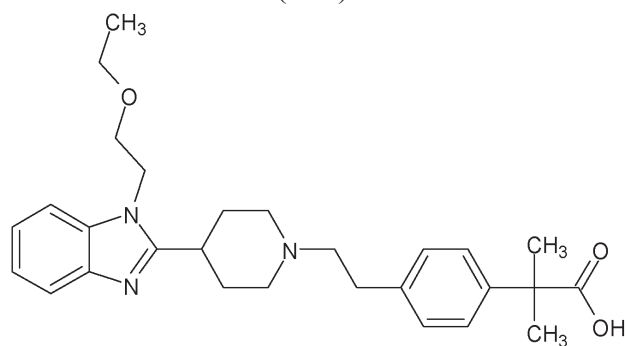
Antidepressivo

Inibe o mecanismo de bomba de membrana responsável pela recaptação de aminas transmissoras, como a norepinefrina e a serotonina, aumentando sua concentração nas fendas sinápticas do cérebro.

Transportador de noradrenalina dependente de sódio;
Transportador de serotonina dependente de sódio;
Receptor intracelular não opioide Sigma 1;
Receptor de histamina H2 e H4.

Bilastina

(BIL)

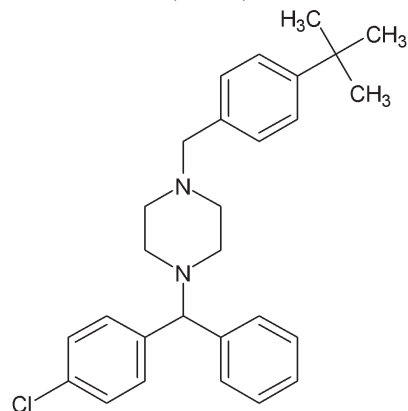


Anti-histamínico

É um antagonista do receptor de histamina H1, reduzindo o desenvolvimento de sintomas alérgicos devido à liberação de histamina dos mastócitos.

Receptor de histamina H1.

Buclizina
(BUC)

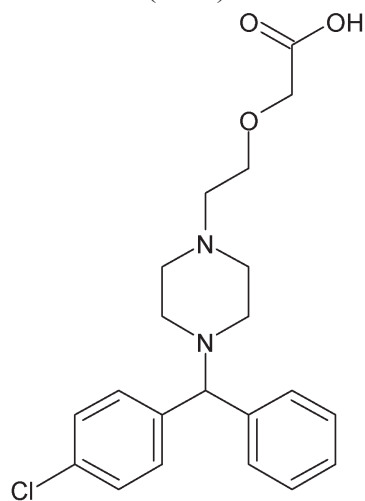


Anti-histamínico

Inibição seletiva dos receptores H1 periféricos, reduzindo o desenvolvimento de sintomas alérgicos devido à liberação de histamina. Além de efeito antiemético e estimulante de apetite.

Receptor de histamina H1;
Receptor muscarínico M1.

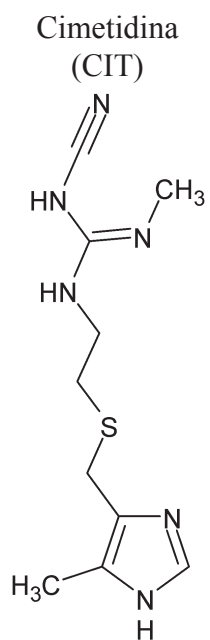
Cetirizina
(CET)



Anti-histamínico

Inibição seletiva dos receptores H1 periféricos, reduzindo o desenvolvimento de sintomas alérgicos devido à liberação de histamina.

Receptor de histamina H1

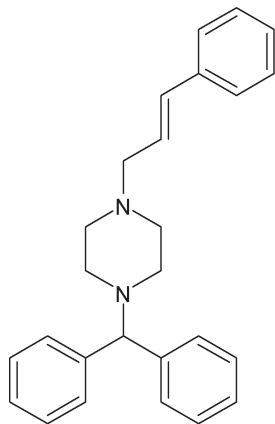


Antiulceroso

É um antagonista do receptor de histamina H₂, reduzindo a secreção de ácido gástrico e consequentemente na redução da acidez gástrica.

Receptor de histamina H₂.

Cinarizina
(CIN)

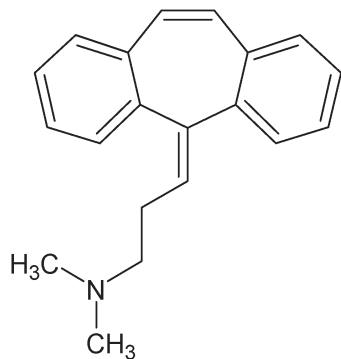


Vasodilatador

Vasodilatador cerebral.
Inibe as contrações das células do músculo liso vascular ao bloquear os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L e do tipo T.

Canal de cálcio tipo L voltagem dependente;
Receptor de dopamina D1 e D2;
Receptor muscarínico;
Receptor de histamina H1.

Cloridrato de ciclobenzaprina
(CIC)

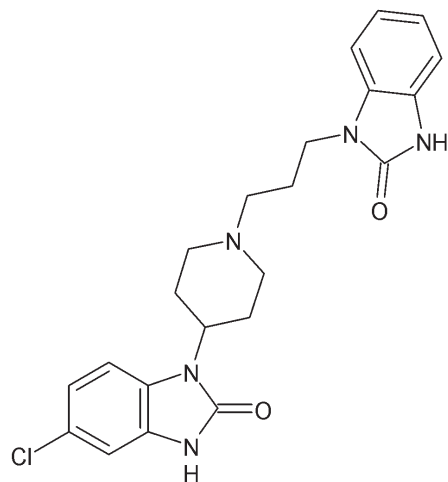


Relaxante muscular

Mecanismos de ação não é completamente elucidado.
Existem evidências que ocorre inibição de vias serotoninérgicas na medula espinhal e tronco encefálico por meio da ação nos receptores 5-HT₂.

Receptor 5-HT;
Transportador de serotonina dependente de sódio;
Transportador de noradrenalina dependente de sódio.

Domperidona
(DOM)

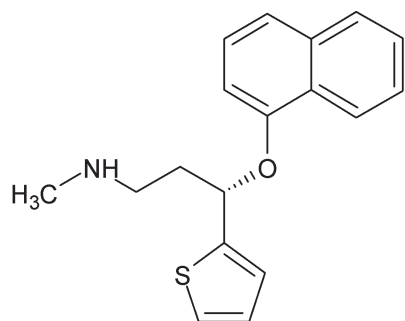


Antiemético

Bloqueador específico dos receptores de dopamina, auxiliando no peristaltismo gastrointestinal sendo usado como antiemético.

Receptor de dopamina D2 e D3.

Cloridrato de duloxetina
(DUL)

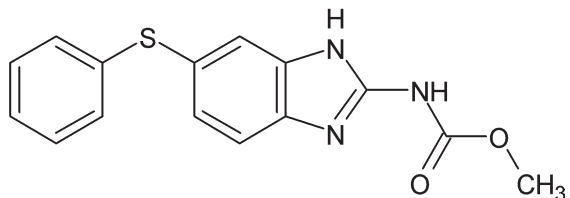


Antidepressivo

Inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina usado principalmente no tratamento da depressão, transtorno de ansiedade generalizada e dor neuropática.

Transportador de serotonina dependente de sódio;
Transportador de noradrenalina dependente de sódio.

Fembendazol
(FEM)

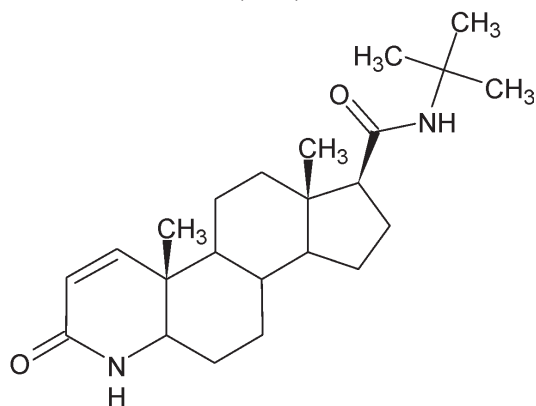


Antiparasitário

Liga-se à tubulina inibindo sua polimerização e consequentemente a montagem dos microtúbulos.

Cadeia beta-2 da tubulina (helmíntica).

Finasterida
(FIN)

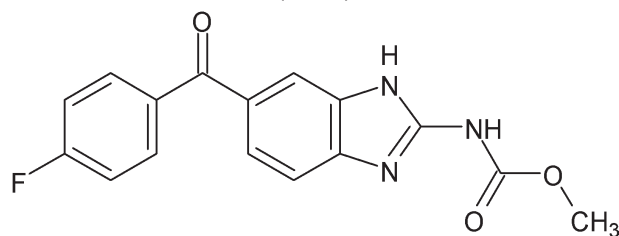


Antiandrogênico

Inibe a enzima 5- α -redutase e consequentemente a conversão a testosterona em seu metabólito ativo dihidrotestosterona.

5- α redutase tipo 2.

Flubendazol
(FLU)

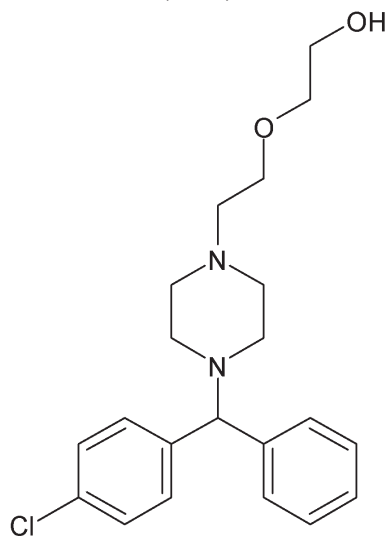


Antiparasitário

Liga-se à tubulina inibindo sua polimerização e consequentemente a montagem dos microtúbulos.

Cadeia beta-2 da tubulina (helmíntica).

Hidroxizina
(HID)

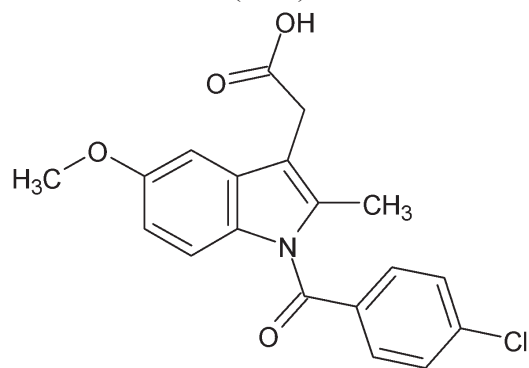


Anti-histamínico.

Antagonista do receptor de histamina H1. Exibe propriedades sedativas, ansiolíticas e antieméticas.

Receptor de histamina H1.

Indometacina
(IND)

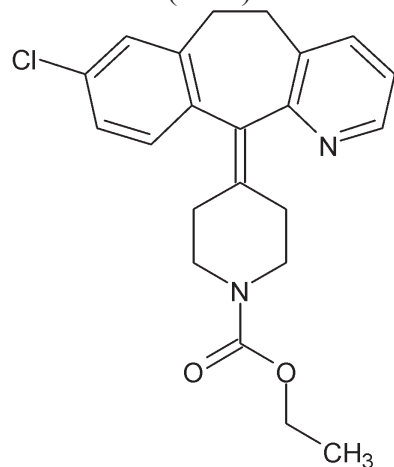


Anti-inflamatório não-esteroidal

Inibição da cicloxigenase 1 e 2 com bloqueio da síntese de prostaglandinas.

Fosfolipase A2
Cicloxigenase 1 e 2.

Loratadina
(LOR)

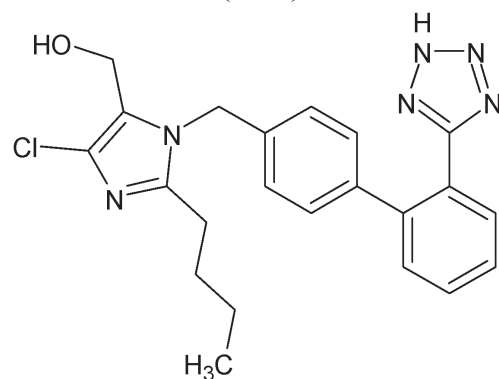


Anti-histamínico

Antagonista do receptor de histamina H1 reduzindo o desenvolvimento de sintomas alérgicos devido à liberação de histamina.

Receptor de histamina H1.

Losartana potássica
(LOS)

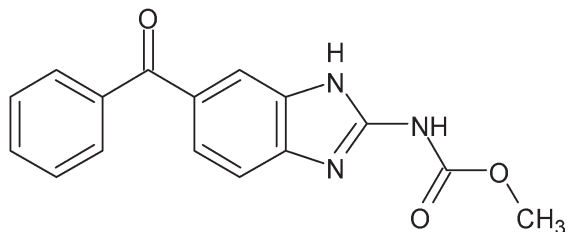


Anti-hipertensivo

Bloqueia o receptor de angiotensina II e consequentemente reduz a vasoconstrição e a síntese de aldosterona.

Receptor de angiotensina II tipo 1.

Mebendazol
(MEB)

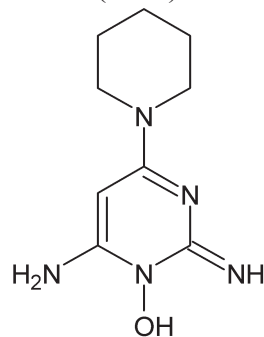


Antiparasitário

Liga-se à tubulina inibindo sua polimerização e consequentemente a montagem dos microtúbulos.

Cadeia de tubulina alfa-1 (Humana)
Cadeia beta-2 da tubulina (helmíntica).

Minoxidil
(MIN)

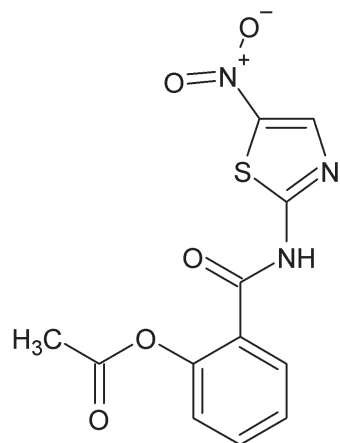


Vasodilatador

Vasodilatador periférico com ação sobre canais de potássio dependentes de ATP.

Canal de potássio dependente de ATP

Nitazoxanida
(NTZ)

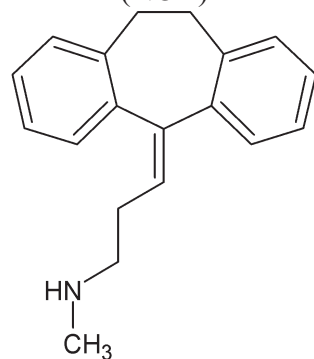


Antiparasitário

Interrupção do metabolismo energético em micróbios anaeróbios pela inibição da piruvato ferredoxina oxirredutase.

Ferredoxina / flavodoxina oxidoreductase (PFOR).

Nortriptilina
(NOR)

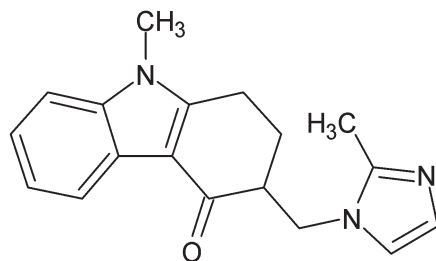


Antidepressivo

Inibe a recaptação de serotonina na membrana neuronal.

Transportador de noradrenalina dependente de sódio;
Transportador de serotonina dependente de sódio;
Receptor de serotonina 2A.

Cloridrato de ondansetrona
(ODT)

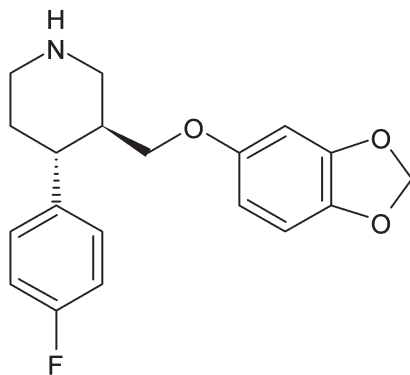


Antiemético

Antagonista do receptor 5-HT₃ usado para prevenir náuseas e vômitos na quimioterapia do câncer e no pós-operatório.

