



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
CURSO DE FARMÁCIA

NATASHA MARIA LIMA PINHEIRO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA AMIODARONA E
SUA INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA COM FLUCONAZOL FRENTE A
Cryptococcus spp.**

FORTALEZA

2023

NATASHA MARIA LIMA PINHEIRO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA AMIODARONA E SUA
INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA COM FLUCONAZOL FRENTE A *Cryptococcus* spp.

Trabalho de Conclusão do Curso submetida à
coordenação do Curso de Graduação em
Farmácia da Universidade Federal do Ceará,
como requisito para obtenção do título de
Bacharela em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre
Júnior.

Coorientadora: Dra. Lívia Gurgel do Amaral
Valente Sá

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P721a Pinheiro, Natasha Maria Lima.
Avaliação in vitro da atividade antifúngica da amiodarona e sua interação farmacológica com fluconazol frente a *Cryptococcus* spp. / Natasha Maria Lima Pinheiro. – 2023.
55 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior .
Coorientação: Profa. Dra. Lívia Gurgel do Amaral Valente Sá.

1. Criptococose. 2. Amiodarona. 3. Reposicionamento de Medicamentos. I. Título.

CDD 615

NATASHA MARIA LIMA PINHEIRO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA AMIODARONA E SUA
INTERAÇÃO FARMACOLÓGICA COM FLUCONAZOL FRENTE A *Cryptococcus* spp.

Trabalho de Conclusão do Curso submetida à
coordenação do Curso de Graduação em
Farmácia da Universidade Federal do Ceará,
como requisito para obtenção do título de
Bacharela em Farmácia.

Aprovada em: 06/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Farmacêutica Lara Elloyse Almeida Moreira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, amigos e família.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre iluminando os caminhos que devo seguir e mostrando o lado bom de todas as coisas.

À minha mãe, Andréa Lima Pinheiro, e ao meu pai, Jean César Pinheiro, que são as minhas referências tanto na vida pessoal quanto na vida profissional, agradeço imensamente por sempre estarem ao meu lado torcendo por mim em todos os momentos.

Ao meu irmão, Francisco César Lima Pinheiro, por trazer sempre leveza nos momentos que mais precisei.

À minha família que sempre me apoiou durante toda a trajetória.

À Instituição da Universidade Federal do Ceará pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

Ao Prof. Dr. Hélio Vitoriano, pela excelente orientação, pelo fornecimento de seu laboratório para o enriquecimento de conhecimentos e repasse de aprendizados que irei levar para a vida profissional e pessoal.

À Dra. Livia Gurgel, por aceitar ser coorientadora do trabalho e por transmitir informações relevantes acerca do assunto.

Aos professores participantes da banca examinadora Profa. Dra. Cecília Rocha e a Mestranda Lara Elloyse Almeida Moreira que desde o momento agradeço por aceitarem o convite e pelas futuras sugestões que serão mencionadas.

Aos integrantes do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas, que sempre estiveram proativos para agregar conhecimentos.

À professora Dra. Maria de Fátima e ao Laboratório de Pesquisa em Doença de Chagas por mostrarem o quanto é importante a função do farmacêutico no auxílio aos pacientes.

Aos meus professores de monitoria Dra. Giovanna Riello, Dra. Cecília Rocha e Dr. Ramon Pessoa, que contribuíram de maneira bastante significativa para a minha vida acadêmica com

os conhecimentos enriquecedores e que foram exemplos importantes para o meu afeto para o caminho da docência.

Ao professor Dr. Tiago Sampaio e aos membros do laboratório do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica, que agregaram bastante na reta final da trajetória acadêmica, sendo de grande importância todos os ensinamentos repassados.

Ao meu namorado, Marcos Paulo, por auxiliar e incentivar a crescer como pessoa e como profissional nessa reta final da minha trajetória acadêmica.

Aos meus amigos da graduação, em especial Adriano Maia, Alberto Macedo, Ana Beatriz Mendes, Ana Caroline Moreno, Arthur Neto, Bruna Duque, Camila Lô, Clara Lira, Diego Joca, Letícia Gois, Luiz Henrique, Maria de Jesus, Nayara Silva e Vitória Carvalho, que sempre trouxeram leveza com conversas e almoços no restaurante universitário, além de agregarem durante trabalhos, estágios e disciplinas realizadas juntos.

Aos meus amigos do colégio e da vida, em especial Ana Vitória, Natália Machado, Paula Tayná, Vitória Façanha e Vitória Moraes, que contribuíram tanto no incentivo a permanecer no caminho correto com conselhos quanto em proporcionar momentos de descontração.

“Eu me lembro do dia que eu orei por coisas que eu tenho hoje!” (FONSECA, 2017).

RESUMO

A criptococose é uma doença causada por fungos patogênicos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, os quais são leveduras que podem infectar pulmões, o sistema nervoso central e o sangue. O patógeno *C. neoformans* é considerado como uma prioridade crítica pela Organização Mundial de Saúde (OMS), gerando juntamente com o *C. gattii*, cerca de 223.100 casos anuais e cerca de 181.100 mortes de meningite criptocócica no mundo. Dentre as possíveis causas para o aumento de casos e consequente elevação da mortalidade, pode-se citar a redução de sensibilidade de cepas de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos itraconazol, anfotericina B e fluconazol, que fazem parte da terapia contra a criptococose. Diante de tais adversidades, há a busca de estratégias para contorná-las, como o reposicionamento de fármacos que visa utilizar fármacos já comercializados para o tratamento de outras doenças diferentemente da indicação original. Desse modo, buscou-se avaliar a atividade antifúngica do antiarrítmico amiodarona *in vitro* e a interação farmacológica desse antiarrítmico com o fluconazol frente a cepas clínicas de *Cryptococcus* spp. Neste estudo foram utilizadas 7 cepas clínicas de *Cryptococcus* spp. e 2 cepas do banco ATCC pertencentes ao Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN). Para a determinação da atividade antifúngica da amiodarona e do fluconazol foi realizado o teste de sensibilidade através da técnica de Microdiluição em Caldo conforme o protocolo M27-A3 do CLSI. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi feita a partir da análise visual do crescimento de 50% do microrganismo. Para a determinação da interação farmacológica foi realizado o Método de *Checkerboard* para o cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF). Em relação a CIM da amiodarona foram encontrados os valores entre 1 e 256 µg/mL e para o fluconazol foram obtidos os valores de CIM entre 1 a 32 µg/mL. Em relação ao efeito ocasionado da associação da amiodarona e do fluconazol, obteve-se que em 4 cepas houve uma interação do tipo sinérgica e em 3 cepas houve uma interação aditiva. Desse modo, é possível evidenciar a importância dessa associação farmacológica *in vitro*, devendo assim incentivar a pesquisa mais aprofundada dessa combinação em camundongos e de outros fármacos no âmbito do reposicionamento de fármacos para a inibição do crescimento fúngico.

Palavras-chave: Criptococose; *Cryptococcus* spp.; Amiodarona, Reposicionamento de fármacos.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a disease caused by pathogenic fungi *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, which are yeasts that can infect the lungs, central nervous system and blood. The pathogen *C. neoformans* is considered a critical priority by the World Health Organization (WHO), generating, together with *C. gattii*, about 223,100 annual cases and about 181,100 deaths of cryptococcal meningitis in the world. Among the possible causes for the increase in cases and consequent increase in mortality, we can mention the reduced sensitivity of strains of *Cryptococcus* spp. to the antifungals itraconazole, amphotericin B and fluconazole, which are part of the therapy against cryptococcosis. This situation, there is a search for strategies to circumvent them, such as the repositioning of drugs that aims to use drugs already marketed for the treatment of other diseases, unlike the original indication. Thus, we sought to evaluate the in vitro antifungal activity of the antiarrhythmic drug amiodarone and the pharmacological interaction of this antiarrhythmic drug with fluconazole against clinical strains of *Cryptococcus* spp. In this study, 7 clinical strains of *Cryptococcus* spp. and 2 strains from the ATCC bank belonging to the Laboratory of Bioprospection of Antimicrobial Molecules (LABIMAN). To determine the antifungal activity of amiodarone and fluconazole, a sensitivity test was performed using the Broth Microdilution technique according to the CLSI M27-A3 protocol. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) was made from the visual analysis of the growth of 50% of the microorganism. To determine the pharmacological interaction, the Checkerboard Method was used to calculate the Fractional Inhibitory Concentration Index (ICIF). Regarding the MIC of amiodarone, values between 1 and 256 $\mu\text{g/mL}$ were found and for fluconazole, MIC values between 1 and 32 $\mu\text{g/mL}$ were obtained. About the effect caused by the association of amiodarone and fluconazole, it was found that in 4 strains there was a synergistic interaction and in 3 strains there was an additive interaction. Thus, it is possible to demonstrate the importance of this pharmacological association in vitro, thus encouraging further research into this combination in mice and other drugs in the context of repositioning drugs for inhibiting fungal growth.

Keywords: Cryptococcosis; *Cryptococcus* spp.; Amiodarone; Drug repositioning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo infeccioso do fungo <i>Cryptococcus</i> spp.	20
Figura 2 – Mecanismos de resistência aos antifúngicos	30
Figura 3 – Representação estrutural da Amiodarona	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol (FCZ) e da amiodarona (AMD) em cepas de <i>Cryptococcus</i> spp. e cepas ATCC (<i>American Type Culture Collection</i>)	40
Tabela 2 –	A interação farmacológica entre o fluconazol (FCZ) e a amiodarona (AMD) frente a cepas de <i>Cryptococcus</i> spp. e cepas ATCC (<i>American Type Culture Collection</i>), classificada como sinérgica (SIN), aditiva (ADT), indiferente (IND), ou antagonista (ANT) a partir do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – *American Type Culture Collection*

AFB – Anfotericina B

AMD – Amiodarona

BHE – Barreira Hematoencefálica

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

FC – Flucitosina

FCZ – Fluconazol

ICIF – Índice de Concentração Inibitória Fracionada

IF – Interação Farmacológica

ITR – Itraconazol

OMS – Organização Mundial da Saúde

RPMI – *Meio Roswell Park Memorial Institute*

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

SNC – Sistema Nervoso Central

UFC – Universidade Federal do Ceará

UFCs – Unidades Formadoras de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

μL – Microlitro

$\mu\text{g/mL}$ – Micrograma por mililitro

M – Massa Molar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Infecções fúngicas	17
2.2	Criptococose	18
2.3	Fatores de virulência	21
2.3.1	<i>Cápsula polissacarídica</i>	21
2.3.2	<i>Melanina</i>	23
2.3.3	<i>Urease</i>	24
2.3.4	<i>Calcineurina</i>	25
2.3.5	<i>Outros fatores de virulência</i>	25
2.4	Tratamento preconizado para a criptococose	26
2.5	Resistência aos antifúngicos	28
2.6	Novas alternativas terapêuticas para contornar a resistência aos antifúngicos	31
2.6.1	<i>Associação de fármacos</i>	31
2.6.2	<i>Reposicionamento de fármacos</i>	32
2.6.2.1	<i>Amiodarona</i>	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo Geral	36
3.2	Objetivos Específicos	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	Delineamento e local da pesquisa	37
4.2	Obtenção das cepas	37
4.3	Obtenção dos ativos farmacológicos	37
4.4	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	37
4.4.1	<i>Preparo do inóculo</i>	38
4.4.2	<i>Inoculação em microplaca</i>	38
4.5	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	38
4.6	Avaliação da interação farmacológica	39
4.7	Análise estatística	39

5	RESULTADOS	40
5.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	40
5.2	Avaliação do efeito associado da amiodarona e do fluconazol	40
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma doença causada pelos fungos patogênicos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que são leveduras do Filo Basidiomycota e que infectam inicialmente os pulmões e posteriormente há a disseminação para o sangue, causando a criptococemia, o qual propiciará a chegada do fungo ao sistema nervoso central (SNC), gerando a meningite criptocócica (DA SILVA *et al.*, 2021; OMS, 2022). O fungo, *C. neoformans*, é considerado, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como um fungo de prioridade crítica para o desenvolvimento de pesquisas, tratamentos e ações de saúde pública a fim de diminuir infecções causadas por este fungo (OMS, 2022).

