

LUCAS GIOVANINI MENEZES

ESTUDO DE DERIVADOS METÁLICOS DA 1,10-FENANTROLINA-5,6-DIONA COMO POTENCIAIS ANTIFÚNGICOS CONTRA  
*Cryptococcus neoformans*



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2021

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação do Professor André Luis Souza dos Santos e coorientação de Lucieri Olegario Pereira Souza.**

**FICHA CATOGRÁFICA****CIP - Catalogação na Publicação**

MM543e Menezes, Lucas Giovanini  
ESTUDO DE DERIVADOS METÁLICOS DA 1,10  
FENANTROLINA-5,6-DIONA COMO POTENCIAIS ANTIFÚNGICOS  
CONTRA *Cryptococcus neoformans* / Lucas Giovanini  
Menezes. -- Rio de Janeiro, 2021.  
73 f.

Orientador: André Luis Souza dos Santos .  
Coorientadora: Lucieri Olegario Pereira Souza.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2021.

1. *Cryptococcus*. 2. Metalocompostos. 3. Cápsula  
polissacarídica. 4. Biofilme fúngico. I. dos Santos  
, André Luis Souza, orient. II. Souza, Lucieri  
Olegario Pereira, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

#### ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO: **Lucas Giovanini Menezes**

DRE: 116029322

BANCA EXAMINADORA: Prof. Leonardo Nimrichter (Presidente)  
Dra. Livia de Souza Ramos  
Dra. Ana Carolina Aor Zaquieu  
Profª. Dirlei Nico (Suplente)

Título da Monografia: **“Estudo de derivados metálicos da 1,10-fenantrolina-5,6-diona como potenciais antifúngicos contra *Cryptococcus neoformans*”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/zzm-dqpf-vqu>

Data e hora de início: **24 de agosto de 2021 às 9:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **10** (dez) neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 24 de agosto de 2021.

NOTA	Banca Examinadora:
___10___	Prof. Leonardo Nimrichter
___10___	Dra. Livia de Souza Ramos
___10___	Dra. Ana Carolina Aor Zaquieu
_____	Profª. Dirlei Nico

Presidente da banca



Prof. Leonardo Nimrichter

Aluno:



Lucas Giovanini Menezes

Orientador:



Prof. André Luis Souza dos Santos / Coorientador: M.Sc. Luciere Olegario Pereira

Coordenador  
de TCC



Profª. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

*“Es denkt in mir”*

(Algo pensa em mim)

– Friedrich Nietzsche

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, antes de qualquer coisa, agradeço aos meus pais, Patricia Giovanini e Frederico Menezes, por tudo que me proporcionaram para que eu pudesse estar aqui e para que eu possa ir muito além. Todo carinho, todo cuidado e todo conforto; sempre lutando muito para me fornecer o que achavam ser o melhor para mim. Mas acima de tudo, agradeço eternamente pela educação libertadora que sempre foi à regra. Obrigado por me ensinarem a não obedecer cegamente, mas a questionar, a entender, a argumentar, a ouvir e a aprender; e por me ensinarem que nem sempre teremos todas as respostas, mas que isso deve ser um incentivo para que eu vá buscar por elas e jamais me conformar com verdades inquestionáveis ou temas indiscutíveis. E hoje, graças a vocês, estou correndo atrás das respostas que ainda não temos para perguntas que muitos ainda não fizeram. “Amo vocês muito muito”.

Gostaria de agradecer a minha família que sempre esteve comigo me apoiando em cada etapa da minha vida, fornecendo todo amor e carinho que precisei ao longo dessa dura jornada que é a vida. Vocês são minha base e meu abrigo.

Caio Giovanini, agradeço-lhe todos os dias por poder ter comigo o irmão que eu nunca quis ter. Você é a pessoinha que mais amo, poder acompanhar cada um de seus passos, cada brilho dessa mente. Muito mais que um primo, você sempre foi meu irmão; meu irmão com quem eu posso conversar sobre a vida, com quem posso contar minhas histórias de infância, quem posso ensinar tudo que aprendi e posso aprender junto todos os dias. E a você, meu maior ensinamento sempre será que você procure aprender. Não tenha vergonha por não saber, mas sim felicidade em ter algo novo a aprender. E no que precisar de ajuda para isso, conte comigo para aprendermos juntos, maninho.

Obrigado Ligia e Jorge por serem os melhores avós do mundo, sempre me agraciando com as incríveis discussões de vocês que me fazem poder parar num momento tenso e rir um pouco com a simplicidade da vida. Obrigado Luciana e Marcelo por todo carinho e amizade do mundo, família vai muito além do sangue, família é acompanhar, torcer, vibrar a cada vitória, e que poderemos depois sentar e beber uma água de coco com a companhia do Biduzinho.

Agradeço agora aos meus amigos que me acompanham em cada uma das minhas loucuras e surtos, nas crises e na euforia que a vida nos proporciona, obrigado por estarem sempre comigo e me ajudarem a aproveitar um pouquinho a loucura que é viver. Muito obrigado João por me acompanhar e me aguentar desde que nascemos e nunca nos afastarmos não importa quantos trabalhos e provas tenhamos a cada ano; obrigado por estar presente cada um

dos meus momentos e nesse não poderia ser diferente. Obrigado a “Gangue dos Galudos” por cada risada enquanto tentamos não morrer nos jogos e melhorar a sempre a nossa pontuação. Obrigado Renan, JP e VH por sempre estarem presentes nas nossas reuniões para contarmos as novidades da vida enquanto tomamos uma cervejinha e rimos das desgraças da vida. Obrigado Nicolly por sempre salvar em todos os roles e me estimular a curtir ao máximo, ainda vai ouvir muito dos meus surtos, minha psicóloga.

Obrigado também aos amigos que me acompanharam ao longo dessa jornada acadêmica me auxiliando não só nos trabalhos, mas nas crises de apresentar artigos de virologia que não tivemos tempo de ler ou preparar os slides na noite anterior para recebermos o elogio de termos feito a melhor apresentação daquele artigo até hoje, nossas amizades transcenderam as salas de aula e espero que estejamos juntos por muitos anos em nossas vidas. Por causa disso agradeço muito ao Jonas Siqueira, por cada história bizarra e inacreditável que eu faço questão de propagar, por ser minha grande dupla nos trabalhos e nas festas de medicina que você tanto odiava, mas sempre me acompanhava com seu corote e cigarrinho. Agradeço ao Pedrão, por mostrar que uma grande amizade pode nascer em segundos, por compartilhar os melhores memes, me iluminar com conhecimentos de Dragonball, me tornar JoJo+, me apresentar ao grande uncle Motong e me ajudar a compor as melhores piadas que esse mundo claramente não está pronto para conhecer. Obrigado, Sarah, por compartilhar comigo as cervejas baratas e o cachorro quente de 1 real enquanto assistíamos nosso Mengão ser campeão. Agradeço muitíssimo a Ursula Lopes, minha grande mestranda, por todos os conselhos e por todos os sentimentos e existencialismos compartilhados, se teve um ponto positivo nessa pandemia foi ter nos aproximado e me mostrando a pessoa incrível e a grande amiga carinhosa e sempre atenciosa que você é; logo estaremos dando nossos rolezinhos na sua nova terra. Agradeço também a minha amiga e conterrânea Thais Tavares que, mesmo sumindo, às vezes, sempre reaparece me fazendo uma companhia incrível com muito carinho, as melhores discussões sobre a vida, o universo, nossa mente e o que é a realidade; vai ser pra sempre a minha caloura favorita. Todos vocês, meus amigos, foram de extrema importância para que eu não surtasse ainda mais ao longo dessa jornada, me permitindo descontraír e rir um pouco do caos.

E por mais distantes que possamos estar eu jamais poderia deixar de agradecer a você, Andreza Arrabal, por ter sido minha melhor amiga, minha companheira de tantos momentos, meu porto seguro na agitada maré da vida. Obrigado por me apresentar um Lucas quem eu jamais teria conhecido sem você e por se dedicar tanto a me conhecer por inteiro, sem qualquer

máscara social. Obrigado por me mostrar que ainda vale a pena e por me ajudar com cada uma das coisas pelas quais passei nesses últimos anos. Não estaria aqui se não fosse por poder ter tido você do meu lado. Obrigado por dedicar tantas das suas horas em nossas conversas, em nossos abraços e em nossas histórias.

Gostaria de agradecer agora ao professor André e a professora Marta por terem me guiado nesse mundo científico. Por lutarem tanto para nos fornecer as condições para continuarmos fazendo ciência nesse país; por sempre ouvirem nossas ideias e nos ensinar o caminho para as pormos em prática; por serem orientadores, administradores, professores e amigos. Nesse sentido não poderia deixar de agradecer diretamente a Lucieri por ser minha coorientadora, minha parceira de bancada, minha amiga, minha mãe de laboratório. Obrigado por me ensinar desde o básico quando eu entrei no laboratório até a correção do meu TCC, por me ajudar a planejar os experimentos, por me ensinar a fazer os experimentos, por me aguentar surtando na bancada sem lembrar o que eu acabei de fazer e me acalmar mostrando que o eppendorff que tinha 1 ml agora tem metade e eu só posso ter pipetado ele ou então falando para eu refazer tudo de novo para aprender a ter mais concentração. Muito obrigado por estar comigo em cada passo nesse laboratório.

Gostaria também de agradecer a todo o grupo do laboratório, pois há um pouco de cada um de vocês nessas páginas; obrigado por proporcionarem um ambiente de trabalho sempre descontraído e divertido. Obrigado a todos da pós por serem sempre solícitos seja para ensinar uma técnica, ajudar com algum aparelho, discutir os resultados e darem ideias para os próximos experimentos. Obrigado aos meus amigos ICs por convivermos a saga de ser um IC num dos maiores laboratório da UFRJ que nos faz exigir sempre mais de nós mesmos todos os dias, nos fazendo surtar, rir, chorar, beber e comermos ana maria com pipoca às 18 da tarde enquanto vivemos nossa rotina de aulas e experimentos desde as 09. E claro, obrigado a Denise por organizar todo o laboratório, manter todos na linha nos ameaçando mandar matar, por nos fazer sempre rir com suas histórias incríveis e por brigar muito por nós nessa faculdade.

Por fim, agradeço a CAPES, CNPq e a FAPERJ pelo apoio financeiro na pesquisa de desenvolvimento nacional.



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Ag-fendiona –  $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$

BHI – Meio de infusão de cérebro e coração (*Brain and Heart Infusion*)

CGB – Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol

CID – Contraste de Interferência Diferencial

CLSI – Instituto de padrões clínicos e laboratoriais (*Clinical & Laboratory Standards Institute*)

CMI – Concentração mínima inibitória

CMF – Concentração mínima fungicida

Cu-fendiona –  $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

DMSO – Dimetilsufóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Fendiona – 1,10-fenantrolina-5,6-diona

GXM – Glucuronoxilomanano

GalXM – Galactoxilomanano

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus*)

Phen – 1,10-fenantrolina

PI – Iodeto de propídeo

RPM – Rotações por minuto

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

UAF – Unidade arbitrária de fluorescência

## RESUMO

### ESTUDO DE DERIVADOS METÁLICOS DA 1,10-FENANTROLINA-5,6-DIONA COMO POTENCIAIS ANTIFÚNGICOS CONTRA *Cryptococcus neoformans*

Orientador: André Luis Souza dos Santos

Coorientadora: Lucieri Olegario Pereira Souza

*Cryptococcus neoformans* é um fungo leveduriforme revestido por uma cápsula polissacarídica, seu principal fator de virulência. Em 2016, esse fungo foi responsável por 6832 casos de meningite criptocócica no Brasil. Por esse fator, buscamos avaliar a atividade antifúngica dos metalocompostos derivados da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona),  $[\text{Ag}(\text{phendione})_2]\text{ClO}_4$  (Ag-fendiona) e  $[\text{Cu}(\text{phendione})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Cu-fendiona), contra três cepas de *C. neoformans* que expressam fenótipos capsulares distintos: Cap67 (acapsular) T1444 (hipercapsulada) HEC3393 (capsula intermediaria). Seguindo o protocolo padrão do CLSI, demonstramos que os compostos foram capazes de inibir a proliferação das três cepas, sendo a concentração mínima inibitória (CMI) da fendiona de 100  $\mu\text{M}$  para Cap67 e 50  $\mu\text{M}$  para HEC3393 e T1444; 50  $\mu\text{M}$  da Cu-fendiona para a HEC3393 e 100  $\mu\text{M}$  para Cap67 e a T1444; ou 12,5  $\mu\text{M}$  da Ag-fendiona para a Cap67 e HEC3393 e 25  $\mu\text{M}$  para a T1444; os controles  $\text{AgNO}_3$  apresentou os mesmos valores que a Ag-fendiona e o  $\text{CuSO}_4$  não teve efeito nas concentrações testadas ( $>400 \mu\text{M}$ ). Entretanto, apenas Cu-fendiona e Ag-fendiona demonstraram atividade fungicida, sendo 100  $\mu\text{M}$  a concentração mínima fungicida (CMF) dos dois compostos ao desafiar qualquer uma das 3 cepas, exceto a HEC3393 que, ao ser desafiada por Cu-fendiona, precisou de 200  $\mu\text{M}$ . Através de microscopia de campo claro, foi possível visualizar que o tratamento com os metalocompostos foi capaz de reduzir a expressão capsular, e que a cepa HEC3393 também apresentava aumento no tamanho do corpo celular. Utilizando marcação por iodeto de propídeo, avaliamos a ação dos compostos na integridade da membrana plasmática dos fungos através de citometria de fluxo. Os tratamentos só afetaram significativamente a integridade da membrana plasmática das cepas HEC3393 e T1444. Por isso também buscamos avaliar a ação antibiofilme dos compostos testes. Verificamos a capacidade das células em

formar biofilme após serem pré-tratadas com  $\frac{1}{2} \times \text{CMI}$ ; pudemos observar que nenhum tratamento reduziu a viabilidade celular, mas a Cu-fendiona foi capaz de inibir formação de biomassa de todas as cepas. Seguindo por essa linha, testamos o potencial dos compostos em desarticular um biofilme maduro de *C. neoformans*. A Ag-fendiona foi o composto mais efetivo contra a Cap67; todos os tratamentos desarticularam o biofilme da T1444, sendo a fendiona e a Cu-fendiona os mais significativos. Com esses resultados nós pudemos então concluir que os metalocompostos de prata e de cobre são promissores no desenvolvimento de novas estratégias antifúngicas contra *Cryptococcus neoformans*, necessitando realizar mais estudos a fim de elucidar os mecanismos de ação e as melhores formas de aplicação desses compostos no tratamento *in vivo*.

Palavras-chaves: *Cryptococcus*; metalocompostos; cápsula polissacarídica; biofilme; fendiona.

## ABSTRACT

### STUDY OF 1,10-PHENANTHROLINE-5,6-DIONE-METAL DERIVATIVES AS POTENTIAL ANTIFUNGALS AGAINST *Cryptococcus neoformans*

Supervisor: André Luis Souza dos Santos

Co-Supervisor: Lucieri Olegario Pereira Souza

*Cryptococcus neoformans* is a yeast-like fungus coated with a polysaccharide capsule, its main virulence factor. In 2016, this fungus was responsible for 6832 cases of cryptococcal meningitis in Brazil. By this factor, we sought to evaluate the antifungal activity of metallocompounds derived from 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione), [Ag(phendione)<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>) (Ag-phendione) and [Cu(phendione)<sub>3</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (Cu-Phendione), against three strains of *C. neoformans* that express distinct capsular phenotypes: Cap67 (acapsular) T1444 (hypercapsulated) HEC3393 (intermediate capsula). Following the standard CLSI protocol, we demonstrated that the compounds were able to inhibit the proliferation of the three strains, with the minimum inhibitory concentration (MIC) of fendione being 100 µM for Cap67 and 50 µM for HEC3393 and T1444; 50 µM Cu-fendione for one HEC3393 and 100 µM for Cap67 and one T1444; or 12.5 µM of Ag-fendione for a Cap67 and HEC3393 and 25 µM for a T1444; AgNO<sub>3</sub> controls have the same values as Ag-fendione and CuSO<sub>4</sub> had no effect on those tested (> 400 µM). However, only Cu-fendione and Ag-fendione showed fungicidal activity, with 100 µM being the minimum fungicidal concentration (MFC) of the two compounds when challenging any of the 3 strains, except for HEC3393 which, when challenged by Cu-fendione, required 200 µM. Through brightfield microscopy, it was possible to visualize that the treatment with metallocompounds was able to reduce capsular expression, and that the HEC3393 strain also showed an increase in cell body size. Using propidium iodide labeling, we evaluated the action of the compounds on the integrity of the fungal plasma membrane through flow cytometry. The treatments only affected plasma membrane compliant HEC3393

and T1444 strains. Therefore, we also sought to evaluate the antibiofilm action of the test compounds. We verified the ability of cells to form biofilm after being pretreated with  $\frac{1}{2} \times$  CMI; we could observe that no treatment reduced the metabolic rate, but Cu-fendione was able to reduce the biomass formation of all strains. Following this line, we tested the potential of the compounds to disarticulate a mature *C. neoformans* biofilm. Ag-fendione was the most effective compound against a Cap67; all treatments disarticulated the T1444 biofilm, with fendione and Cu-fendione being the most complete. With these results, we were able to fulfill that silver and copper metal compounds are promising in the development of new antifungal strategies against *Cryptococcus neoformans*, requiring further studies in order to elucidate the mechanisms of action and the best ways to apply these compounds in the treatment of alive.

Keywords: *Cryptococcus*; metal compounds; polysaccharide capsule; biofilm; fendione.

## RESUMO PARA LEIGOS

### ESTUDO DE DERIVADOS METÁLICOS DA 1,10-FENANTROLINA-5,6-DIONA COMO POTENCIAIS ANTIFÚNGICOS CONTRA *Cryptococcus neoformans*

Orientador: André Luis Souza dos Santos

Coorientadora: Lucieri Olegario Pereira Souza

*Cryptococcus neoformans* é um fungo revestido por uma cápsula protetora. Ele é altamente presente no solo, nas plantas e pode ser carregado pelas aves. Devido a sua alta presença nas cidades, o pombo se torna o principal portador e pode contaminar o ar com esse fungo. Ao respirarmos esse ar contaminado esse fungo pode causar infecção nos pulmões. Entretanto, com auxílio da cápsula o *Cryptococcus* é capaz de resistir as defesas do sistema imunológico e continuar se multiplicando, podendo causar meningite. Atualmente os remédios disponíveis capazes de ajudar a combater essas infecções são anfotericina B e fluconazol, entretanto esses antifúngicos podem causar problemas no fígado e nos rins do paciente, o que pode piorar ainda mais a situação de pacientes já enfraquecidos por outros problemas como serem portadores do HIV, terem leucemia ou terem passado por um transplante recentemente, que são os principais infectados por esse fungo. Por estas razões é de grande importância que realizemos pesquisas testando novos compostos que possam compor um futuro novo remédio para tratar estas infecções ou tornar os remédios atuais mais fortes com uma menor quantidade, reduzindo assim os efeitos negativos nos pacientes. Neste projeto testamos dois compostos, Prata-fendiona e Cobre-fendiona, que foram capazes de matar vários outros agentes infecciosos, impedi-los de causar doenças ou enfraquecê-los, possibilitando que nosso corpo se cure mais fácil e rapidamente. Como a cápsula é muito importante para o sucesso da infecção por *Cryptococcus*, estes compostos foram testados contra três tipos deste fungo: sem cápsula, muita cápsula e com uma cápsula mediana. Assim pudemos avaliar a interferência da cápsula no tratamento por estes compostos.

## ÍNDICE

FICHA CATOLOGRÁFICA .....	iii
FOLHA DE APROVAÇÃO .....	iv
AGRADECIMENTOS.....	vi
I INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Infecções fúngicas .....	1
1.2. Criptococose.....	3
1.3. Atributos de virulência.....	5
1.4. Biofilme .....	10
1.5. Tratamento clássico .....	11
1.6. 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) e seus complexos metálicos .....	13
II JUSTIFICATIVA .....	17
III OBJETIVOS .....	18
1. Objetivo geral.....	18
2. Objetivos específicos.....	18
VI MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
1. IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS .....	19
1.1. Microrganismos .....	19
1.2. Estocagem das cepas.....	19
1.3. Cultivo celular .....	19
2. COMPOSTOS.....	19
3. TESTE DE SUSCETIBILIDADE E VIABILIDADE .....	20
3.1. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima fungicida (CMF)...	20
4. INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA .....	20
5. AVALIAÇÃO DO TAMANHO CAPSULAR E CORPO CELULAR .....	21
7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	23

V	RESULTADOS .....	25
1.	Teste de susceptibilidade e viabilidade.....	25
2.	Análise da morfologia celular (cápsula e corpo celular) .....	26
3.	Integridade da membrana plasmática .....	29
4.	Biofilme .....	33
4.1.	Inibição da formação de biofilme .....	33
4.2.	Teste de desarticulação do biofilme maduro .....	36
VI	DISCUSSÃO .....	38
VII	CONCLUSÕES .....	44
VIII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

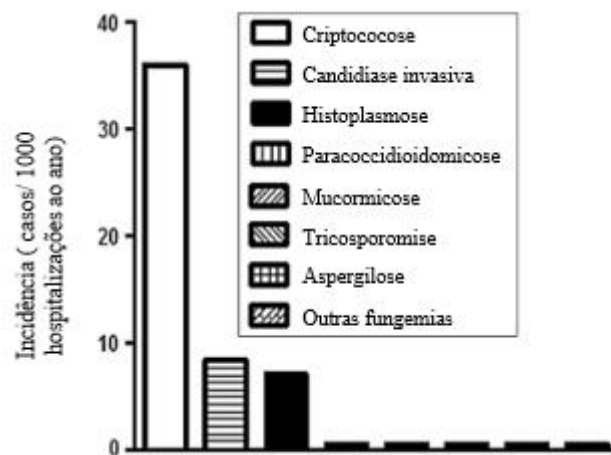


# I INTRODUÇÃO

## 1.1. Infecções fúngicas

Nas últimas décadas vem ocorrendo um crescente aumento do número de infecções oportunistas causadas por fungos. Estima-se haver dois milhões de pessoas acometidas por infecções fúngicas anualmente; estas infecções podem variar desde de lesões cutâneas a infecções pulmonares agudas, desencadeando inflamações graves nos tecidos (Brown *et al.*, 2012). Algumas mudanças na sociedade como o aumento da longevidade populacional e também o aumento no número de pacientes imunocomprometidos por terapias imunossupressoras, doenças crônicas, doenças autoimunes e acometidos por HIV do inglês *human immunodeficiency virus*) proporcionaram as condições ideais para o sucesso na infecção por esses patógenos. E na contramão do aumento de casos, essas doenças continuam sendo negligenciadas pelos agentes de saúde pública (Perlroth, Chois & Spellberg, 2007; Saijo *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2019).