5-HT-3.

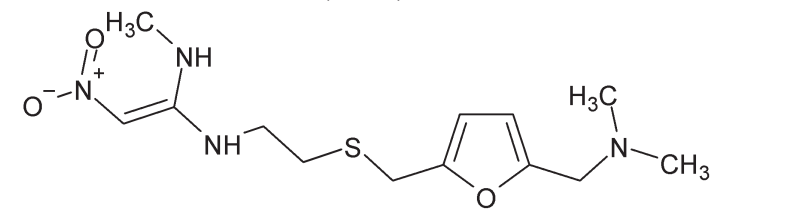
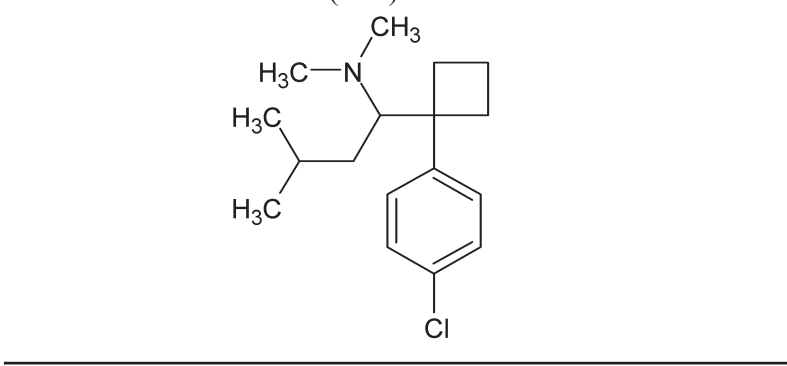
Cloridrato de paroxetina
(PAR)

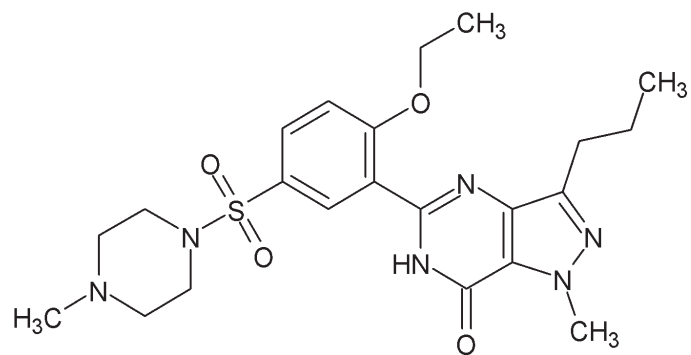


Antidepressivo

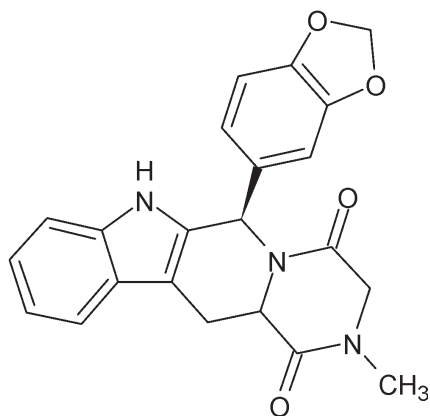
Inibe a recaptação de serotonina resultando em elevação da disponibilidade desse neurotransmissor.

Transportador de serotonina dependente de sódio.

<p>Ranitidina (RAN)</p> 	<p>Antiulceroso</p>	<p>Diminui da secreção de ácido gástrico por ligação reversível aos receptores de histamina (H2).</p>	<p>Receptor de histamina H2.</p>
<p>Sibutramina (SIB)</p> 	<p>Anorexígeno</p>	<p>Inibição da recaptação de noradrenalina, serotonina e dopamina promovendo sensação de saciedade com diminuição do apetite.</p>	<p>Transportador de noradrenalina dependente de sódio; Transportador de serotonina dependente de sódio; Transportador de dopamina dependente de sódio.</p>
<p>Citrato de sildenafil (SIL)</p>	<p>Inibidor de fosfodiesterase</p>	<p>Inibidor de fosfodiesterase indicado para o tratamento da disfunção erétil.</p>	<p>Fosfodiesterase 5.</p>



Tadalafila
(TAD)



Inibidor de
fosfodiesterase

Inibidor de fosfodiesterase
indicado para o tratamento
da disfunção erétil.

Fosfodiesterase 5.

O resultado da triagem da biblioteca de fármacos frente a *C. neoformans* ATCC H99 e *C. gattii* ATCC R265 revelou que os antiparasitários albendazol, mebendazol, flubendazol e os antidepressivos duloxetina e paroxetina, apresentam atividade anticriptocócica promissora com inibição do crescimento fúngico em concentrações ≤ 100 μM . Logo, a CIM desses fármacos foi determinada frente às 7 linhagens de *C. neoformans* e 8 linhagens de *C. gattii* (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima dos fármacos albendazol, fembendazol, flubendazol, mebendazol, duloxetina, paroxetina e anfotericina B frente a diferentes linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*

<i>C. neoformans</i>							
Linhagens	CIM (μ M)						
	ALB	DUL	FEM	FLU	MEB	PAR	AmB
ATCC 24067	1,56	100	0,047	0,40	0,78	100	0,25
ATCC 28957	1,56	100	0,095	0,78	0,40	100	0,25
ATCC 62066	3,13	100	0,095	1,56	0,78	100	0,25
ATCC H99	1,56	100	0,047	3,13	0,78	100	0,25
ATCC WM 626	1,56	100	0,047	0,40	0,40	>100	0,25
ATCC WM 628	1,56	100	0,095	0,78	0,78	100	0,25
ATCC WM148	1,56	100	0,095	0,78	0,78	100	0,25
<i>C. gattii</i>							
Linhagens	CIM (μ M)						
	ALB	DUL	FEM	FLU	MEB	PAR	AmB
ATCC 32608	3,13	>100	0,095	0,78	0,78	100	0,25
ATCC R265	1,56	100	0,095	0,78	1,56	100	0,25
ATCC WM161	1,56	100	0,095	0,78	0,78	>100	0,25
ATCC WM178	1,56	100	0,047	0,40	0,78	100	0,25
ATCC WM179	1,56	>100	0,047	0,40	0,78	100	0,25
ICB 181 ^a	3,13	100	0,095	0,78	1,56	100	0,25
L27/01C	3,13	100	0,047	0,40	0,78	>100	0,25
L28/02 C	3,13	100	0,047	0,40	0,78	>100	0,25

Nota - Valores de CIM representativos de três experimentos independentes. A leitura dos resultados foi realizada visualmente, sendo considerada CIM a menor concentração dos fármacos que inibiu 100% do crescimento fúngico. CIM: concentração inibitória mínima; ALB: albendazol; FEM: fembendazol; FLU: flubendazol; MEB: mebendazol; DUL: duloxetina PAR: paroxetina; AmB: anfotericina B; C: isolados clínicos; A: Isolados ambientais; ATCC: *American Type Culture Collection*. Fonte: próprio autor (2022).

O fembendazol foi o fármaco que apresentou atividade antifúngica de maior potência com CIM entre 0,047 e 0,095 μM frente a *C. neoformans* e *C. gattii*. A média da CIM dos fármacos albendazol, flubendazol e mebendazol frente a diferentes linhagens *C. neoformans* e *C. gattii* foi de 1,78, 1,11 e 0,67 μM , e, 2,35, 0,59 e 0,98 μM , respectivamente. Para todos os fármacos avaliados a CFM foi igual a CIM, sugerindo que estes possivelmente exercem efeitos fungicidas em *C. neoformans* e *C. gattii*.

Os antidepressivos paroxetina e duloxetina apresentaram CIM 100 μM frente à maior parte das linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* testadas (Tabela 2). Contudo, a suscetibilidade da PAR frente a *C. neoformans* ATCC WM626 e *C. gattii* ATCC WM161, L27/01^c, L28/02^c foi superior a 100 μM . O mesmo foi observado para a duloxetina frente *C. gattii* ATCC 32608 e ATCC WM179 (Tabela 2).

A atividade anticriptocócica dos antiparasitários benzimidazólicos foi descrita de forma pioneira na década 1990, porém seus impactos nas células fúngicas, como tamanho de cápsula, atividade frente a biofilmes e outros fatores de virulência, não foram avaliados à época (CRUZ *et al.*, 1994; CRUZ; EDLIND, 1997). Recentemente, alguns trabalhos retomaram a avaliação da atividade desses fármacos frente a *Cryptococcus* spp. confirmando a potente atividade fungicida, possivelmente relacionada com o núcleo benzimidazólico desses fármacos.

A atividade anticriptocócica do flubendazol frente a isolados clínicos, veterinários e ambientais de *Cryptococcus* foi explorada em um recente trabalho, apresentando CIM entre 0,039 $\mu\text{g/mL}$ (0,12 μM) e 0,156 $\mu\text{g/mL}$ (0,49 μM) (TRUONG *et al.*, 2018). Nixon e colaboradores (2018) também demonstraram que o flubendazol tem potente atividade *in vitro* contra 50 isolados *C. neoformans*, com CIM entre 0,06 $\mu\text{g/mL}$ (0,19 μM) e 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (0,79 μM). No entanto, foi reportado que esse fármaco não apresenta atividade *in vivo* comparável aos antifúngicos FLZ e AmB em modelos de meningoencefalite criptocócica em camundongos e coelhos, quando apenas uma atividade modesta ou nenhuma atividade antifúngica, respectivamente, foi observada (NIXON *et al.*, 2018).

Joffe *et al.* (2017) realizaram uma triagem com 727 fármacos e observaram que os antiparasitários benzimidazólicos albendazol, fembendazol, flubendazol e mebendazol, possuem atividade anticriptocócica promissora. Apesar do fembendazol ser descrito como fármaco de maior potência, seus impactos nas células fúngicas não foram avaliadas por Joffe e colaboradores (2017). No entanto, o mebendazol foi bastante explorado, demonstrando

atividade fungicida frente a células de *C. neoformans* ATCC H99 intracelulares em ensaios de fagocitose *in vitro* em macrófagos J774.16, atividade frente a biofilmes criptocócicos e alterações morfológicas relevantes em *C. neoformans* como redução acentuada das dimensões capsulares (JOFFE *et al.*, 2017).

Os resultados iniciais da triagem de fármacos encorajaram a avaliação do fembendazol, paroxetina e duloxetina frente a diferentes linhagens de *Cryptococcus*, visto que até então não existiam dados na literatura sobre os impactos desses fármacos na morfologia fúngica e nos fatores de virulência criptocócicos. No entanto, no decorrer do desenvolvimento do presente projeto de pesquisa, Oliveira e colaboradores (2020) descreveram os impactos *in vitro* e *in vivo*, do tratamento com fembendazol frente a *C. neoformans* e *C. gattii*, com CIM de 0,012 µg/mL (0,040 µM), resultados semelhantes aos observados na tabela 2.

Utilizando modelo de criptocose murina, os autores demonstraram que o fembendazol, administrado por via intranasal (1,25 µM), possui taxas de sobrevivência semelhante aos animais tratados com AmB (2 mg/kg) por via intraperitoneal. Essa via de administração evita a rápida metabolização hepática do fármaco, e, conseqüentemente, garante aumento de sua biodisponibilidade de forma a possibilitar a ação no SNC (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Através da administração intranasal o fármaco alcança rapidamente o cérebro através dos nervos olfatório e trigêmeo, evitando o metabolismo de primeira passagem no fígado e no trato gastrointestinal (CROWE *et al.*, 2018).

Além disso, para o fembendazol também são descritos impactos significativos na cápsula criptocócica e inibição da taxa de proliferação intracelular com redução do escape fagocítico (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Acredita-se que o fármaco, assim como os demais antiparasitários benzimidazólicos, exerce atividade anticriptocócica por meio da desorganização dos microtúbulos fúngicos, com baixo impacto em células de mamíferos (NIXON *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Como pode ser observado, os resultados da suscetibilidade de *Cryptococcus* spp., *in vitro*, aos antiparasitários benzimidazólicos sugerem potente atividade fungicida. No entanto, em modelos *in vivo* esses fármacos são rapidamente metabolizados após absorção oral e possuem propriedades de distribuição inadequadas para atingir o sistema nervoso central, sugerindo que aspectos farmacocinéticos sejam um fator limitante para sua utilização no tratamento da criptocose (HARDIN *et al.*, 1997; NIXON *et al.*, 2018).

Assim como o fembendazol, durante desenvolvimento do presente trabalho, Pereira e colaboradores (2021) descreveram atividade anticriptocócica dos antidepressivos fluoxetina e paroxetina frente *C. neoformans* ATCC 90112 e ATCC 208821, com CIM de 9,6 µg/mL e 41 µg/mL, respectivamente. Ambos os fármacos apresentaram CFM igual a CIM, com impactos fenotípicos significativos. Do mesmo modo, Menezes (2020) descreveu resultados da atividade antifúngica para o cloridrato de duloxetina frente a *C. neoformans* ATCC 90112 com CIM e CFM de 18,5 µg/mL (62,16 µM). Esses resultados podem indicar que os inibidores seletivos da recaptção de serotonina como DUL, PAR e fluoxetina são promissores candidatos ao reposicionamento ou protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos anticriptocócicos.

6.2 Efeitos combinatórios dos fármacos da biblioteca com fluconazol

O efeito combinatório dos fármacos da biblioteca com FLZ foi avaliado frente a *C. neoformans* ATCC H99 por meio do ICIF. Nenhum dos fármacos apresentou índice $\leq 0,5$, ou seja, não foi observado sinergismo com FLZ. No entanto, os antiparasitários albendazol, fembendazol, flubendazol e mebendazol em combinação com FLZ, foram capazes de reduzir a CIM do antifúngico azólico de 4 µg/mL para 1 µg/mL, apesar dos efeitos combinatórios serem classificados como indiferentes (Tabela 3).

Dados recentes da literatura apoiam alguns dos resultados observados para as combinações dos antiparasitários benzimidazólicos e FLZ (JOFFE *et al.*, 2017; TRUONG *et al.*, 2018). Joffe e colaboradores (2017) demonstraram que o mebendazol apresenta efeito aditivo contra *C. neoformans* ATCC H99 quando combinado com AmB, porém não apresenta efeito combinatório com FLZ, sendo caracterizado como indiferente (ICIF 1,5). Resultado semelhante ao observado no presente trabalho, onde o ICIF para essa combinação foi igual a 1,25 (Tabela 3). Do mesmo modo, a combinação fembendazol com AmB frente a *C. neoformans* ATCC H99 é descrita por Oliveira e colaboradores (2020) como aditivo (ICIF 0,62) esse trabalho não avaliou a combinação com FLZ.

Dentre as 28 combinações testadas, foi observado efeito aditivo para finasterida, hidroxizina e paroxetina quando combinados com FLZ, com ICIF igual a 1 nas três amostras. Esses três fármacos possuem isoladamente CIM ≥ 100 µM frente *C. neoformans* ATCC H99, porém em combinação com FLZ (2 µg/mL) a CIM de cada um deles foi reduzida para 50 µM (Tabela 3).

Pereira e colaboradores (2021) descreveram recentemente a atividade anticriptocócica do cloridrato de paroxetina, com CIM e CFM de 41 µg/mL (124,48 µM) frente a *C. neoformans* ATCC 90112 e ATCC 208821. Estes autores reportam efeito sinérgico do cloridrato de paroxetina com AmB, impacto na viabilidade de biofilmes e redução significativa do tamanho capsular quando avaliado isoladamente e em combinação sinérgica (PEREIRA *et al.*, 2021).

O efeito combinatório de inibidores seletivos da recaptção da serotonina com AmB, *in vitro*, já foi documentado por Pereira e colaboradores (2021), porém estudos mais aprofundados ainda são necessários, considerando os possíveis efeitos sinérgicos e aditivos com FLZ e os possíveis impactos fenotípicos dessas combinações em diferentes linhagens de *Cryptococcus* spp.