Algumas condições são descritas como facilitadoras para o desenvolvimento da criptococose, principalmente a imunossupressão em decorrência da presença do HIV, de doenças autoimunes e de outros fatores como ocorre no caso da imunossupressão iatrogênica, havendo mundialmente um valor estimado de 223.100 casos anuais, envolvendo pessoas com baixas taxas de células T CD4⁺, e com um total de aproximadamente 181.100 mortes em decorrência da doença na forma de meningite criptocócica (DA SILVA *et al.*, 2020; RAJASINGHAM *et al.*, 2017). A América Latina é a terceira região com maior número de casos de criptococose com cerca de 54.400 casos, onde no Brasil há elevado grau de mortalidade com 685 mortes em decorrência da criptococose ao considerar o período de 2016 a 2021, principalmente nas regiões Sudeste (44,67%) e Nordeste (16,64%) (BRASIL, 2019; BRASIL, 2021; DA SILVA *et al.*, 2021).

A terapia atual para a criptococose, principalmente quando a doença é vinculada a um quadro de meningite, envolve os antifúngicos anfotericina B (AFB), fluconazol (FCZ), itraconazol (ITR) e flucitosina (FC), sendo medicamentos utilizados tanto para pacientes imunocompetentes quanto para imunossuprimidos (BRASIL, 2019). É importante evidenciar que esses medicamentos geram efeitos adversos os quais podem interferir no tratamento farmacológico, como a AFB que tem um dos efeitos adversos mais grave a toxicidade renal, gerando na maioria dos usuários algum grau de redução renal, e o ITR que gera hepatotoxicidade e síndrome de Stevens-Johnson (RITTER *et al.*, 2022). Ressalta-se também que há indícios de falhas terapêuticas envolvendo cepas de *Cryptococcus* spp. frente antifúngicos com Itraconazol e à Anfotericina B e cepas de *C. gattii* com a utilização de Fluconazol, estando possivelmente correlacionado com o elevado tempo da terapia para cessar a doença (AMARO, 2006; DA SILVA *et al.*, 2008).

Diante de tais adversidades, há a necessidade da adoção de estratégias para contorná-las, a exemplo da utilização de outros fármacos para tornar mais eficaz e seguro o tratamento da criptococose e das sugestões da OMS (2022) como a realização de testes de sinergismo *in vitro* e *in vivo* para expandir e otimizar as opções de tratamento atual da criptococose, a fim minimizar a morbidade e mortalidade dessa doença. Nesse contexto se insere o reposicionamento de fármacos, onde busca-se aproveitar ativos farmacêuticos presentes no mercado para indicações terapêuticas diferentes das quais foram projetados (JOURDAN *et al.*, 2020). A interação farmacológica pode resultar em nenhuma interação propriamente estabelecida, antagonismo e sinergismo, sendo esse último quando os ativos conseguem atuar em conjunto para uma determinada finalidade a exemplo da inibição do crescimento de microrganismos (SECOLI, 2001).

Em algumas linhas de pesquisa foram realizadas avaliações de fármacos antiarrítmicos para atividade antifúngica, a exemplo do verapamil, diltiazem e nifedipina, os quais apresentaram eficácia de alguns fungos como *C. albicans* e *C. glabrata*, entretanto a AMDA, que é um fármaco antiarrítmico de classe III, exibiu atividade contra uma maior quantidade de fungos, a exemplo de *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp. e *C. albicans*, utilizando baixas doses (ZHANG *et al.*, 2021). Além disso, em uma pesquisa utilizando o banco de dados de compostos aprovados com a finalidade de buscar novos antifúngicos empregados para eliminar *C. neoformans*, foi identificado a AMD como um candidato potente devido seu potencial de atravessar a BHE e acessar o fagolisossomo contendo o fungo patogênico (WALL; LOPEZ-RIBOT, 2020).

Desse modo, o presente trabalho optou por avaliar a atividade da amiodarona isolada e em associação com o antifúngico fluconazol, a fim de investigar a efetividade frente a cepas clínica de *Cryptococcus* spp.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Infecções fúngicas

Os fungos são microrganismos eucarióticos, em que os mais patogênicos ao ser humano pertencem aos filos Entomophthorales, com a presença de *Basidiobolus* spp. e *Conidiobolus* spp., Ascomycota, tendo como representantes principais *Histoplasma capsulatum*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. e Basidiomycota, tendo o *Cryptococcus* spp. e *Trichosporon* spp. como representantes. Dentre esses microrganismos, os mais comuns nas infecções em pacientes imunossuprimidos são *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*, sendo conhecidos como patógenos oportunistas (KÖHLER *et al.*, 2017; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2020).

As infecções fúngicas permeiam durante a história do ser humano, em que esses microrganismos necessitam possuir capacidade de atingir os tecidos biológicos, ao contornar as barreiras do hospedeiro como o muco e movimento ciliar do trato respiratório, e de evadir do sistema imunológico através dos fatores de virulência (KÖHLER *et al.*, 2017).

As infecções fúngicas podem ser classificadas em três tipos de micoses: superficiais, subcutâneas e sistêmicas. As micoses superficiais são caracterizadas pela colonização das camadas mais superficiais, as micoses subcutâneas envolvem as camadas mais profundas da pele e, por fim, as micoses sistêmicas estão correlacionadas com o crescimento fúngico em órgãos internos do corpo. A infecção sistêmica é ainda subdividida em infecção primária, que acontece em indivíduos saudáveis, e secundária, que acomete indivíduos mais suscetíveis, a exemplo dos imunossuprimidos (MADIGAN *et al.*, 2016).

Estima-se que a quantidade global de infecções fúngicas seja superior a 1 bilhão de casos, onde aproximadamente 3,8 milhões de casos dessas infecções apresentam-se na forma grave no Brasil (BONGOMIN *et al.*, 2017; GIACOMAZZI *et al.*, 2016). Segundo Mendonça *et al.* (2022) os fungos mais isolados de infecções em países desenvolvidos são *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus* spp., enquanto em países subdesenvolvidos há uma prevalência de *Cryptococcus* spp. e *Pneumocystis* spp., principalmente associada com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

2.2 Criptococose

A criptococose é uma infecção oportunista causada por fungos basidiomicetos leveduriformes, tendo como representantes *C. neoformans* e *C. gattii* os quais variam no tamanho e formato, podendo ser esféricos, ovais ou elípticos, e que possuem uma cápsula polissacarídica extracelular, a qual muitas vezes é observada no formato de um halo transparente após expostas à coloração negativa, por exemplo, tinta da china, que compõe o exame direto (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2020). A espécie *C. gattii* apresenta sua morfologia baciliforme e com parede lisa e a espécie *C. neoformans* apresenta-se na forma esférica, alongada ou cilíndrica com parede ligeiramente rugosa (BARROS, 2012; KWON-CHUNG; BENNETT; RHODES, 1982 *apud* PEREIRA).

Além do exame direto, podem ser realizados os testes sorológicos no processo de identificação do *Cryptococcus* sp., envolvendo o teste de aglutinação de látex e o ELISA (teste de imunoenensaio ligado à enzima). Ressalta-se que há a cultura que pode realizar o cultivo em ágar Sabouraud e em meio diferencial com o ágar Semente de Niger e o ágar L-dopa, podendo ser utilizado também o ágar Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol (CGB) (SILVEIRA *et al.*, 2018). Nos meios que contêm compostos fenólicos há a conversão em melanina por meio da enzima lacase produzida pelas cepas de *Cryptococcus* spp., gerando assim colônias com a cor marrom. No ágar Sabouraud pode ser adicionado antibiótico Cloranfenicol, a fim de inibir o crescimento bacteriano, e quando ocorre o crescimento de cepas capsuladas há a presença de colônias com aspecto mucoide e brilhante (PEDROSO; CÂNDIDO, 2006). É importante evidenciar que a cultura do líquido cefalorraquidiano é o padrão ouro para o diagnóstico da meningite criptocócica e que a hemocultura é responsável por diagnosticar a doença na forma disseminada (KON *et al.*, 2008; GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

A fim de diferenciar laboratorialmente as cepas *C. gatti* e *C. neoformans* após a suspeita de um paciente infectado pelo fungo pode-se realizar testes bioquímicos em ágar CGB que permite a distinção através da viragem de cor para a coloração azul das colônias a partir da assimilação da glicina, que é o caso de *C. gatti*, diferentemente das colônias de *C. neoformans* que não apresentaram mudança de coloração, permanecendo com a tonalidade de amarela a verde. Ademais, há a realização de testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) que permite a identificação entre as duas formas fúngicas através das análises das amostras como o líquido cefalorraquidiano em pacientes com suspeita de meningite criptocócica (SILVEIRA *et al.*, 2018).

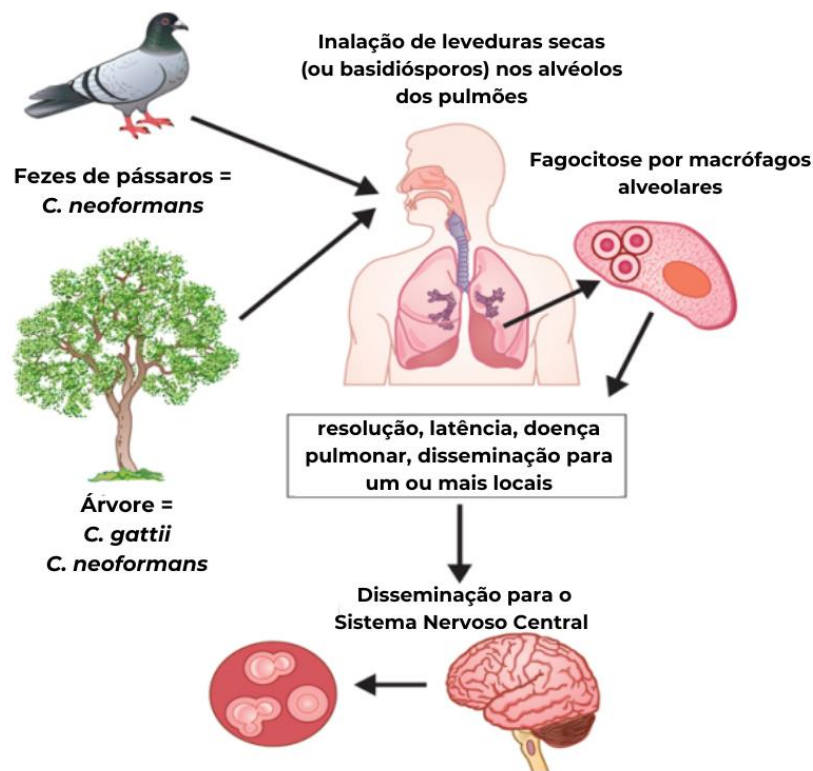
O processo de transmissão, normalmente ocorre por inalação das cepas fúngicas em aerossóis, no formato de esporos, os quais são encontrados em ambientes como áreas contendo fezes contaminadas de pássaros, mais particularmente os pombos no caso de *C. neoformans* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). O desenvolvimento desse fungo no guano desse animal ocorre em decorrência de ser rico em creatinina, ureia e nitrogênio, fornecendo um ambiente propício (SOUZA *et al.*, 2018). Além disso, foi identificado por Chitty *et al.* (2019) que o composto nitrogenado guanina, base purínica, ao estar em maior quantidade no guano de pombo favorecia o crescimento de *C. neoformans*. Há também a transmissão relacionada com a presença de basidiósporos, principalmente, em ambientes com árvores da espécie *Eucalyptus camaldulensis* em climas tropicais e subtropicais, além de obter a presença de *Cryptococcus* spp. também em climas temperados como na Ilha de Vancouver (ELLIS; PFEIFFER, 1990; KIDD *et al.*, 2004). Após análises, foi identificado que a presença das cepas fúngicas em árvores estava correlacionado com a capacidade de utilizar o material lenhoso o qual é rico em compostos fenólicos, que são substratos auxiliares do crescimento em razão da atividade de fenol-oxidase (SORRELL; ELLIS, 1997).