As infecções fúngicas também podem ocorrer no ambiente hospitalar, sendo denominadas infecções nosocomiais. Esse tipo de infecção evidencia a necessidade de novas estratégias para controlar a disseminação de fungos patogênicos e oportunistas pelo ambiente hospitalar, e a necessidade de aplicar corretamente as técnicas sanitárias já existentes (Lai *et al.*, 2008). O fungo *Cryptococcus neoformans* também acomete diversos pacientes imunologicamente competentes, embora, a maior parte dos pacientes acometidos são imunocomprometidos (Murphy *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Por conta disso, trabalhos recentes ressaltam a importância de prevenir e tratar infecções fúngicas invasivas em pacientes com qualquer tipo de imunossupressão (Parahym, 2012; Kuster *et al.*, 2018). Sendo a criptococose, em 2014, a principal infecção sistêmica fúngica no Brasil em passsientes com SIDA, como demonstrado pela figura 1, apresentando uma taxa de mortalidade de 34%, seguida por candidíase invasiva e histoplasmoze; sendo estimados 6832 casos totais de meningite criptocócica no Brasil em 2016 (De Oliveira *et al.*, 2014; Giacomazzi *et al.*, 2016). E, diferente das cepas ambientais, as células isoladas em hospedeiros acometidos por criptococose são mais virulentas, apresentando uma cápsula polissacarídica mais espessa (Love, Boy & Greer, 1985; D'Souza *et al.*, 2001), conferindo assim maior resistência à eliminação pelo processo de fagocitose (Feldmesser *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2012).



**Figura 1:** Incidência de infecções fúngicas no ano de 2011 em pacientes com HIV ou SIDA (Adaptado de De Oliveira *et al.*, 2014).

**Tabela 1:** Epidemiologia das principais infecções fúngicas invasivas (Adaptado de Brown *et al.*, 2012).

Doença (espécies mais comuns)	Localização	Estimativa de infecções potencialmente fatais/ano	Taxa de mortalidade (% nas populações infectadas)
<b>Micoses invasivas oportunistas</b>			
Arpergilose ( <i>Arpergillus fumigatus</i> )	Mundial	>200.000	30-95
Candidíase ( <i>Candida albicans</i> )	Mundial	>400.000	46-75
Criptococose ( <i>Cryptococcus neoformans</i> )	Mundial	>1.000.000	20-70
Mucormicose ( <i>Rhizopus oryzae</i> )	Mundial	>10.000	30-90
Pneumocistose ( <i>Pneumocystis jirovecii</i> )	Mundial	>400.000	20-80
<b>Micoses endêmicas causadas por fungos dimórficos</b>			
Blastomicose ( <i>Blastomyces dermatidis</i> )	Centro-Oeste e atlântico dos Estados Unidos	≈3.000	<2-68
Coccidioidomicose ( <i>Coccidioides immitis</i> )	Sudoeste dos Estados Unidos	≈25.000	<1-70
Histoplasmose ( <i>Histoplasma capsulatum</i> )	Centro-Oeste dos Estados Unidos	≈25.000	28-50
Paracoccidioidomicose ( <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> )	Brasil	≈4.000	5-27

## 1.2. Criptococose

Otto Busse, em 1894, foi o primeiro pesquisador a descrever uma infecção causada pelo fungo *C. neoformans*, recuperado a partir de uma lesão na tíbia de uma paciente. Na época, este fungo ainda era classificado como *Saccharomycosis hominis* (Barnett, 2010; Busse, 1894) e, em 1901, foi reclassificado para o gênero *Cryptococcus* (Vuillemin, 1901); e 13 anos depois, foi conhecida a alta capacidade de neurotropismo desse fungo (Versé, 1914).

Emmons, ao analisar uma coleta de solo na região da Virginia (Estados Unidos da América) por volta da década de 1950, identificou a presença dessa levedura em amostras coletadas de diversos ambientes, e pôde-se constatar que sua presença era ainda mais abundante em fezes e em ninhos de pombos (Emmons 1951, 1955). Em 1950, Evans identificava e confirmava a heterogeneidade dos antígenos de *Cryptococcus* (antígenos A, B e C) e, em 1968, o sorotipo D era confirmado por Wilson *et al.* (1968).

As estirpes de *C. neoformans* foram inicialmente agrupadas em duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii*. Antigenicamente, *C. neoformans* var. *neoformans* eram os sorotipos A e D, enquanto *C. neoformans* var. *gattii* eram os sorotipos B e C. Ambos são patogênicos para seres humanos e causam doenças semelhantes, sendo o *C. neoformans* o principal patógeno fúngico em pacientes imunocomprometidos, e o *C. gattii* acometendo mais a pacientes imunocompetentes. A principal característica clínica é a meningoencefalite disseminada grave associada a uma taxa de mortalidade de pelo menos 20% nos países ocidentais, mesmo com as terapias antifúngicas adequadas (Vecchiarelli, 2005 apud Mitchell, & Perfect, 1995). Em 2006, foi proposta a separação dos sorotipos B e C formando uma nova espécie, denominada *Cryptococcus gattii*, devido a uma significativa diferença metabólica, genética e fenotípica quando comparados com os sorotipos A e D (Meyer *et al.*, 2003; Kwon-Chung, & Varma, 2006).

Hoje existem dois “complexos de espécies” (Kwon-Chung *et al.*, 2017). O complexo *C. neoformans*, dividido em duas variedades: *C. neoformans* var. *grubii* (*C. neoformans*) (sorotipo A) de três tipos moleculares: VNI, VNII e VNB; e *C. neoformans* var. *neoformans* (*C. deneoformans*) (sorotipo D) de tipo molecular VNIV; e há também um híbrido entre *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo AD) de tipo molecular VNIII. E por fim o complexo *C. gattii* (sorotipos B e C) que inclui quatro tipos moleculares: VGI, VGII, VGIII e VGIV (Meyer *et al.*, 2009; Lucas *et al.*, 2010; Mc Taggart *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2013; Hagen *et al.*, 2015; Kwon-Chung *et al.*, 2017; Montagna *et al.*, 2018).

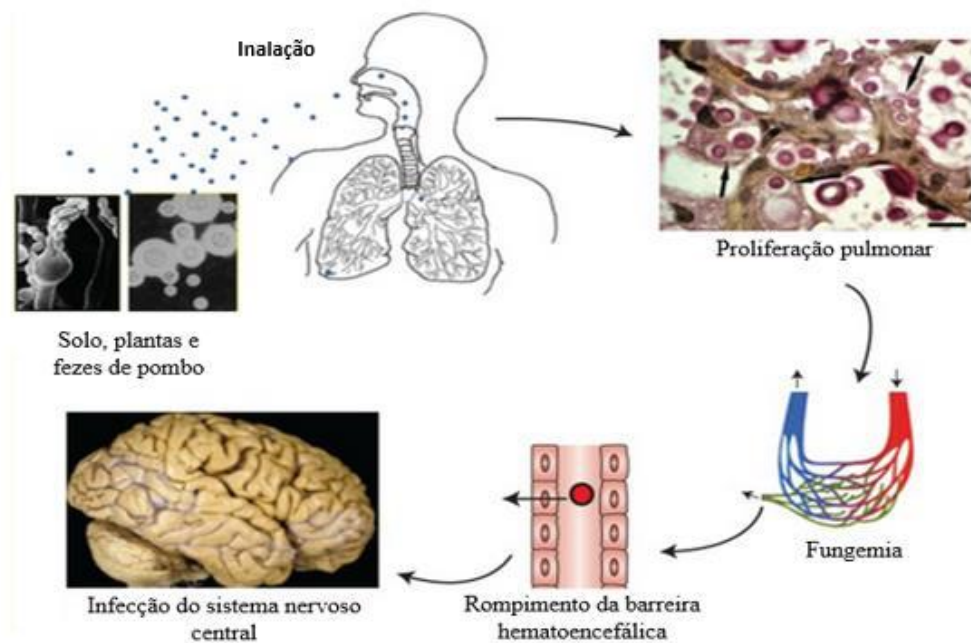
Muitas características podem ser utilizadas na distinção clínica do gênero *Cryptococcus* para os demais fungos patogênicos, sendo a principal característica evidenciada na morfologia do fungo pela presença de uma cápsula polissacarídica envolvendo a levedura e a detecção de seus antígenos ou até a detecção de anticorpos (Seeliger, 1956; Staib, 1962; Consenso em Criptococose, 2008). Além dos testes antigênicos, o meio agar CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol) é capaz de distinguir as cepas da espécie *C. neoformans* da espécie *C. gattii*. As cepas de *C. gattii* apresentarão um bom crescimento e tornarão o meio azulado (azul cobalto), indicando a alteração de pH devido à degradação de creatina em amônia; enquanto a espécie *C. neoformans* terá o crescimento reduzido e o meio apresentará coloração de amarelo para verde (Consenso em Criptococose, 2008; Laborclin, 2018).

Ao analisar o padrão de infecção, podemos observar uma prevalência em pacientes de idade avançada, portadores de doenças que causam deficiência na resposta imunológica como SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida) e pacientes que passaram por cirurgias ou transplantes (Levitz, S. M., 1991; Perlroth, Chois & Spellberg, 2007; Silva *et al.*, 2019; Parahym, 2012; Kuster *et al.*, 2018). Entretanto, ao analisar pacientes com criptococose na China, entre os anos de 1980 e 2006, pode-se observar que, embora a maioria fosse portadora de alguma imunodeficiência, havia também pacientes aparentemente saudáveis acometidos pela doença. Ainda assim, o aumento da população contaminada apresenta relação com o aumento de pacientes HIV+ (Chen *et al.*, 2008), sendo a criptococose responsável por 15% das mortes de pacientes portadores da SIDA (Rajasingham *et al.*, 2017).

Há também muitos portadores assintomáticos, infectados pela levedura sem expressarem qualquer sintoma da doença ou que expressem apenas sintomas gerais como tosse e febre. Essa tese foi confirmada ao analisar estudos sorológicos e verificar que a maioria dos indivíduos analisados possuíam anticorpos presentes no soro, sem que nunca houvessem apresentado sintomas para criptococose anteriormente (Littman, 1959; Feldmesser *et al.*, 2000 apud Chen *et al.*, 1999; Kitkungvan *et al.*, 2008; Li & Mody, 2010).

As cepas isoladas de pacientes sintomáticos também apresentam resistência às terapias antifúngicas clássicas, além de muitos antifúngicos causarem uma elevada toxicidade aos pacientes já debilitados. A dificuldade em tratar os pacientes bem como reduzir a presença de patógenos oportunistas no meio hospitalar corroboram para a disseminação desses microrganismos dentro e fora dos hospitais, além de elevarem os custos dos tratamentos (Lai *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2020).

As aves demonstram ser os principais vetores do fungo *Cryptococcus*, carregando o fungo na forma de basidiósporos, presente nas plantas e no solo, do meio rural para o meio urbano, possibilitando assim a dispersão dos esporos fúngicos pelo ar que poderá ser inalado e iniciar assim o ciclo de infecção ilustrado na figura 2. A forma de basidiósporos possui um diâmetro consideravelmente menor, permitindo assim que as células fúngicas dispersas em aerossóis sejam facilmente inaladas e cheguem até aos alvéolos pulmonares (Ellis & Pfeiffer, 1990; Levitz, 1991; Bocca, & Casadevall, 2014; Coelho & Farrer, 2020; Futatsuya *et al.*, 2020). Os pombos são os principais agentes vetoriais devido a sua alta presença no meio urbano. As fezes das aves podem carrear até 46.000 propágulos viáveis por grama de material seco (Filiú *et al.*, 2002; Ghaderi, Eidi & Razmyar, 2019).



**Figura 2:** Rota da infecção pelo fungo do gênero *Cryptococcus* mostra que os esporos fúngicos, dispersos na natureza, são inalados, ganhando as vias aéreas e se proliferando no pulmão do hospedeiro; nessa etapa os fungos ficam metabolicamente mais ativos e ganham acesso a corrente sanguínea do paciente, podendo então atravessar a barreira hematoencefálica e gerar infecção do sistema nervoso central (Adaptado de *Kwon-Chung et al.*, 2014. Cold Spring HarbPerspectMed).

### 1.3. Atributos de virulência

Existem diversos fatores de virulência já descritos em *C. neoformans*, como a presença de melanina, atividade de urease e fosfolipase, além da capacidade de sobreviver e replicar à temperatura fisiológica humana. Esses fatores serão acionados após os basidiósporos serem

ativados, podendo causar quadros de pneumonia crônica e até meningite, levando o hospedeiro à morte quando não tratado devidamente (Perfect, 2006; Maxson *et al.*, 2007 apud, Casadevall & Perfect, 1998; Kwon-Chung *et al.*, 2014).

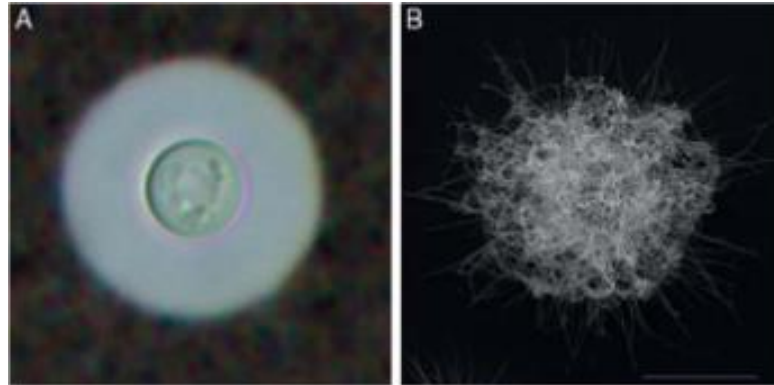
A via de entrada do fungo *C. neoformans* ocorre comumente pela aspiração dos basidiósporos fúngicos presentes no ar contaminado (Levitz, 1991; Ellis, & Pfeiffer, 1990; Sabiti & May, 2012; Springer *et al.*, 2013; Coelho & Farrer, 2020; Futatsuya *et al.*, 2020). Devido a seu diâmetro reduzido, os basidiósporos conseguem se alojar nos alvéolos pulmonares, onde serão fagocitados pelos macrófagos pulmonares (Feldmesser *et al.*, 2000; Coelho, Bocca, & Casadevall, 2014); entretanto, este fungo desenvolveu uma estrutura que o ajuda a sobreviver ao ambiente, a competição contra outros microrganismos e a obter sucesso no processo de infecção intracelular: uma cápsula de polissacarídeos, que confere ao fungo proteção contra condições ambientais como baixa umidade. Além disso, a cápsula é o fator de virulência chave no desenvolvimento patológico, pois confere resistência ao fagolisossoma e também regula negativamente células do sistema imunológico do hospedeiro, induzindo-as a entrar em processo de apoptose (Monari *et al.*, 2005; Monari, Bistoni & Vecchiarelli, 2006; García-Rodas & Zaragoza, 2011; Coelho *et al.*, 2012; Coelho, Bocca & Casadevall, 2014; Hansakon *et al.*, 2018).

A cápsula polissacarídica envolve todo o corpo celular, sendo ancorada à parede celular fúngica, como demonstrado pela figura 3. Devido à alta presença e alta capacidade imunogênica desses antígenos capsulares, o diagnóstico laboratorial utiliza da procura de anticorpos contra os antígenos capsulares (Aksenov, Babyeva, & Golubev, 1973; Kabanda *et al.*, 2013).

Ambientes ricos em glicose aumentam a virulência de *C. neoformans*, regulando positivamente a multiplicação celular, elevando a expressão dos fatores de virulência e tornando a cápsula mais espessa (Choi, Vogl & Kronstad, 2012; Caza & Kronstad, 2019). Há diversos outros fatores que também podem proporcionar essas alterações como: pH mais alcalino, alta pressão osmótica, alta taxa de CO<sub>2</sub>, baixo teor de íons ferro e outras condições que também são encontradas nos hospedeiros e estão presentes no soro de mamíferos (Zaragoza, Fries & Casadevall, 2003; Zaragoza & Casadevall, 2004; Jacobson, Tingler, & Quynn, 2009; Frases *et al.*, 2009; O'Meara & Alspaugh, 2012; Reis *et al.*, 2019).

Uma cápsula polissacarídica mais espessa é capaz de inibir fagocitose e, conseqüentemente, a eliminação do fungo. Para contornar essa adaptação faz-se necessário a presença de soro contendo opsoninas como anticorpos e moléculas do sistema complemento (Diamond, Root, & Bennett, 1972; Cross & Bancroft, 1995; Levitz *et al.*, 1999; Feldmesser *et*

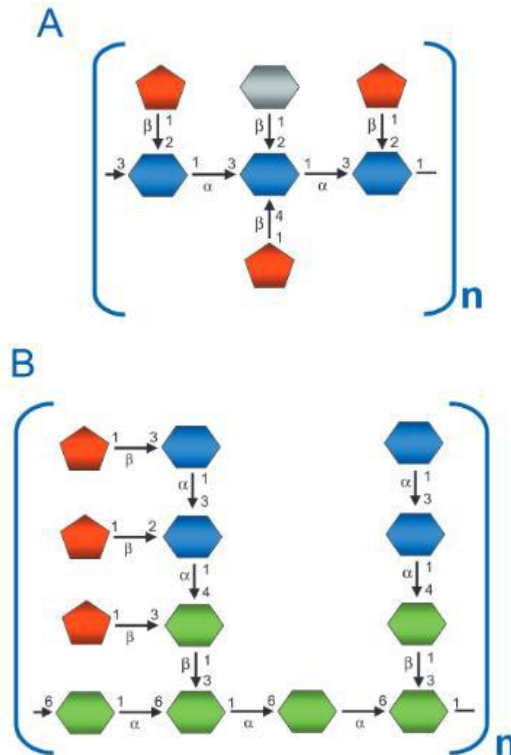
*al.*, 2000). Todavia, a fagocitose não garante a eliminação deste fungo, pois a cápsula também confere alta resistência à degradação das enzimas lisossômicas, garantindo assim a sobrevivência do fungo após ser fagocitado pelas células do sistema imune (Sakaguchi *et al.*, 1993; Coelho *et al.*, 2012; Coelho, Bocca, & Casadevall, 2014).



**Figura 3:** Imagens da cápsula polissacarídica do fungo *C. neoformans* obtidas através de microscopia ótica com contraste de tinta nanquim (A) e microscopia eletrônica de varredura (B) (Adaptado de Zaragoza *et al.*, 2009).

Para obter informações do tamanho da cápsula polissacarídica utiliza-se a técnica de visualização de microscopia de campo claro com auxílio da tinta nanquim. A cápsula não é corada pela tinta devido a sua característica altamente hidrofílica, criando um contraste ao ser iluminada e formando um halo branco ao redor do corpo celular. Esse halo pode ser então medido manualmente ou com auxílio de aplicativos (software) como o ImageJ ou Item (Maxson *et al.*, 2007 apud Anna, 1979; Dragotakes & Casadevall, 2018).

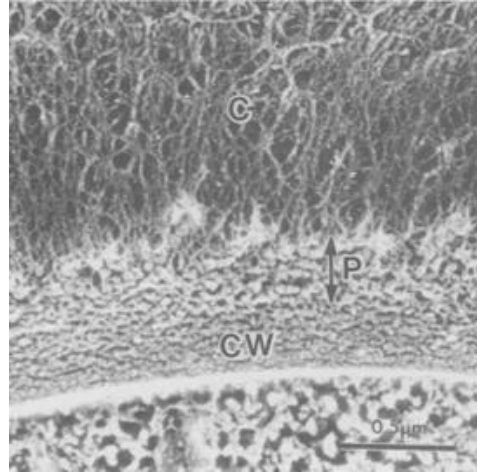
A cápsula de *C. neoformans* é composta majoritariamente por dois principais polissacarídeos: glucuronoxilomanano (GXM) ( $1,7-7 \cdot 10^6$  KDa) 90-95% e galactoxilomanano 5-8% (GalXM) ( $1 \cdot 10^5$  KDa), e uma proporção muito menor de manoproteína, ácido hialurônico e ácido siálico (Cherniak & Sundstrom, 1994; McFadden, De Jesus & Casadevall, 2006; Gilbert, Lodge & Specht, 2011); entretanto, cerca de 90% do peso e do volume da cápsula de *C. neoformans* vem das moléculas de água que são facilmente retidas devido ao alto teor de ácido glucurônico, componente que confere acidez a cápsula (Maxson *et al.*, 2007).



**Figura 4:** Estrutura dos principais polissacarídeos presentes na cápsula de *C. neoformans*: GXM (A) e GalXM (B). Onde azul representa manose; verde - galactose; vermelho - xilose e cinza - ácido glucurônico (Adaptado de Bose et al., 2003).

A estrutura capsular se organiza em uma camada de microfibrilas polimerizadas justamente associadas à camada mais externa da parede celular da levedura. Há também na parede celular uma camada onde ocorre o acúmulo de partículas precursoras que sintetizam os polissacarídeos capsulares. Essas partículas precursoras são acumuladas em diversas vesículas que carregam e sintetizam mais partículas precursoras. Quando, em condições *in vivo*, há o aumento no número dessas vesículas, também ocorre concomitantemente o espessamento da cápsula polissacarídica em torno da levedura (Sakaguchi *et al.*, 1993; Bose *et al.*, 2003).





**Figura 5:** Imagem de microscopia eletrônica de *Cryptococcus neoformans* feita em células fixadas onde: CW indica a parede celular; P indica a camada de acumulação de partículas e C indica a Cápsula. (Adaptado de Sakaguchi et al, 1993).

O aumento progressivo da parede celular durante a infecção também está relacionado à deposição de melanina. O acréscimo da melanina na parede celular é um importante fator protetor contra substâncias antimicrobianas produzidas pelo hospedeiro. As condições encontradas no tecido pulmonar estimulam à formação das chamadas células gigantes ou células titãs de *C. neoformans* 2 h após a infecção. As células titãs apresentam aumento na resistência a medicamentos e alteração nos padrões moleculares mais expostos. Embora seja quantitativamente significativa, nem todas as células apresentam essas alterações morfológicas, sendo assim o sistema imunológico do hospedeiro tem de enfrentar fenótipos heterogêneos durante a infecção, dificultando ainda mais a eliminação do agente patogênico (Feldmesser, Kress & Casadevall, 2001; Garcia-Rodas *et al.*, 2018; Mukaremera *et al.*, 2018; Caza & Kronstad, 2019). Após 2 a 24 h, a levedura responsiva deixará de parasitar a célula hospedeira por um processo de exocitose não lítico, ou ainda realizando a lise da célula hospedeira. Em geral, a exocitose não lítica é um processo é menos danoso, evitando iniciar uma inflamação. Entretanto, quando ocorre no tecido pulmonar, a saída de *Cryptococcus* induz uma inflamação granulomatosa (Feldmesser *et al.*, 2000; Alvarez & Casadevall 2006; Nicola *et al.*, 2011).