As combinações do FLZ com cloridrato de duloxetina e cloridrato de amitriptilina foram capazes de reduzir a CIM do FLZ pela metade e, visualmente, a CIM da amitriptilina frente a *C. neoformans* ATCC H99 para 100 µM. Menezes (2020) descreve resultados diferentes para o cloridrato de duloxetina frente *C. neoformans* ATCC 9011, com efeitos sinérgicos quando combinados com FLZ com ICIF $\leq 0,5$. As diferenças observadas podem estar relacionadas à susceptibilidade de cada linhagem, logo são necessários mais estudos para consolidação da atividade anticriptocócica do cloridrato de duloxetina e cloridrato de amitriptilina frente a outras linhagens de *Cryptococcus* spp.

Não foram encontrados na literatura dados relacionados à atividade anticriptocócica dos fármacos finasterida e hidroxizina. Para finasterida são descritos efeitos antifúngicos na prevenção da formação de biofilme de *C. albicans* em doses ≥ 16 mg/L e no tratamento de biofilmes pré-formados em concentrações ≥ 128 mg/L (CHAVEZ-DOZAL *et al.*, 2014; MIRÓ-CANTURRI *et al.*, 2019). Em combinação, esse fármaco apresentou atividade sinérgica na prevenção da formação de biofilme na concentração de 4 mg/L e 2 mg/L de FLZ. Outro importante impacto, *in vitro*, da finasterida foi a inibição da filamentação de *C. albicans* após 2 dias de incubação em concentrações ≥ 32 mg/L (CHAVEZ-DOZAL *et al.*, 2014).

Nesse sentido, as combinações FLZ+FIN, FLZ+HID e FLZ+PAR sugerem efeitos aditivos ao apreciar somente o ICIF (Tabela 3). No entanto, existem diferentes interpretações para esses efeitos, alguns autores como Odds (2003) propõe que ICIF entre 0,5 e 4,0 seja

classificada como indiferente, e por outro lado, Mor (2015) descreve efeitos aditivos para ICIF igual 1.

Todas as demais combinações testadas apresentaram ICIF entre 1,25 e 2, sendo seus efeitos classificados como indiferentes. Nenhuma das combinações avaliadas apresentou ICIF > 4, portanto, nenhum efeito antagonista foi observado.

Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima dos fármacos da biblioteca candidatos ao reposicionamento isolados e combinados com FLZ frente a *C. neoformans* ATCC H99 e o índice da concentração inibitória fracionada.

Combinação	CIM dos fármacos isolados		CIM dos fármacos combinados		ICIF	Redução da CIM do FLZ
	FLZ (µg/mL)	FBCR (µM)	FLZ	FBCR		
FLZ + AMP	4	>100	4	>100	2	2x
FLZ + ALB	4	1,560	1	1,560	1,5	4x
FLZ + AMI	4	>100	2	100	1,5	2x
FLZ + BIL	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + CET	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + CID	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + CIN	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + CIC	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + DOM	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + DUL	4	>100	2	100	1,5	2x
FLZ + FEM	4	0,047	1	0,047	1,25	4x
FLZ + FIN	4	>100	2	50	1	2x
FLZ + FLU	4	3,125	1	3,12	1,25	4x
FLZ + HID	4	>100	2	50	1	2x

FLZ + IND	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + LOR	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + LOS	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + MEB	4	0,780	1	0,780	1,25	4x
FLZ + MIN	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + NTZ	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + NOR	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + ODT	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + PAR	4	>100	2	50	1	SR
FLZ + RAN	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + SIB	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + SIL	4	>100	4	>100	2	SR
FLZ + TAD	4	>100	4	>100	2	SR

Nota – Valores de CIM representativos de três experimentos independentes. CIM: Concentração Inibitória Mínima; FBCR: Fármaco da Biblioteca Candidato ao Reposicionamento. ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada. SR: Sem redução. X: vezes. Em negrito estão as combinações que reduziram a CIM do FLZ. As combinações consideradas sinérgicas foram aquelas com ICIF $\leq 0,5$, aditiva quando ICIF foram $> 0,5$ e $\leq 1,0$, indiferente quando ICIF > 1 e ≤ 4 e antagonista com ICIF $> 4,0$ (ODDS, 2003; MOR *et al.*; TRUONG *et al.*, 2018). Fonte: próprio autor (2022).

6.2.1 Efeitos combinatórios da finasterida e hidroxizina com fluconazol pelos modelos de Loewe, Bliss, HSA e ZIP

A associação de fármacos é uma estratégia de reposicionamento que pode melhorar o desempenho nas novas indicações terapêuticas, funcionando como terapias adjuvantes aos tratamentos preconizados. Nesse sentido, ferramentas computacionais como o *SynergyFinder* podem facilitar a avaliação de terapias combinadas, estabelecendo pontuações em resultados de ensaios *in vitro* das combinações, com base nas doses dos fármacos e nos efeitos

fenotípicos observados, como a porcentagem de inibição do crescimento ou viabilidade celular (IANEVSKI *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2021).

Os modelos de referência de Bliss (BLISS, 1939), Loewe (LOEWE, 1953), HSA (BERENBAUM, 1989) e ZIP (YADAV *et al.*, 2015) permitem avaliar a interação entre fármacos e classificá-las como sinérgica, aditiva ou antagônica, dependendo do quanto a resposta observada em combinação difere da resposta esperada, pois cada um desses modelos leva em consideração uma hipótese nula com nenhuma interação entre os fármacos (TANG *et al.*, 2015). Assim, qualquer efeito maior do que esperado é classificado como sinérgico ou aditivo, e os menores classificados como antagônicos (LEDERER *et al.*, 2019; SINZGER *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2015).

Os resultados das pontuações de sinergismo com os modelos de referência são descritos na Tabela 4 para as combinações FLZ+FIN, FLZ+HID e FLZ+PAR e frente a *C. neoformans* ATCC H99.

Tabela 4 – Pontuações de sinergismo pelos modelos Bliss, Loewe, HSA e ZIP para as combinações fluconazol + finasterida (FLZ + FIN), fluconazol + hidroxizina (FLZ + HID), fluconazol + paroxetina (FLZ + PAR)

Combinação	Modelos			
	Bliss	Loewe	HSA	ZIP
FLZ+FIN	4,40	9,66	5,30	4,91
FLZ+HID	11,76	-15,46	10,61	11,89
FLZ+PAR	-3,70	-5,61	-3,83	-1,33

Nota – Resultados representativos de três experimentos independentes. Pontuações de sinergismo obtidas no aplicativo *SynergyFinder* (<https://synergyfinder.org/>). FLZ + FIN: fluconazol 2 µg/mL + finasterida 50 µM; FLZ + HID: fluconazol 2 µg/mL + hidroxizina 50 µM; FLZ + PAR: fluconazol 2 µg/mL + paroxetina 50 µM. Pontuações inferiores a -10 descrevem efeitos antagônicos, entre -10 e +10 as interações dos fármacos provavelmente é aditiva e as pontuações superiores a +10 descrevem interações sinérgicas

O modelo de Bliss ou independência de Bliss adota a perspectiva de que as respostas das combinações dos fármacos são decorrentes de ações independentes e a resposta esperada é calculada como a soma das respostas individuais de cada fármaco. Pressupõe-se que os efeitos combinatórios são os resultados das interações de cada fármaco com diferentes alvos em um sistema biológico. Combinações com respostas maiores ou menores do que a esperada podem ser interpretadas como um desvio da independência probabilística, o que implica, portanto, em possível interação entre os dois fármacos (BAEDER *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2015).

O modelo de Loewe ou aditividade de Loewe, baseia-se na suposição de que os fármacos de uma combinação produzem o mesmo efeito farmacológico através do mesmo mecanismo de ação (LEDERER *et al.*, 2018). Nesse modelo considera-se que cada fármaco contribui para o efeito global da combinação na proporção da sua concentração, ou seja, é capaz de definir o ponto em que a combinação pode fornecer benefício adicional em relação ao simples aumento da dose de qualquer um dos fármacos avaliados (LEDERER *et al.*, 2019; RUSS; KISHONY, 2018; TANG *et al.*, 2015).

O modelo HSA (*Highest Single Agent* - modelo de agente único mais alto) assume nulidade considerando que as respostas esperadas para as combinações são iguais aos maiores efeitos dos fármacos individuais (YADAV *et al.*, 2015). Combinações sinérgicas ou aditivas são observadas com desvio dessa hipótese, ou seja, as combinações dos fármacos devem

produzir benefícios adicionais do que esses fármacos podem alcançar isoladamente. Logo, qualquer resposta adicional em relação aos fármacos isolados pode ser considerada como sinérgica ou aditiva (TANG *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2021).

O modelo ZIP (*Zero Interaction Potency* - potência de interação zero) apresenta aspectos dos modelos Loewe e Bliss, no entanto, assume que dois fármacos não interagem quando suas curvas de dose-resposta sofrem alterações mínimas. Assim, desvios na potência observados nas curvas de dose-resposta entre fármacos combinados sugerem interações sinérgicas ou aditivas (TORRES *et al.*, 2018; YADAV *et al.*, 2015).

Na tabela 4 observa-se que as pontuações obtidas nos modelos Bliss, HSA e ZIP são características de combinações com efeitos aditivos e sinérgicos. Na combinação FLZ+FIN os modelos de Bliss (4,40), Loewe (9,66), HSA (5,30) e ZIP (4,91) apresentaram resultados próximos, indicando possíveis efeitos aditivos. A combinação FLZ+HID apresentou pontuações superiores a +10 para os modelos de Bliss (11,76), HSA (10,61) e ZIP (11,89), resultados que sugerem a ocorrência de interação sinérgica entre os fármacos. Para essa combinação foi observado no modelo de Loewe uma pontuação de -15,46 com possíveis efeitos antagônicos. O modelo Loewe pode não ser adequado para a combinação FLZ+HID, pois é realizado sem a premissa de ação independente dos fármacos, ou seja, assume que eles produzem o mesmo efeito farmacológico através do mesmo mecanismo de ação. Para a combinação FLZ+PAR foram observadas nos modelos de Bliss (-3,70), Loewe (-5,61), HSA (-3,83) e ZIP (-1,33) pontuações que sugerem efeitos aditivos, assim como o ICIF.

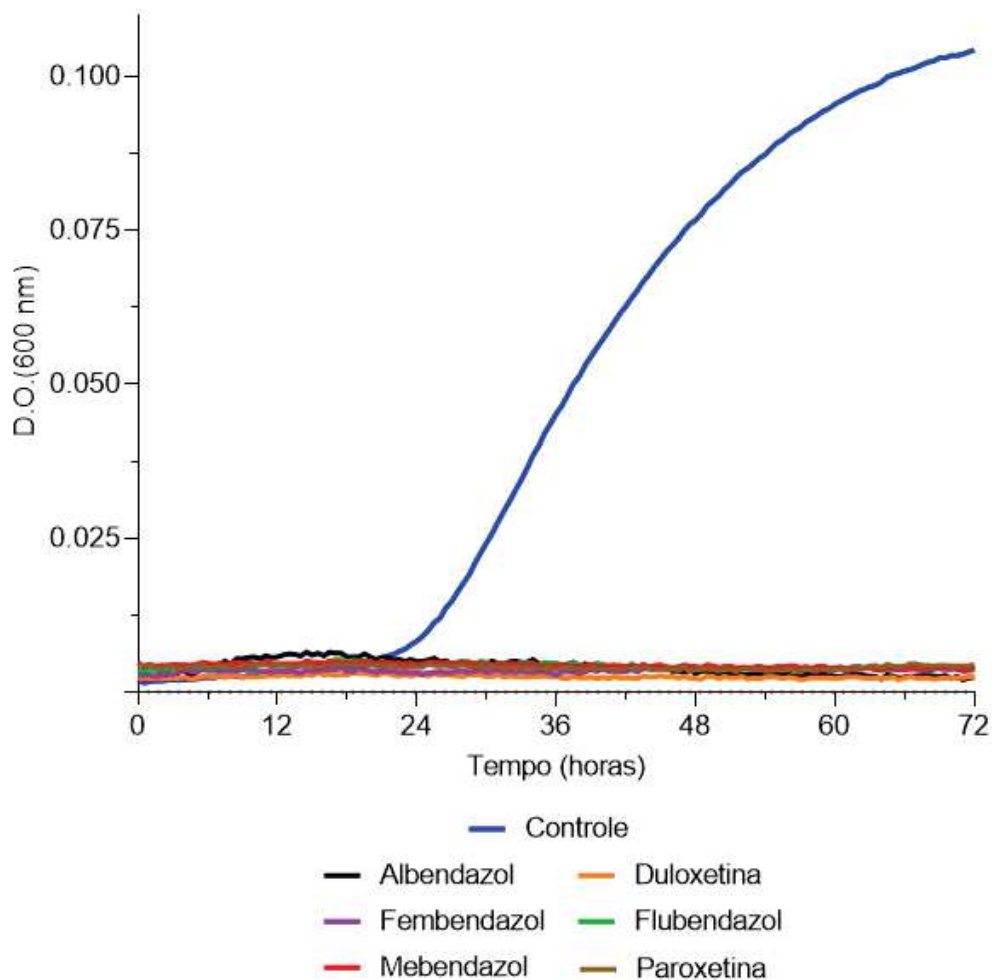
Essas estratégias de quantificação dos efeitos combinatórios podem ser usadas como abordagens exploratórias e fenomenológicas, com o objetivo principal de identificar possíveis combinações sinérgicas, aditivas ou antagônicas que justifiquem uma investigação mecanística aprofundada. Nesse sentido, combinações FLZ+FIN, FLZ+HID e FLZ+PAR encorajam investigações futuras relacionados aos impactos fenótipos desses fármacos isolados e em combinação frente a linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* para elucidação dos seus mecanismos de ação.

6.3 Curva de morte

A curva de morte foi determinada por meio da DO para os fármacos isolados, e por plaqueamento para as combinações com FLZ. Na Figura 10 estão apresentados os resultados para as curvas de morte das células de *C. neoformans* ATCC H99 tratadas com a CIM dos

fármacos albendazol, duloxetine, fembendazol, flubendazol, mebendazol e paroxetina determinadas por DO. Observa-se baixo ou nenhum incremento na DO a 600 nm para os tratamentos, enquanto é possível identificar facilmente o aumento da DO para o grupo controle. As curvas reforçam o entendimento de que esses fármacos exercem efeitos fungicidas nas células de *C. neoformans* ATCC H99 como mostrado no ensaio de determinação da CFM.

Figura 10 – Curvas de morte de *C. neoformans* ATCC H99 sob tratamento com a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos albendazol, duloxetine, fembendazol, flubendazol, mebendazol e paroxetina determinadas por densidade óptica



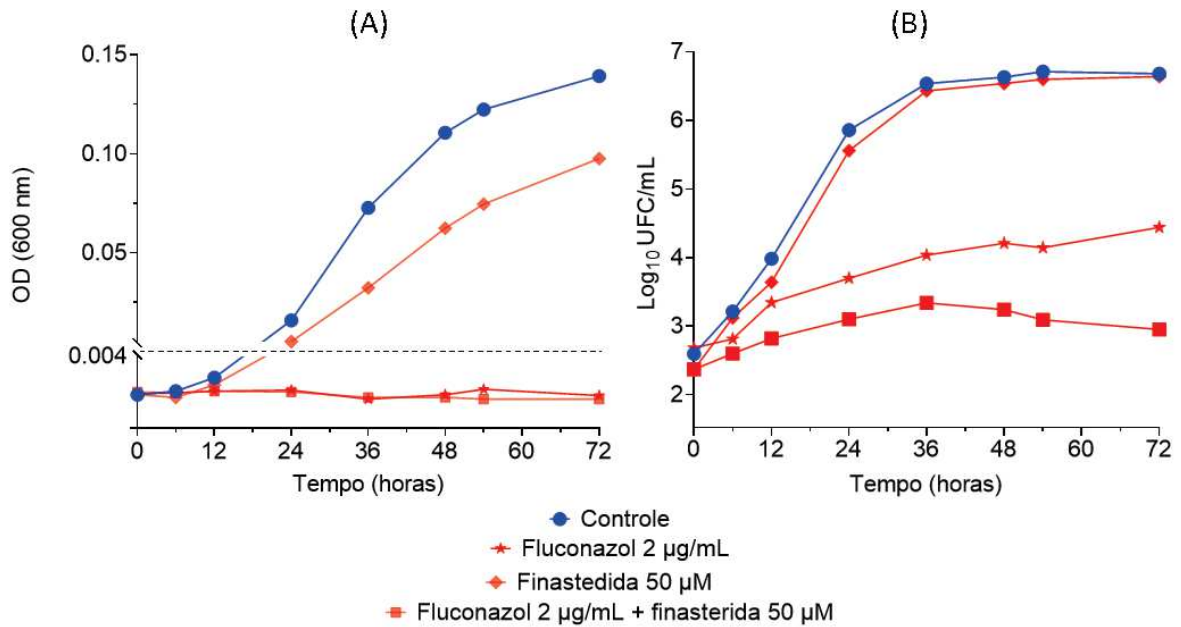
Nota – As curvas de morte foram determinadas com a CIM dos fármacos albendazol (1,56 μM), duloxetine (100 μM), fembendazol (0,047 μM), flubendazol (3,13 μM), mebendazol (0,78 μM) e paroxetina (100 μM). D.O: Densidade Óptica; nm: nanômetro; CIM: Concentração Inibitória Mínima. Os dados representam o valor médio de triplicatas realizadas em três experimentos independentes. Fonte: próprio autor (2022).