Após a inalação dos esporos e escape das barreiras corporais como o muco, o fungo atinge os alvéolos dos pulmões, o qual é o órgão primário. Com o início da infecção nos alvéolos, há a ativação da resposta imunológica do hospedeiro, ativando células dendríticas, macrófagos alveolares, linfócitos, sistema complemento e produção do surfactante pulmonar que contém proteínas que atraem eosinófilos. No espaço alveolar, os fungos *Cryptococcus* spp. são fagocitados por macrófagos que podem formar granulomas, os quais são concentrações de macrófagos circundados por linfócitos ativos, essa resposta imune granulomatosa pode seguir para a formação de um complexo linfonodal primário ou nódulo subpleural, o qual é visível no exame radiológico. As células fúngicas presentes nos granulomas podem ser facilmente destruídas ou persistir de maneira latente, ocorrendo, normalmente, a eliminação na maioria dos indivíduos imunocompetentes. Em indivíduos imunossuprimidos por terem uma reduzida quantidade de linfócitos T CD4⁺ facilita o escape do microrganismo do pulmão para a disseminação pelo organismo por meio da corrente sanguínea, podendo alcançar principalmente as meninges devido à disseminação do fungo ao SNC (SETIANINGRUM; RAUTEMAA-RICHARDSON; DENNING, 2019). Esse mecanismo infeccioso se encontra de maneira resumida na Figura 1.

Para atingir o SNC e causar uma meningoencefalite, há três mecanismos propostos: 1) ocorrência de endocitose pelas células endoteliais após a ligação das células fúngicas no lúmen da barreira hematoencefálica (BHE) com auxílio de alguns fatores de virulência como a

urease e fosfolipases; 2) acontecimento de danos das junções estreitas da BHE, facilitando a passagem dos fungos entre as células endoteliais; 3) sobrevivência das cepas no interior das células fagocíticas que atravessam a BHE, sendo conhecido como mecanismo de disseminação “cavalo de Tróia”, a fim de garantir a sobrevivência dentro da célula fagocítica *Cryptococcus* spp. utiliza a enzima urease para inibir a acidificação dentro do fagolisossoma e a cápsula que tem propriedades antioxidantes, resistindo aos radicais livres produzidos pelas células fagocitárias (ZARAGOZA, 2019). Evidencia-se que com relação à criptococose cutânea pode haver a infecção do tipo primária após ocorrer uma inoculação transcutânea através de uma lesão do epitélio e do tipo secundária que é ocasionada a partir da disseminação hematogênica (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2020).

Figura 01 – Ciclo infeccioso do fungo *Cryptococcus* spp.



Fonte: Adaptado de RIEDEL *et al.*, 2022

As formas fúngicas *C. neoformans* e *C. gattii* são patogênicas em indivíduos imunocompetentes, entretanto a espécie *C. neoformans* é mais frequentemente encontrada em indivíduos imunodeprimidos, ocasionando principalmente a meningite fúngica (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2020). Ressalta-se também, que foi observado em um estudo, por URAI *et al.* (2016), a relação da depleção de células CD4⁺ com a mortalidade em camundongos

infectados com *C. neoformans*, devendo ter um cuidado por esse microrganismo estar vinculado principalmente a pacientes com deficiência no sistema imunológico.

As manifestações clínicas em decorrência da meningite criptocócica, principalmente em pessoas portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), podem ser dores de cabeça, febre, estado mental alterado podendo estar associados com paralisia de nervoso cranianos e elevação da pressão intracraniana. Em relação à infecção pulmonar pode apresentar sintomas como febre, tosse, dor torácica, hemoptise e sinais como nódulos pulmonares, lesões cavitárias e derrames pleurais. Os outros tipos de infecção causados por *Cryptococcus* spp. que são menos recorrentes como infecções na pele, que podem estar associadas a presença de úlceras, abscessos, nódulos e pústulas, e infecções na próstata, que podem apresentar disúria ou uropatia obstrutiva geralmente no contexto da infecção disseminada (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

De acordo com um estudo retrospectivo por RAJASINGHAM *et al.* (2017) foi estimado uma prevalência mundial de 278.000 pessoas com criptococose em 2014, tendo uma maior concentração de casos na África Subsaariana. Em relação aos dados epidemiológicos do Brasil acerca da criptococose contidos no Sistema de Informação sobre Mortalidade, o número de óbitos envolvendo essa doença durante o período de 2011 a 2021 foi de 1.206 em todo o Brasil, sendo aproximadamente 57% (685) dos casos somente nos últimos 5 anos. É importante evidenciar que nos últimos 10 anos a região Nordeste (15%) está como a terceira região, ficando logo depois das regiões do Sudeste (46%) e Sul (16%), entretanto nos últimos 5 anos a região Nordeste passou a ser a segunda região com maior mortalidade no país com o número de 114 mortes (16,64%). Deve-se evidenciar que com relação à região Nordeste, o Ceará contém quase 23% dos casos de óbitos por criptococose de 2016 a 2021 (BRASIL, 2021). Ressalta-se que as informações sobre a epidemiologia no Brasil ainda são limitadas devido em razão da criptococose ter passado para a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças apenas em 2020 a partir da portaria N° 264 (BRASIL, 2020).

2.3 Fatores de virulência

2.3.1 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica é um importante fator de virulência, sendo em *C. neoformans* o principal componente o Glucuronoxilomanana (GXM), onde foi observado que esse polissacarídeo reduz a fagocitose, inibe a saída das células leucocitárias dos vasos

sanguíneos e reduz a expressão de receptores de quimiocinas (ZARAGOZA, 2019). A cápsula, além do GXM, contém outro polissacarídeo que é a galactoxilomana e uma quantidade reduzida de manoproteína, estando a estrutura capsular presente também na cepa clinicamente relevante de *C. gattii* (URAI *et al.*, 2016; YAUCH; LAM; LEVITZ, 2006).

De acordo com as diferenças estruturais da cápsula polissacarídica há a divisão de *C. neoformans* em sorotipos A (*C. neoformans* var. *grubii*) e D (*C. neoformans* var. *neoformans*) e *C. gattii* em sorotipos B e C (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021). Ressalta-se que em um estudo por Yauch, Lam e Levitz (2006), obteve-se a correlação do GXM com a inibição da proliferação das células T mesmo após a captação pelas células apresentadoras de antígenos, as quais seriam responsáveis pela ativação da linhagem T das células linfocitárias.

É importante evidenciar que a inibição da opsonização por células fagocíticas gerada pela presença da cápsula, deve-se, principalmente, por ser pouco imunogênica, reduzindo assim a opsonização pela Imunoglobulina tipo G (IgG) e consequentemente protegendo do reconhecimento pelas células fagocíticas do sistema imune, sendo uma situação que facilitará a evasão da célula fúngica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2022; CASADEVALL *et al.*, 2018). Ressalta-se que o fungo dentro do hospedeiro pode passar por esse processo de alargamento capsular, que ocorre na fase G1 do ciclo celular, aumentando a sobrevivência fúngica na presença de defensinas e de espécies reativas de oxigênio, produzidas por macrófagos, e de antifúngicos (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018; GARCÍA-RODAS *et al.*, 2014; ZARAGOZA *et al.*, 2009). O estudo elaborado por ZARAGOZA *et al.* (2008) demonstrou a relação da presença de cápsulas maiores com uma resistência às EROs, reduzindo assim a morte oxidativa, sendo identificado também nesse estudo a resistência a algumas drogas antifúngicas, dentre elas o fluconazol, à medida que havia um alargamento dessa estrutura.

Ademais, a cápsula propicia uma regulação negativa da produção de citocinas pró-inflamatórias e uma defesa antioxidante das espécies reativas de oxigênio (EROs), com auxílio da glutathione peroxidase, ao estar dentro do macrófago com a finalidade de inibir o processo de fagocitose (O'MEARA; ANDREW ALSPAUGH, 2012; ZARAGOZA *et al.*, 2008). Essa proteção ao microrganismo foi observada desde o final do século XX em um estudo por Cross e Bancroft (1995) com cepas sem cápsulas onde evidenciou que há uma rápida ingestão por macrófagos sem a necessidade de um contato prévio em razão da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (fator de necrose tumoral) e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos).

2.3.2 Melanina

Outra característica que aumenta a virulência do *C. neoformans* é a presença de melanina, visto que se observou que possui funções na proteção contra a radiação ionizante, a alteração de temperatura, a fagocitose e compostos antimicrobianos, como também na realização de uma imunomodulação (CORDERO; CAMACHO; CASADEVALL, 2020; NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015). Esse pigmento, que gera uma coloração marrom nas colônias de *Cryptococcus* spp. em razão de ser um pigmento de cor escura, realiza transdução de energia onde cepas mielinizadas apresentaram a capacidade de crescerem ao serem expostas à radiação de alta energia devido possivelmente converterem a energia eletromagnética em energia utilizável para processos biológicos (CASADEVALL *et al.*, 2017; NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015).

Em relação ao processo de inibição da fagocitose, foi evidenciado que a melanina estava vinculada a uma supressão da produção de EROs pelos macrófagos durante o processo fagocítico, sendo considerado o fator principal na tolerância dessas substâncias (ESHER; ZARAGOZA; ALSPAUGH, 2018; TAJIMA *et al.*, 2019). Além disso, esse pigmento gera uma imunomodulação, processo que forneceu uma proteção para o crescimento fúngico, tendo em vista que induziu a proteção por meio da produção da citocina anti-inflamatória IL-4 (interleucina 4) para ativação das células T tipo 2 (Th2), inibindo assim o processo fagocítico que ocorreria por meio das células T tipo 1 (Th1) durante o processo de eliminação do *C. neoformans* do pulmão (MEDNICK, NOSANCHUCK, CASADEVALL, 2005).

No processo de biossíntese da melanina, estão envolvidos os genes *LAC1* e *LAC2*, os quais codificam a enzima lacase, uma fenol-oxidase, que é responsável pela oxidação de substância fenólicas como a 3,4- dihidroxifenilalanina (DOPA) iniciando, assim, várias reações até a biossíntese de melanina (PUKKILA-WORLEY *et al.*, 2005). A melanina está presente na parede celular de cepas de *C. neoformans*, estando presente nessa estrutura após a fusão de corpos multivesiculares à parede fúngica, nesses corpos contém melanosossomas as quais são organelas onde acontece a síntese de melanina, ressaltando que os grânulos de melanina podem ser liberados para o meio extracelular após a ação enzimática na estrutura dos melanosomas (CAMACHO *et al.*, 2019).