Um dos quadros patológicos mais característicos é a meningite criptocócica devido ao alto neurotropismo do fungo, sendo relatados aproximadamente 220.000 casos mundiais de desenvolvimento de meningoencefalite causada por *Cryptococcus* spp. por ano, o que corresponde a 180.000 mortes anuais globais (Rajasingham *et al.*, 2017). As células de

*Cryptococcus* possuem mecanismos que as permitem atravessar passivamente a barreira hematoencefálica sem gerar ativação de processos inflamatórios no hospedeiro; para isso, a levedura deve ser internalizada por células do endotélio ou fagócitos e então serem liberadas no líquido, causando a meningoencefalite. Embora característico, acredita-se que poucas células consigam atravessar essa barreira imunológica, porém uma vez superada, a levedura poderá replicar-se livremente sem o antagonismo do sistema imunológico do hospedeiro (Rajasingham *et al.*, 2017).

Uma forma de se estudar os efeitos da cápsula polissacarídica é comparar resultados obtidos ao desafiar cepas que expressem diferentes fenótipos capsulares. A cepa mutante acapsulada Cap67 é comumente utilizada como controle (Maxon *et al.*, 2007; Albuquerque *et al.*, 2014). Apesar de a cepa Cap67 demonstrar ainda ser capaz de produzir os epítopos precursores da GXM (Feldmesser, Kress & Casadevall, 2001), a mesma não costuma apresentar virulência em um hospedeiro imunologicamente responsivo (Chang & Kwon-Chung, 1994; Fromtling, Shadomy & Jacobson, 1982; Maxon *et al.*, 2007). Existem ainda isolados hiper capsulados como T<sub>1444</sub> utilizados para avaliar perfil de cepas hipervirulentas e HEC3393, que é uma cepa que expressa pouca cápsula (Barbosa *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2010). Esses fatos evidenciam que a cápsula do fungo *C. neoformans* é um possível alvo terapêutico devido sua importância no desenvolvimento do processo patogênico.

#### **1.4. Biofilme**

Biofilme é uma comunidade de microrganismos recoberta por uma matriz extracelular polimérica própria. Essa matriz forma uma complexa estrutura tridimensional composta por (glico)proteínas, (glico)lipídios, mono e polissacarídeos, DNA extracelular, sais minerais e água. Esse “estilo de vida” fornece aos integrantes dessa comunidade maior adesão, comunicação (*quorum sensing*) proteção e resistência/tolerância a antimicrobianos, a resposta imunológica do hospedeiro e a condições de estresses ambientais; além de favorecer o processo evolutivo dos microrganismos “adeptos” e aumento da virulência (Santos *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2020).

O biofilme se inicia pela interação e adesão celular a uma superfície, podendo ser uma bancada, cateteres, utensílios de uso médico ou a camada epitelial do hospedeiro, onde irão iniciar a proliferação e formação de pequenas colônias. As células começarão então a produzir e secretar matriz polimérica extracelular. A matriz do biofilme formará uma espessa camada tridimensional junto às leveduras, formando uma espécie de rede, com capacidade de reter

moléculas como antimicrobianos, reduzindo o alcance desses compostos aos microrganismos que compõe este biofilme. Essa estrutura também apresentará canais de água, para hidratar e carrear pequenas moléculas secretadas pelos componentes desse biofilme. Após a maturação completa o biofilme inicia a fase de dispersão, onde partículas do biofilme contendo células filhas se destacarão e se dispersarão no meio possibilitando, em caso de infecção, alcançar a corrente sanguínea e colonizar outros tecidos do hospedeiro (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2012; Fanning & Mitchell, 2012; Solano, Echeverz, & Lasa, 2014; Martinez & Casadevall, 2015; Hirota *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2018; Tavares *et al.*, 2019; Dominguez *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2020).

A associação em biofilme proporciona as leveduras diferentes mecanismos de resistência a ações imunológicas e antifúngicas. Além da própria arquitetura e do revestimento de matriz extracelular, as células presentes no biofilme também aumentam a expressão de bombas de efluxo e apresentam uma maior plasticidade metabólica (Fanning & Mitchell, 2012; Sardi *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2015; Mello *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018; Dominguez *et al.*, 2019).

Por todas as razões expostas acima, o biofilme é considerado um importante fator de virulência para os microrganismos e um grande alvo a ser explorado na criação de novos fármacos antimicrobianos. Nessa via, as pesquisas atuais buscam fármacos antibiofilme capazes de inibir a formação do biofilme e desarticular o biofilme maduro (Taraszkievicz *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2018).

### **1.5. Tratamento clássico**

Embora tenhamos testemunhado diversos avanços nas últimas décadas, as terapias antifúngicas ainda demonstram defasagens no tratamento da criptococose. Na tentativa de contornar esse problema, vem sendo experimentado diversos esquemas terapêuticos. Entretanto, as atuais pesquisas estão focadas no desenvolvimento de antifúngicos voltados principalmente para os gêneros *Candida* e *Aspergillus* negligenciando importantes patógenos como *Cryptococcus* (Mendes, 2009; Santos-Gandelman, Rodrigues & Machado, 2018).

Ao analisar isolados clínicos de *Cryptococcus*, observou-se sensibilidade para a maioria dos antifúngicos tradicionais como anfotericina B, fluconazol, voriconazol e itraconazol; entretanto, observou-se também uma alta taxa já previamente resistente a 5-fluorocitosina (Bonogomin *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020); e intrinsecamente resistente à classe das equinocandinas (Feldmesser *et al.*, 2000; Denning, 2002; Maligie & Selitrennikoff, 2005). Os dados indicam que o estresse com compostos azólicos (como fluconazol) e a 5-fluorocitosina

podem estimular a expressão de genes de resistência em *C. neoformans* (Sionov *et al.*, 2010) e que cada vez mais os isolados já apresentam essa resistência antes mesmo de se iniciar o tratamento (Bonogomin *et al.*, 2018). Devido à retirada da 5-fluorocitosina de mercado brasileiro, administra-se fluconazol como substituto em território nacional (Brasil, 2012).

Ao analisar o desempenho de diversos antifúngicos clássicos na eliminação do patógeno *C. neoformans* e a consequente recuperação de pacientes hospitalizados e imunocompetentes, pode-se concluir que o tratamento de maior eficácia contra infecção por *Cryptococcus* é a administração combinada de anfotericina B com 5-fluorocitosina, sendo esta combinação ainda mais efetiva em casos de infecção pulmonar. Esse mesmo tratamento pode ser administrado também em casos de meningite criptocócica; tornando-se mais eficiente quando o tratamento se inicia o mais precocemente possível (Diamond, 1974; Bennett *et al.*, 1979; Consenso em Criptococose, 2008; Temfack *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020). Entretanto, embora mais eficiente este tratamento acarreta em grande toxicidade ao paciente podendo causar outras complicações, como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade causadas pela administração da anfotericina B e 5-fluorocitosina, respectivamente; e essas complicações poderiam agravar ainda mais o quadro dos pacientes já debilitados (Zuger, 1986; Falci, Rosa & Pasqualotto 2015; Krysan, 2015). Nesses casos mais delicados existe a alternativa de se administrar as novas variantes lipídicas, no intuito de reduzir a toxicidade para o paciente (Mendes, 2009; Falci, Rosa & Pasqualotto 2015); entretanto, essas variantes lipídicas ainda apresentam um custo muito alto, fora da realidade de diversos pacientes ou sistemas públicos de saúde pelo mundo (Ostermann *et al.*, 2014).

A criptococose é uma doença que depende do sistema imunológico do hospedeiro para alcançar a cura. Em casos de pacientes imunocomprometidos ou com imunossupressão induzida e pacientes tratados com corticoides, há perda na resposta imunológica natural do paciente, acarretando também na perda da eficácia do tratamento. Portanto, para pacientes que apresentem quadros de imunossupressão deve ser mantido o tratamento com anfotericina B até 6 meses após sanar a infecção, evitando-se uma possível recaída (Zuger 1986; Alspaugh & Granger 1991; Consenso em Criptococose, 2008; Loyse *et al.*, 2018). Porém, embora sigam adequadamente a terapia antifúngica, muitos pacientes relatam persistência da criptococose, ocorrendo à continuidade da infecção ou a reincidência mesmo após o término do tratamento (Feldmesser *et al.*, 2000; Frases *et al.*, 2008, Medzhitov, Schneider, & Soares, 2012). Isso pode sinalizar para a necessidade de novos fármacos que possam atuar tanto sozinhos como em conjunto com outras drogas a fim de aumentar a taxa de sobrevida ou buscar a cura desses

pacientes, bem como a redução da citotoxicidade dos tratamentos clássicos (Sarosi *et al.*, 1969; Diamond, 1974; Zuger, 1986; Krysan, 2015; Santos-Gandelman, Rodrigues, & Machado, 2018).

### **1.6. 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) e seus complexos metálicos**

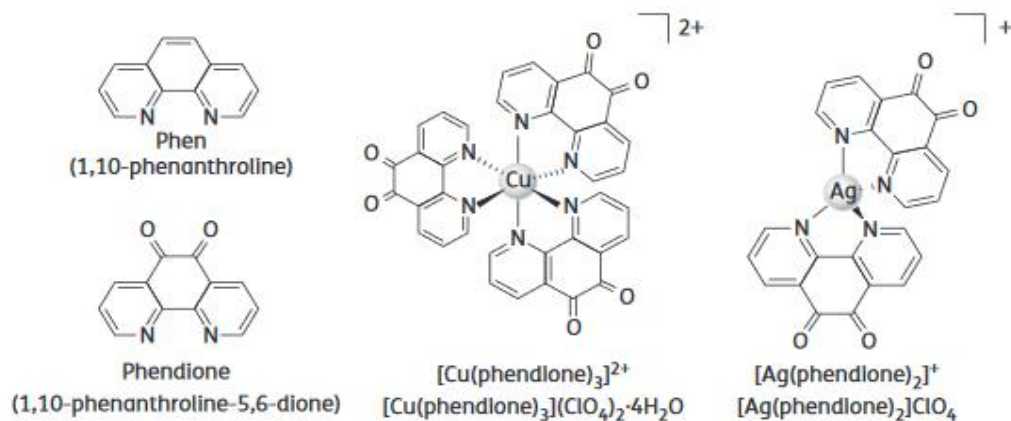
Embora haja um crescente aumento em sua incidência, as infecções fúngicas continuam sendo negligenciadas. Apesar do gênero *Cryptococcus* ser o maior causador de infecções e mortes por meningite fúngica no mundo, essa não recebe a devida importância no desenvolvimento de novos antifúngicos; sendo os existentes altamente tóxicos e prejudiciais para os pacientes, além de não serem eficazes em diversos casos, causando persistência ou reincidência da infecção, o que gera ainda mais prejuízo ao paciente, ao sistema médico e a sociedade (Falci, Rosa & Pasqualotto, 2015; Krysan, 2015; Santos-Gandelman, Rodrigues & Machado, 2018).

O desenvolvimento de novos fármacos com ação quelante pode ser uma alternativa viável no tratamento anti-*Cryptococcus*. Essa nova linha de pesquisa vem se mostrando extremamente promissora sendo capaz de alterar o metabolismo do patógeno e interferir na expressão dos fatores de virulência, possibilitando uma maior eficiência na eliminação do patógeno pelo sistema imunológico do hospedeiro. Além disso, essa abordagem não exerce tanta pressão seletiva sobre o patógeno, dificultando a seleção de microrganismos resistentes (Santos *et al.*, 2012; Allen *et al.*, 2014; Dickey *et al.*, 2017; Galdino *et al.*, 2019).

Recentemente, compostos a base de metais vem sendo estudados como alternativas farmacológicas e são considerados extremamente promissores (Warra *et al.*, 2011; Viganor *et al.*, 2015B; Galdino *et al.*, 2017). A molécula 1,10-fenantrolina (fen) e seu derivado 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) já demonstraram ter grande atividade biológica tanto *in vitro* (culturas celulares) como *in vivo* (em modelos de *Galleria mellonella* e camundongos) (McCann *et al.*, 2012). Comparada à fen, as ligações carbonil presentes na fendiona podem interagir com biomoléculas fúngicas. Além disso, a molécula de fendiona também parece participar de reações redoxes no meio intracelular e possuem atividade antitumoral (McCann, *et al.*, 2004; Deegan *et al.*, 2006)

Em busca de maior eficiência antimicrobiana e menor toxicidade, nossos colaboradores, o professor McCann e sua equipe, sintetizaram compostos à base de fendiona complexados com metais de transição, como cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e prata ( $\text{Ag}^+$ ), tendo como moléculas resultantes:  $\text{Ag}(\text{phendione})_2]\text{ClO}_4 = [\text{Ag}(\text{phendione})_2]^+$  ou (Ag-fendiona) e  $\text{Cu}(\text{phendione})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

=  $[\text{Cu}(\text{phendione})_3]^{2+}$  ou (Cu-fendiona) (McCann *et al.*, 2004). Os níveis de toxicidade destes complexos metálicos foram testados *in vivo* inoculando-se, inicialmente, em larvas de *Galleria mellonella* 10  $\mu\text{g}$  de cada composto, obtendo-se nesse ensaio uma sobrevivência de 100% das larvas tratadas para ambos os compostos. Devido ao excelente resultado, os autores decidiram testar diferentes concentrações de cada composto em camundongos, obtendo-se 100% de tolerância até 45 mg/Kg e 150 mg/Kg dos complexos de cobre e prata, respectivamente (McCann *et al.*, 2012; Gandra *et al.*, 2020).



**Figura 6:** 1,10-Fenantrolina e seus derivados. (Adaptado de Viganor *et al.*, 2015).

Fendiona e seus derivados já demonstraram ação como inibidores proteolíticos de importantes fatores de virulência produzidos por microrganismos, como *Pseudomonas aeruginosa* (Galdino *et al.*, 2017; Galdino *et al.*, 2019 B), impedindo assim a ação das proteases, enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas formando peptídeos menores ou aminoácidos (Lopez-Otín & Overall, 2002). As proteases são um perfeito alvo para o desenvolvimento de novas terapias antivirulência (Drag & Salvesen, 2010; Lopez *et al.*, 2019) devido a sua grande importância em processos metabólicos celulares, na obtenção e no processamento de nutrientes e seu protagonismo no desenvolvimento da fisiopatologia de diversos microrganismos (Turk *et al.*, 2012). Os compostos também demonstraram a capacidade de reduzir a virulência a partir da regulação da expressão dos fatores de virulência em nível genético (Galdino *et al.*, 2017; 2019 B).

Quando usados como inibidor de fatores de virulência, é recomendado que  $[\text{Cu}(\text{phendione})_3]^{2+}$  e  $[\text{Ag}(\text{phendione})_2]^+$  sejam aplicados de forma conjunta com outros

fármacos clássicos, garantindo e potencializando a eliminação completa dos agentes patogênicos (Kellett *et al.*, 2013; Granato *et al.*, 2017).

Os compostos também demonstraram atividade antimicrobiana não só contra células planctônicas, mas também contra células associadas ao biofilme bacteriano. Em alguns casos mostraram uma capacidade inibitória maior do que a dos antibióticos convencionais (Viganor *et al.*, 2015B; Gandra *et al.*, 2017). A capacidade de desarticulação de biofilmes pelos derivados da fendiona mostrou-se ser dose-dependente, abrindo a possibilidade de ser utilizado também como um pré-tratamento de cateteres ou ainda como uma solução de limpeza de utensílios hospitalares (Viganor *et al.*, 2015A).

Os derivados da fendiona também demonstraram atividade contra o fungo filamentosso *Phialophora verrucosa* inibindo sua transição morfológica e reduzindo a produção de esteróis (Granato *et al.*, 2017). A mudança morfológica é uma etapa chave na estratégia de infecção de fungos filamentosos (Cortez *et al.*, 2008), sendo assim, o bloqueio dessa alteração é uma estratégia para impedir o processo infeccioso (Mello *et al.*, 2016).

Em linhas gerais, o complexo  $[\text{Cu}(\text{phendione})_3]^{2+}$  é mais ativo do que o  $[\text{Ag}(\text{phendione})_2]^+$ . Apenas com *C. albicans*, foi visto maior efetividade no derivado da prata (McCann *et al.*, 2004).

Existem indícios do uso do cobre na medicina de 4000 anos, sendo usado principalmente como antisséptico local em feridas (Grass *et al.*, 2011). Hoje o uso medicinal do cobre foi ampliado, ele está presente em adstringentes, antissépticos, antifúngicos, no tratamento de feridas e em dispositivos anticoncepcionais intrauterinos (Borkow & Gabbay, 2009; Vincent *et al.*, 2018; Armendariz *et al.*, 2019). Além disso, seu uso se estende também a agricultura como antimicrobianos, algicidas, pesticidas, antifúngicos e até como aditivos à ração animal (Russell *et al.*, 2005; Grass *et al.*, 2011; Barrett *et al.*, 2019). Já os íons de prata são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas, estando comumente presentes em produtos de uso tópico e na produção de novos fármacos. Também já foi demonstrada sua habilidade de desarticular biofilme bacteriano. Existem três mecanismos prováveis para explicar essa atividade dos íons de prata que são: uma possível interferência no carregamento de elétrons, ligação ao DNA e interação com as membranas celulares (Tilton & Rosenberg, 1978; Ratte, 1999; Bjarnsholt *et al.*, 2007; Gonzales-Fernandez *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2020). Compostos baseados em íons de cobre vêm sendo utilizados recentemente a fim de aprimorar terapias antitumorais, criar materiais com atividade bactericida, podendo ser mais eficaz e mais barato que o custo da prata. (Lu *et al.*, 2020; Matsushima, Shibata & Ohara, 2020). Trabalhos mais recentes também

estudam a criação de materiais utilizando ambos os íons de cobre e de prata, a fim de criar superfícies com amplo efeito antimicrobiano e que seja esteticamente atrativo; podendo ser utilizado amplamente em ambiente hospitalar (Videira-Quintela *et al.*, 2020). Além disso, o cobre e a prata também estão presentes no estudo de nanopartículas, sendo relatadas diversas alterações celulares culminando na fragmentação do material genético bacteriano (Li *et al.*, 2010; Grass *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014).



## II JUSTIFICATIVA

O crescente aumento no número de indivíduos imunossuprimidos ao redor do mundo permite o aumento de infecções por patógenos oportunistas (Perlroth, Chois & Spellberg, 2007). O fungo *C. neoformans* destaca-se como um dos principais responsáveis pelas mortes por infecções fúngicas no Brasil (De Oliveira *et al.*, 2014), sendo seu principal fator de virulência a presença de uma cápsula polissacarídica. Durante o processo de infecção, a capsula pode atuar de diferentes formas (Sakaguchi *et al.*, 1993; Monari, Bistoni, & Vecchiarelli, 2006) e a diferença de expressão capsular é relevante em qualquer teste a ser realizado. Para se estudar esses fatores é comum que sejam realizados ensaios utilizando cepas que não expressam ou superexpressam as cápsulas, permitindo assim que se possa comparar esses resultados e determinar se a expressão capsular é capaz de afetá-los (Maxon *et al.*, 2007).

Há uma defasagem de fármacos antifúngicos e estes apresentam alta toxicidade aos pacientes, sendo por vezes necessário recorrer a composições mais caras a fim de se reduzir a toxicidade (Mendes, 2009). Além disto, tem sido isolado em todo mundo cada vez mais cepas que demonstram terem adquiridos novos genes de resistência aos mais diversos tipos de antimicrobianos utilizados. Sendo assim, na busca por novas alternativas, nosso grupo demonstrou a alta eficiência de compostos metálicos derivados da fendiona na inibição dos principais fatores de virulência de protozoários, bactérias e fungos. Além disso, as concentrações utilizadas nos tratamentos não exibiram toxicidade. Esses ensaios demonstram que esses compostos podem atuar de diversas formas, possibilitando o desenvolvimento de novas terapias (McCann *et al.*, 2012; Viganor *et al.*, 2015A; Galdino *et al.*, 2017).

### III OBJETIVOS

#### 1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho consiste em caracterizar a ação antifúngica dos derivados da fendiona em três isolados de *Cryptococcus neoformans*, que expressam quantidades distintas do seu principal fator de virulência, a cápsula polissacarídica.

#### 2. Objetivos específicos

- Definir a concentração mínima inibitória e a concentração mínima fungicida dos compostos testes, derivados da fendiona, para as três cepas de *C. neoformans*: Cap67 (acapsular), HEC3393 (cápsula intermediária) e T1444 (hipercapsulada).
- Examinar, possíveis alterações na estrutura da cápsula polissacarídica causado pelo tratamento com os compostos.
- Estimar os danos celulares, devido ao tratamento com os compostos, verificando a integridade da membrana plasmática.
- Analisar a capacidade do pré-tratamento com os compostos testes em afetar a formação de biofilme das três cepas.
- Avaliar a capacidade dos compostos testes na desarticulação do biofilme maduro das três cepas fúngicas.

## VI MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS

#### 1.1. Microrganismos

As amostras de *C. neoformans* foram cedidas gentilmente pelo professor Leonardo Nimrichter, Laboratório de Glicobiologia de Eucariotos, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG). Foram utilizadas três cepas de *C. neoformans* que diferem na sua expressão capsular: T<sub>1</sub>444 (sorotipo A), cepa que pode expressar uma cápsula polissacarídica mais espessa; Cap67, mutante acapsular e HEC3393 (sorotipo A), que apresenta uma expressão capsular intermediária entre as outras duas amostras (Valle, 2011; Barbosa *et al.*, 2006).

#### 1.2. Estocagem das cepas

As cepas foram estocadas em criotubos contendo 70% de meio de infusão de cérebro e coração (BHI, BD, França) e 30% de glicerol (ISOFAR) e acondicionou-se a -20 °C. Além disso, também se cultivou as células em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud dextrosado, crescido por 48 h a 37 °C.

#### 1.3. Cultivo celular

Antes de cada experimento repicou-se uma alíquota para o meio RPMI ou Sabouraud líquido, mantido a 37 °C por 48 h, a fim de promover multiplicação celular, estimular a ativação metabólica. O meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, EUA) tamponado com 0,165 M de MOPS (Sigma Aldrich, EUA) foi utilizado para promover um maior desenvolvimento capsular (O'Meara & Alspaugh, 2012; Reis *et al.*, 2019). O meio Sabouraud é composto por 20 g de glicose (ISOFAR), 10 g de peptona (NEOGEN, ACUMEDIA LAB), 7,5 g de extrato de levedura (ISOFAR MICRO MED) para cada 1 L. Para preparar Sabouraud sólido adiciona-se Bactor ágar (BD) na mesma quantidade de glicose.

### 2. COMPOSTOS

1,10-Fenantrolina-5,6-diona (fendiona), Ag[(phendione)<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>) (Ag-fendiona) e Cu[(phendione)<sub>3</sub>](ClO<sub>4</sub>).2.4H<sub>2</sub>O (Cu-fendiona) foram sintetizados de acordo com os métodos descritos anteriormente na literatura (McCann *et al.*, 2004). Os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA) a 10 mM e armazenados à temperatura ambiente no escuro.