Para todas as combinações foram observadas nas curvas de morte reduções significativas do crescimento de *C. neoformans* ATCC H99. Esses impactos no crescimento fúngico foram observados após 12 horas de exposição, momento onde ocorre o início da fase de crescimento exponencial, não observado nas células tratadas. Dessa maneira, em todos os tempos subsequentes de exposição aos tratamentos foi evidente a inibição do crescimento de *C. neoformans* ATCC H99 para FLZ+FIN, FLZ+HID, FLZ+PAR e FLZ.

Após 72 horas as combinações FLZ+FIN (99,98%), FLZ+HID (99,99%) e FLZ+PAR (100%) apresentaram intensidade de morte fúngica discretamente superior ao FLZ (98,56%) isoladamente. Do mesmo modo, quando comparadas com os controles, neste mesmo intervalo de tempo, todas as combinações apresentaram também reduções acentuadas no crescimento de *C. neoformans* ATCC H99 (Figuras 11, 12 e 13).

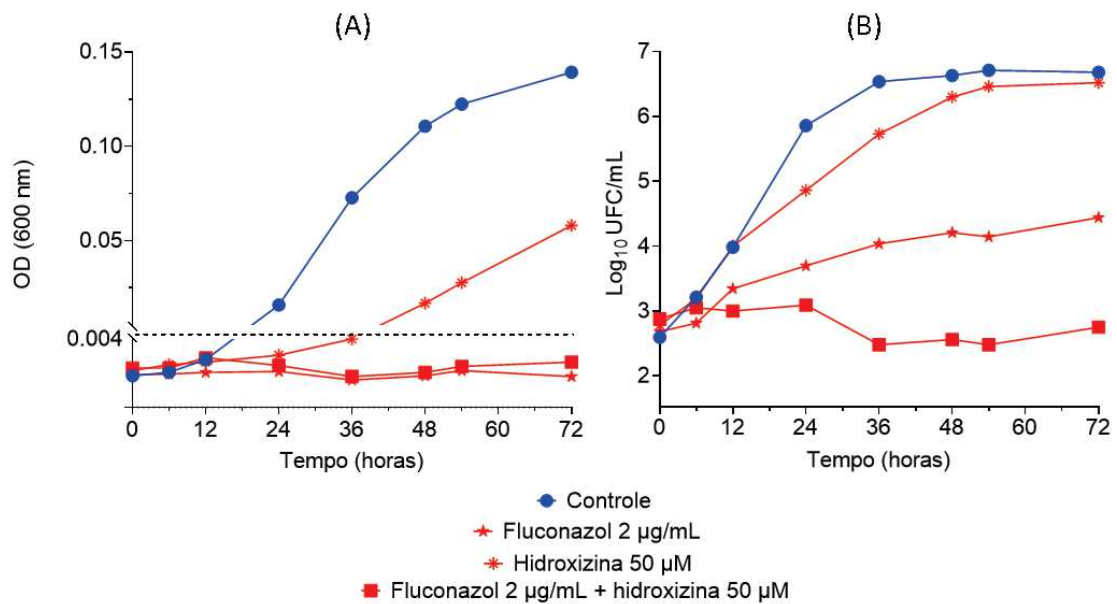
As diferenças em \log_{10} UFC/mL das combinações FLZ+FIN, FLZ+HID e o controle, após 72 horas, foram de 4,07 e 4,24 \log_{10} UFC/mL, respectivamente (Figura 11B, 12B). A combinação FLZ+PAR (Figura 13) apresentou efeito fungicida após 48 horas, onde nenhuma UFC/mL foi observada. Já as diferenças em \log_{10} UFC/mL do FLZ isolado para combinações FLZ+FIN foi de 1,45 \log_{10} UFC/mL e para FLZ+HID de 1,69 \log_{10} UFC/mL. Os fármacos FIN, HID e PAR isoladamente a 50 μ M não apresentaram reduções consideráveis no crescimento de *C. neoformans* ATCC H99.

Figura 11 – Curva de morte (A e B) para *C. neoformans* ATCC H99 sob tratamento com fluconazol + finasterida



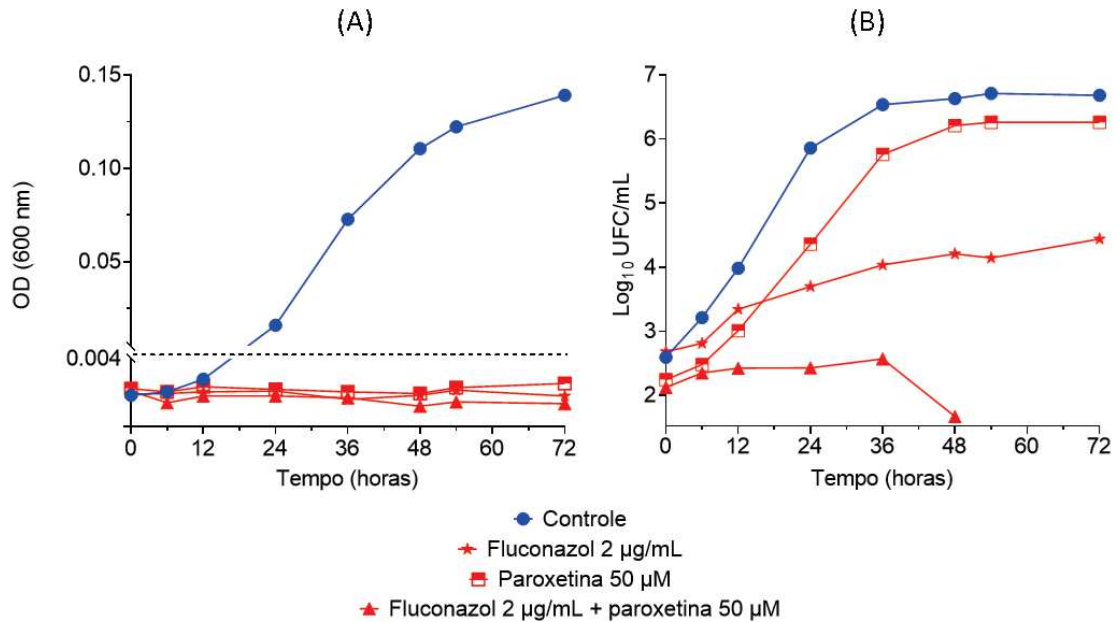
Nota – Curva de morte (A: representado em DO a 600 nm) (B: representado em Log₁₀UFC/mL) para *C. neoformans* ATCC H99 sob tratamento com fluconazol (2 µg/mL) + finasterida (50 µM). O incremento na DO é proporcional ao aumento da população fúngica. Controle: células fúngicas não tratadas cultivadas em meio RPMI-1640 livre de fármacos. DO: Densidade Óptica. UFC/mL: Unidades formadoras de colônias por mililitro. CIM: Concentração Inibitória Mínima. Os dados representam o valor médio de triplicatas realizadas em três experimentos independentes. Fonte: próprio autor (2022).

Figura 12 – Curva de morte (A e B) e curva de crescimento (C) para *C. neoformans* ATCC H99 sob tratamento com fluconazol + hidroxizina



Nota – Curva de morte (A: representado em DO a 600 nm) (B: representado em Log₁₀UFC/mL) para *C. neoformans* ATCC H99 sob tratamento com fluconazol (2 µg/mL) + hidroxizina (50µM). Curva de crescimento (C: representado em DO a 600 nm) para *C. neoformans* ATCC H99 sob tratamento com fluconazol (2 µg/mL) + hidroxizina (50 µM). O incremento na DO é proporcional ao aumento da população fúngica. Controle: células fúngicas não tratadas cultivadas em meio RPMI-1640 livre de fármacos. DO: Densidade Óptica. UFC/mL: Unidades formadoras de colônias por mililitro. CIM: Concentração Inibitória Mínima. Os dados representam o valor médio de triplicatas realizadas em três experimentos independentes Fonte: próprio autor (2022).

Figura 13 – Curva de morte (A e B) e curva de crescimento (C) para *C. neoformans* ATCC H99 sob tratamento com fluconazol + paroxetina



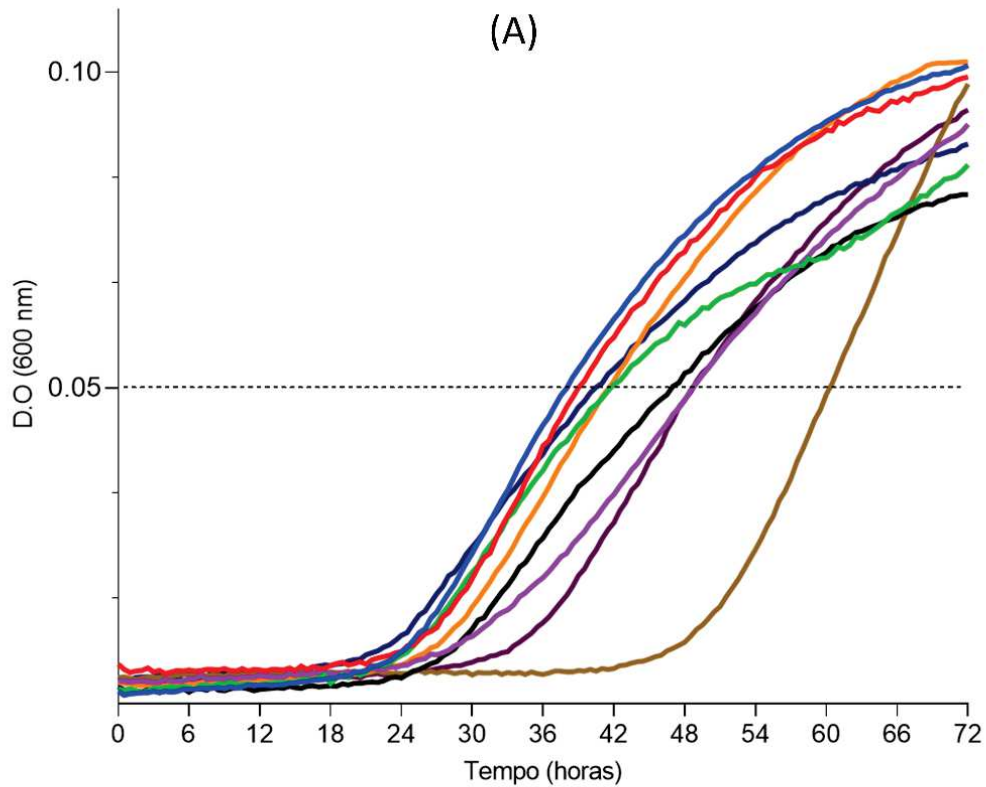
Nota – Curva de morte (A: representado em DO a 600 nm) (B: representado em Log₁₀UFC/mL) para *C. neoformans* ATCC H99 sob tratamento com fluconazol (2 µg/mL) + paroxetina (50µM). Curva de crescimento (C: representado em DO a 600 nm) para *C. neoformans* ATCC H99 sob tratamento com fluconazol (2 µg/mL) + paroxetina (50 µM). O incremento na DO é proporcional ao aumento da população fúngica. Controle: células fúngicas não tratadas cultivadas em meio RPMI-1640 livre de fármacos. DO: Densidade Óptica. UFC/mL: Unidades formadoras de colônias por mililitro. CIM: Concentração Inibitória Mínima. Os dados representam o valor médio de triplicatas realizadas em três experimentos independentes Fonte: próprio autor (2021).

6.5 Efeitos pós-antifúngico

O EPAF observado para os fármacos da biblioteca que apresentam atividade anticriptocócica na triagem inicial ficou entre 0,5 e 10,5 horas frente a *C. neoformans* ATCC H99 (Figura 14). As maiores atenuações do crescimento fúngico foram observadas para 100 μM de duloxetina e 100 μM de paroxetina, ambos com EPAF de 10,5 horas, e 3,125 μM de flubendazol com 8,5 horas. Em relação a 1,56 μM de albendazol e 0,047 μM de fenbendazol, o EPAF foi de 3,5 horas para ambos e para 0,78 μM de mebendazol o EPAF foi de 2 horas (Figura 14).

No que se refere ao EPAF dos fármacos combinados com FLZ, todas combinações avaliadas apresentaram resultados superiores ao tratamento com 2 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol isoladamente (figura 15). O maior EPAF foi observado para 50 μM de hidroxizina + 2 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol com 22,5 horas de atenuação do crescimento de *C. neoformans* ATCC H99, seguido de 50 μM de paroxetina + 2 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol com 14,5 horas e 50 μM de finasterida + 2 $\mu\text{g/mL}$ de fluconazol com 12 horas (Figura 15).

Figura 14 – Gráfico (A) e quadro (B) do efeito pós-antifúngico para os fármacos fluconazol, anfotericina B, albendazol, duloxetine, fembendazol, flubendazol, mebendazol e paroxetina frente a *C. neoformans* ATCC H99

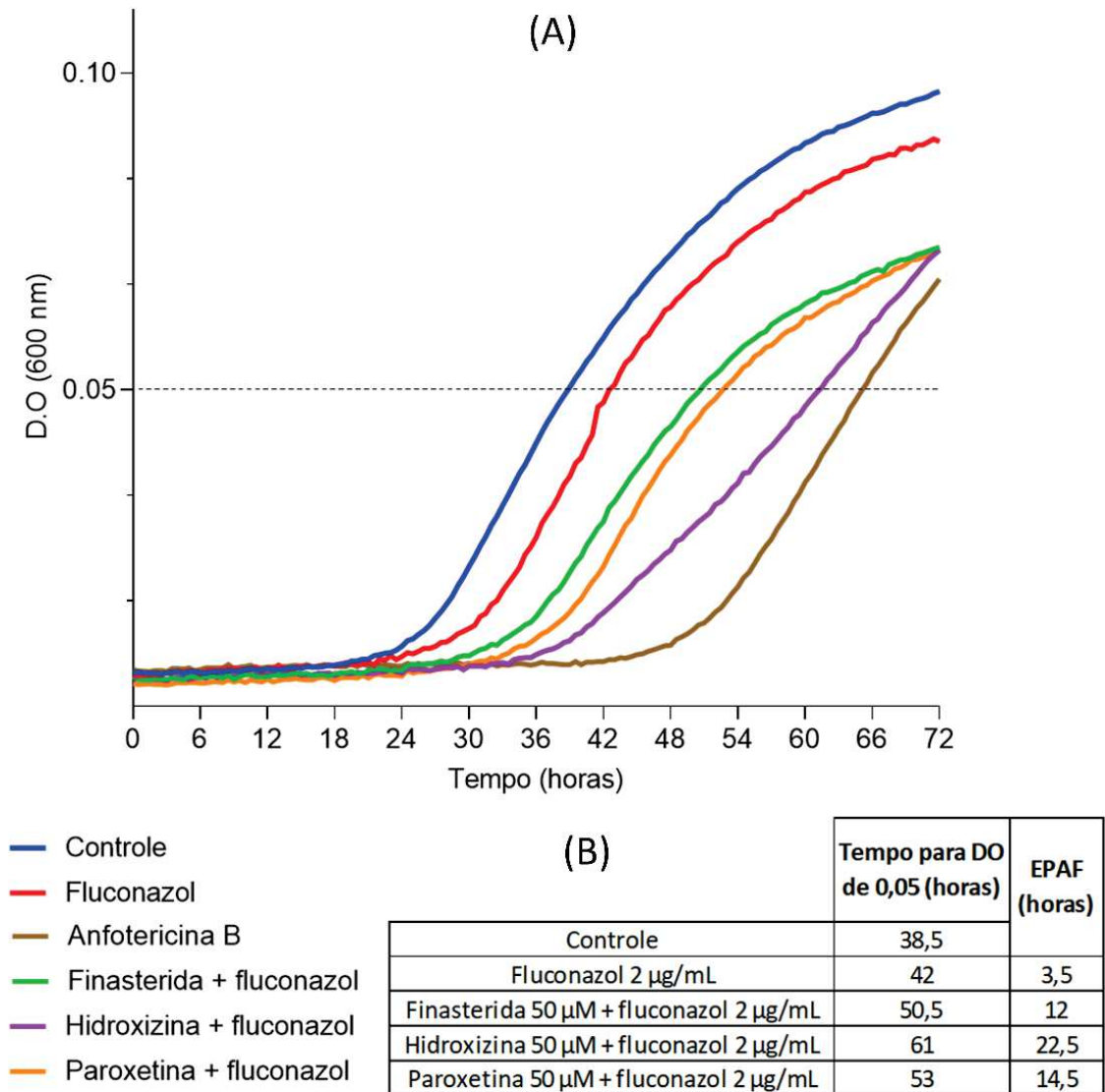


(B)