O papel da mielinização foi identificado também na proteção de tratamento contra agentes antifúngicos como no caso da Anfotericina B e da Caspofungina (VAN-DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). Destaca-se que a melanina também apresenta relevância em *C. gattii*, tendo em vista que a expressão da lacase contribui para a inibição do

sistema de defesa dos macrófagos e de respostas dos neutrófilos no início da infecção da criptococose (HANSAKON; NGAMSKULRUNGROJ; ANGKASEKWINAI, 2020).

2.3.3 Urease

A enzima urease, codificada pelo gene *URE1*, é responsável por realizar a hidrólise de ureia em amônia e carbamato, conseguindo fornecer nitrogênio como fonte de utilização para o metabolismo fúngica (COX *et al.*, 2000). A urease é uma metaloenzima devido necessitar de níquel para a efetivação da atividade catalítica, além de necessitar das proteínas acessórias codificadas por *URE4*, *URE6* e *URE7* (SINGH *et al.*, 2013). Todavia, há evidências de funções mais amplas correlacionadas a essa enzima identificada pelos pesquisadores Osterholzer *et al.* (2009) que por meio da infecção com cepas de *C. neoformans* produtoras e não produtoras de urease em camundongos foi observado um crescimento de até 100 vezes das cepas produtoras da enzima quando comparado com as cepas que não a apresentavam após duas semanas de infecção, estando vinculado com a quantidade elevada de IL-4 (interleucina 4) quando comparado com os níveis de INF- γ (interferon gama), polarizando para uma resposta pelas células Th2, que não é eficaz para a eliminação do microrganismo, reduzindo assim a diferenciação em células Th1 que são responsáveis pela eliminação efetiva por meio da fagocitose.

Foi observado em outra linha de pesquisa por Olszewski *et al.* (2004) que a urease está envolvida com o sequestro de *C. neoformans* em microcapilares da BHE, entretanto essa enzima não contribui para o crescimento fúngico ao ser instaurado no cérebro, sendo necessário outros fatores de virulência como a enzima lacase. Em outro estudo realizado por SHI *et al.* (2010), confirmou a associação da urease com o processo de transmigração das cepas pela BHE, sendo verificado raras leveduras no parênquima cerebral no caso de cepas sem urease, diferentemente de cepas com a presença de urease que apresentou um resultado elevado de fungos. No processo de invasão da BHE, surgiu a hipótese do produto da urease, a amônia, estar vinculada na adesão das cepas de *C. neoformans* em razão de aumentar a expressão de adesinas no tecido endotelial ou de realizar um efeito tóxico nas junções das células que compõem a BHE (ZARAGOZA, 2019).

Ademais, em uma pesquisa recente por FU *et al.* (2018), evidenciou que o aumento do pH fagolisossomal por meio da amônia, produzida pela urease, estava associado com uma redução do crescimento fúngico, essa correlação aparentemente parece ser negativa, entretanto essa replicação atrasada pode estar vinculada com latência do fungo dentro do macrófago,

corroborando com evidências sobre a relação entre aumento da replicação intracelular de *C. neoformans* e elevação de danos lisossômicos nos macrófagos. Nessa pesquisa, foi identificado também uma relação entre a presença de urease e ureia com a exocitose não lítica em macrófagos, facilitando a saída do interior da célula, onde ambas permanecem vivas.

2.3.4 Calcineurina

A calcineurina é uma fosfatase ativada por cálcio-calmodulina e composta por duas subunidades, uma catalítica e uma reguladora, que possui como funções a regulação da progressão do ciclo celular, do alongamento das hifas e da homeostase iônica em vários tipos de fungo, inclusive em *C. neoformans*. Ressaltando, que foi identificado a relação entre a atividade dessa enzima e a regulação do crescimento fúngico a 37°C, gerando sobrevivência dentro do hospedeiro infectado (CRUZ; FOX; HEITMAN, 2001; SQUIZANI *et al.*, 2021). Dessa forma, essa fosfatase é essencial para o crescimento de *C. neoformans* em temperaturas superiores a 35°C e em elevadas concentrações de cátions (KOZUBOWSKI *et al.*, 2011).

A presença do complexo Ca²⁺-calmodulina ativa a calcineurina, que tem como principal alvo o fator de transcrição *Crz1*, o qual se desloca para o núcleo e realiza regulação da expressão gênica de genes responsáveis pela produção de transportadores de cálcio como o PMC1, CCH1 e VCX1 e regula negativamente o gene *URE1* (GAMARRA *et al.*, 2010; SQUIZANI *et al.*, 2021). Em quantidades elevadas de cálcio gera a ativação da via de sinalização Ca²⁺- calcineurina, facilitando o crescimento a 37°C, reprodução sexuada e a produção de fatores que auxiliam no processo de virulência em razão de regular a nível transcricional os transportadores de cálcio, a exemplo do transportador de cálcio PMC1, presente na membrana vacuolar, que ao ser interrompido reduz de maneira significativa a transmigração do fungo através da barreira hematoencefálica. É importante evidenciar também que cepas com ausência do transportador PMC1 possuem os níveis intracelulares de cálcio alterados e geram uma menor ativação do gene produtor de urease, *URE1*, e do gene *NIC1*, que codifica um transportador de níquel o qual é necessário para atividade da urease de conversão de ureia em amônia (SQUIZANI *et al.*, 2017).

2.3.5 Outros fatores de virulência

É importante ressaltar que há também outros fatores de virulência como a superóxido dismutase, protease, fosfolipase, proteína antifagocítica 1 e alterações estruturais.

A superóxido dismutase é um polipeptídeo que é sintetizado no citosol e translocado para a matriz da mitocôndria, sendo uma defesa para o microrganismo devido a sua ação antioxidante contra espécies reativas de oxigênio, permitindo assim a viabilidade celular. Além de ter sido identificado que a presença dessa enzima é essencial para o crescimento de colônias de *C. neoformans* em temperaturas elevadas (GILES *et al.*, 2005). Em relação às enzimas fosfolipase e protease, identifica-se que a primeira tem como função digerir membranas celulares e promover lise da célula por meio da hidrólise dos fosfolipídios presentes na membrana, obtendo também uma ação de destruição da substância surfactante nos pulmões, permitindo, assim, uma maior adesão do fungo nesse órgão e que a segunda possui com finalidade de digerir imunoglobulinas e parte do sistema complemento no hospedeiro (CAMPOS; BARONI, 2010). Ressalta-se que a fosfolipase B está vinculada à invasão ao parênquima pulmonar e à disseminação hematogênica e linfática, facilitando esses processos em cepas que continham essa enzima e, conseqüentemente, um aumento do processo infeccioso (SANTANGELO *et al.*, 2004). Em relação à proteína antifagocítica 1, sabe-se que uma função na inibição da fagocitose realizada pelo sistema complemento, sendo essa proteína regulada por algumas condições no pulmão do hospedeiro como temperatura, concentração de CO₂ e quantidade de glicose (MOMIN; WEBB, 2021). Por fim, há alterações estruturais que favorecem a virulência como as modificações que geram um aumento celular e espessamento da parede celular e da cápsula, onde cerca de 30% das células de *C. neoformans* são convertidas nessas células maiores, células Titãs, no início da infecção pulmonar, resultando em uma diminuição da fagocitose (ZAFAR *et al.*, 2019).

2.4 Tratamento preconizado para a criptococose

De acordo com o Ministério da Saúde o tratamento para meningite criptocócica deve contar com o auxílio do Guia de Vigilância em Saúde, levando em consideração tanto o estado imunológico do paciente quanto o acesso dos medicamentos. Todo o tratamento é dividido em três fases sendo essas: indução, consolidação e manutenção, com auxílio de AFB, FCZ, ITR e FC, sendo este último antifúngico recentemente incorporado em razão da eficácia superior e segurança semelhante ao tratamento quando vinculado com a AFB do que quando a AFB é usada isoladamente, obtendo também efeito sinérgico após a combinação da AFB com FC (BRASIL, 2022, STEVENS, 2012).

De acordo com o Consenso em criptococose por Kon *et al.* (2008) a terapia para infecção pulmonar por *Cryptococcus* spp. em indivíduos imunocompetentes envolve FCZ ou

ITR ou AFB de 6 a 12 meses nos casos leves a moderados, e em indivíduos imunocomprometidos FCZ ou ITR de 6 a 12 meses. Em relação aos dois tipos de pacientes, caso haja a presença da forma grave da infecção pulmonar, indica-se o tratamento como meningoencefalite, além de ser possível que pacientes com formas pulmonares localizadas, assintomáticos, oligossintomáticos ou com nódulo pulmonar ressecado não utilizem antifúngicos, porém devem ter uma monitorização criteriosa dos sintomas e parâmetros laboratoriais.

Os antifúngicos utilizados no tratamento da infecção por *Cryptococcus* sp. possuem mecanismos de ação específicos a exemplo da AFB que é um polieno macrolídeo anfotérico e que se liga principalmente ao ergosterol, o qual está presente na membrana celular do fungo, formando poros a fim de alterar a permeabilidade, favorecendo, assim, o extravasamento de moléculas intracelulares e lise celular. Ressalta-se que é um antifúngico com maior espectro de ação, englobando *C. albicans*, *C. neoformans* e *Aspergillus fumigatus* administrado por via intravenosa (FUCHS; WANNAMACHER, 2017). Com relação ao FCZ, esse fármaco faz parte dos triazóis e tem ação na inibição da enzima lanosteol 14- α desmetilase (CYP51) do grupo citocromo P450, que é responsável pela produção do ergosterol, um dos principais componentes da membrana celular fúngica, tendo utilização tanto na meningite criptocócica quanto na candidemia por via intravenosa ou via oral (KATZUNG, VANDERAH, 2023; MENOZZI *et al.*, 2017).

Outro fármaco que faz parte dos triazóis é o ITR que tem ação também na inibição da síntese do ergosterol, podendo ser utilizado no tratamento de várias micoses sistêmicas como aspergilose, blastomicose, candidíase, apresentando uma atividade antifúngica potente que pode ser administrado via oral ou intravenosa (CAZEDEY *et al.*, 2007; KATZUNG, VANDERAH, 2023). Por fim, o fármaco FC que inicialmente foi desenvolvido como antineoplásico, mostrou-se ser um antifúngico potente por meio da introdução em células fúngicas, com auxílio da enzima permease, e depois da conversão à 5-fluorouracil, por meio da citosina desaminase, e do processamento, por intermédio da uracil fosforibosiltransferase, para ocorrer assim a inibição da enzima timidilato sintetase e, conseqüentemente, redução da síntese do desoxirribonucleotídeo timina que compõe de DNA do fungo, sendo ativa contra *C. neoformans* spp., *Candida* spp. e fungos demáceos que causam a cromoblastomicose, normalmente sendo associada com AFB em infecções graves (KATZUNG, VANDERAH, 2023; RITTER *et al.*, 2022; ZHAO *et al.*, 2023).

Dentre as fases do tratamento farmacológico da criptococose, a fase de indução tem o objetivo de reduzir de maneira significativa a carga fúngica e, conseqüentemente, as taxas de

mortalidade, obtendo como período mínimo de duas semanas, a fase de consolidação está vinculada com a permanência de negatividade da carga fúngica e normalização de sintomas e de parâmetros laboratoriais, sendo utilizada por no mínimo oito semanas, e por fim, a fase de manutenção, a qual também é denominada de fase de supressão, tendo como finalidade manter o paciente sem a reincidência de infecção em pacientes imunossuprimidos com $CD4^+ < 100$ células/mm³, obtendo um tempo mínimo de 1 ano, variando de acordo com o estado imunológico do indivíduo (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021; KON *et al.*, 2008).