### **3. TESTE DE SUSCETIBILIDADE E VIABILIDADE**

#### **3.1. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima fungicida (CMF).**

Para avaliar o perfil de susceptibilidade utilizou-se o método de microdiluição em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, EUA) tamponado com 0,165 M de MOPS (Sigma Aldrich, EUA), conforme descrito no protocolo M27-A3 do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2008). Nas placas de cultivo celular de 96 poços (BIOFIL, EUA) adicionou-se RPMI contendo os compostos testes (fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona) em diferentes concentrações, variando de 3,75 a 400  $\mu\text{M}$ , bem como os sais de prata e os sais de cobre ( $\text{AgNO}_3$  e  $\text{CuSO}_4$ ). A partir do crescimento fúngico (48 h) em meio Sabouraud, as colônias foram suspensas com PBS 1X estéril e ajustadas para  $10^4$  células/mL. Adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  desta suspensão final a cada poço da placa contendo 190  $\mu\text{L}$  de meio mais composto de teste. A solução PBS 10X é composta por 82 g de NaCl + 10,5 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 3,55 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , diluídos em 1 L de água destilada e pH ajustado para 7,2, para se obter PBS 1X deve-se diluir 100 mL dessa solução (10X) para 900 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , obtendo-se assim o PBS 1X. Incubou-se a placa por 48 horas a 37 °C. Considerou-se CMI a menor concentração de cada composto capaz de inibir o crescimento fúngico, conforme determinado pela ausência de turbidez visível em cada poço. Utilizou-se como controle os sistemas contendo RPMI mais suspensão fúngica, e apenas RPMI.

Para determinar a CMF, transferiu-se para placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud dextrosado uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  dos poços que não exibiram turbidez. Incubou-se as placas por 48 h a 37 °C. Considerou-se a CMF a menor concentração de cada composto que não apresentou formação de colônia.

### **4. INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA**

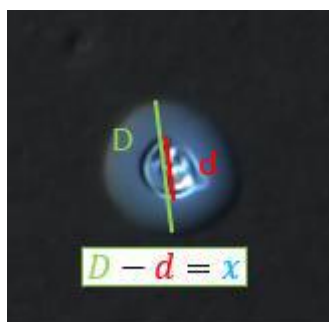
A partir do crescimento em meio Sabouraud, centrifugou-se a 12000 RPM (5,000 x g) por 3 min, descartou-se o sobrenadante e ajustou-se a concentração celular para  $10^6$  células/mL em eppendorfs com PBS 1X. Avaliou-se a integridade da membrana plasmática a partir da marcação por iodeto de propídio (PI), que se torna permeável quando a integridade da membrana está, por algum motivo, comprometida. Realizou-se o experimento com os seguintes grupos: células controles vivas (marcadas ou não com PI), células autoclavadas e marcadas PI e células tratadas (fendiona; Cu-fendiona ou Ag-fendiona), nas concentrações de  $\frac{1}{2} \times \text{CMI}$ ; CMI

e 2×CMI e marcadas com PI. Após o tratamento, incubou-se as células por 24 h a 37 °C na ausência de luz. Após esse período lavou-se o sistema com PBS, ressuspendeu-se as células em PBS estéril e incubou-se com PI na concentração de 10 µg/mL por 10 min na ausência luz. Por fim, lavou-se as leveduras com PBS 1X e observou-se em citômetro de fluxo, FACScan (Becton-Dickinson- Mountain View, CA, USA), utilizando-se o software Cell Quest versão 3.3 (Becton-Dickinson-Mountain View, CA, USA) para aquisição e analisou-se a 620 nm (Benaducci *et al.*, 2015; Keogan *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020). Utilizando os parâmetros FSC e SSC, também avaliamos o tamanho celular e a granulosidade celular, respectivamente, a partir dos dados obtidos pela análise no citometro de fluxo.

## 5. AVALIAÇÃO DO TAMANHO CAPSULAR E CORPO CELULAR

A partir do crescimento em meio RPMI 1640, tamponado com 0,165 M de MOPS, centrifugou-se a 12000 RPM (5,000 x g) por 3 min, descartou-se o sobrenadante e ajustou-se a concentração celular para 10<sup>4</sup> células em 300 µL de meio, sendo preparado uma duplicata para cada condição: controle (célula + RPMI); fendiona; Cu-fendiona ou Ag-fendiona. Para cada condição testou-se as diferentes concentrações ½×CMI; CMI e 2×CMI. Incubou-se os eppendorfs por 24 h a 37 °C na ausência de luz. Recuperou-se as células a partir da centrifugação a 12000 rpm, a 4 °C por 5 min (Eppendorf, Centrifuge 5424 R). Lavou-se as células duas vezes com água destilada e resuspendeu-se o pellet em PBS. Após isso, realizou-se a determinação do tamanho capsular em lâmina (Taxon), depositando-se uma alíquota de 2 µL de cada amostra de *Cryptococcus* e adicionou-se 3 µL de tinta Nanquim (Acrilex); por fim, levou-se para observação em Microscópio de campo claro (Nikon, eclipse E200). Utilizou-se o hardware AxioCamMRc da ZEISS para a obtenção das imagens e o software AnalySIS (Soft Image System) para análise das imagens, na Unidade de Microscopia Multiusuário do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, coordenado pela professora Fernanda de Ávila Abreu do IMPG. A análise foi realizada pelo Mestrando do Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia, Igor Taveira, que utilizou a técnica de Microscopia óptica de Contraste de Interferência Diferencial (CID). A determinação do tamanho capsular foi definida pela distância entre a parede celular e a borda externa da cápsula, conforme demonstrado pela figura 7 (Barbosa *et al.*, 2006; Maxson *et al.*, 2007 apud Anna, 1979; Dragotakes & Casadevall, 2018). Medimos 10 células de cada

grupo para obtermos a média do diâmetro capsular e do diâmetro celular utilizando o software “Item”, da Olympus.



**Figura 7:** Ilustração demonstrando como foram realizadas as medidas e o cálculo do tamanho capsular. **D** representado pelo diâmetro total (comprimento celular + comprimento capsular) obtido a partir da borda halo capsular, **d** representado o diâmetro celular, e por fim, **X** representando o comprimento capsular.

## 6. BIOFILME

### 6.1. Teste de inibição da formação do biofilme

A partir do crescimento em meio RPMI/MOPS, retirou-se uma alíquota de 1 mL, centrifugou-se a 12000 RPM (5,000 x g), descartou-se o sobrenadante e ajustou-se a concentração celular para  $10^6$  células em 300  $\mu$ L de meio RPMI/MOPS em eppendorfs, que foram incubados por 24 h a 37 °C na ausência ou na presença da fendiona ou seus derivados na concentração de  $\frac{1}{2} \times$  MIC. Em seguida centrifugou-se os eppendorfs a 12000 RPM, descartou-se o sobrenadante, resuspendeu-se as células com 200  $\mu$ L de RPMI/MOPS e distribuiu-se cada suspensão em uma placa de poliestireno de 96 poços (BIOFIL) e incubou-se por 48 h a 37°C. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e os poços lavados duas vezes com 200  $\mu$ L de PBS 1X. No final do período de incubação, a revelação foi realizada com cristal violeta (evidencia a biomassa total) e XTT (evidencia a viabilidade celular) conforme descrito abaixo (itens 6.3 e 6.4) (Peeters *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014; Viganor *et al.*, 2015A; Ventura *et al.*, 2020).

### 6.2. Teste de desarticulação do biofilme maduro

As cepas foram inoculadas em RPMI/MOPS (Sigma Aldrich, EUA) e incubadas por 48 h a 37 °C. Em seguida, centrifugou-se a 12000 RPM (5000 x g), descartou-se o sobrenadante e ajustou-se para  $10^8$  células/mL. Posteriormente, distribuiu-se 10  $\mu$ L da suspensão em placas de poliestireno de 96 poços contendo 190  $\mu$ L de meio RPMI/MOPS (BIOFIL). Após a formação

do biofilme (48 h a 37 °C), retirou-se o sobrenadante e adicionou-se os compostos aos poços em diferentes concentrações (25–800 µM) diluídos em meio RPMI/MOPS. Incubou-se então os sistemas por mais 48 h a 37 °C. No final do período de incubação, a revelação foi realizada com cristal violeta e XTT (Peeters *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014; Viganor *et al.*, 2015A; Ventura *et al.*, 2020).

### **6.3. Mensuração da biomassa do biofilme por cristal violeta**

Os sobrenadantes foram descartados e os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS 1X e aplicou-se 200 µL de metanol 99% por 15 minutos, a fim de fixar o biofilme. Após esse período, extraiu-se o sobrenadante, aguardou-se a secagem natural da placa e adicionou-se 100 µL de solução de cristal violeta (0,3% p / v) a todos os poços. Após 15 min, o excesso de cristal violeta foi enxaguado duas vezes com 200 µL de água destilada. Finalmente, após a secagem natural das placas, o cristal violeta ligado foi liberado pela adição de 100 µL de etanol 70% com álcool isopropílico 10%. A absorvância foi medida espectrofotometricamente usando um leitor de microplaca (SpectraMax M3; Molecular Devices) a 590 nm (Peeters *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014; Mello *et al.*, 2018).

### **6.4. Atividade metabólica do biofilme por XTT**

Mensurou-se a atividade metabólica do biofilme a partir de métodos de investigação colorimétricos pela redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-hidróxido de tetrazólio (XTT; Sigma-Aldrich) a formazan. Para isto retirou-se o sobrenadante e lavou-se duas vezes as células com 200 µL de PBS 1X; após a secagem natural, adicionou-se 100 µL de XTT [4 mg de XTT dissolvidos em 10 mL de PBS pré-aquecido e suplementado com 100 µL de menadiona em solução estoque (55 mg de menadiona para cada 100 µL de acetona) ] aos poços e incubou-se no escuro a 37°C por 4 horas. Após a incubação, transferiu-se para outra microplaca de 96 poços e leu-se a absorvância num leitor de microplacas (SpectraMax M3; Molecular Devices) a 492 nm para mensurar a alteração colorimétrica (Peeters *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014; Mello *et al.*, 2018).

## **7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Todos os experimentos foram realizados em duplicata ou em triplicata e foram repetidos três vezes em conjuntos experimentais independentes. Todas as análises e gráficos construídos

foram realizados e produzidos utilizando o programa Graphpad Prism v8.0.1. Em todas as análises, o p-valor de 0,05 ou inferior foi considerado estatisticamente significativo.



## V RESULTADOS

### 1. Teste de susceptibilidade e viabilidade

Para avaliar o perfil de susceptibilidade utilizou-se o método de microdiluição em meio RPMI 1640, conforme descrito no protocolo M27-A3 do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2008). Nas placas de cultivo celular de 96 poços adicionou-se RPMI contendo de 3,75 a 400  $\mu\text{M}$  dos compostos a serem testados (fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona) bem como os sais de prata e cobre ( $\text{AgNO}_3$  e  $\text{CuSO}_4$ ). Os poços que não apresentavam turbidez visível ao meio, se assemelhando aos poços controle contendo meio puro, foram considerados como as concentrações capazes de inibir o crescimento celular. Os resultados obtidos demonstraram boa capacidade inibitória de todos os compostos, não apresentando variação mediante ao fenótipo capsular das cepas de *C. neoformans*. O composto derivado de prata (Ag-fendiona) apresentou os melhores resultados, sendo a concentração de 12,5  $\mu\text{M}$  capaz de inibir o crescimento das cepas Cap67 e HEC3393 e 25  $\mu\text{M}$  da cepa T1444. Entretanto, o controle com  $\text{AgNO}_3$  mostrou o mesmo resultado, sendo possível inferir que a inibição metabólica desses dois compostos é ocasionada pela presença dos átomos de prata (Ag) (Tilton & Rosenberg, 1978; Gonzales-Fernandez *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2020). Os tratamentos com fendiona e Cu-fendiona também apresentaram bons resultados, sendo 100  $\mu\text{M}$  a maior concentração necessária para obter efeito inibitório. Já o controle com  $\text{CuSO}_3$  não apresentou capacidade inibitória em nenhuma das concentrações testadas para nenhuma das cepas.

**Tabela 2:** CIM dos compostos testes sobre diferentes cepas de *C. neoformans*.

Compostos	Cap67	HEC3393	T1444
<b>Fendiona</b>	100 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$
<b>Cu-fendiona</b>	100 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
<b>Ag-fendiona</b>	12,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$
<b><math>\text{CuSO}_4</math></b>	>400 $\mu\text{M}$	>400 $\mu\text{M}$	>400 $\mu\text{M}$
<b><math>\text{AgNO}_3</math></b>	12,5 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$

Esses dados foram utilizados então para determinar também a concentração mínima fungicida (CMF). Para isso transferimos uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  dos poços que não exibiram turbidez para placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud dextrosado e incubamos por 48 h

a 37 °C. Dessa forma, caso não houvesse crescimento fúngico na placa, significava que a concentração molar foi suficiente para exercer ação fungicida. Consideramos a CMF a menor concentração de cada composto que não apresentou formação de colônia. Os derivados metálicos (Cu-fendiona e Ag-fendiona) apresentaram uma boa atividade fungicida. O derivado da prata exerceu ação fungicida na concentração de 100 µM contra as três cepas fúngicas testadas; enquanto Cu-fendiona necessitou de 200 µM para a HEC3393 e 100 µM para as demais cepas para exercer a ação fungicida. Além disso, os compostos fendiona e o controle com AgNO<sub>3</sub> apresentaram crescimento de colônia para todas as concentrações testadas, não exibindo efeito fungicida. Esse resultado evidencia que embora a presença do átomo de prata seja suficiente para que haja inibição do metabolismo fúngico, sem estar complexado a fendiona não é capaz de exercer ação fungicida.

**Tabela 3:** CMF dos compostos testes sobre diferentes cepas de *C. neoformans*.

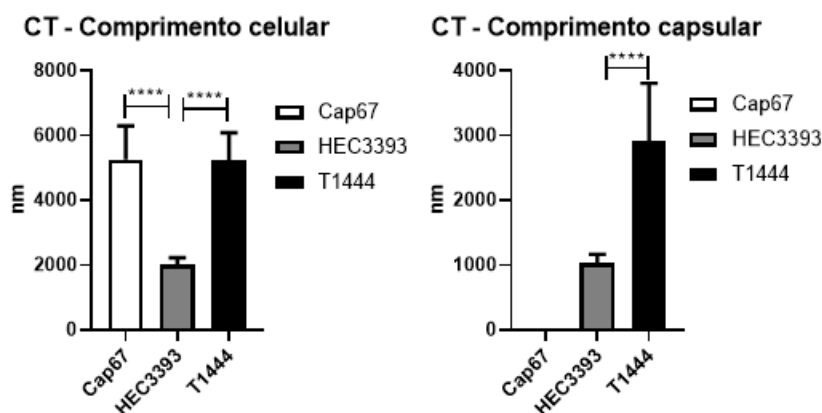
Compostos	Cap67	HEC3393	T1444
Fendiona	>400 µM	>400 µM	>400 µM
Cu-fendiona	100 µM	200 µM	100 µM
Ag-fendiona	100 µM	100 µM	100 µM
AgNO <sub>3</sub>	>400 µM	>400 µM	>400 µM

## 2. Análise da morfologia celular (cápsula e corpo celular)

Como já descrevemos, a cápsula polissacarídica é um importante alvo terapêutico. Portanto, buscamos observar, por microscopia de campo claro, alterações na expressão fenotípica do principal fator de virulência do fungo *C. neoformans*. Esse experimento inicial consiste na visualização e comparação da espessura capsular a partir da diferença em seu diâmetro conforme descrito anteriormente na metodologia.

Ao analisar os resultados expressos pela figura 8 foi possível confirmar pelas imagens obtidas que a cepa Cap67 não apresentava revestimento capsular, apesar de seu volume total se assemelhar ao apresentado pela cepa HEC3393. Embora apresente um revestimento por uma cápsula polissacarídica, a HEC3393 possui um comprimento celular diminuto (descontando o volume capsular) se comparado com as outras duas cepas. Também foi possível confirmar que a cepa T1444 apresenta um revestimento capsular médio 3 vezes maior que o expresso pela

cepa HEC3393; e observamos que seu comprimento celular (descontando o comprimento capsular) é similar ao da cepa Cap67.



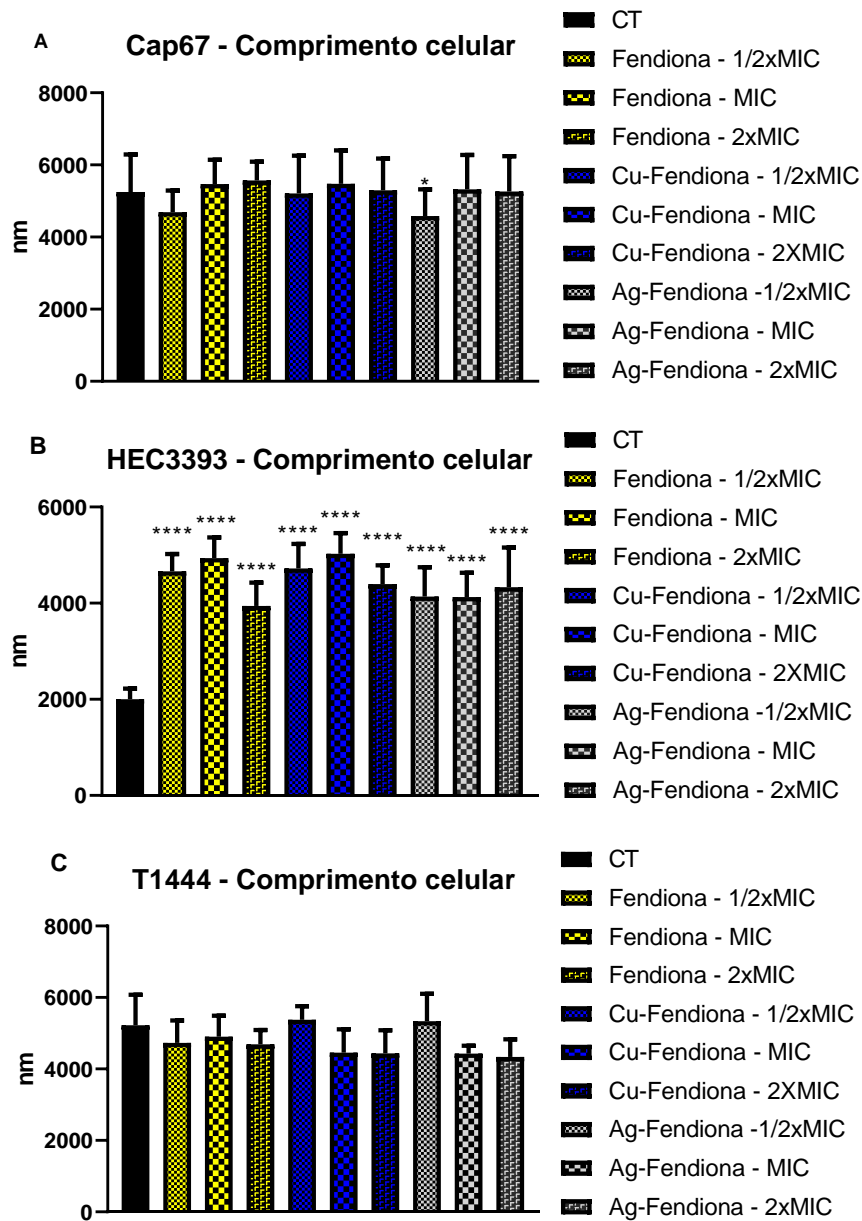
**Figura 8:** Comprimento celular (descontando o comprimento capsular) à esquerda, e o comprimento capsular à direita, das cepas - Cap67, HEC3393 e T1444. (\*\*\*\*) indica p-valor < 0,0001 (one-way ANOVA, Sidak's multiple comparison test) e determina a significância da diferença do comprimento celular e comprimento capsular. O resultado é demonstrado pela média +/- desvio padrão de 30 células distintas.

Ao submeter às células ao tratamento com os compostos, pôde-se observar que a cepa Cap67 (figura 9 A) apresentou uma pequena redução no comprimento celular no tratamento com  $\frac{1}{2} \times \text{CMI}$  de Ag-fendiona, não apresentando qualquer alteração significativa no comprimento para os outros grupos.

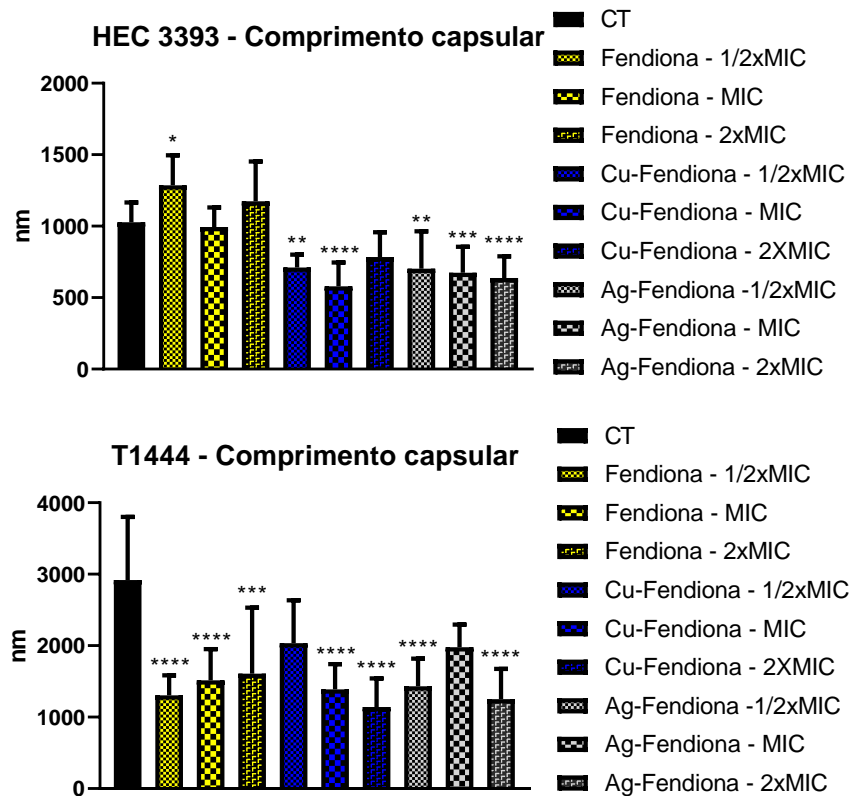
Comparando com seu controle, a cepa HEC3393 dobrou o tamanho celular nos grupos tratados (figura 9 B), não apresentando alterações significativas entre os tratamentos. Entretanto, analisando a figura 10 A observamos que enquanto o tratamento com  $\frac{1}{2} \times \text{CMI}$  de fendiona estimulou a expressão capsular, os grupos tratados com os Cu-fendiona e Ag-fendiona apresentaram redução na expressão capsular. A redução capsular mais significativa foi vista nos tratamentos com Cu-fendiona, na CMI, e com Ag-fendiona a 2x CMI.