	Tempo para DO de 0,05 (horas)	EPAF (horas)
Controle	38,5	
Fluconazol 4 µg/mL	39	0,5
Anfotericina B 0,25 µM	60,5	22
Albendazol 1,56 µM	42	3,5
Duloxetine 100 µM	49	10,5
Fembendazol 0,047 µM	42	3,5
Flubendazol 3,125 µM	47	8,5
Mebendazol 0,78 µM	40,5	2
Paroxetina 100 µM	49	10,5

Nota – Efeito pós-antifúngico representado como a diferença no tempo (horas) necessário para atingir densidade óptica de 0,05 entre células não tratadas cultivadas em meio RPMI-1640 livre de fármacos, e, células fúngicas tratadas com a CIM dos fármacos albendazol (1,56 µM), duloxetine (100 µM), fembendazol (0,047 µM), flubendazol (3,13 µM), mebendazol (0,78 µM) e paroxetina (100 µM) durante curta exposição (1 hora). D.O.: Densidade Óptica CIM: Concentração Inibitória Mínima. Os dados representam o valor médio de triplicatas realizadas em três experimentos independentes. Fonte: próprio autor (2022).

Figura 15 – Gráfico (A) e quadro (B) do efeito pós-antifúngico (EPAF) para os tratamentos com fluconazol (FLZ), fluconazol + finasterida, fluconazol + hidroxizina, fluconazol + paroxetina frente a *C. neoformans* ATCC H99



Nota – EPAF representado como a diferença no tempo (horas) necessário para atingir densidade óptica de 0,05 entre células não tratadas cultivadas em meio RPMI-1640 livre de fármacos, e, células fúngicas tratadas com a CIM dos fármacos fluconazol 2 µg/ml, fluconazol 2 µg/mL + finasterida 50 µM fluconazol 2 µg/mL + hidroxizina 50 µM, fluconazol 2 µg/mL + paroxetina 50 µM durante curta exposição (1 hora). D.O: Densidade Óptica CIM: Concentração Inibitória Mínima. Os dados representam o valor médio de triplicatas realizadas em três experimentos independentes Fonte: próprio autor (2022).

A determinação *in vitro* do EPAF para os fármacos ALB, DUL, FLU, FEM, MEB, PAR e as combinações FIN + FLZ, HID + FLZ, PAR + FLZ ainda não foi descrita na literatura. Os resultados das Figura 14 e 15 demonstram EPAF relevante para todos os

fármacos avaliados frente a *C. neoformans* ATCC H99, com retardo do crescimento fúngico de até 10,5 horas após curto período de exposição, sugerindo que estes possuem atividade inibitória prolongada, mesmo quando o estresse provocado por eles é retirado em pouco tempo.

A determinação do EPAF para a CIM de FLZ (4 µg/mL) e AmB (0,25 µM) frente a *C. neoformans* ATCC H99 permitiu observar atenuação do crescimento fúngico de 0,5 e 22 horas, respectivamente (Figura 14). Ernst e colaboradores (2000) observaram que fármacos fungicidas como AmB têm EPAFs prolongados e dose-dependente, enquanto fármacos fungistáticos como o FLZ não apresentam EPAFs apreciáveis frente a isolados clínicos de *C. neoformans*.

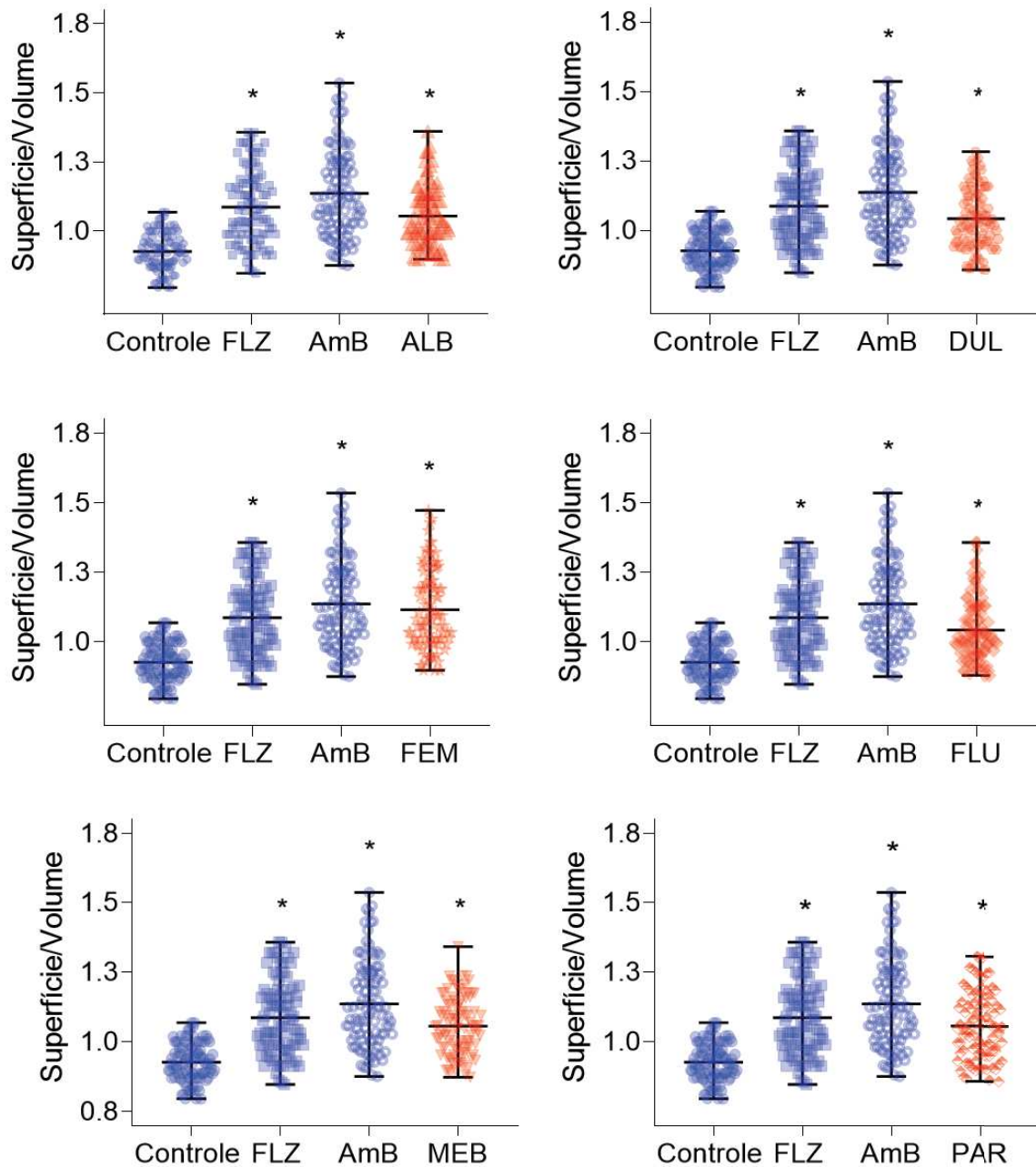
O EPAF é um fenômeno antimicrobiano relacionado à eficácia dos agentes antifúngicos e reflete a supressão persistente do crescimento fúngico após breve exposição. A capacidade de um antifúngico de induzir um EPAF é uma propriedade atraente, e pode ser clinicamente útil na determinação dos regimes de dosagem de um novo antimicrobiano. Esse fenômeno pode estar relacionado à recuperação lenta das atividades enzimáticas; alterações morfológicas, metabólicas e nos receptores celulares, mudanças no tempo de geração, variações na susceptibilidade à fagocitose e na aos fármacos antifúngicos após as re-exposições (ELLEPOLA *et al.*, 2015; PROMA, SHOURAV e CHOI, 2020).

6.6. Morfometria

A avaliação da morfometria das células de *C. neoformans* ATCC H99 foi realizada com concentrações subinibitórias de 0,5 da CIM. Todos os fármacos avaliados provocaram alterações na morfometria das células fúngicas com aumentos significativos da relação superfície volume (V/D), reduções do tamanho capsular em relação ao controle ($p < 0,05$), conforme observado nas Figuras 16 e 17.

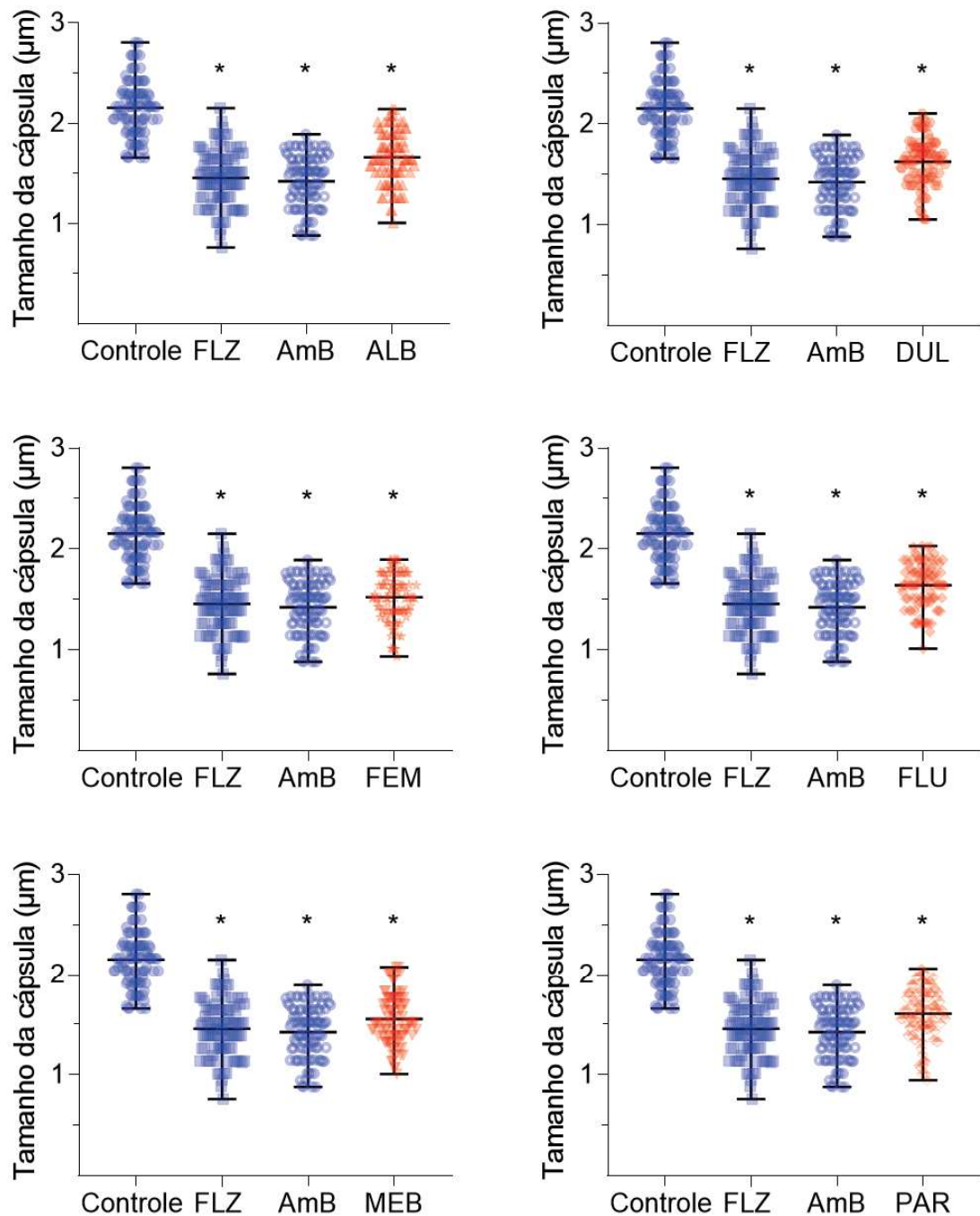
No que se refere aos impactos no tamanho da cápsula, todos os fármacos avaliados foram capazes de reduzir esse importante fator de virulência. As reduções de maior intensidade foram observadas para o FEM com 29,8% e MEB com 28,3% de redução (Figura 17). Para os fármacos ALB, FLU, DUL e PAR a redução do tamanho da cápsula de *C. neoformans* ATCC H99 foi de 23,3%, 24,2%, 24,9% e 25,8%, respectivamente. Os antifúngicos FLZ e AmB também reduziram significativamente o tamanho de cápsula nesse experimento, em 67,3% e 65,7%, respectivamente (Figura 17).

Figura 16 – Impactos sobre a relação superfície volume (S/V) de células de *C. neoformans* ATCC H99 após tratamento com contrações subinibitórias de fluconazol (FLZ), anfotericina B (AmB), albendazol (ALB), duloxetine (DUL), fembendazol (FEM), flubendazol (FLU), mebendazol (MEB) e paroxetina (PAR)



Nota – O impacto na relação superfície volume de *C. neoformans* ATCC H99 foi determinado com concentrações subinibitórias dos fármacos FLZ: fluconazol 2 μ g/mL, AmB: anfotericina B (0,13 μ M), ALB: albendazol 0,78 μ M, DUL: duloxetine 50 μ M, FEM: fembendazol 0,024 μ M, FLU: flubendazol 1,56 μ M, MEB: mebendazol 0,40 μ M, PAR: paroxetina 50 μ M.*: indicam significância estatística (P>0,05) quando comparadas ao grupo controle (sem tratamento) Fonte: próprio autor (2022).