Na fase da indução, é preconizado AFB, que pertence ao grupo poliênico e que possui um sinergismo com flucitosina, podendo assim vir associada com FC por pelo menos 14 dias, principalmente em casos mais graves. É importante evidenciar que há a possibilidade de indicação do uso de fluconazol associado à FC como alternativa terapêutica nessa fase inicial em pacientes imunodeprimidos. Na fase de consolidação há o uso do FCZ que é do grupo dos azóis, sendo preconizado a utilização por no máximo de 10 semanas quando presente nessa fase. Ressalta-se, que o uso do fluconazol só acontece quando anteriormente há o uso da AFB em associação com FC pelo período predefinido. Por fim, na fase de manutenção há a recomendação, para pacientes imunodeprimidos, o uso de fluconazol ou de itraconazol durante um período extenso de 12 a 24 meses (BRASIL, 2019; RITTER *et al.*, 2022; STEVENS, 2012).

Segundo as diretrizes para diagnóstico, prevenção e gerenciamento da criptococose em adultos, adolescentes e crianças infectados pelo HIV da OMS (2018), é necessário a triagem para antígeno criptocócico seguida de terapia preventiva caso haja positividade da presença do antígeno antes de iniciar ou reiniciar terapia anti-retroviral (TARV) em adultos e adolescentes HIV positivos com contagem < 100 células/mm³ de células $CD4^+$, a fim de reduzir o desenvolvimento da meningite criptocócica. Entretanto, em crianças não é recomendada a profilaxia inicial em razão da baixa incidência de meningite criptocócica nessa faixa etária. Sendo enfatizado também nessas diretrizes que não é recomendado o uso de corticoide junto com a terapia de indução e que a TARV, para pacientes positivo para o vírus HIV e meningite criptocócica, deve ser adiada por 4 a 6 semanas após o início da terapia antifúngica, a fim de reduzir os riscos de mortalidade.

2.5 Resistência aos antifúngicos

A resistência a terapia com antifúngicos é uma problemática em razão do escasso arsenal de antifúngicos para erradicar os fungos e do crescente aparecimento de patógenos multirresistentes, que foram gerados por vários mecanismos adaptativos de resistência como

alteração do alvo da droga com a formação de esteróis alternativos dificultando a ligação com a Anfotericina B e superexpressão de bombas de efluxo para a liberação dos antifúngicos dos alvos do ativo farmacológico (LEE *et al.*, 2021).

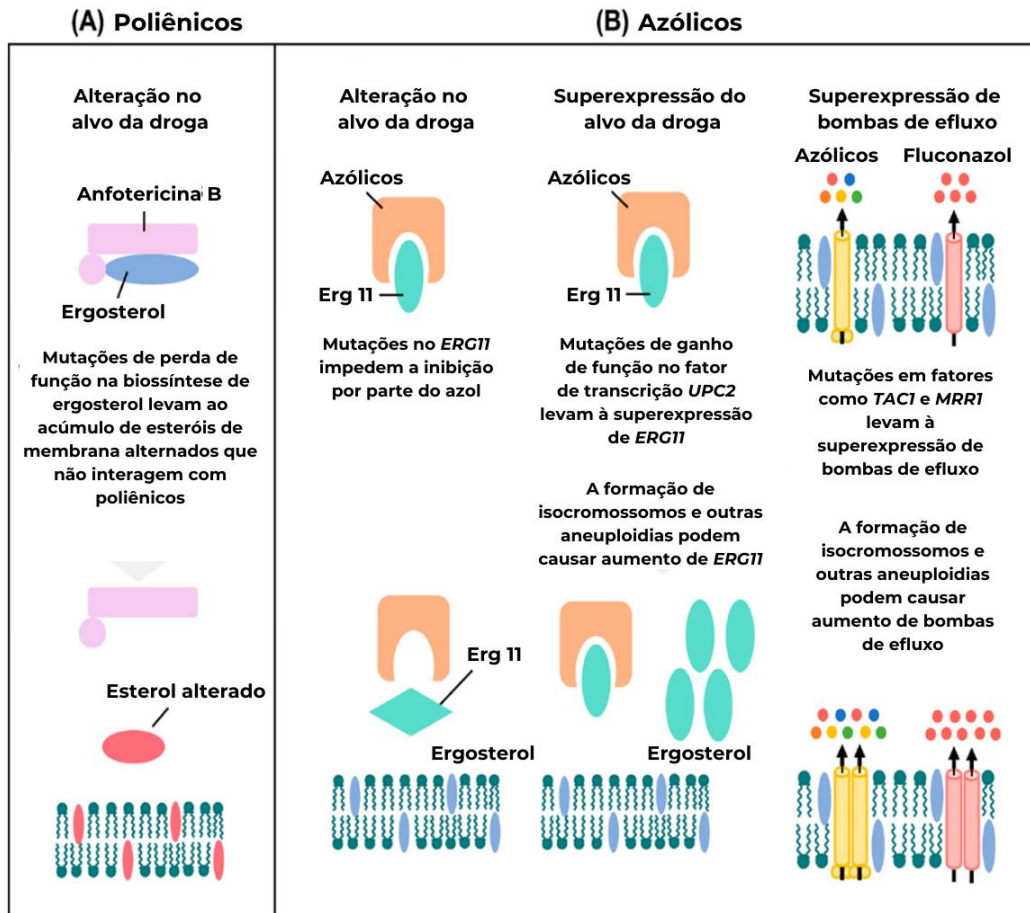
Em relação aos compostos poliênicos, o principal mecanismo de resistência proposto é a mutação na enzima esterol $\Delta 8-7$ isomerase, reduzindo a síntese de ergosterol, dificultando, assim, a ação da AFB em *C. neoformans* (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020). O mecanismo de resistência relacionado ao antifúngico do grupo de poliênicos está representado na Figura 2.

Há também a existência de resistência aos compostos azólicos em vários fungos, englobando o fungo causador da criptococose, em razão de provavelmente possuir ação fungistática. Os mecanismos envolvidos nos fungos resistentes estão vinculados a 1) mutações no *ERG11*, que é o gene responsável pela produção da enzima lanosteol 14- α desmetilase, a qual é o principal alvo de ação do FCZ, e 2) superexpressão de genes *ERG11*, aumentando a quantidade de alvos com o fito de diminuir a susceptibilidade ao medicamento, e de genes *AFR1* e *MDR1* vinculados a formação de bombas de efluxo (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020). Ressalta-se que cepas de *C. neoformans* são heterorresistentes aos compostos azólicos, contribuindo o retorno da infecção fúngica durante a terapia de manutenção com o FCZ (ZHAO *et al.*, 2023).

Há trabalhos que evidenciam esses mecanismos de resistência como em um trabalho por Sionov, Chang e Kwon-Chung (2013) que identificou o aumento de cepas *C. neoformans* que não responderam ao tratamento antifúngico, em decorrência de uma superexpressão do gene *ERG11*, sendo esse aumento relacionado possivelmente com o uso prolongado do FCZ.

O outro mecanismo de resistência identificado está vinculado com o aumento da expressão do gene *CnAFR1*, que codifica a proteína de bomba de efluxo presente na membrana, aumentando assim a formação dessa proteína que irá realizar a retirada dos fármacos do interior do microrganismo e, conseqüentemente, uma ineficácia do tratamento terapêutico, a exemplo do que foi observado em *C. neoformans* com o efluxo principalmente do FCZ (POSTERARO *et al.*, 2003). Os mecanismos de resistência envolvendo os compostos azólicos estão esquematizados na Figura 2.

Figura 02 – Mecanismos de resistência aos antifúngicos



Fonte: Adaptado de LEE *et al.*, 2021

Em relação a FC, foram relatadas mutações em cepas de *C. neoformans* no gene *MSH2*, que é responsável por codificar a proteína de reparo de incompatibilidades do DNA, gerando estados hipermutadores com aumento de mutações e de aneuploidias que podem conferir uma ineficácia frente ao uso dos antifúngicos, principalmente à FC (ZHAO *et al.*, 2023). Ademais, foram relatadas resistências à flucitosina em cepas criptocócicas correlacionadas à mutagênese dos transposons, que são genes transponíveis na sequência de DNA, além de mutações que geram a inibição da expressão do gene *FURI*, responsável pela produção uracil fosforibosiltransferase, do gene *FCY2*, que produz a citosina permease e do gene *UXS1*, que realiza a produção de uma enzima conversora de ácido UDP glicurônico gerando o acúmulo dessa substância que age suprimindo o pró-fármaco (FC) e o fármaco (5-fluorouracil) (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020; BILLMYRE *et al.*, 2020).

Em relação a resistência aos antifúngicos utilizados, foi observado em um estudo que algumas cepas de *C. neoformans* e de *C. gattii* não apresentaram redução com o uso do itraconazol e da anfotericina B, que são fármacos utilizados normalmente na terapia da criptococose (DA SILVA *et al.*, 2008). Em outra pesquisa com o FCZ e a AFB foi identificado um aumento da concentração inibitória mínima (CIM) de AFB para com as cepas de *C. neoformans* em razão de uma reduzida quantidade de esteróis da membrana, logo por ter uma dependência dessas substâncias para alterar a permeabilidade da membrana celular, evidenciou-se que a mudança da quantidade gerou uma resistência a esse antifúngico (KELLY *et al.*, 1994). Ressalta-se também que a presença de células tiths está vinculada com a resistência ao FCZ e à AFB, em decorrência de diminuir a penetrabilidade do fármaco, reduzindo ação para eliminação da infecção (ZAFAR *et al.*, 2019).

2.6 Novas alternativas terapêuticas para contornar a resistência aos antifúngicos

2.6.1 Associação de fármacos

A interação entre fármacos pode desencadear uma alteração da absorção, da distribuição, da metabolização e da excreção, além de poder promover uma ação sinérgica, aditiva, indiferente e antagonista, logo dependendo da associação pode desencadear uma melhora significativa com a redução do tempo de tratamento. Com relação à interação farmacodinâmica, no efeito sinérgico há um aumento de um efeito terapêutico que pode ser desencadeado por uma junção de fármacos que possuem o mesmo mecanismo de ação ou por uma associação de fármacos que possuem vias de ação diferentes, em que um fármaco potencializa o efeito do outro, reduzindo as concentrações efetivas. Há também as interações aditivas que a ação final é resultado da soma das ações individuais, indiferentes que após a associação a ação é equivalente a um fármaco utilizado sozinho e, por fim, a ação antagonista, que acontece a redução ou supressão de uma resposta farmacológica de um medicamento a partir da presença de outro, reduzindo a eficácia do efeito terapêutico (JORGE *et al.*, 2017; SECOLI, 2001).

As interações entre os medicamentos podem gerar benefícios no tratamento terapêutico a exemplo do reforço da eficácia e da redução da resistência microbiana, aumentando as chances de eliminação da doença ou minimização do problema de saúde que esteja acometendo o paciente (BRASIL, 2012). Além da associação entre as drogas poderem retardar a progressão de resistência do microrganismo ao esquema terapêutico, há também o

favorecimento de redução das quantidades administradas em razão da combinação medicamentosa, diminuindo, assim, o risco de toxicidade (HASSELT; IYENGAR, 2019).