O comprimento celular da cepa T1444 (figura 9 C) não apresentou qualquer variação significativa. Entretanto, o comprimento capsular (figura 10 B) foi significativamente reduzido para quase todos os tratamentos que esta cepa foi submetida. Ao tratarmos fendiona, a  $\frac{1}{2} \times \text{CMI}$ , reduzimos cerca de metade da expressão capsular; entretanto, embora ainda tenha permanecido menor que do grupo controle, o comprimento capsular foi gradualmente elevado nas concentrações seguintes (CMI e 2x CMI da fendiona). O tratamento com Ag-fendiona demonstrou grande efetividade na redução capsular, entretanto, os grupos tratados com  $\frac{1}{2} \times \text{CMI}$  e 2x CMI apresentaram maior efetividade que o tratamento a CMI, que não apresentou redução

capsular significativa. Os grupos tratados com CMI e 2x a CMI de Cu-fendiona também apresentaram uma inibição significativa na expressão capsular.



**Figura 9:** Alteração do comprimento celular (descontando o comprimento capsular) das cepas Cap67, HEC3393 e T1444 frente ao tratamento com os compostos fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona em diferentes concentrações. (\*) indica p-valor entre 0,05-0,009 e (\*\*\*\*) indica p-valor < 0,0001 e (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test) e determina a significância da diferença do comprimento celular. O resultado é demonstrado pela média +/- desvio padrão de 30 células distintas.



**Figura 10:** Alteração do comprimento capsular das cepas HEC3393 e T1444 frente ao tratamento com os compostos fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona em diferentes concentrações. (\*) indica p-valor entre 0,05-0,009; (\*\*) entre 0,009-0,0009; (\*\*\*) entre 0,0009-0,0001 e (\*\*\*\*) < 0,0001 (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test) e determina a significância da diferença do comprimento capsular. O resultado é demonstrado pela média +/- desvio padrão de 30 células distintas.

### 3. Integridade da membrana plasmática

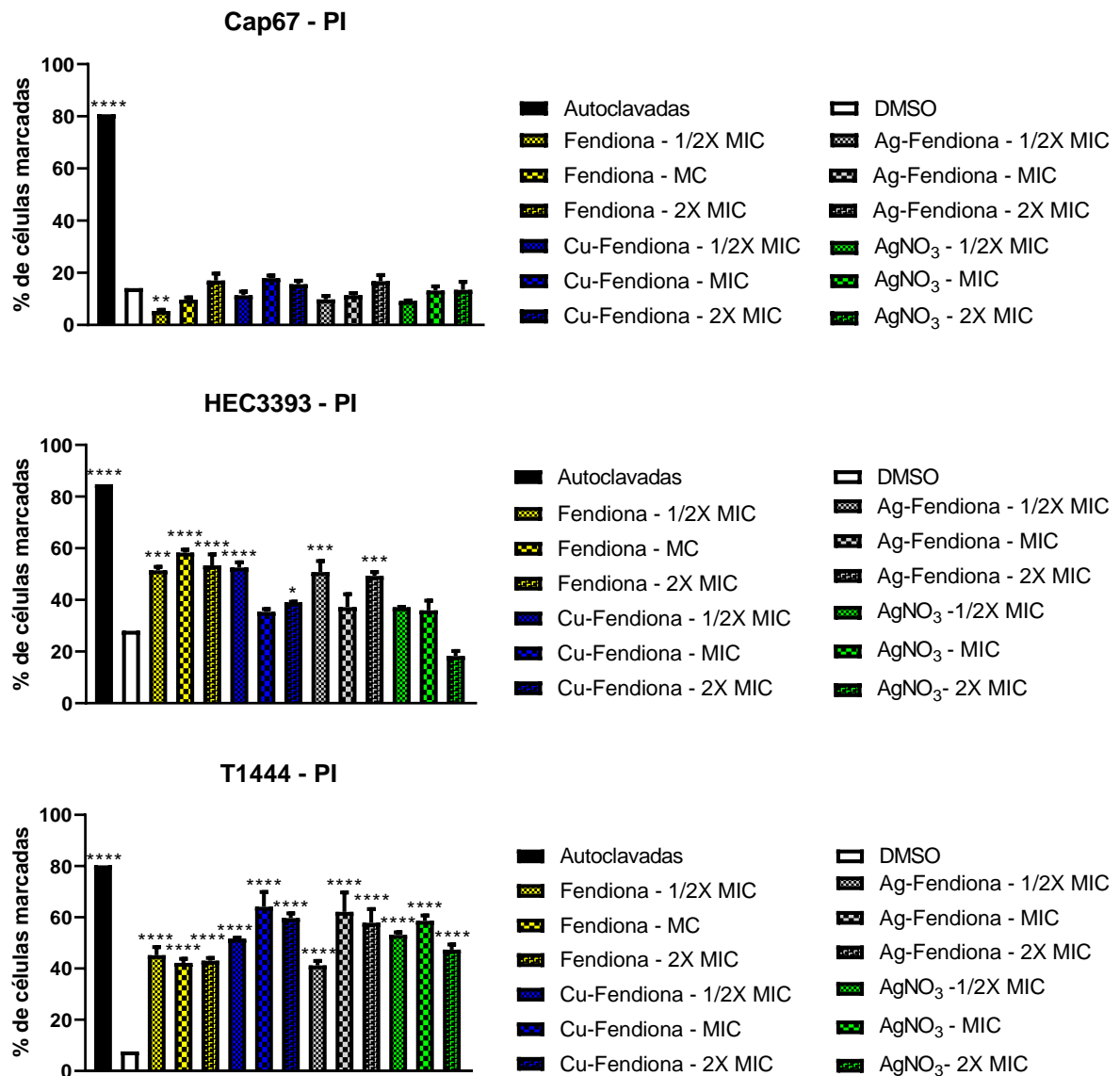
Um possível dano celular que os compostos podem causar é o comprometimento da integridade da membrana plasmática. Para avaliar o dano à membrana plasmática utilizamos a técnica de incorporação passiva do PI (iodeto de propídeo). Células que apresentem dano na membrana plasmática tornam-se permeáveis a passagem desse marcador que poderá ser visualizado posteriormente em um citômetro de fluxo a 636 nm.

Ao analisar os resultados obtidos podemos observar que a cepa Cap67 não apresentou perda da integridade da membrana plasmática ao ser submetida aos tratamentos, apresentando a mesma porcentagem de células marcadas por PI no grupo tratado com 10  $\mu$ L de DMSO e nos demais tratamentos, sem alteração significativa.

Para HEC3393, nós observamos que, ao comparar com o grupo tratado com DMSO, há um aumento geral na porcentagem de células marcadas nos grupos tratados com todos os

compostos, com exceção do  $\text{AgNO}_3$  que não apresentou aumento significativo. Entretanto, na contramão do que esperávamos, podemos observar que o número de células marcadas diminuiu nas CMI dos compostos Cu-fendiona e Ag-fendiona, e torna a aumentar ao tratarmos com 2x a CMI.

Ao tratarmos a T1444, todos os grupos demonstraram um aumento muito significativo na porcentagem de células marcadas com PI, comparando com as células tratadas apenas com  $10 \mu\text{M}$  DMSO, incluindo o tratamento com nitrato de prata. Permitindo-nos concluir que esta cepa foi mais susceptível a perda da integridade da membrana plasmática.



**Figura 11:** Porcentagem de células marcadas por PI das células tratadas ou não por fendiona, Ag-fendiona, Cu-fendiona ou AgNO<sub>3</sub> em diferentes concentrações. (\*) indica p-valor entre 0,05-0,009; (\*\*) entre 0,009-0,0009; (\*\*\*) entre 0,0009-0,0001 e (\*\*\*\*) < 0,0001 (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test) e determina a significância da diferença da porcentagem de células marcadas por PI do grupo controle tratado com DMSO para os outros tratamentos. O resultado é demonstrado pela média +/- desvio padrão de 3 análises distintas.

Comparamos também os dados de tamanho e granulosidade celular, indicados pelo citômetro, do grupo tratado apenas com DMSO com os demais tratamentos. Pudemos perceber que o tamanho da cepa Cap67 (909,7 UAF) reduz drasticamente ao tratar com o valor da CMI de fendiona (664,5 UAF), enquanto todos os outros tratamentos não foram capazes de alterar significativamente seu tamanho celular. O mesmo foi observado com a granulosidade da Cap67, onde apenas o tratamento com fendiona foi capaz de causar alteração significativa (de 81 para

61,7 UAF). Já a cepa HEC393 mostrou-se ter o menor tamanho celular das três cepas. Esse tamanho aumentou consideravelmente ao ser tratada com Ag-fendiona, sendo a responsável pelo maior aumento celular (de 85 para 216 UAF). Além disso, também pudemos observar um pequeno aumento significativo nos tratamentos por fendiona (171 UAF) e Cu-fendiona (189 UAF). Observamos que o tratamento por todos os compostos aumentou a granulosidade celular desta cepa, sendo o tratamento por  $\frac{1}{2}$  CMI de fendiona o responsável pelo maior aumento dessa característica (6,1 para 31,2 UAF). Enquanto isso, a cepa T1444 mostrou uma drástica redução de tamanho ao ser desafiada por qualquer composto, sendo o nitrato de prata a  $2\times$ CMI o responsável pela maior redução celular (194,2 para 125,1 UAF). Já a granulosidade não demonstrou variação significativa em nenhum dos tratamentos realizados.

**Tabela 4:** Tabela comparando o tamanho celular das cepas Cap67, HEC3393 e T1444 tratadas com DMSO com os demais tratamentos. A unidade de medida dos números é dada em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF). (\*) indica p-valor entre 0,05-0,009; (\*\*) entre 0,009-0,0009; (\*\*\*) entre 0,0009-0,0001 e (\*\*\*\*)  $< 0,0001$  (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test) e determina a significância da diferença do tamanho celular. O resultado é demonstrado pela média  $\pm$  desvio padrão da triplicata de  $10^5$  células distintas.

	Tamanho (FSC)			
	Cap67	HEC3393	T1444	
Controle	909,7	95,9	194,2	
Fendiona	$\frac{1}{2}\times$ CMI	$934,8 \pm 19$	$167,9 \pm 5,8^*$	$163,6 \pm 1$
	CMI	$859,1 \pm 7,1^{****}$	$171,0 \pm 17^*$	$178,5 \pm 11,5$
	$2\times$ CMI	$664,5 \pm 26,4^{***}$	$154,1 \pm 13$	$146,9 \pm 2,3^{**}$
Cu-fendiona	$\frac{1}{2}\times$ CMI	$930,2 \pm 3,1$	$189,4 \pm 8,2^*$	$161,4 \pm 5^*$
	CMI	$937,6 \pm 10$	$105 \pm 8$	$199,1 \pm 5,1$
	$2\times$ CMI	$936,1 \pm 8,6$	$108,8 \pm 12$	$184,3 \pm 6,5$
Ag-fendiona	$\frac{1}{2}\times$ CMI	$945,3 \pm 12,2$	$216,7 \pm 41^{***}$	$155,2 \pm 18^*$
	CMI	$915,7 \pm 0,08$	$200,6 \pm 13,5^{**}$	$160,2 \pm 4^*$
	$2\times$ CMI	$912,6 \pm 26,5$	$166,3 \pm 11,8^*$	$152,7 \pm 2,8^*$
AgNO <sub>3</sub>	$\frac{1}{2}\times$ CMI	$945,6 \pm 2,6$	$107,1 \pm 0,3$	$136,3 \pm 2,4^{***}$
	CMI	$910,2 \pm 13$	$154,5 \pm 17$	$152,3 \pm 12,2^{**}$
	$2\times$ CMI	$884,4 \pm 6,5$	$107 \pm 4$	$125,1 \pm 9^{****}$



**Tabela 5:** Tabela comparando a granulosidade celular das cepas Cap67, HEC3393 e T1444 tratadas com DMSO com os demais tratamentos. A unidade de medida dos números é dada em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF). (\*) indica p-valor entre 0,05-0,009; (\*\*) entre 0,009-0,0009; (\*\*\*) entre 0,0009-0,0001 e (\*\*\*\*) < 0,0001 (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test) e determina a significância da diferença da granulosidade celular. O resultado é demonstrado pela média +/- desvio padrão da triplicata de  $10^5$  células distintas.

		Granulosidade (SSC)		
		Cap67	HEC3393	T1444
Controle		81	6,1	15,2
Fendiona	½×CMI	64,6 ± 2,1	31,2 ± 0,2****	11,1 ± 1,8
	CMI	56,4 ± 1,3**	22,9 ± 2,4***	11,8 ± 1,8
	2×CMI	61,7 ± 8*	23,3 ± 1,6**	9,6 ± 0,5
Cu-fendiona	½×CMI	74,4 ± 0,6	21,7 ± 0,7**	17,4 ± 2,2
	CMI	86,4 ± 6,7	10,1 ± 4,6	20,9 ± 0,4
	2×CMI	65,9 ± 5,3	10,7 ± 4,2	15,7 ± 2,1
Ag-fendiona	½×CMI	78,1 ± 5	23,3 ± 2,4**	10,4 ± 3,5
	CMI	78,7 ± 3,7	25,5 ± 2,6***	10,8 ± 1,6
	2×CMI	79,4 ± 1	19,4 ± 3**	13,6 ± 0,7
AgNO <sub>3</sub>	½×CMI	83,2 ± 6,5	8,3 ± 0,2	11,4 ± 1,7
	CMI	89,1 ± 0,13	17,1 ± 6,1*	11,4 ± 0,3
	2×CMI	72,2 ± 7,5	8,1 ± 2,1	10,1 ± 0,2

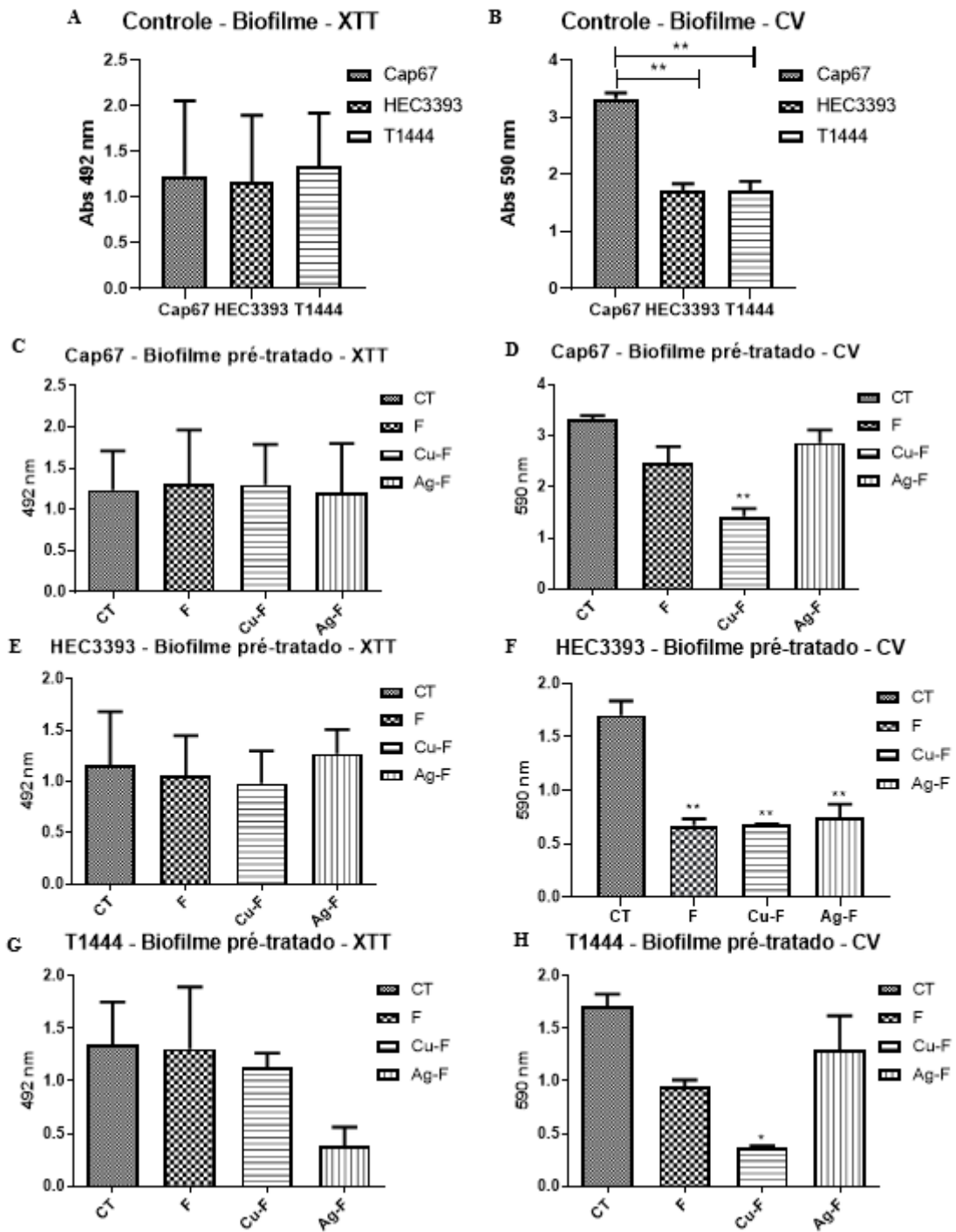
#### 4. Biofilme

Biofilme é um importante fator de virulência em diversos microrganismos, possibilitando aumento da resistência no tratamento antifúngico, maior proteção contra a resposta imune do hospedeiro, comunicação celular e troca de material genético (Santos *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2020). Essas razões mostram que o biofilme é um importante alvo terapêutico a ser explorado (Silva *et al.*, 2018). Buscamos então verificar a ação antibiofilme dos nossos compostos e, para isso, existem duas principais vias de tratamentos a serem avaliadas: a capacidade dos compostos em inibir a formação de um biofilme após o pré-tratamento das células planctônicas; e a capacidade de desarticular um biofilme maduro a partir do tratamento com os compostos metálicos.

##### 4.1. Inibição da formação de biofilme

Podemos observar pela figura 12A que todas as cepas estavam igualmente metabolicamente ativas, e que a cepa Cap67 foi a maior formadora de biofilme no período de 48 horas (figura 12B). A cepa HEC3393 e a T1444 não demonstraram diferenças significativas entre si na formação de biomassa nesse mesmo período (figura 12B).

Analisamos então a capacidade dos compostos de inibirem a formação de biofilme em células pré-tratadas com fendiona e seus derivados. Podemos observar que nenhum dos compostos foi capaz de reduzir significativamente a atividade metabólica de nenhuma das três cepas testadas (figura 12 C, E e G). Entretanto, o pré-tratamento com o composto Cu-fendiona foi capaz de inibir significativamente a formação de biomassa de todas as cepas (figura 12 D, F e H). A fendiona e a Ag-fendiona só mostraram atividade significativa contra a HEC3393 (figura 12F), onde ambos os compostos apresentaram inibição significativa.

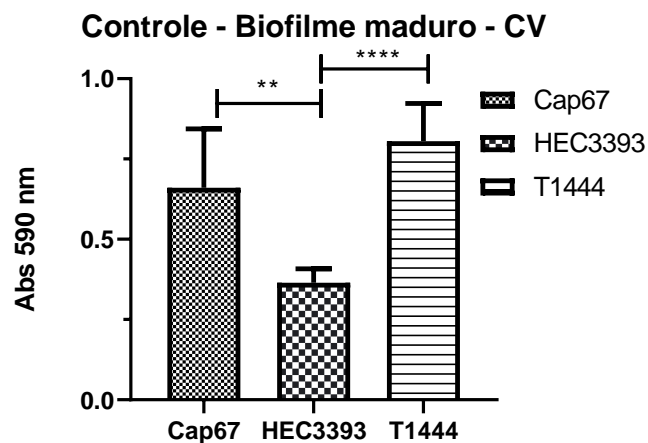


**Figura 12:** Mensuração da biomassa (direita) e de atividade metabólica (esquerda) onde: A e B comparamos os biofilmes não tratado das três cepas; C e D comparamos a inibição da formação de biofilme das cepas Cap 67; E e F da HEC3393 e na G e H da T1444. (\*) indica p-valor entre 0,05-0,009 e (\*\*) entre 0,009-0,0009 (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test) e determina a significância da inibição metabólica ou da biomassa formada após as células serem pré-tratadas. O resultado é demonstrado pela média +/- desvio padrão de 3 duplicatas distintas.

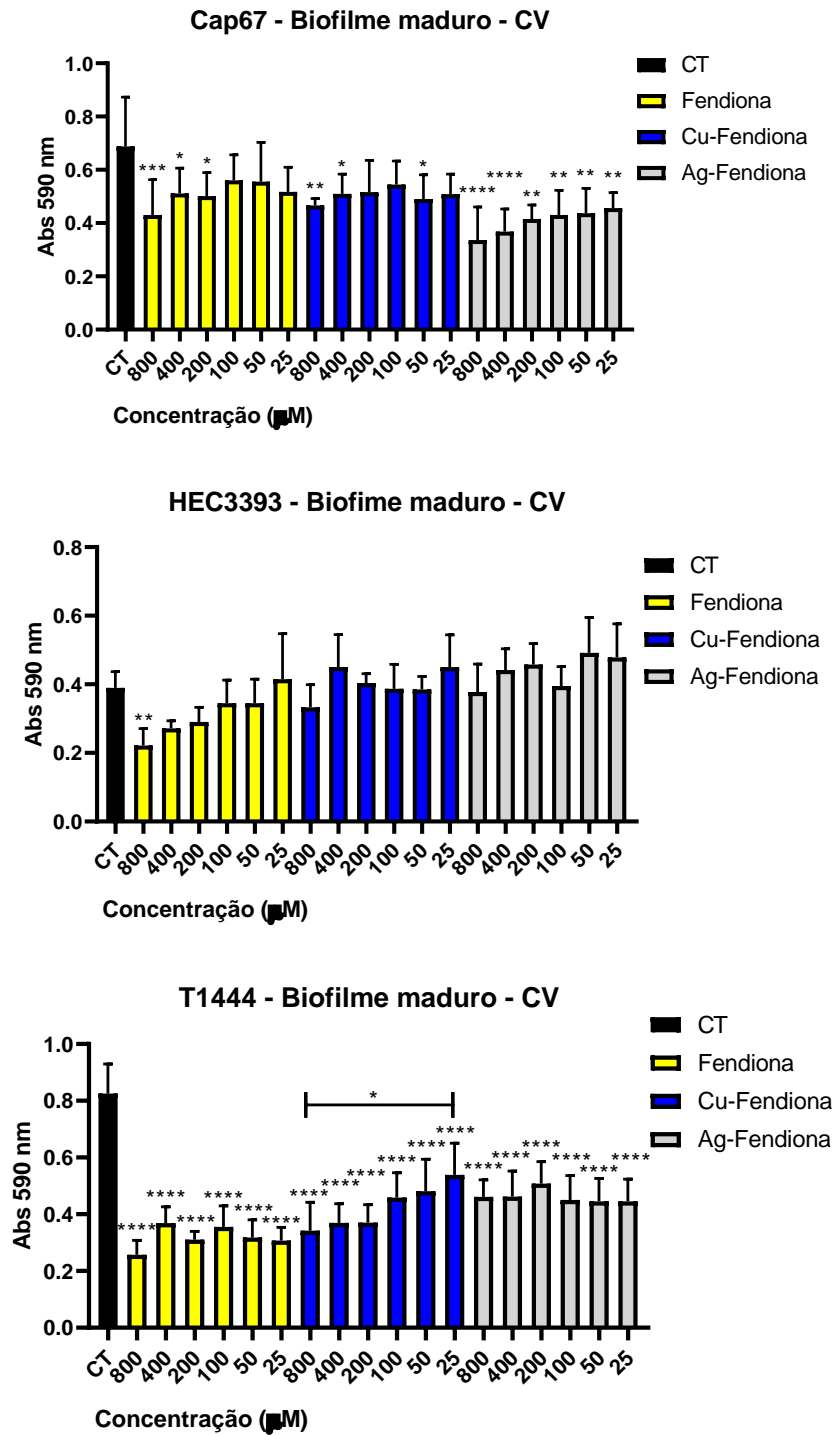
#### 4.2. Teste de desarticulação do biofilme maduro

Para analisar a capacidade dos compostos de desarticular um biofilme maduro, formamos um biofilme em RPMI sem tratamento por 48 horas e então substituímos os meios por meios contendo diferentes concentrações dos compostos de tratamento.