Figura 17 – Impactos no tamanho da cápsula de *C. neoformans* ATCC H99 após tratamento com contrações subinibitórias de fluconazol (FLZ), anfotericina B (AmB), albendazol (ALB), duloxetine (DUL), fembendazol (FEM), flubendazol (FLU), mebendazol (MEB) e paroxetina (PAR)

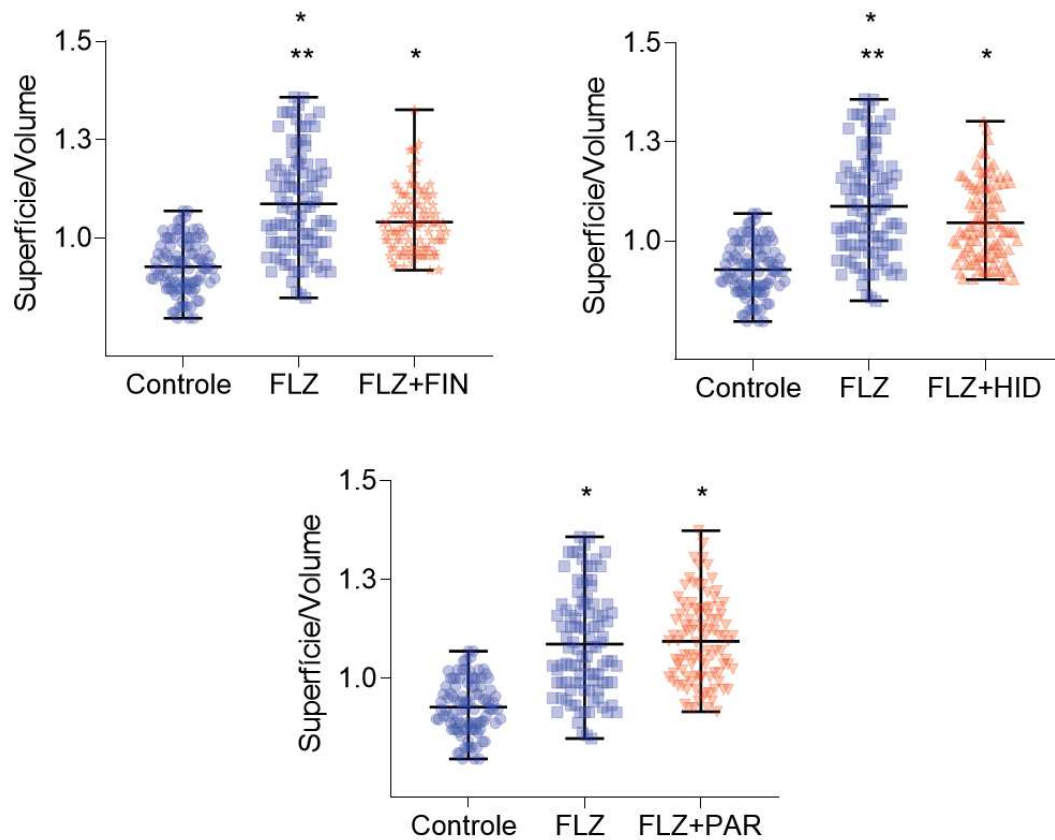


Nota – O impacto no tamanho da cápsula de *C. neoformans* ATCC H99 foi determinado com concentrações subinibitórias dos fármacos FLZ: fluconazol 2 µg/mL, AmB: anfotericina B (0,13 µM), ALB: albendazol 0,78 µM, DUL: duloxetine 50 µM, FEM: fembendazol 0,024 µM, FLU: flubendazol 1,56 µM, MEB: mebendazol 0,40 µM, PAR: paroxetina 50 µM. *: indicam significância estatística ($p > 0,05$) quando comparadas ao grupo controle (sem tratamento) Fonte: próprio autor (2022).

Do mesmo modo, foram observadas alterações morfométricas nas células de *C. neoformans* ATCC H99 tratadas com FLZ e com as combinações FLZ +FIN, FLZ+HID e FLZ+PAR, onde é possível destacar aumentos significativos da relação superfície volume ($p < 0,05$) quando comparado com controle sem tratamento (Figura 18). FLZ isoladamente apresentou discreto aumento da relação superfície volume ($p < 0,05$) quando comparado às combinações, com exceção da combinação FLZ+PAR na qual as reduções do tamanho celular não foram estatisticamente diferentes do FLZ quando avaliado de maneira isolada (Figura 19).

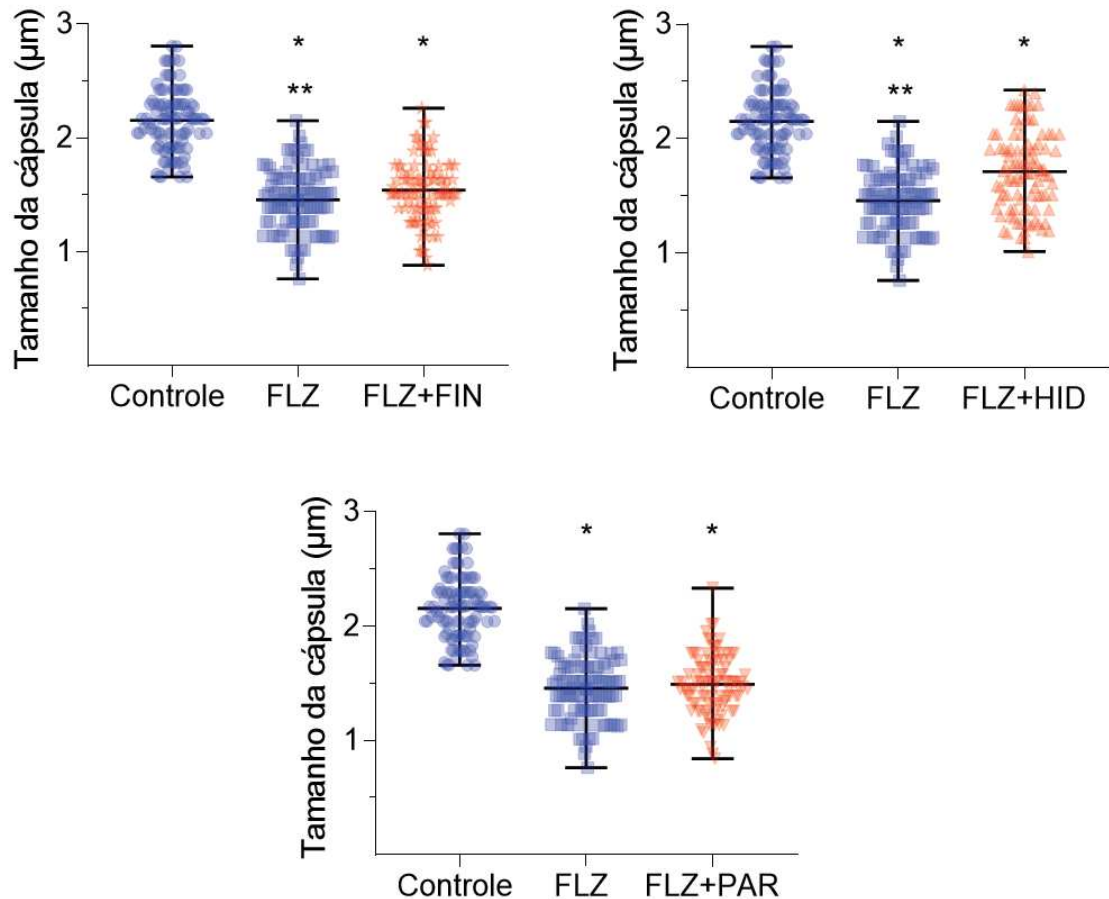
Também foi verificada redução no tamanho da cápsula das células de *C. neoformans* ATCC H99 tratadas com FLZ (32,70%) e com as combinações FLZ+FIN (28,82%), FLZ+HID (20,83%) e FLZ+PAR (31,13%) ($p < 0,05$), como pode ser observado na Figura 19. Quando avaliado isoladamente, FLZ apresentou redução das dimensões capsulares discretamente superiores às combinações ($p < 0,05$), com exceção da combinação FLZ+PAR que não apresentou diferença quando comparada com FLZ isolado (figura 19).

Figura 18 – Impactos sobre a relação superfície volume (S/V) de *C. neoformans* ATCC H99 após tratamento com concentrações subinibitórias de fluconazol (FLZ), fluconazol + finasterida (FLZ+FIN), fluconazol + hidroxizina (FLZ+HID), fluconazol + paroxetina (FLZ+PAR).



Nota – O impacto sobre a relação superfície volume de *C. neoformans* ATCC H99 foi determinado com concentrações subinibitórias dos fármacos FLZ: fluconazol 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, FLZ+FIN: fluconazol 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + finasterida 25 μM , FLZ+HID: fluconazol 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + hidroxizina 25 μM , FLZ+PAR: fluconazol 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + paroxetina 25 μM .*: indicam significância estatística ($p < 0,05$) quando comparadas ao grupo controle (sem tratamento).**: indicam significância estatística ($p < 0,05$) quando comparadas as combinações FLZ+FIN ou FLZ+HID. Fonte: próprio autor (2022).

Figura 19 – Impactos no tamanho capsular de *C. neoformans* ATCC H99 após tratamento com concentrações subinibitórias de fluconazol (FLZ), fluconazol + finasterida (FLZ+FIN), fluconazol + hidroxizina (FLZ+HID), fluconazol + paroxetina (FLZ+PAR)



Nota – O impacto no tamanho da cápsula de *C. neoformans* ATCC H99 foi determinado com concentrações subinibitórias dos fármacos FLZ: fluconazol 1 µg/mL, FLZ+FIN: fluconazol 1 µg/mL + finasterida 25 µM, FLZ+HID: fluconazol 1 µg/mL + hidroxizina 25 µM, FLZ+PAR: fluconazol 1 µg/mL + paroxetina 25 µM. µm: micrômetros.*: indicam significância estatística ($p < 0,05$) quando comparadas ao grupo controle (sem tratamento).**: indicam significância estatística ($p < 0,05$) quando comparadas as combinações FLZ+FIN ou FLZ+HID. Fonte: próprio autor (2022).

Recentemente, alguns trabalhos descreveram impactos na morfologia de *Cryptococcus* spp. com significativas reduções das dimensões celulares e capsulares, após tratamentos com concentrações subinibitórias dos antiparasitários ALB, FLU, FEM, MEB e dos antidepressivos PAR e DUL (JOFFE *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2021). Alguns desses resultados foram publicados durante a execução do presente trabalho, e corroboram com a possibilidade de reposicionamento desses fármacos, considerando a

atividade anticriptocócica e a atenuação de fatores de virulência como a cápsula das células de *C. neoformans* ATCC H99.

Como já mencionado anteriormente, as células de *Cryptococcus* spp., possuem uma cápsula polissacarídica crucial para a integridade e sobrevivência celular (CASADEVALL *et al.*, 2019). Acredita-se que a cápsula é um dos fatores de virulência de maior importância em *C. neoformans*, de modo que mutantes não encapsulados são praticamente avirulentos (CHANG *et al.*, 1994), células com cápsula mais espessa exibem resistência a AmB e maior virulência; (VECCHIARELLI *et al.*, 2013; ZARAGOZA *et al.*, 2019). Essa estrutura pode auxiliar na modulação das respostas imunes e conferir proteção contra o estresse oxidativo (CASADEVALL *et al.*, 2019; ZARAGOZA *et al.*, 2019).

Nesse sentido, fármacos que interferem na morfologia e integridade da cápsula de *Cryptococcus* spp. podem ser promissores no desenvolvimento de novas terapias anticriptocócicas. Algumas enzimas envolvidas na biossíntese da cápsula desses fungos, como xilosiltransferase e a lactonohidrolase, são alvos farmacológicos antivirulência promissores (KLUTTS *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2014; IYER *et al.*, 2021).

7 CONCLUSÕES

No presente estudo, foi criada uma biblioteca de fármacos que possibilitou confirmar o potencial dos antiparasitários benzimidazólicos ALB, FEM, FLU e MEB no reposicionamento como antifúngicos, com potente atividade fungicida *in vitro* frente às linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*. Também foi observada atividade dos fármacos DUL e PAR frente a diferentes linhagens de *Cryptococcus* spp.

Os efeitos combinatórios dos fármacos da biblioteca com FLZ revelou potencial efeito aditivo da FIN, PAR com reduções na CIM desses fármacos e do FLZ frente a *C. neoformans* ATCC H99. Também foi possível observar EPAF para a CIM dos fármacos ALB, DUL, FEM, FLU, MEB e PAR, bem como para as combinações FLZ+FIN, FLZ+HID e FLZ+PAR. Todos os fármacos que apresentam atividade anticriptocócica foram capazes de provocar alterações morfométricas significativas em *C. neoformans* ATCC H99, com redução das dimensões celulares e da cápsula desse fungo. O mesmo foi observado para as combinações FLZ+HID, FLZ+HID e FLZ+PAR.

Observa-se que os fármacos com EP podem ser promissores para o RF no tratamento da criptococose, uma doença que possui recursos terapêuticos escassos e uma necessidade de terapias eficazes. No entanto, são necessárias investigações mais aprofundadas dos impactos morfológicos, metabólicos e possíveis alvos farmacológicos em *Cryptococcus* spp.. para antiparasitários ALB, FLU, FEM, MEB e dos antidepressivos PAR e DUL e suas combinações com o FLZ, para consolidação de um promissor reposicionamento.

8 REFERÊNCIAS

ACHESON, E. S.; GALANIS, E.; BARTLETT, K.; MAK, S. et al. Searching for clues for eighteen years: deciphering the ecological determinants of *Cryptococcus gattii* on Vancouver Island, British Columbia. **Medical Mycology**, 56, n. 2, p. 129-144, 2018.

AGUIAR, P. A. D. F. d.; PEDROSO, R. D. S.; BORGES, A. S.; MOREIRA, T. d. A. 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**, 59, p. e13-e13, 2017.

AMARE, G. G.; MEHARIE, B. G.; BELAYNEH, Y. M. A drug repositioning success: The repositioned therapeutic applications and mechanisms of action of thalidomide. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**, 27, n. 3, p. 673-678, 2021. ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, 78, p. 55-58, 2015.

ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. **Current Biology**, 16, n. 21, p. 2161-2165, 2006.

ANDRADE, C. H.; NEVES, B. J.; MELO-FILHO, C. C.; RODRIGUES, J. et al. In Silico Chemogenomics Drug Repositioning Strategies for Neglected Tropical Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, 26, n. 23, p. 4355-4379, 2019.

ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, 3, n. 8, p. 673-683, 2004.

BAEDER, D. Y.; YU, G.; HOZÉ, N.; ROLFF, J. et al. Antimicrobial combinations: Bliss independence and Loewe additivity derived from mechanistic multi-hit models. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 371, n. 1695, p. 20150294, 2016.

BALLARD, C.; AARSLAND, D.; CUMMINGS, J.; O'BRIEN, J. et al. Drug repositioning and repurposing for Alzheimer disease. **Nature Reviews Neurology**, 16, n. 12, p. 661-673, 2020.

BERENBAUM, M. C. What is synergy? **Pharmacological Reviews**, 41, n. 2, p. 93, 1989.

BICANIC, T.; BOTTOMLEY, C.; LOYSE, A.; BROUWER, A. E. et al. Toxicity of Amphotericin B Deoxycholate-Based Induction Therapy in Patients with HIV-Associated Cryptococcal Meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 59, n. 12, p. 7224, 2015.

BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin**, 72, n. 1, p. 99-118, 2004.

BLISS, C. I. The toxicity of poisons applied jointly. **Annals of Applied Biology**, 26, n. 3, p. 585-615, 1939.

BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R. O.; DENNING, D. W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, 3, n. 4, p. 57, 2017.

BONGOMIN, F.; OLADELE, R. O.; GAGO, S.; MOORE, C. B. et al. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, 61, n. 5, p. 290-297, 2018

BRASIL, Ministério da saúde. Portaria nº298, de 21 de março de 2013. Atualiza os protocolos de uso da Talidomida no tratamento da Doença Enxerto Contra Hospedeiro e do Mieloma Múltiplo. Brasília, 2013. Disponível em <
https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0298_21_03_2013.html>

BRASIL. Ministério da saúde. **Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020**. Brasília, 2020. Disponível em <
<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-264-de-17-de-fevereiro-de-2020-244043656>>

BRASIL. Flucitosina para o tratamento de pacientes com meningite criptocócica e demais formas de neurocriptococose. Conitec. **Relatório de recomendação nº 64. 2021**, Brasília, 2021. Disponível em
<http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2021/20210602_Relatorio_614_flucitosina_Meningite_Criptococica_P_21.pdf>

BRILHANTE, R. S. N.; DA ROCHA, M. G.; DE OLIVEIRA, J. S.; ESPAÑA, J. D. A. et al. Proton pump inhibitors versus *Cryptococcus* species: effects on *in vitro* susceptibility and melanin production. **Future Microbiology**, 14, n. 6, p. 489-497, 2019.

BROUWER, A. E.; VAN KAN HENDRIKUS, J. M.; JOHNSON, E.; RAJANUWONG, A. et al. Oral versus intravenous flucytosine in patients with human immunodeficiency virus-associated cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 51, n. 3, p. 1038-1042, 2007.

BRÜGGEMANN, R. J. M.; ALFFENAAR, J.-W. C.; BLIJLEVENS, N. M. A.; BILLAUD, E. M. et al. Clinical relevance of the pharmacokinetic interactions of azole antifungal drugs with other coadministered agents. **Clinical Infectious Diseases**, 48, n. 10, p. 1441-1458, 2009.