As combinações de fármacos estão inseridas atualmente no mercado como o esquema no tratamento da tuberculose que associa os medicamentos rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol e no tratamento da meningite criptocócica que indica as associações da AFB e FC ou do FCZ e FC (BRASIL, 2019). Outras combinações são realizadas para ampliar espectro de ação contra microrganismos no ambiente hospitalar como o uso concomitante da vancomicina e meropenem (SANTOS *et al.*, 2016).

2.6.2 Reposicionamento de fármacos

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia que identifica possíveis princípios ativos, que já possuem perfil farmacocinético e toxicológico descritos, para uma nova indicação clínica, a qual difere da indicação original para o qual foi desenvolvido (BUTTS; KRYSAN, 2012; PUSHPAKOM *et al.*, 2018). Exemplos de medicamentos que passaram por esse processo de reaproveitamento é o minoxidil que foi desenvolvido inicialmente para controlar a hipertensão arterial por via oral e após observações de efeitos colaterais como a hipertricose e realização de alguns estudos começou a utilização de solução de minoxidil aplicado via tópica para o tratamento de alopecia androgenética (NASCIMENTO; GONÇALVES, 2021).

A fim de realizar o reposicionamento de medicamentos, primeiramente, uma molécula é identificada a ser um possível potencial para uma determinada ação farmacológica e depois há realização de estudos pré-clínicos e estudos clínicos, levando em consideração a segurança estabelecida nos estudos de fase I que foram realizados para a indicação inicial. Com o objetivo selecionar a molécula podem ser realizados as abordagens computacionais, que englobam comparação de assinaturas de um medicamento com base por exemplo nas similaridades estruturais; realização de *docking* molecular computacional; estudos da associação do genoma, identificando novos alvos para determinada doença; mapeamento de caminhos, onde envolve a construção de caminhos com dados genéticos, dados da doença e interação proteica; análise clínica retrospectiva, analisando registros eletrônicos de saúde e novas fontes de dados como grandes biobancos de DNA vinculados com os registros eletrônicos de saúde. Além dessa abordagem, há as abordagens experimentais, tendo exemplo os ensaios como a cromatografia de afinidade e espectrometria de massa para identificar novos alvos de drogas conhecidas e a triagem fenotípica englobando modelos *in vivo* e *in vitro* com a finalidade

de identificar moléculas que apresentam efeitos para determinadas doenças (PUSHPAKOM *et al.*, 2018).

Em razão da presença de resistências a alguns tratamentos e do repertório reduzido de antifúngicos quando comparado com a quantidade de antibacterianos começou a ascensão da utilização do reposicionamento de fármacos, ou seja, da busca de medicamentos que continham capacidade antifúngica, mas com indicações que a priori não se enquadravam como um antifúngico, começando também associar, principalmente, com antifúngicos existentes, buscando, assim, um efeito sinérgico (BUTTS; KRYSAN, 2012).

No tocante à inibição de cepas de *C. neoformans*, foi identificado um efeito antifúngico na combinação de um antimalárico, primaquina, e de um anti-inflamatório, celecoxibe (VALLIÈRES *et al.*, 2020). Outro fármaco testado em experimentos foi o mebendazol interagindo com FCZ e AFB, sendo identificado efeito sinérgico com a AFB, entretanto sem efeito na associação com FCZ (JOFFE *et al.*, 2017).

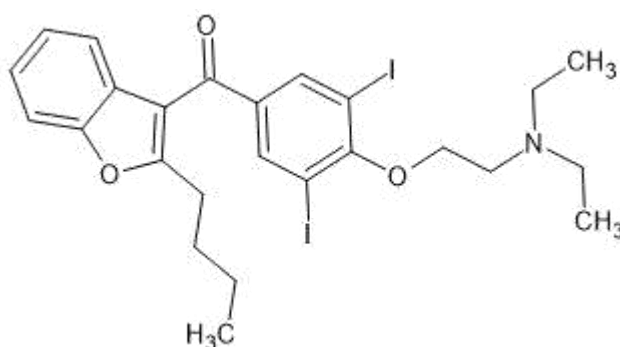
Ademais, foi demonstrado a efetividade de outros fármacos na eliminação das cepas desse microrganismo como a sertralina, que é um psicotrópico, tendo evidência de eliminação também da carga fúngica presente no cérebro em murinos, mostrando ser uma possibilidade de uso nos casos de meningite criptocócica (ZHAI *et al.*, 2012). Posteriormente, para colocar em prática o reposicionamento de medicamentos de maneira eficaz foram realizados em ensaios clínicos como os estudos de fase III com a sertralina (NCT 01802385) e outro estudo envolvendo a utilização em um grupo de pessoas, inclusive pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) com meningite criptocócica, sendo identificado que os indivíduos apresentaram depuração fúngica e uma menor incidência de síndrome inflamatória de reconstituição imune (RHEIN *et al.*, 2016). Dessa forma, o reposicionamento de fármacos é bastante promissor principalmente pelo medicamento obter testes de segurança e reduzir os custos em relação à pesquisa e desenvolvimento de novos ativos (PUSHPAKOM *et al.*, 2018).

2.6.2.1 Amiodarona

A amiodarona (AMD), (2-butil-1-benzofuran-3-il)-[4-[2-(dietilamino)etoxi]-3,5-diidrofenil]metanona (Figura 3), é um fármaco antiarrítmico de classe III, obtendo o mecanismo de ação por meio do prolongamento do potencial de ação cardíaco através de alguns canais de potássio. Tal prolongamento aumenta o período refratário, reduzindo assim episódios de taquicardia (RITTER *et al.*, 2022). Esse fármaco apresenta-se tanto na forma líquida, que possui como dose usual 5mg/kg em 250mL de solução de glicose a 5% e administração

parenteral por um período de 20 minutos a 2 horas, quanto na forma sólida, que pode ter doses diárias variando de 100mg a 1000mg dependendo da necessidade do paciente e administração oral (CLORIDRATO DE AMIODARONA, 2019, GUIA FARMACÊUTICO, 2021). A AMD tem ação inibitória nas enzimas CYP 3A4, CYP 2C9, CYP 2D6 e tempo de meia-vida de eliminação longa variando de 20 a 100 dias, além de possuir elevada distribuição pelos tecidos (CLORIDRATO DE AMIODARONA, 2019). Em relação a concentração plasmática máxima pode variar de 2,5 a 3µg/mL atingindo o pico entre 3 e 7 horas (ANCORON, 1997; CLORIDRATO DE AMIODARONA, 2019).

Figura 03 - Representação estrutural da Amiodarona



Fonte: Adaptado do PUBCHEM, 2004

Nas últimas décadas, começou a correlação da atividade antifúngica, principalmente em *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus nidulans*, tendo dados que em cepas de *C. neoformans* há uma inibição a partir do uso da AMD na concentração de 5µM, que é equivalente a 3,2µg/mL, bloqueando totalmente a proliferação desse fungo (COURCHESNE, 2002). Além disso, foi observado na literatura outra linha de pesquisa que demonstrou eficácia contra cepas fúngicas, realizada por Da Silva *et al.* (2013) com *Candida tropicalis*.

Recentemente, foram realizados estudos envolvendo administração de amiodarona em nanocápsulas lipídicas em camundongos, obtendo como resultado um aumento do efeito antifúngico, provavelmente pelo influxo de cálcio e H⁺, causado pela hiperpolarização da membrana transitória seguida de uma despolarização, e pela regulação a expressão dos genes envolvidos na via cálcio-calcidurina (MARESOVA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

A fim de analisar a atividade antifúngica da AMD, foi evidenciado em um estudo com *C. albicans* que esse fármaco alterou a expressão de genes responsáveis pela produção da parede celular e pela regulação de cátions, de vias de transcrição, do transporte vesicular e do

ciclo celular, conferindo atividade ligada ao estresse de cálcio e pH em razão da superexpressão dos canais de Ca^{+2} de membrana, CCH1 e MID1, e do vacúolo, PMC1 (GAMARRA *et al.*, 2010). Sendo essa atividade antifúngica da AMD evidenciada em outra linha de pesquisa, onde foi observado efetividade da AMD e de um antipsicótico, Tioridazina, em cepas de *C. neoformans* dentro de fagócitos murinos, mostrando ser potenciais na eliminação de uma infecção pulmonar (BUTTS *et al.*, 2013).

A associação da AMD com outro antifúngicos, como o FCZ, parece ser bastante promissora, tendo em vista que em um trabalho com *C. tropicalis* houve o aumento de células eliminadas após o tratamento com a associação desses dois fármacos e a combinação entre as drogas obteve-se um $\text{ICIF} \leq 0,50$ que correlaciona com uma interação farmacológica do tipo sinérgica (DA SILVA *et al.*, 2013). Portanto, ao avaliar esses dados que demonstram a atividade promissora acerca da AMD é necessário a exploração do seu efetivo potencial antifúngico durante o tratamento da criptococose, podendo reduzir a evolução da doença principalmente em pacientes imunossuprimidos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica da Amiodarona *in vitro* e a sua interação farmacológica com o Fluconazol frente a cepas clínicas de *Cryptococcus* spp.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima da Amiodarona em cepas de *Cryptococcus* spp.;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima do Fluconazol em cepas de *Cryptococcus* spp.;
- Avaliar a interação farmacológica entre a Amiodarona e o Fluconazol.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento e local da pesquisa

O estudo que foi realizado é experimental, prospectivo e de caráter analítico. Ressaltando que o experimento foi desenvolvido no Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN - UFC).

4.2 Obtenção das cepas

Neste estudo foram utilizadas 7 cepas clínicas de *Cryptococcus* spp. e 2 cepas do banco ATCC, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, que é intrinsecamente sensível ao FCZ, e *Candida krusei* ATCC 6258, que é resistente ao FCZ, as quais são cepas de referência utilizadas no controle de qualidade do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, todas pertencentes à micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN - UFC). As cepas foram armazenadas em caldo Muller Hinton acrescido de glicerol, a uma temperatura de -20°C.

Na recuperação, transferiu-se 100µL da suspensão das leveduras em 900µL de meio caldo Sabouraud dextrose e levadas posteriormente para serem incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas as cepas de *Cryptococcus* spp. e 24 horas as cepas de *Candida* spp., que é correspondente à fase exponencial de crescimento. Depois, foi realizado um repique em meio ágar Batata com cloranfenicol 2% onde foram incubadas novamente a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas (CLSI, 2008).

4.3 Obtenção dos ativos farmacológicos

Os fármacos Amiodarona (Hipolabor) e Fluconazol (Sigma-Aldrich) foram cedidos pelo LABIMAN-UFC e foram utilizados nas concentrações de trabalho de 512 µg/mL e de 128 µg/mL respectivamente.

4.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade das cepas de *Cryptococcus* spp. foi realizado pela técnica de Microdiluição em Caldo conforme o método estabelecido pela norma M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008).

4.4.1 Preparo do inóculo

As cepas foram repicadas em placas contendo meio de cultura ágar Batata com cloranfenicol 2% e posteriormente incubadas em temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas. Posteriormente, utilizou uma alça bacteriológica para retirar a colônia e inocular em 3 mL de solução salina estéril 0,85% (p/v). Após a realização da suspensão, realizou o ajuste de densidade celular para a escala 0,5 de McFarland (CLSI, 2008).

A partir dessa suspensão com a densidade já ajustada foi retirada a quantidade de 20 μL para inocular em um tubo contendo 1mL de meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute* (pH 7,0) tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS, Sigma-chemical) e deste tubo foi retirado 100 μL para inocular em outro tubo contendo RPMI 1640 q.s.p. 2mL, sendo essa última diluição utilizada no teste (CLSI, 2008).