Após analisarmos o resultado da figura 13, podemos observar que o biofilme da cepa T1444 foi o que desenvolveu maior a biomassa, acompanhado pela Cap67 e em seguida a cepa HEC3393. Embora a biomassa da Cap67 não tenha sido significativamente diferente da apresentada pela cepa T1444, a biomassa produzida pela T1444 foi mais significativa que da Cap67 se comparados com a biomassa da cepa HEC3393. Os resultados demonstrados na figura 14 nos apontam que todos os compostos testados tiveram eficiência na desarticulação do biofilme da Cap67, onde as concentrações mais altas mostraram as inibições e o composto Ag-fendiona teve a capacidade inibitória mais significativa se comparado com outros tratamentos nas mesmas concentrações. Ao desafiar o biofilme da HEC3393, apenas a fendiona, na maior concentração testada, apresentou inibição significativa. Já contra a cepa T1444, a maior formadora de biofilme, todos os compostos apresentaram grande redução da biomassa em todas as concentrações de tratamento; e dentro dos grupos de tratamentos, a concentração de 800  $\mu\text{M}$  mostrou-se significativamente mais eficiente do que a de 25  $\mu\text{M}$ . Os dados sugerem que a redução da biomassa pode estar ligada ao aumento da concentração testada.



**Figura 13:** Biomassa do biofilme maduro não tratado das três cepas de *C. neoformans* (Cap67, HEC3393 e T1444). (\*\*) indica p-valor entre 0,009-0,0009 e (\*\*\*\*) < 0,0001 (one-way ANOVA, Sidak's multiple comparison test) e determina a significância da diferença da absorbância a 590 nm que avalia a biomassa formada. O resultado é demonstrado pela média +/- desvio padrão de 3 duplicatas distintas.



**Figura 14:** Mensuração da biomassa do biofilme maduro das cepas Cap 67 (primeiro gráfico), HEC3393 (gráfico do meio) e T1444 (último) tratados por fendiona, Cu-fendiona ou Ag-fendiona em diferentes concentrações. (\*) indica p-valor entre 0,05-0,009; (\*\*) entre 0,009-0,0009; (\*\*\*) entre 0,0009-0,0001 e (\*\*\*\*) < 0,0001 (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test) da absorbância a 590 nm que avalia a biomassa formada. O resultado é demonstrado pela média +/- desvio padrão de 3 duplicatas distintas.

## VI DISCUSSÃO

Contabiliza-se cerca de 1 milhão de mortes por infecções fúngicas invasivas por ano e um crescente aumento no número dessas infecções nas últimas décadas, sendo, em 2014, a criptococose a principal infecção sistêmica em território brasileiro com taxa de mortalidade de 34%. E enquanto o avanço da medicina proporciona o aumento da longevidade populacional, aumento no número de transplantes efetuados e maior sobrevivência dos pacientes acometidos por SIDA ou outros imunocomprometimentos, as infecções fúngicas continuam sendo negligenciadas pelos agentes de saúde ao redor do mundo (Perlroth, Chois & Spellberg, 2007; Armstrong-James, Meintjes & Brown, 2014; De Oliveira *et al.*, 2014; Saijo *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2019). Esse quadro proporciona as condições perfeitas para disseminação da criptococose, que além de ser intrinsecamente resistente a classe das equinocandinas (Feldmesser *et al.*, 2000; Denning, 2002; Maligie & Selitrennikoff, 2005) e da alta toxicidade das drogas disponíveis (Falci, Rosa & Pasqualotto 2015; Krysan, 2015), vem sendo relatado isolados clínicos resistentes a terapia antifúngica clássica; o que eleva o custo dos tratamentos e pode não ser suficiente para sanar a infecção (Lai *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2020). O conjunto desses fatores evidencia a necessidade pela busca de novos fármacos que auxiliem o tratamento contra o fungo *C. neoformans* (Sarosi *et al.*, 1969; Diamond, 1974; Zuger, 1986; Krysan, 2015).

Na busca por compostos promissores, decidimos testar os derivados metálicos da fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona. Ambos compostos de coordenação já haviam demonstrado forte ação bactericida e fungicida (Viganor *et al.*, 2015A; Viganor *et al.*, 2015B; Mello *et al.*, 2016; Galdino *et al.*, 2017; Gandra *et al.*, 2017; Granato *et al.*, 2017; Galdino *et al.*, 2019 B; Lopez *et al.*, 2019), além de possuírem uma baixa toxicidade nos modelos de *Galleria mellonella* (*in vivo*), células de mamíferos (*in vitro*) e camundongos (*in vivo*) (McCann *et al.*, 2012; Gandra *et al.*, 2020).

Nesse sentido, buscamos avaliar pela primeira vez a ação inibitória e fungicida da Ag-fendiona e do Cu-fendiona contra a espécie *C. neoformans*. Após 48 h, podemos observar que ambos os compostos demonstraram forte capacidade inibitória em concentração molar que não apresentaram toxicidade nos modelos de *G. mellonella*, células humanas e em camundongos (McCann *et al.*, 2012; Gandra *et al.*, 2020). Além disso, podemos observar que o composto Ag-fendiona apresentou maior atividade em menor concentração se comparado com a Cu-fendiona (tabela 2); essa maior eficácia no composto derivado da prata, embora incomum, foi observada anteriormente também em ação antifúngica contra células planctônicas de *Candida albicans*,

*Candida haemulonii* e *Pseudallescheria boydii* (McCann *et al.*, 2004; Gandra *et al.*, 2017). O composto de prata também apresentou ação em menor concentração que outros compostos de coordenação já testados na literatura como alguns derivados de enxofre, ouro (I); mostrando assim ser mais promissor e menos tóxico do que outros compostos já descritos (Hanafy *et al.*, 2007; Dennis *et al.*, 2019).

Entretanto, ao analisar a atividade antifúngica dos compostos, podemos observar que a Cu-fendiona apresentou valores muito próximos aos de inibição metabólica. Vale ressaltar que, embora o sal de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) tenha demonstrado capacidade de inibir o metabolismo das células de *C. neoformans* nas mesmas concentrações que a Ag-fendiona, este não demonstrou qualquer atividade fungicida dentro das concentrações testadas (>400 mM). Esse desempenho já havia sido relatado em testes anteriores contra o complexo *Candida haemulonii* onde o sal de prata demonstrou elevada CMI com valores semelhantes aos encontrados com a Ag-fendiona (Gandra *et al.*, 2017). Esses dados ressaltam a elevada ação antifúngica da prata, sendo assim um excelente material para fabricar ou revestir utensílios de uso hospitalar.

Diante destes resultados, buscamos avaliar se os compostos seriam capazes de causar danos às estruturas celulares, uma vez que estudos anteriores relataram essa ação pela 1,10-fenantrolina contra *C. albicans*, *P. verrucosa* e epimastigotas de *T. cruzi* (Lane *et al.*, 1998; McCann *et al.*, 2012; Granato *et al.* 2016). Devido a importância da cápsula polissacarídica para a fisiopatologia deste fungo (Monari *et al.*, 2005; Monari, Bistoni, & Vecchiarelli, 2006; Coelho *et al.*, 2012), esta foi a primeira estrutura a ser analisada. Para isto, tratamos as cepas com metade da CMI, na CMI ou duas vezes a CMI por 24 h e analisamos então se houve alteração na espessura da cápsula polissacarídica apresentada pelos grupos controles (não tratados). Estas análises foram realizadas por técnicas de microscopia ótica e as imagens obtidas foram fotografadas e então medidas o diâmetro capsular (Maxson *et al.*, 2007 apud Anna, 1979; Dragotakes & Casadevall, 2018). Ao comparar o comprimento capsular, pudemos observar que todos os tratamentos foram efetivos na redução da expressão capsular, com exceção da fendiona que aumentou a cápsula da cepa HEC3396; sendo a Ag-fendiona e a Cu-fendiona os compostos mais efetivos na redução do fator de virulência mais característico e importante desse patógeno. Além disso, pudemos avaliar que todos os tratamentos dobraram o comprimento celular da cepa HEC3393 (descontando o comprimento capsular), que apresentou o menor comprimento celular. Enquanto isso, as outras cepas não demonstraram alterações significativas no comprimento celular para nenhum dos tratamentos.

Foi demonstrado, em estudos anteriores, que células do fungo *C. neoformans* tratadas com 0,1 mM do agente quelante Phen (1,10-phenantrolina) também tinham sua expressão capsular inibida (Santos *et al.*, 2012). Esse efeito foi atribuído a ação quelante do composto, que reduzia a disponibilidade de cátions divalentes, afetando a formação da cápsula polissacarídica, como visto por Nimrichter *et al.*, em 2007 (Santos *et al.*, 2012). Embora a quelação dos cátions divalentes presentes no meio justifique também a redução da expressão capsular das células tratadas por fendiona, o efeito quelante não justifica ainda a ação dos metalocompostos que apresentam boa estabilidade e, portanto, não teriam mais a capacidade quelante (McCann *et al.*, 2004).

Em 2011, Silva *et al.*, também visualizou inibição da expressão capsular da cepa T1444 ao ser desafiada por microplusina, um peptídeo antimicrobiano. A hipótese levantada foi que a capacidade do peptídeo de quelar íons de cobre pode ter interferido na ação de alguma enzima que utilize cobre como cofator, inibindo um ou mais processos metabólicos (Silva *et al.*, 2011; Matsumoto *et al.*, 2019). Nesse sentido, trabalhos anteriores demonstraram que a Cu-fendiona e a Ag-fendiona são fortes inibidores de metalopeptidases, assim como sua molécula de origem, a 1,10-phenantrolina, e seus outros derivados metálicos (Galdino *et al.*, 2017; McCarron *et al.*, 2018; Galdino 2019)

Após observarmos a indução das alterações na expressão da cápsula polissacarídica, buscamos avaliar também a integridade da membrana plasmática, uma vez que já foi sugerido a ação da prata em comprometer a integridade do envoltório celular (Jung *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). Para isso tratamos as células com os compostos a concentração de ½ CMI, CMI e 2X a CMI. Após isso aplicamos PI para marcar as células cuja a integridade da membrana estivesse comprometida e mensuramos essa marcação por citometria de fluxo para avaliar porcentagem de células fluorescentes.

Apesar de alguns resultados esperados indicando aumento na porcentagem de células marcadas para as cepas tratadas com maior concentração dos compostos (como foi observado nos tratamentos da cepa Cap67 com a fendiona e a Cu-fendiona), alguns grupos demonstraram o inverso, ou seja, queda na marcação por PI conforme o aumento da concentração de tratamento pelos compostos (como apresentado pela cepa HEC3393 ao ser tratada com Cu-fendiona e com a CMI da Ag-fendiona). Na literatura existe a demonstração de que esse efeito se deve não à falta de permeabilidade na membrana, mas pela destruição do compartimento nuclear da célula. Esse efeito foi descrito ao tratar a cepa H99 de *Cryptococcus* com 2 a 16 mg/L de Anfotericina B por 24 horas, visualizando uma progressiva queda na porcentagem de



células marcadas por PI (Sangalli-Leite *et al.*, 2011). Acreditamos, portanto, que esse efeito pode ter ocorrido ao tratar a HEC3393 com o metalocomposto de cobre, reduzindo sua marcação por PI conforme aumentamos a concentração.

O ensaio com PI em citometria de fluxo aponta que a cepa é susceptível ao composto quando a porcentagem de células marcadas é superior a 60% do controle, como foi demonstrado com AMB em *Cryptococcus* sp. (Benaducci *et al.*, 2015). Seguindo esses parâmetros, a cepa T1444 se mostrou altamente susceptível a todos os tratamentos; a HEC3393 apresentou susceptibilidade intermediária; e a porcentagem de células marcadas da Cap67 mostrou-se baixa em todos os tratamentos realizados. Essa análise aponta que, talvez, a ausência de expressão capsular confira maior resistência a manutenção da integridade da membrana frente ao tratamento com fendiona e seus derivados metálicos. O que dialoga com a tese de que parte dos danos pode estar sendo causados junto com a regulação negativa da expressão capsular, como discutimos anteriormente.

A análise em citometria também nos forneceu dados em unidades arbitrárias de fluorescência sobre o tamanho e a granulosidade das células analisadas. Os dados fornecidos sobre o tamanho celular corroboram com o resultado obtido na microscopia, reforçando que as células da cepa HEC3393 são menores que as da cepa T1444. Entretanto, foi gerado um valor de quase 10 vezes maior para a cepa Cap67. Acreditamos que isso seja um erro e que uma nova repetição desse experimento possa corrigir este problema.

Podemos observar que a cepa HEC3393 apresentou aumento na granulosidade em grande parte dos grupos de tratamento. Cruzando esses resultados com o de microscopia óptica, que nos indicou aumento no diâmetro celular pós-tratamento em todos os grupos, podemos cogitar que o aumento da granulosidade apresentado pode estar associado a uma resposta anti-estresse, com o aumento da resposta anti-oxidativa intracelular. Esse tipo de resposta pode ser observado durante o processo de colonização do ambiente pulmonar, onde algumas células de *Cryptococcus* podem apresentar um aumento no tamanho celular como parte da adaptação ao estresse ambiental; além de maior resistência ao processo fagocítico, as células também se tornam mais resistentes ao estresse oxidativo/nitrosativo (Okagaki *et al.*, 2010; Zaragoza *et al.*, 2010; Crabtree *et al.*, 2012). Entretanto, devido uma grande diversidade, as correlações fenotípicas com *C. neoformans* ainda permanecem desconhecidas (Dal Pupo *et al.*, 2019), tornando impreciso correlacionar diferentes características fenotípicas.

A capacidade de formar biofilme é descrita como um importante fator de virulência de diversos microrganismos; além de auxiliar na evasão do sistema imunológico, também aumenta

a resistência a diversos antifúngicos e favorece a aquisição horizontal de genes de resistência (Gandra *et al.*, 2017; Mello *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018; Dominguez *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2020). Além disso, a formação de biofilme em dispositivos médicos, como cateteres, pode representar um reservatório de patógenos, liberando-os na corrente sanguínea do paciente e causando uma infecção sistêmica, agravando o quadro do paciente já debilitado (Ramos *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018; Dominguez *et al.*, 2019; Ramos *et al.*, 2020), sendo assim de extrema importância a busca por compostos capazes de impedir a formação de biofilme e/ou de desarticular um biofilme já formado sobre uma superfície. Nessa via, testamos também a capacidade dos derivados metálicos de inibirem a formação de biofilme por células pré-tratadas e de desarticularem um biofilme maduro.

Embora o pré-tratamento não tenha sido capaz de induzir qualquer alteração metabólica significativa a nenhuma das cepas, o pré-tratamento com Cu-fendiona foi capaz de inibir significativamente a formação da biomassa de todas as cepas testadas, inibindo mais de 50% da biomassa formada pelos seus respectivos controles (não tratados). A fendiona e a Ag-fendiona demonstraram atividade significativa apenas contra a cepa HEC3393, tendo valores próximos ao apresentado pelo grupo tratado com o derivado de cobre; entretanto, não inibiram a formação de biomassa de nenhuma das outras cepas. A forte ação da Cu-fendiona no pré-tratamento provavelmente se deve a sua CMI (tabela 2) ser igual ou muito próxima da CMF (tabela 3) para todas as três cepas, eliminando assim as células mais susceptíveis, o que justifica a redução na biomassa sem afetar o metabolismo celular desses grupos.

Avaliamos também o desempenho antibiofilme dos derivados metálicos frente ao biofilme maduro de *Cryptococcus*, ou seja, a capacidade dos compostos de desarticular um biofilme já formado. Ao compararmos o crescimento da biomassa dos grupos controles da figura 13 (biomassa em 48 horas) com a figura 14 (biomassa em 96 horas) podemos observar que ocorreu uma redução da biomassa apresentada por ambas as cepas no tempo de 48 horas. É descrito que a maturação do biofilme de *Cryptococcus neoformans* ocorre no período de 24-48 horas (Martinez & Casadevall, 2015), o que nos permite levantar a hipótese de que os biofilmes não tratados estivessem na etapa de destacamento parcial durante a análise, realizada em 96 horas, justificando a redução na biomassa se comparar com os controles do experimento do pré-tratamento (analisado após 48 horas).

Nossos compostos apresentaram atividade contra a cepa T1444 (hipercapsulada) e a Cap67 (acapsular), mas não foram capazes de desarticular o biofilme da cepa HEC3393, exceto pela fendiona na maior concentração testada (800  $\mu$ M). Assim como ocorrido com a HEC3393,

outros compostos testados contra biofilme maduro de *Cryptococcus* spp. também só demonstraram atividade antibiofilme em concentrações muito mais elevadas que sua CMI (Camacho & Casadevall, 2018; Krummenauer *et al.* 2019).

Ao serem testados anteriormente pela nossa equipe, os compostos Ag(phendione)<sub>2</sub>ClO<sub>4</sub> (Ag-fendiona) e Cu(phendione)<sub>3</sub>[(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O] (Cu-fendiona) também não apresentaram atividade antibiofilme satisfatória contra biofilme fúngico de algumas cepas do complexo *Candida haemulonii*, tendo sua ação antibiofilme próxima a ação da fendiona e superada pela ação de outros derivados metálicos da fendiona (Gandra *et al.*, 2017). Em adição a esses resultados, nossos dados apresentaram baixa atividade contra o biofilme maduro de *C. neoformans*, sendo por vezes próxima a atividade da fendiona ou não demonstrando atividade significativa, com algumas exceções pontuais que variaram de acordo com a cepa desafiada. Além disso, o biofilme é um fator de virulência capaz de elevar a resistência antifúngica das células aderidas por barreiras físicas da matriz extracelular e pela elevada presença de bombas de efluxo (Martinez & Casadevall, 2015; Ramos *et al.*, 2017; Camacho & Casadevall, 2018; Santos *et al.*, 2018; Kim & Eom, 2020), podendo ser estas algumas das razões para a baixa atividade dos nossos compostos contra as células que se encontram nesse estilo de vida.

Coletivamente, os dados apresentados evidenciam a forte atividade anti-*Cryptococcus* dos compostos Ag-fendiona e Cu-fendiona, sendo igualmente eficiente contra cepas mais virulentas, ou seja, hiper capsuladas. Os dados apontam para a capacidade dos compostos em inibir a virulência do fungo *Cryptococcus neoformans* por meio da redução da expressão de sua cápsula polissacarídica e pela inibição da formação de biofilme fúngico sobre a superfície de poliestireno, tornando assim esses compostos uma excelente alternativa para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas antifúngicas, cada vez mais requisitadas (Krysan, 2015; Santos-Gandelman, Rodrigues, & Machado Silva, 2018; Silva *et al.*, 2019). Nesse sentido, devido a forte atividade como inibidores de metaloproteases (Galdino *et al.*, 2017; McCarron *et al.*, 2018; Galdino 2019), seria interessante, futuramente, analisar a ação da fendiona e seus derivados quanto a inibição da *Mpr1*, uma metaloprotease altamente relevante no processo de infecção do sistema nervoso central do fungo *Cryptococcus* (Camacho & Casadevall, 2018). Sendo assim, novos estudos devem ser realizados, elucidando os mecanismos de ação desses compostos contra o fungo *Cryptococcus neoformans*, além de demonstrar sua segurança para o uso *in vivo* e avaliar as estratégias terapêuticas mais eficientes no combate a criptococose.

## VII CONCLUSÕES

- De modo geral, a Ag-fendiona e Cu-fendiona são capazes de inibir o metabolismo, exercer ação fungicida contra células planctônicas do fungo *Cryptococcus neoformans* independente do fenótipo capsular expressado pelas cepas;
- Os compostos de coordenação foram capazes de danificar a integridade da membrana plasmática apenas da HEC3393 e da T1444, sugerindo que essa ação possa estar associada a via de síntese da cápsula polissacarídica;
- O tratamento com os metalocompostos não foi capaz de reduzir o comprimento celular (descontando o comprimento capsular), mas reduziu drasticamente o comprimento capsular, conseqüentemente, tornando as células tratadas menos virulentas e, possivelmente, menos resistentes aos mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro;
- Embora o pré-tratamento com nenhum dos compostos tenha apresentado redução metabólica significativa, a Cu-fendiona foi capaz de reduzir a formação da biomassa de todas as cepas fúngicas, indicando que inibiram assim a formação do biofilme;
- Os compostos metálicos também apresentaram capacidade de desarticular o biofilme maduro das cepas Cap67 e T1444, mas não apresentaram atividades contra o biofilme da cepa HEC3393;
- Foi possível observar alteração na característica morfológica de algumas células tratadas, bem como a identificação de restos celulares citoplasmáticos presentes na lâmina;
- A cápsula polissacarídica parece não oferecer resistência ao tratamento com os compostos metálicos e os resultados sugerem que sua produção pode ser um dos alvos da ação desses compostos, além disso, a Ag-fendiona demonstrou maior efetividade contra a cepa T1444, sugerindo que a maior expressão capsular pode favorecer a ação desse composto;
- Os compostos Cu-fendiona e Ag-fendiona podem representar uma alternativa muito promissora no combate a infecções fúngicas e, em especial, uma excelente alternativa no tratamento da criptococose, sendo, claro, necessária a realização

de mais estudos a fim de elucidar os mecanismos de ação e as melhores formas de aplicação desses compostos no tratamento *in vivo*.

## VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anna, E.J. (1979). Rapid in vitro capsule production by cryptococci. *Am. J. Med. Technol.* 45, 585–588
- Aksenov, S. I., Babyeva, I. P., and Golubev, V. I. (1973). On the mechanism of adaptation of micro-organisms to conditions of extreme low humidity. *Life. Sci. Space Res.* 11,55–61.
- Albuquerque, P. C., Fonseca, F. L., Dutra, F. F., Bozza, M. T., Frases, S., Casadevall, A., & Rodrigues, M. L. (2014). *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan fractions of different molecular masses are functionally distinct. *Future Microbiology*, 9(2), 147–161. doi:10.2217/fmb.13.163
- Allen, R. C., Popat, R., Diggle, S. P., and Brown, S. P. (2014). Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 300–308. doi:10.1038/nrmicro3232
- Alspaugh & Granger. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. *Infect Immun.* 1991 Jul;59(7):2291-6.
- Alvarez, M., & Casadevall, A. (2006). Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages. *Current Biology*, 16(21), 2161–2165. doi:10.1016/j.cub.2006.09.061
- Armenderriz O.M., Quintero Y., Llanquilef, A., Morel, M., Argente, M.L., Garcia, A. (2019). Anti-biofouling and desalination properties of thin film composite reverse osmosis membranes modified with copper and iron nanoparticles. *Materials (Basel)*; 12: e2081.
- Armstrong-James D, Meintjes G, Brown GD. (2014). A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends Microbiol.* 22(3):120–127.
- Barbosa, F.M., Fonseca, F.L., Holandino, C., Alviano, C.S., Nimrichter, L. & Rodrigues, M.L. (2006). Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cell results in fungal internalization and host cell damage. *Microbes. Infect.*, 8(2): 493-502, 2006.
- Barnett, J. A. (2010). A history of research on yeasts 14:1 medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. *Yeast*, 27(11), 875–904. doi:10.1002/yea.1786
- Barrett, T.C., Mok, W.W.K., Murawski A.M., Brynildsen, M.P. (2019). Enhanced antibiotic resistance development from fluoroquinolone persists after a single exposure to antibiotic. *Nat Commun.* 10:1177
- Benaducci, T., Matsumoto, M. T., Sardi, J. C. O., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2015). A flow cytometry method for testing the susceptibility of *Cryptococcus spp.* to amphotericin B. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(3), 159–163. doi:10.1016/j.riam.2014.06.004
- Bennett, J. E., Dismukes, W. E., Duma, R. J., Medoff, G., Sande, M. A., Gallis, H., Alling, D. W. (1979). A Comparison of Amphotericin B Alone and Combined with Flucytosine in the Treatment of Cryptococcal Meningitis. *New England Journal of Medicine*, 301(3), 126–131. doi:10.1056/nejm197907193010303
- Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Kristiansen S, Phipps R, Nielsen AK, Østrup Jensen P, Høiby N, Givskov M. (2007). Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *APMIS*, 115(8), 921–928. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_646.x
- Bongomin, F., Oladele, R. O., Gago, S., Moore, C. B., & Richardson, M. D. (2018). A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. *Mycoses*, 61(5), 290–297. doi:10.1111/myc.12747
- Borkow, G., Gabbay, J. Copper. (2009). An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections. *Current Chemical Biology*; 3: 272-278.
- Bose, I., Reese, A. J., Ory, J. J., Janbon, G., & Doering, T. L. (2003). A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 2(4), 655–663. doi:10.1128/ec.2.4.655-663.2003
- Brasil. Ministério da Saúde. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais*. Brasília-DF, 2012.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A., Levitz, S.M., Netea, M.G., White, T.C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* 4,165.
- Busse O. 1894. Über parasitare Zelleinschlüsse und ihre Züchtung [About parasitic cell enclosures and their generation]. *Z Bacteriol* 16:175–180.

- Camacho, E., & Casadevall, A. (2018). Cryptococcal Traits Mediating Adherence to Biotic and Abiotic Surfaces. *Journal of Fungi*, 4(3), 88. doi:10.3390/jof4030088)
- Caza, M. & Kronstad, J.W. (2019). The cAMP/Protein Kinase a Pathway Regulates Virulence and Adaptation to Host Conditions in *Cryptococcus neoformans*. *Front Cell Infect Microbiol*. doi: 10.3389/fcimb.2019.00212.
- Chang YC, Kwon-Chung KJ. (1994) Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol*; 14:4912-9.
- Chen L C, Goldman D L, Doering T L, Pirofski L, Casadevall A. (1999) Antibody response to *Cryptococcus neoformans* proteins in rodents and humans. *Infect Immun*. 67:2218–2224.
- Cherniak R, Sundstrom JB. (1994). Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 62:1507-1512.
- Chen, J., Varma, A., Diaz, M. R., Litvintseva, A. P., Wollenberg, K. K., & Kwon-Chung, K. J. (2008). Strains and Infection in Apparently Immunocompetent Patients, China. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), 755–762. doi:10.3201/eid1405.071312
- Choi J, Vogl AW, Kronstad JW. (2012). Regulated expression of cyclic AMP-dependent protein kinase A reveals an influence on cell size and the secretion of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*85:700–715
- Coelho, Bocca, & Casadevall. (2014). The Intracellular Life of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Pathol*. 2014; 9: 219–238. doi: 10.1146
- Coelho, C. & Farrer, R.A. (2020). Pathogen and Host Genetics Underpinning Cryptococcal Disease *Adv Genet* 2020;105:1-66. doi: 10.1016/bs.adgen.2020.02.001. Epub 2020 Mar 18.
- Coelho, C., Tesfa, L., Zhang, J., Rivera, J., Gonçalves, T., & Casadevall, A. (2012). Analysis of Cell Cycle and Replication of Mouse Macrophages after *In Vivo* and *In Vitro* *Cryptococcus neoformans* Infection Using Laser Scanning Cytometry. *Infection and Immunity*, 80(4). 1467–1478. doi:10.1128/iai.06332-11
- Consensoem Criptococose. *Rev Soc Bras Med Trop*. (2008). v.41, p.524-544.
- Cortez, K. J., Roilides, E., Quiroz-Telles, F., Meletiadiis, J., Antachopoulos, C., Knudsen, T., Buchanan, W., Jeffrey Milanovich, J., Sutton, D.A., Fothergill, A., Rinaldi, M.G., Shea, Y.R., Zaoutis, T., Kottlil, S., Walsh, T. J. (2008). Infections Caused by *Scedosporium spp*. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(1), 157–197. doi:10.1128/cmr.00039-07
- Crabtree, J. N., Okagaki, L. H., Wiesner, D. L., Strain, A. K., Nielsen, J. N., & Nielsen, K. (2012). Titan Cell Production Enhances the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 80(11), 3776–3785. doi:10.1128/iai.00507-12
- Cross CE, Bancroft GJ. (1995). Ingestion of acápsular *Cryptococcus neoformans* occurs via mannose and  $\beta$ -glucan receptors, resulting in cytokine production and increased phagocytosis of the encápsulated form. *Infect Immun*.1995;63(7):.2604–11.
- Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Villagómez-Castro, J. C., Ruiz-Baca, E. (2012). *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiology* 7(6), 755–771.
- Dal Pupo, H. D., Sena, B. A. G., Reis, F. C. G., Machado, L., Fortes, S. T., de Almeida Junior, J. N., Godinho, R. M. C., Rodrigues, M. L. (2019). Polysaccharide diversity in VNI isolates of *Cryptococcus neoformans* from Roraima, Northern Brazil. *Fungal Biology*. doi:10.1016/j.funbio.2019.06.003
- Drag, M & Salvesen S. Emerging principles in protease-based drug discovery. 2010. *Nat. Rev. Drug Discov*.9, 690–701
- Dragotakes, Q., Casadevall, A. (2018). Automated Measurement of *Cryptococcal* Species Polysaccharide Capsule and Cell Body. *J. Vis. Exp.* (131), e56957, doi:10.3791/56957.
- De Oliveira, R. B., Atobe, J. H., Souza, S. A., & de Castro Lima Santos, D. W. (2014). Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome at a Reference Hospital for Infectious Diseases in Brazil. *Mycopathologia*, 178(1-2). 71–78. doi:10.1007/s11046-014-9755-3
- Denning, D. W. (2002). Echinocandins: a new class of antifungal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(6), 889–891. doi:10.1093/jac/dkf045

- Dennis, E. K., Kim, J. H., Parkin, S., Awuah, S. G., & Garneau-Tsodikova, S. (2019). Distorted Gold(I)–Phosphine Complexes as Antifungal Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01436
- Deegan, C., Coyle, B., McCann, M., Devereux, M., and Egan, D. (2006). In vitro anti-tumour effect of 1,10-phenanthroline-5,6-dione(phenidione)., [Cu(phenidione).3] (ClO<sub>4</sub>).2.4H<sub>2</sub>O and [Ag(phenidione).2] ClO<sub>4</sub> using human epithelial cell lines. *Chem. Biol. Interact.* 164, 115–125. doi: 10.1016/j.cbi.2006.08.025
- Diamond, R. D., Root, R. K., & Bennett, J. E. (1972). Factors Influencing Killing of *Cryptococcus neoformans* by Human Leukocytes In Vitro. *Journal of Infectious Diseases*, 125(4)., 367–376. doi:10.1093/infdis/125.4.367.
- Diamond & Bennett. (1973). Growth of *Cryptococcus neoformans* Within Human Macrophages In Vitro. *Infect Immun.* 1973 Feb; 7(2):. 231–236. PMC422665 PMID: 4697791
- Diamond (1974). Prognostic Factors in Cryptococcal Meningitis. *Annals of Internal Medicine*, 80(2)., 176. doi:10.7326/0003-4819-80-2-176
- Dickey, S. W., Cheung, G. Y. C., and Otto, M. (2017). Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 457–471. doi: 10.1038/nrd.2017.23
- Dominguez, E. G., Zarnowski, R., Choy, H. L., Zhao, M., Sanchez, H., Nett, J. E., & Andes, D. R. (2019). Conserved Role for Biofilm Matrix Polysaccharides in *Candida auris* Drug Resistance. *mSphere*, 4(1). doi:10.1128/mspheredirect.00680-18
- D'Souza, C. A., Alspaugh, J. A., Yue, C., Harashima, T., Cox, G. M., Perfect, J. R., & Heitman, J. (2001). Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Controls Virulence of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Molecular and Cellular Biology*, 21(9), 3179–3191. doi:10.1128/mcb.21.9.3179-3191.2001
- Ellis, D., & Pfeiffer, T. (1990). Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *The Lancet*, 336(8720). 923–925. doi:10.1016/0140-6736(90)92283-n
- Ellis DH, Pfeiffer TJ. (1990). Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol*28:1642–1644.
- Emmons CW. (1951). Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J Bacteriol*62:685–690.
- Emmons CW. (1955). Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Hyg*62:227–232.
- Evans EE. (1950). The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*: 1. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. *J Immuno* 164:423–430.
- Falci, D. R., da Rosa, F. B., & Pasqualotto, A. C. (2015). Comparison of nephrotoxicity associated to different lipid formulations of amphotericin B: a real-life study. *Mycoses*, 58(2), 104–112. doi:10.1111/myc.12283
- Fanning, S., Mitchell, A.P. (2012). Fungal biofilms. *PLoS Pathog.* 8(4):e1002585.
- Feldmesser, Kress & Casadevall, (2001). Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection, *Microbiology*. 2001 Aug;147(Pt 8):.2355–65. doi: 10.1099/00221287-147-8-2355
- Feldmesser, M., Kress, Y., Mednick, A., & Casadevall, A. (2000). The Effect of the Echinocandin Analogue Caspofungin on Cell Wall Glucan Synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(6), 1791–1795. doi:10.1086/317614
- Feldmesser, Kress, Novikoff & Casadevall, (2000). *Cryptococcus neoformans* Is a Facultative Intracellular Pathogen in Murine Pulmonary Infection. *Infect Immun.* 2000 Jul; 68(7):. 4225–4237. doi: 10.1128/iai.68.7.4225-4237.2000.
- Feng, X., Fu, X., Ling, B., Wang, L., Liao, W., & Yao, Z. (2013). Development of a Singleplex PCR Assay for Rapid Identification and Differentiation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cryptococcus gattii*, and Hybrids. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1920–1923. doi:10.1128/jcm.000
- Filiú, W. F. de O., Wanke, B., Agüena, S. M., Vilela, V. O., Macedo, R. C. L., & Lazéra, M. (2002). Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(6)., 591–595. doi:10.1590/s0037-86822002000600008



- Fonseca, F. L., Nohara, L. L., Cordero, R. J. B., Frases, S., Casadevall, A., Almeida, I. C., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L. (2010). Immunomodulatory Effects of Serotype B Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* Correlate with Polysaccharide Diameter. *Infection and Immunity*, 78(9),
- Frases S, Nimrichter L, Viana NB, Nakouzi A, Casadevall A. (2008). *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. *Eukaryot Cell* 7:319–327.
- Frases, S., Pontes, B., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., Viana, N. B., & Casadevall, A. (2009). The Elastic Properties of the *Cryptococcus neoformans* Capsule. *Biophysical Journal*, 97(4), 937–945. doi:10.1016/j.bpj.2009.04.043
- Fromtling, R. A., Shadomy, H. J., and Jacobson, E. S. (1982). Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 79(1), 23–29.
- Futatsuya, T., Anzawa, K., Mochizuki, T., Shoji, A., Hoshino, Y., & Abe, M. (2020). Disseminated cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent elderly long-term pigeon fancier. *The Journal of Dermatology*. doi:10.1111/1346-8138.15280
- Galdino, A.C.M. Mecanismos de ação anti-*Pseudomonas aeruginosa* de compostos de coordenação derivados da 1,10-fenantrolina-5,6-diona. Tese de doutorado. Instituto de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2019.
- Galdino, Branquinha, Santos, and Viganor. (2017). “*Pseudomonas aeruginosa* and its arsenal of proteases: weapons to battle the host,” in *Pathophysiological Aspects of proteases*, 1st Edn, eds S. Charaborti and N. S. Dhalla (Berlin: Springer), 381–397. doi: 10.1007/978-981-10-6141-7\_16
- Galdino, A.; Oliveira, M.P.; Ramalho, T.C.; Castro A.A.; Branquinha, M.H.; Santos, A.L.S. (2019). A Anti-Virulence Strategy against the Multidrug-Resistant Bacterial Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: Pseudolysin (Elastase B) as a Potential Druggable Target. *Current Protein and Peptide Science*, 2019, Vol. 20, No. 00 3. DOI: 10.2174/1389203720666190207100415
- Galdino, Viganor, Castro, Cunha, Mello, Mattos, Pereira, Hunt, O’Shaughnessy, Howe, Devereux, McCann, Ramalho, Branquinha and Santos (2019 B). Disarming *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by the Inhibitory Action of 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione-Based Compounds: Elastase B (LasB). as a Chemotherapeutic Target. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01701
- Gandra, R. M., Mc Carron, P., Fernandes, M. F., Ramos, L. S., Mello, T. P., Aor, A. C., Branquinha, M.H., McCann, M., Devereux, M., Santos, A. L. S. (2017). Antifungal Potential of Copper(II), Manganese(II) and Silver(I) 1,10-Phenanthroline Chelates Against Multidrug-Resistant Fungal Species Forming the *Candida haemulonii* Complex: Impact on the Planktonic and Biofilm Lifestyles. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01257
- Gandra, R. M., McCarron, P., Viganor, L., Fernandes, M. F., Kavanagh, K., McCann, M., Branquinha, M.H., Santos, A.L.S., Howe, O., Devereux, M. (2020). In vivo Activity of Copper(II), Manganese(II), and Silver(I) 1,10-Phenanthroline Chelates Against *Candida haemulonii* Using the *Galleria mellonella* Model. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.00470
- García-Rodas, R., & Zaragoza, O. (2011). Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 64(2), 147–161. doi:10.1111/j.1574-695x.2011.00871.x
- Ghaderi, Z., Eidi, S., & Razmyar, J., (2019). High Prevalence of *Cryptococcus neoformans* and Isolation of Other Opportunistic Fungi From Pigeon (*Columba livia*) Droppings in Northeast Iran *J Avian Med Surg*. 2019 Dec 9;33(4):335-339. doi: 10.1647/2018-370.
- Grass, G., Rensing, C., Ssolioz, M., Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Appl Environ Microbiol* (2011); 77: 1541–1547.
- Giacomazzi, J., Baethgen, L., Carneiro, L. C., Millington, M. A., Denning, D. W., Colombo, A. L. P., Pasqualotto, A. C. (2016). The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*, 59(3), 145–150. doi:10.1111/myc.12427
- Gilbert NM, Lodge JK, Specht CA. (2011). The cell wall of *Cryptococcus*. In *Cryptococcus*, from human pathogen to model yeast (ed. Heitman J, et al.), pp. 67–79. ASM, Washington, DC

- González-Fernández, S., Lozano-Iturbe, V., García, B., Andrés, L. J., Menéndez, M. F., Rodríguez, D., Vazquez, F., Martín, C., Quirós, L. M. (2020). Antibacterial effect of silver nanorings. *BMC Microbiology*, 20(1). doi:10.1186/s12866-020-01854-z
- Granato, M. Q., Gonçalves, D. de S., Seabra, S. H., McCann, M., Devereux, M., dos Santos, A. L. S., & Kneipp, L. F. (2016). 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione-Based Compounds Are Effective in Disturbing Crucial Physiological Events of *Phialophora verrucosa*. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00076
- Granier F, Kanitakis J, Hermier C, Zhu Y Y, Thivolet J. (1987) Localized cutaneous cryptococcosis successfully treated with ketoconazole. *J Am Acad Dermatol*. 1987; 16:243–249
- Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., Falk, R., Parmen, S., Lumbsch, H.T., Boekhout, T. (2015). Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 78, 16–48. doi:10.1016/j.fgb.2015.02.009
- Hanafy, A., Uno, J., Mitani, H., Kang, Y., & Mikami, Y. (2007). In Vitro Antifungal Activities of Sulfa Drugs against Clinical Isolates of *Aspergillus* and *Cryptococcus* Species. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 48(1), 47–50. doi:10.3314/jjmm.48.47
- Hansakon, A., Mutthakalin, P., Ngamskulrungraj, P., Chayakulkeeree, M., & Angkasekwinai, P. (2018). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* clinical isolates from Thailand display diverse phenotypic interactions with macrophages. *Virulence*. doi:10.1080/21505594.2018.1556150
- Hirota, K., Yumoto, H., Sapaar, B., Matsuo, T., Ichikawa, T., Miyake, Y. (2016). Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *J. Appl. Microbiol.*, 122(2), 321–330.
- IUBMB, Enzyme Nomenclature: recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology. 1992. Academic Press: San Diego.
- Jacobson, E. S., Tingler, M. J., & Quynn, P. L. (2009). Effect of Hypertonic Solutes Upon the Polysaccharide Capsule in *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses*, 32(1), 14–23. doi:10.1111/j.1439-0507.1989.tb02163.x
- Jung, W.K., Koo, H.C., Kim, K.W., Shin, S., Kim, S.H., Park, Y.H. (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74:2171–2178.
- Kabanda T, Siedner MJ, Klausner JD, Muzoora C, Boulware DR. (2014). Point-of-care diagnosis and prognostication of cryptococcal meningitis with the cryptococcal antigen lateral flow assay on cerebrospinal fluid. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2014; 58:113–6.
- Kellett, A., Prisecaru, A., Slator, C., Molphy, Z., and McCann, M. (2013). Metal-based antimicrobial protease inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 20, 3134–3151. doi: 10.2174/0929867311320250008
- Keogan, D. M., Oliveira, S. S. C., Sengenito, L. S., Branquinha, M. H., Jago, R. D., Twamley, B., A. L. S. Santos, Griffith, D. M. (2018). Novel antimony(III) hydroxamic acid complexes as potential anti-leishmanial agents. *Dalton Transactions*, 47(21), 7245–7255. doi:10.1039/c8dt00546j
- Kim, H., & Eom, Y. (2020). Antifungal and Anti-biofilm effects of 6-shogaol against *Candida auris*. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.14870
- Kitkungvan, D., Apisarnthanarak, A., Plengpart, P., & Mundy, L. M. (2008). Fever of unknown origin in patients with HIV infection in Thailand: an observational study and review of the literature. *International Journal of STD & AIDS*, 19(4), 232–235. doi:10.1258/ijsa.2007.007191
- Krummenauer, M. E., Lopes, W., Garcia, A. W. A., Schrank, A., Gnoatto, S. C. B., Kawano, D. F., Vainstein, M. H. (2019). A Highly Active Triterpene Derivative Capable of Biofilm Damage to Control *Cryptococcus* spp. *Biomolecules*. 2019 Dec 5;9(12):831. doi: 10.3390/biom9120831.
- Krysan, D. J. (2015). Toward improved anti-cryptococcal drugs: Novel molecules and repurposed drugs. *Fungal Genetics and Biology*, 78, 93–98. doi:10.1016/j.fgb.2014.12.001
- Kuster, S.; Stampf, S.; Gerber, B.; Beattig, V; Weisser, M.; Gerrul, S.; Mendiger, M.; Passweg, J.; Schanz, U.; Garzoni, C.; Berger, C.; Chalandon, Y.; Mueller, N.J.; Delden, C.; Neofytos, D.; Khanna, N. (2018). Incidence and Outcome of Invasive Fungal Diseases after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Swiss Transplant Cohort Study. *Transplant Infectious Disease*, e12981. doi:10.1111/tid.12981