BUTTS, A.; KOSELYN, K.; CHABRIER-ROSELLÓ, Y.; SEMIGHINI, C. P. et al. Estrogen receptor antagonists are anti-cryptococcal agents that directly bind EF hand proteins and synergize with fluconazole *in vivo*. **mBio**, 5, n. 1, p. e00765-00713, 2014.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, 133, p. 86-96, 2017.

CANO, E. J.; YETMAR, Z. A.; RAZONABLE, R. R. *Cryptococcus* Species Other Than *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: Are They Clinically Significant? **Open Forum Infectious Diseases**, 7, n. 12, 2020.

CAROLUS, H.; PIERSON, S.; LAGROU, K.; VAN DIJCK, P. Amphotericin B and other polyenes — discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, 6, n. 4, 2020.

- CASADEVALL, A.; COELHO, C.; CORDERO, R. J. B.; DRAGOTAKES, Q. et al. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, 10, n. 1, p. 822-831, 2019.
- CASTRO-LAINEZ, M. T.; DELIZ-AGUIRRE, R.; ANTUNEZ, D.; CRUZ-CODINA, M. et al. *Cryptococcus laurentii* meningitis in a non-HIV patient. **IDCases**, 18, p. e00612, 2019.
- CAVASSIN, F. B.; BAÚ-CARNEIRO, J. L.; VILAS-BOAS, R. R.; QUEIROZ-TELLES, F. Sixty years of Amphotericin B: an overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. **Infectious Diseases and Therapy**, 10, n. 1, p. 115-147, 2021.
- CHANG, C. C.; SORRELL, T. C.; CHEN, S. C. A. Pulmonary cryptococcosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, 36, n. 05, p. 681-691, 2015.
- CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; BRIGITTE, M. et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, 77, n. 1, p. 120-127, 2009.
- CHAVEZ-DOZAL, A. A.; LOWN, L.; JAHNG, M.; WALRAVEN, C. J. et al. *In vitro* analysis of finasteride activity against candida albicans urinary biofilm formation and filamentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 58, n. 10, p. 5855-5862, 2014.
- CHEN, S. C. A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, 27, n. 4, p. 980, 2014.
- CHENG, Y.-S.; WILLIAMSON, P. R.; ZHENG, W. Improving therapy of severe infections through drug repurposing of synergistic combinations. **Current Opinion in Pharmacology**, 48, p. 92-98, 2019.
- CHEONG, J. W. S.; MCCORMACK, J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? **Medical Mycology**, 51, n. 3, p. 261-269, 2013.
- CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; PRAKASH, A.; MEIS, J. F. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: An update. **Critical Reviews in Microbiology**, 38, n. 1, p. 1-16, 2012.
- CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, **CLSI document M27-A3**, Wayne, PA., 2008.
- COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The Intracellular Life of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 9, n. 1, p. 219-238, 2014.
- CROWE, T. P.; GREENLEE, M. H. W.; KANTHASAMY, A. G.; HSU, W. H. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. **Life Sciences**, 195, p. 44-52, 2018.
- CRUZ, M. C.; BARTLETT, M. S.; EDLIND, T. D. *In vitro* susceptibility of the opportunistic fungus *Cryptococcus neoformans* to anthelmintic benzimidazoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 38, n. 2, p. 378, 1994.

- CRUZ, M. C.; EDLIND, T. β -Tubulin genes and the basis for benzimidazole sensitivity of the opportunistic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, 143, n. 6, p. 2003-2008, 1997.
- DECOTE-RICARDO, D.; LAROCQUE-DE-FREITAS, I. F.; ROCHA, J. D. B.; NASCIMENTO, D. O. et al. Immunomodulatory Role of Capsular Polysaccharides constituents of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Medicine**, 6, p. 129, 2019.
- DESIMONE, R. W.; CURRIE, K. S.; MITCHELL, S. A.; DARROW, J. W. et al. Privileged Structures: applications in drug discovery. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, 7, n. 5, p. 473-493, 2004.
- DOLAN, K.; MONTGOMERY, S.; BUCHHEIT, B.; DIDONE, L. et al. Antifungal Activity of Tamoxifen: *in vitro* and *in vivo* activities and mechanistic characterization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 53, n. 8, p. 3337, 2009.
- DRAGOTAKES, Q.; FU, M. S.; CASADEVALL, A. Dragocytosis: Elucidation of the Mechanism for *Cryptococcus neoformans* Macrophage-to-Macrophage Transfer. **The Journal of Immunology**, p. j1801118, 2019.
- EBIED, A. M.; NA, J.; COOPER-DEHOFF, R. M. New Drug Approvals in 2018 - Another Record Year! **The American Journal of Medicine**, 132, n. 9, p. 1038-1043, 2019.
- ELLEPOLA, NA; CHANDY R, KHAN ZU. In vitro postantifungal effect, adhesion traits and haemolysin production of *Candida dubliniensis* isolates following exposure to 5-fluorocytosine. **Mycoses**, 58(9):536-43, 2015
- EMAMI, S.; TAVANGAR, P.; KEIGHOBADI, M. An overview of azoles targeting sterol 14 α -demethylase for antileishmanial therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 135, p. 241-259, 2017.
- ERNST, EJ; KLEPSE, ME; PFALLER, MA. Postantifungal effects of echinocandin, azole, and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother**. 44(4):1108-111, 2000.
- ESPINEL-INGROFF, A.; ALLER, A. I.; CANTON, E.; CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R. et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 56, n. 11, p. 5898-5906, 2012.
- FARHA, M. A.; BROWN, E. D. Drug repurposing for antimicrobial discovery. **Nature Microbiology**, 4, n. 4, p. 565-577, 2019.
- FDA. The Drug Development Process. **U.S. Food and Drug Administration (FDA)**. 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>. Acesso em: 03 de ago 2020.
- FERREIRA, G. F.; BALTAZAR, L. d. M.; SANTOS, J. R. A.; MONTEIRO, A. S. et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the

fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 68, n. 8, p. 1801-1811, 2013.

FIRACATIVE, C.; LIZARAZO, J.; ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M. T.; CASTAÑEDA, E. et al. The status of cryptococcosis in Latin America. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 113, n. 7, p. e170554-e170554, 2018.

FORSYTHE, A.; VOGAN, A.; XU, J. Genetic and environmental influences on the germination of basidiospores in the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Scientific Reports**, 6, n. 1, p. 33828, 2016.

GARON, S. L.; PAVLOS, R. K.; WHITE, K. D.; BROWN, N. J. et al. Pharmacogenomics of off-target adverse drug reactions. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 83, n. 9, p. 1896-1911, 2017.

GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. **Antifungal Therapy**. Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press, 2019.p.55-65.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L. C.; MILLINGTON, M. A. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, 59, n. 3, p. 145-150, 2016.

GILES, S. S.; DAGENAIS, T. R. T.; BOTTS, M. R.; KELLER, N. P. et al. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, 77, n. 8, p. 3491, 2009.

GIROIS, S. B.; CHAPUIS, F.; DECULLIER, E.; REVOL, B. G. P. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: **Review and meta-analysis**. 24, p. 119-130, 2005.

GIROIS, S. B.; CHAPUIS, F.; DECULLIER, E.; REVOL, B. G. P. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 25, n. 2, p. 138, 2006.

GRELA, E.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B.; CYTRYNSKA, M. et al. Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against *Candida albicans*. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 17029, 2019.

GUIRAO-ABAD, J. P.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R.; ALBURQUERQUE, B.; HERNÁNDEZ, J. A. et al. ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*. **International Journal of Medical Microbiology**, 307, n. 4, p. 241-248, 2017.

HAI, T. P.; VAN, A. D.; NGAN, N. T. T.; NHAT, L. T. H. et al. The combination of tamoxifen with amphotericin B, but not with fluconazole, has synergistic activity against the majority of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**, 62, n. 9, p. 818-825, 2019.

HAMILL, R. J. Amphotericin B Formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, 73, n. 9, p. 919-934, 2013.

- HARDIN, T. C.; NAJVAR, L. K.; RIZZO, J.; FOTHERGILL, A. W. et al. Discrepancy between *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of albendazole. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, 35, p. 153-158, 1997.
- HARRIS, B. E.; MANNING, B. W.; FEDERLE, T. W.; DIASIO, R. B. Conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil by human intestinal microflora. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 29, n. 1, p. 44-48, 1986.
- HEITMAN, J.; CARTER, D. A.; DYER, P. S.; SOLL, D. R. Sexual reproduction of human fungal pathogens. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 4, n. 8, 2014.
- HERKERT, P. F.; HAGEN, F.; PINHEIRO, R. L.; MURO, M. D. et al. Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in developing Countries. **Journal of fungi**, 3, n. 4, p. 62, 2017.
- HESSLER, G.; BARINGHAUS, K.-H. Artificial Intelligence in Drug Design. **Molecules**, 23, n. 10, 2018.
- HOEHAMER, C. F.; CUMMINGS, E. D.; HILLIARD, G. M.; ROGERS, D. P. Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54, n. 5, p. 1655-1664, 2010.
- HUANG, Y.; FURUNO, M.; ARAKAWA, T.; TAKIZAWA, S. et al. A framework for identification of on- and off-target transcriptional responses to drug treatment. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 17603, 2019.
- HUGHES, J. P.; REES, S.; KALINDJIAN, S. B.; PHILPOTT, K. L. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011.
- HWANG, T. J.; CARPENTER, D.; LAUFFENBURGER, J. C.; WANG, B. et al. Failure of Investigational Drugs in Late-Stage Clinical Development and Publication of Trial Results. **JAMA Internal Medicine**, 176, n. 12, p. 1826-1833, 2016.
- IANEVSKI, A.; HE, L.; AITOKALLIO, T.; TANG, J. SynergyFinder: a web application for analyzing drug combination dose–response matrix data. **Bioinformatics**, 33, n. 15, p. 2413-2415, 2017.
- IYER, K. R.; REVIE, N. M.; FU, C.; ROBBINS, N. et al. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature Reviews Microbiology**, 19, n. 7, p. 454-466, 2021.
- JOFFE, L. S.; SCHNEIDER, R.; LOPES, W.; AZEVEDO, R. et al. The Anti-helminthic Compound Mebendazole Has Multiple Antifungal Effects against *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Microbiology**, 8, p. 535, 2017.
- JOURDAN, J.-P.; BUREAU, R.; ROCHAIS, C.; DALLEMAGNE, P. Drug repositioning: a brief overview. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 72, n. 9, p. 1145-1151, 2020.
- JONG, A.; WU, C.-H.; SHACKLEFORD, G. M.; KWON-CHUNG, K. J. et al. Involvement of human CD44 during *Cryptococcus neoformans* infection of brain microvascular endothelial cells. **Cellular Microbiology**, 10, n. 6, p. 1313-1326, 2008.

- KALARIA, P. N.; KARAD, S. C.; RAVAL, D. K. A review on diverse heterocyclic compounds as the privileged scaffolds in antimalarial drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 158, p. 917-936, 2018.
- KAMIŃSKI, D. M. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. **European Biophysics Journal**, 43, n. 10, p. 453-467, 2014.
- KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 13.ed ed. Porto Alegre: McGraw Hill Brasil, 2017, p.1-22.
- KIM, W.; KRAUSE, K.; ZIMMERMAN, Z.; OUTTERSON, K. Improving data sharing to increase the efficiency of antibiotic R&D. **Nature Reviews Drug Discovery**, 20, n. 1, p. 1-2, 2021.
- KNEALE, M.; BARTHOLOMEW, J. S.; DAVIES, E.; DENNING, D. W. Global access to antifungal therapy and its variable cost. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 71, n. 12, p. 3599-3606, 2016.
- KON, A. S.; GRUMACH, A. S.; COLOMBO, A. L.; PENALVA, A. C. O. et al. Consenso em criptococose - 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 41, n. 5, p. 524-544, 2008.
- KOZUBOWSKI, L.; HEITMAN, J. Profiling a killer, the development of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Microbiology Reviews**, 36, n. 1, p. 78-94, 2012.
- KUENZI, B. M.; REMSING RIX, L. L.; KINOSE, F.; KROEGER, J. L. et al. Off-target based drug repurposing opportunities for tivantinib in acute myeloid leukemia. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 606, 2019.
- KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier Science, 2011.
- KWON-CHUNG, K. J.; FRASER, J. A.; DOERING, T. L.; WANG, Z. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 4, n. 7, p. a019760-a019760, 2014.
- LEDERER, S.; DIJKSTRA, T. M. H.; HESKES, T. Additive dose response models: explicit formulation and the Loewe additivity consistency condition. **Frontiers in Pharmacology**, 9, p. 31, 2018.
- LEDERER, S.; DIJKSTRA, T. M. H.; HESKES, T. Additive dose response models: defining synergy. **Frontiers in Pharmacology**, 10, p. 1384, 2019.
- LEITE, A. C. L.; ESPÍNDOLA, J. W. P.; CARDOSO, M. V. d. O.; FILHO, G. B. d. O. Privileged structures in the design of potential drug candidates for neglected diseases. **Current Medicinal Chemistry**, 26, n. 23, p. 4323-4354, 2019.
- LI, Y.; HUANG, X.; QIN, Y.; WU, H. et al. What is the most appropriate induction regimen for the treatment of hiv-associated cryptococcal meningitis when the recommended regimen is

not available? Evidence from a network meta-Analysis. **Frontiers in Pharmacology**, 11, p. 963, 2020.

LINDENBERG, A. D. S. C.; CHANG, M. R.; PANIAGO, A. M. M.; LAZÉRA, M. D. S. et al. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 50, p. 75-78, 2008.

LITVINTSEVA, A. P.; CARBONE, I.; ROSSOUW, J.; THAKUR, R. et al. Evidence that the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* may have evolved in Africa. **PLOS ONE**, 6, n. 5, p. e19688, 2011.

LIU, T.-B.; KIM, J.-C.; WANG, Y.; TOFFALETTI, D. L. et al. Brain inositol is a novel stimulator for promoting *Cryptococcus* Penetration of the blood-brain-barrier. **PLOS Pathogens**, 9, n. 4, p. e1003247, 2013.

LIU, T. T.; LEE, R. E. B.; BARKER, K. S.; LEE, R. E. et al. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49, n. 6, p. 2226-2236, 2005.

LOEWE, S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. **Arzneimittel-Forschung**, 3, n. 6, p. 285-290, 1953.

LORUSSO, P. M.; BOERNER, S. A.; SEYMOUR, L. An overview of the optimal planning, design, and conduct of phase i studies of new therapeutics. **Clinical Cancer Research**, 16, n. 6, p. 1710, 2010.

LOW, Z. Y.; FAROUK, I. A.; LAL, S. K. Drug repositioning: new approaches and future prospects for life-debilitating diseases and the covid-19 pandemic outbreak. **Viruses**, 12, n. 9, 2020.

LOYSE, A.; DROMER, F.; DAY, J.; LORTHOLARY, O. et al. Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 68, n. 11, p. 2435-2444, 2013.

MAGALHÃES, T. F. F.; COSTA, M. C.; HOLANDA, R. A.; FERREIRA, G. F. et al. N-acetylcysteine reduces amphotericin B deoxycholate nephrotoxicity and improves the outcome of murine cryptococcosis. **Medical Mycology**, 58, n. 6, p. 835-844, 2020.

MAGDITCH, D. A.; LIU, T.-B.; XUE, C.; IDNURM, A. DNA Mutations mediate microevolution between host-adapted forms of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **PLOS Pathogens**, 8, n. 10, p. e1002936, 2012.

MALIGIE, M. A.; SELITRENNIKOFF, C. P. *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3) β -glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49, n. 7, p. 2851-2856, 2005.

MAY, R. C.; STONE, N. R. H.; WIESNER, D. L.; BICANIC, T. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, 14, n. 2, p. 106-117, 2016.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, 30, n. 1, p. 179-206, 2016.

Menezes, Raquel Teles. **Efeito do cloridrato de duloxetina frente a *Cryptococcus neoformans*: abordagem *in vitro* e *in vivo***. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal). Pós-graduação em Biopatologia Bucal. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

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

MILEFCHIK, E.; ANN LEAL, M.; HAUBRICH, R.; BOZZETTE, S. A. et al. Fluconazole alone or combined with flucytosine for the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. **Medical Mycology**, 46, n. 4, p. 393-395, 2008.

MINNECI, P. C.; DEANS, K. J. Clinical trials. **Seminars in Pediatric Surgery**, 27, n. 6, p. 332-337, 2018.