4.4.2 Inoculação em microplaca

O teste foi realizado em placas de microdiluição estéreis e descartáveis, as quais apresentavam 96 poços em formato de U. Com a micropipeta multicanal, adicionou-se 100 μL de meio RPMI 1640 em cada fileira da placa, excetuando a segunda fileira que foi destinada para colocar 200 μL da AMD diluída com a concentração de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e do FCZ diluído em concentração de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Logo em seguida, 100 μL da droga foi retirada do poço 2 e transferido ao poço 3 seguindo em ordem até o poço 11 a fim de realizar a diluição seriada. Posteriormente, foi utilizada uma pipeta monocal para colocar 100 μL de cada inóculo com os microrganismos do poço 2 ao 12. Desta forma, o poço 1 foi o controle negativo do teste, contendo apenas o meio de cultura e que o poço 12 foi o controle positivo do teste, estando presente meio de cultura e microrganismo. Por fim, as placas foram incubadas em estufa por 72 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para posterior leitura dos resultados, a qual foi realizada visualmente (CLSI, 2008).

4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima foi definida como a menor concentração da droga que impediu o crescimento visível de 50% do microrganismo. Dessa forma, a análise foi realizada visualmente comparando os crescimentos obtidos no poço 12, controle positivo, com

os poços contendo as diferentes concentrações da droga resultante da diluição seriada (CLSI, 2008).

4.6 Avaliação da interação farmacológica

A fim de determinar a interação farmacológica, utilizou-se o método de *Checkerboard* adaptado de Da Silva et al. (2013), onde realizou-se a determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF). O ICIF foi calculado de acordo com a equação número 1. É importante evidenciar que CIM A e CIM B ISOLADO correspondem às concentrações inibitórias das drogas isoladas e CA e CB COMBINADO se referem às concentrações dos fármacos combinados. A CIM encontrada para cada droga foi determinada de acordo com o teste sensibilidade aos antimicrobianos para o *Cryptococcus* spp.

Foi adicionada a quantidade de 100µL do meio RPMI 1640 em cada fileira da placa, excetuando a segunda fileira que foi destinada para colocar 200µL da solução resultante da combinação das concentrações dos fármacos de acordo com a cepa avaliada. Logo em seguida, foi realizada a diluição seriada do poço 2 até o poço 11 e depois adicionado 100µL do inóculo final. Ressalta-se que o poço 1 foi o controle negativo do teste, contendo apenas o meio de cultura e que o poço 12 foi o controle positivo, estando presente meio de cultura e microrganismo (CLSI, 2008). No final, a interação entre as drogas foi classificada como sinérgica (SIN), se $ICIF \leq 0,5$; aditiva (ADT), se $0,5 < ICIF \leq 1$; indiferente (IND), se $1 < ICIF \leq 4$; ou antagonista (ANT), se $ICIF > 4$ (JORGE *et al.*, 2017).

$$ICIF = \frac{CA \text{ COMBINADO}}{CIM \text{ A ISOLADO}} + \frac{CB \text{ COMBINADO}}{CIM \text{ B ISOLADO}} \quad (1)$$

4.7 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado considerado foi a média aritmética dos testes com o fluconazol e amiodarona.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da CIM

A partir da realização dos ensaios de sensibilidade aos antimicrobianos, as CIMs foram determinadas para cada droga frente às cepas testadas. Para a amiodarona, os valores de CIM variaram entre o intervalo de 1,33 a 213,3 μ g/mL envolvendo cepas clínicas de *Cryptococcus* sp., e de 2 e 1 μ g/mL para as cepas ATCC (Tabela 1).

A CIM encontrada para o fluconazol nas cepas clínicas de *Cryptococcus* spp. variaram entre 1 a 5,33 μ g/mL e de 2 e 32 μ g/mL para as cepas ATCC (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol (FCZ) e da amiodarona (AMD) em cepas de *Cryptococcus* spp. e cepas ATCC (*American Type Culture Collection*)

Identificação das cepas	CIM 50% (μ g/mL)	
	FCZ	AMD
<i>Cryptococcus</i> sp. (01)	1	149,33
<i>Cryptococcus</i> sp. (02)	1,75	74,66
<i>Cryptococcus</i> sp. (03)	2,75	3,66
<i>Cryptococcus</i> sp. (04)	2,75	4,33
<i>Cryptococcus</i> sp. (05)	3	213,33
<i>Cryptococcus</i> sp. (06)	2,25	1,33
<i>Cryptococcus</i> sp. (07)	5,33	256
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 sensível ao FCZ	2	2
<i>C. krusei</i> ATCC 6258 resistente ao FCZ	32	1

Fonte: elaborada pela autora.

5.2 Avaliação do efeito associado da amiodarona e do fluconazol

Dentre as 7 cepas analisadas, observou-se que em 4 (57,14%) houve uma redução da CIM em decorrência da ação sinérgica da associação da amiodarona com o fluconazol; em 3 (42,86%) apresentaram interação do tipo aditiva. Nenhuma cepa apresentou efeito antagonista (Tabela 2). Ademais, foi evidenciado uma diminuição da CIM tanto do FCZ quanto da AMD,

obtendo o exemplo da cepa 7 que apresentou um valor 4 vezes menor quando comparado a concentração inibitória mínima da AMD antes (Tabela 1) e após a associação farmacológica (Tabela 2).

Tabela 2 – A interação farmacológica entre o fluconazol (FCZ) e a amiodarona (AMD) frente a cepas de *Cryptococcus* spp. e cepas ATCC (*American Type Culture Collection*), classificada como sinérgica (SIN), aditiva (ADT), indiferente (IND), ou antagonista (ANT) a partir do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF)

Cepas	CIM FCZ COMBINADO (µg/mL)	CIM AMD COMBINADO (µg/mL)	ICIF	Tipo de interação
<i>Cryptococcus</i> sp. (01)	0,33	49,77	0,66	ADT
<i>Cryptococcus</i> sp. (02)	0,21	9,33	0,24	SIN
<i>Cryptococcus</i> sp. (03)	1,25	1,67	0,91	ADT
<i>Cryptococcus</i> sp. (04)	0,68	1,08	0,5	SIN
<i>Cryptococcus</i> sp. (05)	0,09	6,66	0,06	SIN
<i>Cryptococcus</i> sp. (06)	1,12	0,66	0,99	ADT
<i>Cryptococcus</i> sp. (07)	1,33	64	0,5	SIN
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 sensível ao FCZ	2	2	2	IND
<i>C. krusei</i> ATCC 6258 resistente ao FCZ	16	0,5	1	ADT

Fonte: elaborada pela autora.

6 DISCUSSÃO

Em detrimento do aumento da ineficácia de eliminação de cepas de *Cryptococcus* spp. frente aos fármacos utilizados na terapia antifúngica como o fluconazol e anfotericina B, visa-se a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novas opções terapêuticas efetivas. Dessa forma, é de grande importância a busca de ativos farmacológicos a fim de serem utilizados no combate a infecções fúngicas, onde o reposicionamento de fármacos se torna uma estratégia viável devido às propriedades farmacológicas e toxicológicas serem previamente conhecidas.

No presente trabalho, a AMD demonstrou atividade inibitória frente a cepas de *Cryptococcus* spp., onde observou-se semelhança da CIM de 3 cepas clínicas deste estudo com uma pesquisa realizada que obteve os valores de CIM da AMD iguais a 12,5 µg/mL para duas cepas e a 6,25 µg/mL para uma cepa de *Cryptococcus* sp. (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Em outra linha de estudo por Courchesne (2002) envolvendo cepa de *C. neoformans* de um banco, JEC21, obteve a conclusão que o aumento da concentração da AMD permitia lentificar o processo de crescimento celular, inibindo drasticamente a proliferação criptocócica. Além disso, foi identificado nesse mesmo estudo que o uso das concentrações 5 µM (3,2µg/mL) e 7 µM (4,5µg/mL) reduziram o crescimento de uma cepa clínica de *Cryptococcus* sp. e que as CIM variaram entre 15 µM (9,7µg/mL) a 50 µM (32,3µg/mL) para as espécies fúngicas *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidula*, respectivamente. Quando comparado com os resultados obtidos, observou-se que em três cepas clínicas 3, 4 e 6, conforme mostradas na Tabelas 1 e Tabela 2, a AMD apresentou a concentrações abaixo de 4,5 µg/mL, principalmente após a associação com o FCZ.

Em outro estudo envolvendo cepas de *C. albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol, foi observado que os valores da concentração inibitória mínima da AMD foram iguais a 25 µg/mL, onde esse valor encontra-se no intervalo dos resultados achados neste estudo. Essa comparação evidencia que apesar de serem microrganismos de espécies diferentes há uma proximidade dos valores obtidos das CIMs da AMD, o que sugere que atividade antifúngica pode acontecer, provavelmente, em sítios ou por mecanismos de ação semelhantes (GAMARRA *et al.*, 2010).

É possível evidenciar que a Amiodarona além de apresentar atividade antifúngica *in vitro* possui também ação contra bactérias, tendo em vista que em um estudo *in vitro* houve ação rápida de eliminação de cepas bastante isoladas na clínica, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, onde apresentaram valores de CIM

menores ou iguais a 0,5µg/mL (ITTZES *et al.*, 2020). Ademais, foi identificado também uma efetividade da AMD contra o vírus *Ebola*, causador da doença Ebola, durante um estudo com células infectadas com o vírus utilizando a concentração equivalente a 3,6 µg/mL (5,6 µM) (SALATA *et al.*, 2015).

Os resultados, após o método de *Checkerboard*, têm associação com o trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2021) que também observou uma redução dos valores de CIM do FCZ e da AMD quando associados, a exemplo de uma cepa que antes apresentava CIM do FCZ de 0,5 µg/mL e após o uso em conjunto apresentou CIM igual a 0,25 µg/mL, obtendo ao final um valor de ICIF que caracterizava uma interação aditiva. Ao avaliar as cepas clínicas utilizadas no teste, interações do tipo aditiva também foram encontradas no presente trabalho, tendo em vista que após a combinação dos fármacos evidenciou uma ação aditiva em 3 (42,86%) cepas clínicas de *Cryptococcus* spp.

Além disso, obteve-se uma interação sinérgica em 4 (57,14%) cepas clínicas, sendo essa interação similar ao resultado de um estudo com *Candida tropicalis* que em 6 cepas clínicas a combinação entre AMD e FCZ também gerou um efeito sinérgico (DA SILVA *et al.*, 2013). Em outro estudo também realizado com fungo, sendo mais especificamente *C. albicans*, observou-se uma interação sinérgica entre a AMD e o FCZ principalmente em cepas resistentes ao FCZ (GAMARRA *et al.*, 2010). Tanto a interação sinérgica quanto a interação aditiva são relevantes, visto que podem favorecer a eficácia ao reduzir as concentrações utilizadas dos medicamentos e ao diminuir a resistência ao tratamento farmacológico (HASSELT; IYENGAR, 2019). Dessa forma, há o aumento da possibilidade de eliminação de cepas clínicas de *Cryptococcus* spp., e, conseqüentemente, redução dos casos de criptococose e de meningite criptocócica.