- Kwon-Chung, K.J., Bennett, J.E., Wickes, B.L., Meyer, W., Cuomo, C.A., Wollenburg, K.R., Bicanic, T.A., Castañeda, E., Chang, Y.C., Chen, J., Cogliati, M., Dromer, F., Ellis, D., Filler, S.G., Fisher, M.C., Harrison, T.S., Holland, S.M., Kohno, S., Kronstad, J.W., Lazera, M., Levitz, S.M., Lionakis, M.S., May, R.C., Ngamskulrongroj, P., Pappas, P.G., Perfect, J.R., Rickerts, V., Sorrell, T.C., Walsh, T.J., Williamson, P.R., Xu, J., Zelazny A.M., Casadevall, A., (2017). The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *mSphere* 2 (1) (e00357-1).
- Kwon-Chung, K. J., & Varma, A. (2006). Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research*, 6(4). 574–587. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00088.x
- Kwon-Chung, K. J., Fraser, J.A., Doering, T.L., Wang, Z., Janbon, G., Idnurm, A., Bahn, Y.S. (2014). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis Cold Spring Harb Perspect Med. 2014 Jul; 4(7): a019760. doi: 10.1101/cshperspect.a019760
- Laborclin. (2018). O ágar CGB (Canavanina – Glicina - Azul de Bromotimol) é um meio destinado à diferenciação de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Disponível em: [https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/06/CGB\\_AGAR\\_510920.pdf](https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/06/CGB_AGAR_510920.pdf) . Acesso em 22/06/2020
- Lai, C.-C., Tan, C.-K., Huang, Y.-T., Shao, P.-L., & Hsueh, P.-R. (2008). Current challenges in the management of invasive fungal infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 14(2). 77–85. doi:10.1007/s10156-007-0595-7
- Lane J.E., Bogitsh, B.J., Ribeiro-Rodrigues, R., Kral, M.V., Jones, M.M., Carter, C.E. (1998). Ultrastructural effects of the chelating agent 1,10-phenanthroline on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *in vitro*. *Parasitol Res* 1998; 84: 399-402.
- Lee, Y.L., Liu, C.E., Cho, W.L., Kuo, C.L., Cheng, W.L., Huang, C.S., Liu, C.S. (2014). Presence of cytomegalovirus DNA in leucocytes is associated with increased oxidative stress and subclinical atherosclerosis in healthy adults. *Biomarkers* 2014; 19: 109-113.
- Levitz, S. M. (1991). The Ecology of *Cryptococcus neoformans* and the Epidemiology of Cryptococcosis. *Clinical Infectious Diseases*, 13(6). 1163–1169. doi:10.1093/clinids/13.6.1163
- Levitz, Nong, Seetoo, Harrison, Speizer, Simons,. (1999). *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect Immun*. 1999 Feb; 67(2):885-90. PMID: 9916104.
- Li, Y., Huang, X., Chen, H., Qin, Y., Hou, J., Li, A., Wu, H., Yan, X., Chen, Y. (2020). The prevalence of cryptococcal antigen (CrAg) and benefits of pre-emptive antifungal treatment among HIV-infected persons with CD4+ T-cell counts < 200 cells/μL: evidence based on a meta-analysis. *BMC*. doi:10.1186/s12879-020-05126-z
- Li, S. S., & Mody, C. H. (2010). *Cryptococcus*. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7(3), 186–196. doi:10.1513/pats.200907-063al
- Li, W.R., Xie, X.B., Shi, Q.S., Zeng, H.Y., Ou-Yang, Y.S., Chen, Y.B. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 85: 1115-1122.
- Littman, M. L. (1959). Cryptococcosis (Torulosis). *The American Journal of Medicine*, 27(6), 976–998. doi:10.1016/0002-9343(59)90181-0
- Love GL, Boyd GD, Greer DL. (1985). Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess. *J Clin Microbiol* 1985; 22:1068-1070.
- Loyse, A., Burry, J., Cohn, J., Ford, N., Chiller, T., Ribeiro, I, Nyirenda, R. (2018). Leave no one behind: response to new evidence and guidelines for the management of cryptococcal meningitis in low-income and middle-income countries. *The Lancet Infectious Diseases*. Doi: 10.1016/s1473-3099(18)30493-6
- Lu, X., Gao, S., Lin, H., Yu, L., Han, Y., Zhu, P., Bao, W., Yao, H., Chen, Y., Shi, J. (2020). Bioinspired Copper Single-Atom Catalysts for Tumor Parallel Catalytic Therapy. *Advanced Materials*, 2002246. doi:10.1002/adma.202002246
- Lucas, S., Martins, M. da L., Flores, O., Meyer, W., Spencer-Martins, I., & Inácio, J. (2010). Differentiation of *Cryptococcus neoformans* varieties and *Cryptococcus gattii* using CAP59-based loop-mediated isothermal DNA amplification. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(6), 711–714. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02919.x
- Luo, P., Wang, N., Lu, M., Chen, X., Ji, Y., Wang, W., Xu, Z., Jiang, J., Zhang, C., Xiao, X. (2020). Acute and subchronic toxicity of Ag+-laden liposomes on *Daphnia magna*: the effect of encapsulation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 1–10. doi:10.1080/10934529.2020.1794444

- Maligie, M. A., & Selitrennikoff, C. P. (2005). *Cryptococcus neoformans* Resistance to Echinocandins: (1,3)-Glucan Synthase Activity Is Sensitive to Echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2851–2856. doi:10.1128/aac.49.7.2851-2856.2005
- Martinez, L., Casadevall, A. (2015). Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology Spectrum* 3(3). Doi: 10.1128/microbiolspec.mb-0006-2014
- Matsushima, A., Shibata, S., & Ohara, H. (2020). Novel transparent copper film with antibacterial activity for environmental infection control. *Acute Medicine & Surgery*, 7(1). doi:10.1002/ams2.543
- Matsumoto, Y., Azami, S., Shiga, H., Nagamachi, T., Moriyama, H., Yamashita, Y., Yoshikawa, A., Sugita, T. (2019). Induction of signal transduction pathways related to the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* in the host environment. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 13(4), 177–182. doi:10.5582/ddt.2019.01047
- Maxson, M. E., Cook, E., Casadevall, A., & Zaragoza, O. (2007). The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *Fungal Genetics and Biology*, 44(3), 180–186. doi:10.1016/j.fgb.2006.07.010
- McCann, M., Santos, A. L. S., Silva, B. A., Romanos, M. T. V., Pyrrho, A. S., Devereux, M., et al. (2012). In vitro and in vivo studies into the biological activities of 1,10-phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5, 6-dione and its copper(II) and silver(I) complexes. *Toxicol. Res.* 1, 47–54. doi: 10.1039/c2tx00010e
- McCann, M., Coyle, B., McKay, S., McCormack, P., Kavanagh, K., Devereux, M., et al. (2004). Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phenidio)<sub>2</sub>]ClO<sub>4</sub>(phenidio=1,10-phenanthroline-5,6-dione). And its effects on fungal and mammalian cells. *Biometals* 17, 635–645. doi: 10.1007/s10534-004-1229-5
- McCarron, P., McCann, M., Devereux, M., Kavanagh, K., Skerry, C., Karakousis, P. C., Aor, A. C., Mello, T. P., Santos, A. L. S., Campos, D. L., Pavan, F. R. (2018). Unprecedented in Vitro Antitubercular Activity of Manganese(II) Complexes Containing 1,10-Phenanthroline and Dicarboxylate Ligands: Increased Activity, Superior Selectivity, and Lower Toxicity in Comparison to Their Copper(II) Analogs. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01432
- McFadden, D. C., De Jesus, M., and Casadevall, A. (2006). The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. *J. Biol. Chem.* 281(4), 1868–1875
- McTaggart, L., Richardson, S. E., Seah, C., Hoang, L., Fothergill, A., & Zhang, S. X. (2011). Rapid Identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* by Use of Rapid Biochemical Tests, Differential Media, and DNA Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(7),
- Medzhitov, R., Schneider, D. S., & Soares, M. P. (2012). Disease Tolerance as a Defense Strategy. *Science*, 335(6071), 936–941. doi:10.1126/science.1214935
- Mello, T. P., Oliveira, S. S. C., Frases, S., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2018). Surface properties, adhesion and biofilm formation on different surfaces by *Scedosporium* spp. and *Lomentospora prolificans*. *Biofouling*, 1–15. doi:10.1080/08927014.2018.1503652
- Mello, T. P. de Aor, A. C., Oliveira, S. S. C. de Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. dos. (2016). Conidial germination in *Scedosporium apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. minutisporum* and *Lomentospora prolificans*: influence of growth conditions and antifungal susceptibility profiles. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(7), 484–494. doi:10.1590/0074-02760160200
- Mello, T.P., de Souza Ramos, L., Braga-Silva, L.A., Branquinha, M.H., Dos Santos, A.L. (2017). Fungal Biofilm - A Real Obstacle against an Efficient Therapy: Lessons from Candida. *Current topics in medicinal chemistry*, Advance online publication. PMID: 28056742
- Mendes FES. (2009). Correlação entre a susceptibilidade in vitro e a atividade in vivo do fluconazol em modelo murinho de infecção cerebral causada por *Cryptococcus gattii*. Dissertação (Programa de Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Vale Do Rio Doce, Governador Valadares, 2009
- Meyer, W., Castañeda, A., Jackson, S., Huynh, M., Castañeda, E. (2003). Ibero American Cryptococcal Study Group. Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 9 (2), 189–195.
- Meyer, W., Aanensen, D.M., Boekhout, T., Cogliati, M., Diaz, M.R., Esposto, M.C., Fisher, M., Gilgado, F., Hagen, F., Kaocharoen, S., Litvintseva, A.P., Mitchell, T.G., Simwami, S.P., Trilles, L., Viviani, M.A., Kwon-

- Chung, J., (2009). Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med. Mycol.* 47,561–570
- Mitchell, T.G. and Perfect, J.R. (1995). Cryptococcosis in the Era of AIDS—100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, 515-548.
- Monari, C., Bistoni, F., & Vecchiarelli, A. (2006). Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties. *FEMS Yeast Research*, 6(4), 537–542. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00072.x
- Monari C, Pericolini E, Bistoni G, Casadevall A, Kozel TR &Vecchiarelli A (2005).*Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan induces expression of fas ligand in macrophages. *J Immunol*174: 3461–3468.
- Montagna, M. T., De Donno, A., Caggiano, G., Serio, F., De Giglio, O., Bagordo, F., D'Amicis, R., Lockhart, S. R., Cogliati, M. (2018). Molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from environmental sources and genetic comparison with clinical isolates in Apulia, Italy. *Environmental Research*, 160, 347–352. doi:10.1016/j.envres.2017.09.032
- Mukaremera, L., Lee, K. K., Wagener, J., Wiesner, D. L., Gow, N. A. R., & Nielsen, K. (2018). Titan cell production in *Cryptococcus neoformans* reshapes the cell wall and capsule composition during infection. *The Cell Surface*, 1, 15–24. doi:10.1016/j.tcs.2017.12.001
- Murphy, L. S., Lacy, A. J., Smith, A. T., & Shah, K. S. (2020). Cryptococcal meningitis in an immunocompetent patient. *The American Journal of Emergency Medicine*. doi:10.1016/j.ajem.2020.05.115
- Nicola, A. M., Robertson, E. J., Albuquerque, P., Derengowski, L. d. S., & Casadevall, A. (2011). Nonlytic Exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from Macrophages Occurs In Vivo and Is Influenced by PhagosomalpH. *mBio*, 2(4). doi:10.1128/mbio.00167-11
- Nimrichter, L., Frases, S., Cinelli, L. P., Viana, N. B., Nakouzi, A., Travassos, L. R., Casadevall, A., Rodrigues, M. L. (2007). Self-Aggregation of *Cryptococcus neoformans* Capsular Glucuronoxylomannan Is Dependent on Divalent Cations. *Eukaryotic Cell*, 6(8), 1400–1410. doi:10.1128/ec.00122-07
- O'Meara, T. R., & Alspaugh, J. A. (2012). The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 387–408. doi:10.1128/cmr.00001-12
- Okagaki, L. H., Strain, A. K., Nielsen, J. N., Charlier, C., Baltes, N. J., Chrétien, F., Heitman, J., Dromer, F., Nielsen, K. (2010). Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. *PLoS Pathogens*, 6(6), e1000953. doi:10.1371/journal.ppat.1000953
- Ostermann, H., Solano, C., Jarque, I., Garcia-Vidal, C., Gao, X., Barrueta, J. A., Cansado, M.S., Stephens, J., Xue, M., Weber, B., Charbonneau, C. (2014). 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(1). doi:10.1186/2050-6511-1
- Parahym, A.M.R.C. (2012). Infecções fúngicas nosocomiais em unidade de terapia intensiva: ocorrência e controle. Tese (Programa de pós graduação) - Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), 157–165. doi:10.1016/j.mimet.2007.11.010
- Perfect JR. (2006). *Cryptococcus neoformans*: The yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Res* 6:463–468.
- Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., Denning, D. W., Loyse, A., Boulware, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(8), 873–881. doi:10.1016/s1473-3099(17).30243-8
- Ramos, L. S., Oliveira, S. C. S., Branquinha, M. H., and Santos, A. L. S. (2017). Planktonic growth and biofilm formation profiles in *Candida haemulonii* species complex. *Med. Mycol.* doi: 10.1093/mmy/myx005
- Ramos, L. S., Mello, T. P., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2020). Biofilm Formed by *Candida haemulonii* Species Complex: Structural Analysis and Extracellular Matrix Composition. *Journal of Fungi*, 6(2), 46. doi:10.3390/jof6020046
- Ratte HT. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*18, 89–108 and references therein.

- Reis, F. C. G., Borges, B. S., Jozefowicz, L. J., Sena, B. A. G., Garcia, A. W. A., Medeiros, L. C., Rodrigues, M. L. (2019). A Novel Protocol for the Isolation of Fungal Extracellular Vesicles Reveals the Participation of a Putative Scramblase in Polysaccharide Export and Capsule Construction in *Cryptococcus gattii*. *mSphere*, 4(2). doi:10.1128/msphere.00080-19
- Rhodes JC. Contribution of complement component C5 to the pathogenesis of experimental murine cryptococcosis. *Sabouraudia*. 1985;23(3):225–34.
- Sabiiti, W., & May, R. C. (2012). Capsule Independent Uptake of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* into Brain Microvascular Endothelial Cells. *PLoS ONE*, 7(4), e35455. doi:10.1371/journal.pone.0035455
- Saijo T, Chen, J., Chen, S.C-A., Rosen, L.B., Yi, J., Sorrell, T.C., Bennett, J.E., Holland, S.M., Brown, S.K., Kwon-Chung, K.J. (2014). Anti-GM-CSF autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immune competent patients. *mBio*5:e00912–14
- Sakaguchi, N., Baba, T., Fukuzawa, M., & Ohno, S. (1993). Ultrastructural study of *Cryptococcus neoformans* by quick-freezing and deep-etching method. *Mycopathologia*, 121(3), 133–141. doi:10.1007/bf01104068
- Sangalli-Leite, F., Scorzoni, L., Mesa-Arango, A. C., Casas, C., Herrero, E., Soares Mendes Gianinni, M. J., Rodriguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M., Zaragoza, O. (2011). Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes and Infection*, 13(5), 457–467. doi:10.1016/j.micinf.2011.01.015
- Santos, A. L. S. dos, Galdino, A. C. M., Mello, T. P. de, Ramos, L. de S., Branquinha, M. H., Bolognese, A. M., Neto, J.C., Roudbary, M. (2018). What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(9).doi: 10.1590/0074-02760180212
- Santos, A.L.S., Mello, T.P., Ramos, L.S., e Branquinha, M.H. (2015). Biofilm: a robust and efficient barrier to antifungal chemotherapy. *J. Antimicro. 1*, e101
- Santos, A.L.S., Sodr e, C.L., Valle, R.S., Silva, B.A., Abi-chacra, E.A., Silva, L. V., Souza-Gonçalves, A.L., Sanganito, L.S., Gonçalves, D.S., Souza, L.O.P., Palmeira, V.F., d'Avila-Levy, C.M., Kneipp, L.F., Kellett, A., McCann, M. and Branquinha, M.H.. (2012). Antimicrobial Action of Chelating Agents: Repercussions on the Microorganism Development, Virulence and Pathogenesis. *Current Medicinal Chemistry*, 19(17), 2715–2737. doi:10.2174/092986712800609788
- Santos-Gandelman, J., Rodrigues, M. L., & Machado Silva, A. (2018). Future perspectives for cryptococcosis treatment. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 1–10. doi:10.1080/13543776.2018.1503252
- Sardi, J.C., Pitangui, N.S., Rodríguez-Arellanes, G., Taylor, M.L., Fusco-Almeida, A.M., Mendes-Giannini, M.J. (2014). Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Rev. Iberoam. Micol.* 31, 22-29.
- Sarosi, G.A., Parker, I.D., Doto, I.L., Tosh, F.E. (1969). Amphotericin B in cryptococcal meningitis: long-term results of treatment. *Ann Intern Med.* 1969; 71:1079-87
- Seeliger HPR. 1956. Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci. *J Bacteriol*72:127–131
- da Silva, B. G. M., Carvalho, M. L., Rosseti, I. B., Zamuner, S., & Costa, M. S. (2018). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using toluidine blue inhibits both growth and biofilm formation by *Candida krusei*. *Lasers in Medical Science*, 33(5), 983–990. doi:10.1007/s10103-017-2428-y
- Silva, L. V., Galdino, A. C. M., Nunes, A. P. F., dos Santos, K. R. N., Moreira, B. M., Cacci, L. C., Sodre, C.L., Ziccardi, M., Branquinha, M.H., Santos, A. L. S. (2014). Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 990–1000.
- Silva, L.N.; Mello, T.P.; Ramos, L, S.; Branquinha, M.H.; Santos, A.L.S. 2019. Current Challenges and Updates on the Therapy of Fungal Infections. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2019, Vol. 19, No. 7 495 doi:10.2174/156802661907190531093808
- Silva, F. D., Rossi, D. C. P., Martinez, L. R., Frases, S., Fonseca, F. L., Campos, C. B. L., Rodrigues, M. L., Nosanchuk, J. D., Daffre, S. (2011). Effects of microplusin, a copper-chelating antimicrobial peptide, against *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Microbiology Letters*, 324(1), 64–72. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02386.x

- Silva, L. N., Oliveira, S. S. C., Magalhães, L. B., Andrade Neto V. V., Torres-Santos, E. C., Carvalho, M. D. C., Pereira, M. D., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S. (2020). Unmasking the Amphotericin B Resistance Mechanisms in *Candida haemulonii* Species Complex. *ACS Infect. Dis.* 2020, 6, 1273–1282.
- Sionov, E., Lee, H., Chang, Y. C., & Kwon-Chung, K. J. (2010). *Cryptococcus neoformans* Overcomes Stress of Azole Drugs by Formation of Disomy in Specific Multiple Chromosomes. *PLoS Pathogens*, 6(4), e1000848. doi:10.1371/journal.ppat.1000848
- Solano, C., Echeverz, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 96–104. doi:10.1016/j.mib.2014.02.008
- Springer, D. J., Saini, D., Byrnes, E. J., Heitman, J., & Frothingham, R. (2013). Development of an Aerosol Model of *Cryptococcus* Reveals Humidity as an Important Factor Affecting the Viability of *Cryptococcus* during Aerosolization. *PLoS ONE*, 8(7), e69804
- Staib F. (1962). *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (Syn *G. oleifera*). Farbreaktion für *Cr. Neoformans* [*Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (Syn *G. oleifera*). color reaction for *Cr. neoformans*]. *ZHyg*148:466–475.
- Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M., & Nakonieczna, J. (2013). Innovative Strategies to Overcome Biofilm Resistance. *BioMed Research International*, 2013, 1–13. doi:10.1155/2013/150653
- Tavares, E., Gionco, B., Morguette A., Andriani, G., Morey, A., Carmo, A., Pereira, U., Andrade, G., Oliveira, A., Pinge-Filho, P., Nakamura, C., Yamauchi, L., Yamada-Ogatta, S. (2019). Phenotypic characteristics and transcriptome profile of *Cryptococcus gattii* biofilm. *Scientific Reports*. Doi: 10.1038/s41598-019-42896-2.
- Temfack, E., Bigna, J. J., Luma, H. N., Spijker, R., Meintjes, G., Jarvis, J. N., Dromer, F., Harrison, T., Cohen, J.F., Lortholary, O. (2018). Impact of routine cryptococcal antigen screening and targeted pre-emptive fluconazole therapy in antiretroviral naive HIV-infected adults with less than 100 CD4 cells/ $\mu$ L: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. DOI: [10.1093/cid/ciy567](https://doi.org/10.1093/cid/ciy567)
- Tilton RC and Rosenberg B. (1978). Reversal of the silver inhibition of microorganisms by agar. *Appl. Environ Microbiol*35, 1116–1120.
- Tucker, S. C., & Casadevall, A. (2002). Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 3165–3170. doi:10.1073/pnas.052702799
- Turk, B; Turk, D; Turk, V. Protease signalling: The cutting edge. 2012. *EMBO J*.31, 1630–1643.
- Valle, R.S. (2011). Aspártico peptidase secretada pelo patógeno fúngico *Cryptococcus neoformans*: clivagem de diferentes substratos proteicos, efeito da cápsula polissacarídica e de inibidores proteolíticos utilizados na quimioterapia do HIV. Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2011.
- Vecchiarelli, A. (2005). The Cellular Responses Induced by the Capsular Polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* Differ Depending on the Presence or Absence of Specific Protective Antibodies. *Current Molecular Medicine*, 5(4), 413–420. doi:10.2174/1566524054022585
- Ventura, R. F., Galdino, A. C. M., Viganor, L., Schuenck, R. P., Devereux, M., McCann, M., Santos, A.L. S., Nunes, A. P. F. (2020). Antimicrobial action of 1,10-phenanthroline-based compounds on carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains: efficacy against planktonic- and biofilm-growing cells. *Brazilian Journal of Microbiology*. doi:10.1007/s42770-020-00351-9
- Verse M. 1914. Über einen Fall von generalisierter Blasto-mykose beim menschen [About a case of generalized human blastomycosis]. *VerhDtschPathol Ges*17:275–278.
- Videira-Quintela, D., Guillén, F., Montalvo, & Martín, O. (2020). Silver, copper, and copper hydroxy salt decorated fumed silica hybrid composites as antibacterial agents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111216. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111216
- Viganor, L., Galdino, A. C., Nunes, A. P., Santos, K. R., Branquinha, M. H., Devereux, M., et al. (2015A).. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of 1,10-phenanthroline-based drugs against both planktonic and biofilm-growing cells. *J. Antimicrob. Chemother.*71, 128–134. doi: 10.1093/jac/dkv292
- Viganor, L., Skerry, C., McCann, M., and Devereux, M. (2015B). Tuberculosis: an inorganic medicinal chemistry perspective. *Curr. Med. Chem.*22, 2199–2224. doi: 10.2174/0929867322666150408112357

- Vincent, M., Duval, R.E., Hartemann, P., Engels-Deutsch, M. (2018). Contact killing and antimicrobial properties of copper. *J Appl Microbiol* 2018; 124:1032-1046.
- Vuillemin P. (1901). Les blastomycetes pathogènes. *Rev Gen SciPures Appl*12:732–751.
- Warra, A. A. (2011). Transition metal complexes and their application in drugs and cosmetics - A Review. *J. Chem. Pharm. Res.* 3, 951–958.
- Wilson DE, Bennett JE, Bailey JW. (1968). Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proc Soc Exp Biol Med*127:820–823.
- Yang, M., Cheng, L., Sun, F., Liu, F., Feng, W., Yao, P., Weng, B. Xia, P. (2020). Comparison of cryptococcal meningitis in HIV-negative patients with and without lung infections. *Journal of International Medical Research*, 48(6), 030006052092959. doi:10.1177/0300060520929591
- Zaragoza, O., & Casadevall, A. (2004). Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biological Procedures Online*, 6(1), 10–15. doi:10.1251/bpo6
- Zaragoza, O., Fries, B. C., & Casadevall, A. (2003). Induction of Capsule Growth in *Cryptococcus neoformans* by Mammalian Serum and CO<sub>2</sub>. *Infection and Immunity*, 71(11), 6155–6164. doi:10.1128/iai.71.11.6155-6164.2003
- Zaragoza, O., García-Rodas, R., Nosanchuk, J. D., Cuenca-Estrella, M., Rodríguez-Tudela, J. L., & Casadevall, A. (2010). Fungal Cell Gigantism during Mammalian Infection. *PLoS Pathogens*, 6(6), e1000945. doi:10.1371/journal.ppat.1000945
- Zaragoza, O., Rodrigues, M. L., De Jesus, M., Frases, S., Dadachova, E., & Casadevall, A. (2009). Chapter 4 The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology*, 133–216. doi:10.1016/s0065-2164(09)01204-0
- Zhang J.; Zhang D.; Xue X.; Yang L.; Chen L. & Pan, L. (2020). Clinical analysis of 16 cases of pulmonary cryptococcosis in patients with normal immune function. *Ann Palliat Med* 2020 <http://dx.doi.org/10.21037/apm-20-897>
- Zuger. (1986). Cryptococcal Disease in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 104(2), 234. doi:10.7326/0003-4819-104-2-234