MIRÓ-CANTURRI, A.; AYERBE-ALGABA, R.; SMANI, Y. Drug repurposing for the treatment of bacterial and fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, 10, p. 41, 2019.

MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions**, 3, n. 4, p. 651-657, 2017.

MOLLOY, S. F.; KANYAMA, C.; HEYDERMAN, R. S.; LOYSE, A. et al. Antifungal combinations for treatment of cryptococcal meningitis in Africa. **New England Journal of Medicine**, 378, n. 11, p. 1004-1017, 2018.

MONK, B. C.; SAGATOVA, A. A.; HOSSEINI, P.; RUMA, Y. N. et al. Fungal lanosterol 14 α -demethylase: a target for next-generation antifungal design. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, 1868, n. 3, p. 140206, 2020.

MOR, V.; RELLA, A.; FARNOUD AMIR, M.; SINGH, A. et al. Identification of a New Class of Antifungals Targeting the Synthesis of Fungal Sphingolipids. **mBio**, 6, n. 3, p. e00647-00615.

MOURAD, A.; PERFECT, J. R. The war on cryptococcosis: a review of the antifungal arsenal. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 113, n. 7, p. e170391-e170391, 2018.

MULLARD, A. 2020 FDA drug approvals. **Nature Reviews Drug Discovery**, 20, p. 85-90, 2021.

MUN, J.; CHOI, G.; LIM, B. A guide for bioinformaticians: 'omics-based drug discovery for precision oncology. **Drug Discovery Today**, 25, n. 11, p. 1897-1904, 2020.

NAICKER, S. D.; MPEMBE, R. S.; MAPHANGA, T. G.; ZULU, T. G. et al. Decreasing fluconazole susceptibility of clinical South African *Cryptococcus neoformans* isolates over a decade. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 14, n. 3, p. e0008137, 2020.

- NGAN, N. T. T.; MAI, N. T. H.; TUNG, N. L. N.; LAN, N. P. H. et al. A randomized open label trial of tamoxifen combined with amphotericin B and fluconazole for cryptococcal meningitis. **Wellcome open research**, 4, p. 8-8, 2019.
- NIXON, G. L.; MCENTEE, L.; JOHNSON, A.; FARRINGTON, N. et al. Repurposing and reformulation of the antiparasitic agent flubendazole for treatment of cryptococcal meningoencephalitis, a neglected fungal disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 62, n. 4, p. e01909-01917, 2018.
- NOGUCHI, H.; MATSUMOTO, T.; KIMURA, U.; HIRUMA, M. et al. Cutaneous Cryptococcosis. **Medical Mycology Journal**, 60, n. 4, p. 101-107, 2019.
- NUNES, J. d. O.; TSUJISAKI, R. A. d. S.; NUNES, M. d. O.; LIMA, G. M. E. et al. Cryptococcal meningitis epidemiology: 17 years of experience in a state of the Brazilian Pantanal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 51, p. 485-492, 2018.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 52, n. 1, p. 1-1, 2003.
- OGUNDEJI, A. O.; POHL, C. H.; SEBOLAI, O. M. Repurposing of aspirin and ibuprofen as candidate anti-cryptococcus drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 60, n. 8, p. 4799, 2016.
- OGUNDEJI, A. O.; POHL, C. H.; SEBOLAI, O. M. The Repurposing of anti-psychotic drugs, quetiapine and olanzapine, as anti-cryptococcus drugs. **Frontiers in Microbiology**, 8, p. 815, 2017.
- OLIVEIRA, E. A. M. ; LANG, K. L. Drug Repositioning: concept, classification, methodology, and importance in rare/orphans and neglected diseases. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 8, n. 8, p. 157-165, 2018.
- OLIVEIRA, H. C.; JOFFE, L. S.; SIMON, K. S.; CASTELLI, R. F. et al. Fenbendazole controls *in vitro* growth, virulence potential, and animal infection in the *Cryptococcus* model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 64, n. 6, p. e00286-00220, 2020.
- OLSZEWSKI, M. A.; NOVERR, M. C.; CHEN, G.-H.; TOEWS, G. B. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **The American Journal of Pathology**, 164, n. 5, p. 1761-1771, 2004.
- OSTERMANN, H.; SOLANO, C.; JARQUE, I.; GARCIA-VIDAL, C. et al. Cost analysis of voriconazole versus liposomal amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis among patients with haematological disorders in Germany and Spain. **BMC Pharmacology and Toxicology**, 15, n. 1, p. 52, 2014.
- PALVE, V.; LIAO, Y.; REMSING RIX, L. L.; RIX, U. Turning liabilities into opportunities: off-target based drug repurposing in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, 68, p. 209-229, 2021.

- PARIN, K. V.; RAKESH, R. S.; MADHURI, H. J. Drug Repositioning: an approach for drug discovery. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, 13, n. 5, p. 363-376, 2016.
- PARISI, D.; ADASME, M. F.; SVESHNIKOVA, A.; BOLZ, S. N. et al. Drug repositioning or target repositioning: a structural perspective of drug-target-indication relationship for available repurposed drugs. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 18, p. 1043-1055, 2020.
- PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, 23, n. 4, 2009.
- PEREIRA, T. C.; DE MENEZES, R. T.; DE OLIVEIRA, H. C.; DE OLIVEIRA, L. D. et al. *In vitro* synergistic effects of fluoxetine and paroxetine in combination with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Pathogens and Disease**, 79, n. 2, 2021.
- PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, 16, n. 9, p. 603-616, 2017.
- PETROU, A.; FESATIDOU, M.; GERONIKAKI, A. Thiazole ring—a biologically active scaffold. **Molecules**, 26, n. 11, 2021.
- PUSHPAKOM, S.; IORIO, F.; EYERS, P. A.; ESCOTT, K. J. et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, 18, n. 1, p. 41-58, 2019.
- PROMA, F.H.; SHOURAV, M.K.; CHOI, J. Post-Antibiotic Effect of Ampicillin and Levofloxacin to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Based on Microscopic Imaging Analysis. **Antibiotics**, 2020, 9, 458.
- RAJASINGHAM, R.; SMITH, R. M.; PARK, B. J.; JARVIS, J. N. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet. Infectious diseases**, 17, n. 8, p. 873-881, 2017.
- RIBEIRO, N. d. Q.; COSTA, M. C.; MAGALHÃES, T. F. F.; CARNEIRO, H. C. S. et al. Atorvastatin as a promising anticryptococcal agent. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 49, n. 6, p. 695-702, 2017.
- RIBEIRO, N. Q.; SANTOS, A. P. N.; EMÍDIO, E. C. P.; COSTA, M. C. et al. Pioglitazone as an adjuvant of amphotericin B for the treatment of cryptococcosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 54, n. 3, p. 301-308, 2019/09/01/ 2019.
- RODRIGUES, M. L.; ALBUQUERQUE, P. C. Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 12, n. 6, p. e0006479, 2018.
- RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 14, n. 2, p. e0007964, 2020.

- ROSSI, S. A.; DE OLIVEIRA, H. C.; AGREDA-MELLON, D.; LUCIO, J. *et al.* Identification of Off-Patent Drugs That Show Synergism with Amphotericin B or That Present Antifungal Action against *Cryptococcus neoformans* and *Candida* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 64, n. 4, p. e01921-01919, 2020.
- ROSSI, S.A, TREVIJANO-CONTADOR N., SCORZONI L., MESA-ARANGO A.C., DE OLIVEIRA H.C., WERTHER K., DE FREITAS RASO T., MENDES-GIANNINI, M.J.S, ZARAGOZA O., FUSCO-ALMEIDA, A.M. Impact of Resistance to Fluconazole on Virulence and Morphological Aspects of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Isolates. **Frontiers in Microbiology**. 7:153, 2016
- RUSS, D.; KISHONY, R. Additivity of inhibitory effects in multidrug combinations. **Nature Microbiology**, 3, n. 12, p. 1339-1345, 2018.
- SAMANTARAY, S.; CORREIA, J. N.; GARELNABI, M.; VOELZ, K. *et al.* Novel cell-based *in vitro* screen to identify small-molecule inhibitors against intracellular replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 48, n. 1, p. 69-77, 2016.
- SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N.; GALILLY, R.; COHN, Z. A. *et al.* Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, 173, n. 3, p. 699-703, 1991.
- SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; MESA-ARANGO, A. C.; CASAS, C. *et al.* Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection**, 13, n. 5, p. 457-467, 2011.
- SCANNELL, J. W.; BLANCKLEY, A.; BOLDON, H.; WARRINGTON, B. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. **Nature Reviews Drug Discovery**, 11, n. 3, p. 191-200, 2012.
- SCHNEIDER, G. Automating drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, 17, n. 2, p. 97-113, 2018.
- SCHOCH, C. L.; CIUFO, S.; DOMRACHEV, M.; HOTTON, C. L. *et al.* NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. **Database**, 2020.
- SEOANE, P. I.; MAY, R. C. Vomocytosis: what we know so far. **Cellular Microbiology**, 22, n. 2, p. e13145, 2020.
- SETIANINGRUM, F.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; DENNING, D. W. Pulmonary cryptococcosis: a review of pathobiology and clinical aspects. **Medical Mycology**, 57, n. 2, p. 133-150, 2019.
- SHEKHOVA, E.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE AXEL, A. Induction of mitochondrial reactive oxygen species production by itraconazole, terbinafine, and amphotericin b as a mode of action against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 61, n. 11, p. e00978-00917, 2017.

- SINZGER, M.; VANHOEFER, J.; LOOS, C.; HASENAUER, J. Comparison of null models for combination drug therapy reveals and model as biochemically most plausible. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 3002, 2019.
- SMITH, K. D.; ACHAN, B.; HULLSIEK, K. H.; MCDONALD, T. R. et al. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 59, n. 12, p. 7197, 2015.
- SOARES, E. A.; LAZERA, M. d. S.; WANKE, B.; FERREIRA, M. d. F. et al. Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 13, n. 7, p. e0007569, 2019.
- SOUZA, L. K. H. e.; COSTA, C. R.; FERNANDES, O. d. F. L.; ABRAO, F. Y. et al. Clinical and microbiological features of cryptococcal meningitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 46, p. 343-347, 2013.
- SUETH-SANTIAGO, V.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; LIMA, M. E. F. CYP51: Uma Boa Ideia? **Revista Virtual de Química**, 7, n. 2, p. 539-575, 2015.
- SUN, D.-J.; ZHU, L.-J.; ZHAO, Y.-Q.; ZHEN, Y.-Q. et al. Diarylheptanoid: A privileged structure in drug discovery. **Fitoterapia**, 142, p. 104490, 2020.
- SUN, S.; COELHO, M. A.; DAVID-PALMA, M.; PRIEST, S. J. et al. The evolution of sexual reproduction and the mating-type locus: links to pathogenesis of *Cryptococcus* human pathogenic fungi. **Annual Review of Genetics**, 53, n. 1, p. 417-444, 2019.
- SUN, W.; SANDERSON, P. E.; ZHENG, W. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. **Drug Discovery Today**, 21, n. 7, p. 1189-1195, 2016.
- TANG, J.; WENNERBERG, K.; AITTOKALLIO, T. What is synergy? The Saariselkä agreement revisited. **Frontiers in Pharmacology**, 6, p. 181, 2015.
- TENFORDE, M. W.; SHAPIRO, A. E.; ROUSE, B.; JARVIS, J. N. et al. Treatment for HIV-associated cryptococcal meningitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 2018.
- THOMSON, S.; RICE, C. A.; ZHANG, T.; EDRADA-EBEL, R. et al. Characterisation of sterol biosynthesis and validation of 14 α -demethylase as a drug target in *Acanthamoeba*. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 8247, 2017.
- TOPLIS, B.; BOSCH, C.; SCHWARTZ, I. S.; KENYON, C. et al. The virulence factor urease and its unexplored role in the metabolism of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, 20, n. 4, 2020.
- TORRES, N. S.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; ABERCROMBIE, J. J.; SRINIVASAN, A. et al. antimicrobial and antibiofilm activity of synergistic combinations of a commercially available small compound library with colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, 9, p. 2541, 2018.

- TRUONG, M.; MONAHAN, L. G.; CARTER, D. A.; CHARLES, I. G. Repurposing drugs to fast-track therapeutic agents for the treatment of cryptococcosis. **PeerJ**, 6, p. e4761, 2018.
- TURNIDGE, JD; GUDMUNDSSON, S; VOGELMAN, B; CRAIG, WA. The postantibiotic effect of antifungal agents against common pathogenic yeasts, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** , 34 (1), p. 83-92, 1994.
- VAN DAELE, R.; SPRIET, I.; WAUTERS, J.; MAERTENS, J. et al. Antifungal drugs: What brings the future? **Medical Mycology**, 57, n. 3, p. S328-S343, 2019.
- VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y.-P.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J. R. et al. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, 77, n. 10, p. 4345, 2009.
- VENA, A.; MUÑOZ, P.; GUINEA, J.; ESCRIBANO, P. et al. Fluconazole resistance is not a predictor of poor outcome in patients with cryptococcosis. **Mycoses**, 62, n. 5, p. 441-449, 2019.
- VERMES, A.; KUIJPER, E. J.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. An *in vitro* study on the active conversion of flucytosine to fluorouracil by microorganisms in the human intestinal microflora. **Chemotherapy**, 49, n. 1-2, p. 17-23, 2003.
- VIDAL, J. E.; GERHARDT, J.; PEIXOTO DE MIRANDA, E. J.; DAUAR, R. F. et al. Role of quantitative CSF microscopy to predict culture status and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis in a brazilian cohort. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, 73, n. 1, p. 68-73, 2012.
- VILLASMIL, M. L.; BARBOSA, A. D.; CUNNINGHAM, J. L.; SINIOSSOGLU, S. et al. An Erg11 lanosterol 14- α -demethylase-Arv1 complex is required for *Candida albicans* virulence. **PLoS ONE**, 15, n. 7, p. e0235746, 2020.
- VU, K.; THOMPSON, G. R., III; ROE, C. C.; SYKES, J. E. et al. Flucytosine resistance in *Cryptococcus gattii* is indirectly mediated by the FCY2-FCY1-FUR1 pathway. **Medical Mycology**, 56, n. 7, p. 857-867, 2018.
- WAN, Y.; LI, Y.; YAN, C.; YAN, M. et al. Indole: a privileged scaffold for the design of anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 183, p. 111691, 2019.
- WANG, L.; ZHAI, B.; LIN, X. The Link between Morphotype Transition and Virulence in *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathogens**, 8, n. 6, p. e1002765, 2012.
- WHO. **Guidelines for the diagnosis, prevention, and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children**. Geneva: World Health Organization, 2018.
- WILLIAMSON, P. R.; JARVIS, J. N.; PANACKAL, A. A.; FISHER, M. C. et al. *Cryptococcal meningitis*: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews Neurology**, 13, n. 1, p. 13-24, 2017.

WOUTERS, O. J.; MCKEE, M.; LUYTEN, J. estimated research and development investment needed to bring a new medicine to market, 2009-2018. **JAMA**, 323, n. 9, p. 844-853, 2020.

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

YADAV, B.; WENNERBERG, K.; AITTOKALLIO, T.; TANG, J. searching for drug synergy in complex dose–response landscapes using an interaction potency model. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 13, p. 504-513, 2015.

Yet, Larry. **Privileged Structures in Drug Discovery: Medicinal Chemistry and Synthesis**. Reino Unido, Wiley, 2018.

ZAVALA, S.; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, 41, n. 1, p. 069-079, 2020.

ZHAI, B.; WU, C.; WANG, L.; SACHS, M. S. et al. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 56, n. 7, p. 3758, 2012.

ZHANG, Q.; LIU, F.; ZENG, M.; MAO, Y. et al. Drug repurposing strategies in the development of potential antifungal agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2021.

ZHAO, Y.; LIN, J.; FAN, Y.; LIN, X. Life cycle of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Microbiology**, 73, n. 1, p. 17-42, 2019.

ZHENG, S.; WANG, W.; ALDAHDOOH, J.; MALYUTINA, A. et al. SynergyFinder Plus: towards a better interpretation and annotation of drug combination screening datasets. **bioRxiv**, p. 2021.2006.2001.446564, 2021.

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **British Journal of Pharmacology**, 175, n. 2, p. 181-191, 2018