O sinergismo do antifúngico com outras drogas é de grande relevância para o tratamento, tendo em consideração que há a presença de isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* com a presença de uma sensibilidade reduzida aos antifúngicos utilizados como anfotericina B, fluconazol e itraconazol (MACHADO *et al.*, 2022). Tal situação também é favorável ao analisar o contexto que os valores de CIM do FCZ estão aumentando com base em um estudo de vigilância laboratorial para criptococose realizado em dois períodos, 2007-2008 e 2017, onde foi identificado uma elevação do número de cepas de *Cryptococcus* spp. que passaram a ser inibidas por uma concentração maior desse fármaco, estando vinculada com o aparecimento de mecanismos de resistência, evidenciando-se, assim, que o aumento de CIM é preocupante devido à maior chance de falha terapêutica e óbito do paciente e que há a necessidade de ter o

auxílio de outros medicamentos para combater o crescimento desse fungo (NAICKER *et al.*, 2020).

Butts *et al.* (2013), obtiveram uma redução em escala logarítmica das Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) das cepas de *C. neoformans* quando tratadas com a associação de amiodarona com fluconazol. Além disso foi evidenciado também por esse grupo de pesquisadores que a AMD foi responsável pela redução da carga das cepas fúngicas que estavam no interior de fagócitos murinos J774, sendo de grande importância, visto que se tem o conhecimento que a cápsula polissacarídica das cepas de *Cryptococcus* spp. tem como função reduzir a eliminação dentro dos fagócitos. Logo, a amiodarona mostra-se ser bastante promissora no combate ao crescimento fúngico, tendo em vista que alguns microrganismos se apresentam no interior de fagossomos dificultando, assim, a ação da anfotericina B e do fluconazol, os quais seriam os principais fármacos a fim de reduzir a crescimento fúngico.

O fármaco amiodarona tem indicação de utilização principalmente no tratamento agudo de arritmias, tendo um pico de concentração plasmática atingido cerca de 5 a 6 horas após a administração oral. De acordo com os estudos farmacocinéticos da substância, a concentração plasmática atingida na faixa terapêutica está inserida entre os valores de 0,5 a 3µg/mL (MARTINS, 1994). Esse intervalo é compatível com a CIM encontrada de Amiodarona em 1 cepa testada de *Cryptococcus* sp. ao ser utilizada isoladamente e em 3 cepas clínicas de *Cryptococcus* spp. após a associação farmacológica desta com o FCZ. Dessa forma, a utilização do Fluconazol para a criptococose em um paciente que esteja fazendo o uso temporário da AMD pode ser uma alternativa benéfica para a redução de crescimento fúngico e impedimento consequentemente da propagação da doença. Todavia, em casos que para a eliminação das cepas fúngicas necessita de uma concentração plasmática maior que a concentração plasmática da faixa terapêutica, fato que ocorreu com algumas cepas do teste, o uso da AMD pode não ser tão benéfico, pois aumenta a chance de efeitos tóxicos para os pacientes, devendo assim ter alternativas terapêuticas para erradicação da criptococose.

Portanto, foi evidente uma atividade promissora da amiodarona em cepas clínicas, devendo aprofundar a investigação desse fármaco, isolado e associados aos antifúngicos, para avaliar a eficácia e toxicidade *in vivo*, por exemplo em camundongos, no processo de eliminação do fungo causador da criptococose.

7 CONCLUSÃO

A partir desse trabalho, chegou-se à conclusão de que, no âmbito do reposicionamento de fármacos, a Amiodarona apresenta-se bastante promissora como antifúngico frente a cepas de *Cryptococcus* spp., principalmente quando utilizada juntamente com o Fluconazol, sendo necessário uma busca mais aprofundada na avaliação da efetividade e toxicidade da interação farmacológica desses fármacos em experimentos *in vivo*, envolvendo camundongos, por exemplo, e na identificação de mais fármacos que podem agir em conjunto com a amiodarona, e auxiliar no seu efeito antifúngico, a fim de que aumente o número de opções possíveis a serem utilizadas na terapia. Ademais, é necessário ampliar o estudo acerca da correlação da amiodarona com tecnologias na produção de fármacos, como a nanotecnologia, a fim de buscar a efetividade e redução de riscos de efeitos colaterais ao paciente.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda., 2022.

AMARO, M.C.O. **Caracterização de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* quanto à susceptibilidade a fluconazol**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ANCORON. Farmacêutico Responsável Cintia Delphino de Andrade. São Paulo: Libbs Farmacêutica Ltda, 1997. 1 bula de remédio. Disponível em: <https://www.saudedireta.com.br/catinc/drugs/bulas/ancoron.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **DATASUS (Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde)**: Sistema de Informação sobre Mortalidade, Brasília: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 15 abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 3. ed. rev. Brasília, DF: MS, 2019. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acesso em: 19 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde incorpora medicamento para meningite criptocócica**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/noticias/2021/junho/ministerio-da-saude-incorpora-medicamento-para-meningite-criptococica>. Acesso em: 19 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020**. Brasília, DF: MS, 2020. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264_19_02_2020.html#:~:text=SUS\)%20C%20resolve%3A-,Art.,esporotricose%20humana%20e%20a%20paracoccidioidomycose](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264_19_02_2020.html#:~:text=SUS)%20C%20resolve%3A-,Art.,esporotricose%20humana%20e%20a%20paracoccidioidomycose). Acesso em: 20 abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**. Brasília, DF: MS, 2012. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/uso_racional_medicamentos_temas_selecionados.pdf. Acesso em: 05 maio 2023.

BERMAS, A.; GEDDES-MCALISTER, J. Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 114, n. 5, p. 721–734, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.14565>. Acesso em: 10 maio 2023.

BILLMYRE, R. B. *et al.* 5-fluorocytosine resistance is associated with hypermutation and alterations in capsule biosynthesis in *Cryptococcus*. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020. DOI: 10.1038/S41467-019-13890-Z.

BONGOMIN, F. *et al.* Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, 2017.

BUTTS, A. *et al.* A repurposing approach identifies off-patent drugs with fungicidal cryptococcal activity, a common structural chemotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of cryptococcosis. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 2, p. 278, fev. 2013.

BUTTS, A.; KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 9, p. e1002870, set. 2012.

CAMACHO, E. *et al.* The structural unit of melanin in the cell wall of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 27, p. 10471, 2019.

CAMPOS, F. L.; BARONI, F. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical**, p. 83–89, 2010.

CASADEVALL, A. *et al.* Melanin, Radiation, and Energy Transduction in Fungi. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 2, 2017.

CASADEVALL, A. *et al.* The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 822–831, 2018.

CAZEDEY, E. C. L. *et al.* Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 774–776, 2007.

CHITTY, J. L. *et al.* Quantitation of Purines from Pigeon Guano and Implications for *Cryptococcus neoformans* Survival During Infection. **Mycopathologia**, v. 184, n. 2, p. 273–281, 2019.

CLORIDRATO DE AMIODARONA. Farmacêutico Responsável Ronan Juliano Pires Faleiro. Goiás: Geolab Indústria Farmacêutica S/A, 2019. 1 bula de remédio. Disponível em: <https://www.geolab.com.br/wp-content/uploads/2021/05/cloridrato-de-amiodarona-PF.pdf>. Acesso em: 10 maio 2023.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A3**, 3^oed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.

CORDERO, R. J. B.; CAMACHO, E.; CASADEVALL, A. Melanization in *Cryptococcus neoformans* Requires Complex Regulation. **mBio**, v. 11, n. 1, 2020.

COURCHESNE, W. E. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 300, n. 1, p. 195–199, 2002.

COX, G. M. *et al.* Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443, 2000.

CROSS, C. E.; BANCROFT, G. J. Ingestion of acapsular *Cryptococcus neoformans* occurs via mannose and beta-glucan receptors, resulting in cytokine production and increased phagocytosis of the encapsulated form. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 7, p. 2604, 1995.

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

DA SILVA, C. R. *et al.* Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691–1700, abr. 2013.

DA SILVA, L. B. *et al.* Cryptococcosis in HIV-AIDS patients from Southern Brazil: Still a major problem. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 30, n. 4, p. 101044, 1 dez. 2020.

DA SILVA, P. R. *et al.* Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 158–162, mar. 2008.

DA SILVA, S. M. *et al.* Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes (Vol. 02 - Fungos): Aspectos clínicos, diagnósticos, estratégias de prevenção e tratamentos da criptococose. 1. ed. São José dos Pinhais - PR: **Latin American Publicações**, p. 148–169, 2021.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1642, 1990.

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

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

FUCHS, F. D.; WANNAMACHER, Lenita. **Farmacologia Clínica e Terapêutica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2017.

GAMARRA, S. *et al.* Mechanism of the Synergistic Effect of Amiodarone and Fluconazole in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 1753, maio 2010.

GARCÍA-RODAS, R. *et al.* Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. **mBio**, v. 5, n. 3, 2014.

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

GILES, S. S. *et al.* *Cryptococcus neoformans* Mitochondrial Superoxide Dismutase: an Essential Link between Antioxidant Function and High-Temperature Growth. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 1, p. 46, 2005.

GUIA FARMACÊUTICO. Amiodarona: injetável. **Hospital Sírio Libanês**. Disponível em: <https://guiafarmaceutico.hsl.org.br/amiodarona-injetavel>. Acesso em: 10 maio 2023.

GUSHIKEN, A. C.; SAHARIA, K. K.; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 493–514, 1 jun. 2021.

HANSAKON, A.; NGAMSKULRUNGROJ, P.; ANGKASEKWINAI, P. Contribution of Laccase Expression to Immune Response against *Cryptococcus gattii* Infection. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 3, 1 mar. 2020.

HASSELT, J. G. C; IYENGAR, R. Systems Pharmacology: Defining the Interactions of Drug Combinations. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 59, p. 21–40, 6 jan. 2019.

ITTZES, B. *et al.* Amiodarone that has antibacterial effect against human pathogens may represent a novel catheter lock. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 67, n. 2, p. 133–137, 6 jul. 2020.

JOFFE, L. S. *et al.* The Anti-helminthic Compound Mebendazole Has Multiple Antifungal Effects against *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 535, 28 mar. 2017.

JORGE, P. *et al.* Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* single- and double-species biofilms. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, 1 mar. 2017.

JOURDAN, J. P. *et al.* Drug repositioning: a brief overview. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1145, 1 set. 2020.

KATZUNG, B. G.; VANDERAH, T. W. **Farmacologia Básica e Clínica**. 15.ed. Porto Alegre: AMGH EDITORA LTDA, 2023.

KELLY, S. L. *et al.* Resistance to amphotericin B associated with defective sterol $\Delta 8 \rightarrow 7$ isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. **FEMS Microbiology Letters**, v. 122, n. 1–2, p. 39–42, 1 set. 1994.

KIDD, S. E. *et al.* A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17258, 12 dez. 2004.

KÖHLER, J. R. *et al.* Fungi that Infect Humans. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, 2017.

KON, A. S. *et al.* Consenso em criptococose-2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524–544, 2008.

KOZUBOWSKI, L. *et al.* Calcineurin colocalizes with P-bodies and stress granules during thermal stress in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 11, p. 1396–1402, 2011.

LEE, Y. *et al.* Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390, 3 mar. 2021.

MACHADO, K. R. G. *et al.* Influência das condições nutricionais na virulência e resistência antifúngica de *Cryptococcus spp.* **Revista Ceuma Perspectivas**, v. 37, n. 2, p. 55, 2022.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre. Artmed, 2016.

MARESOVA, L. *et al.* Membrane Hyperpolarization Drives Cation Influx and Fungicidal Activity of Amiodarone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 5, p. 2795, 1 jan. 2009.

MARTINS, C. A. S. Antiarrítmicos. **Rev Bras Anesthesiol**. São Luiz. v. 44, n.1, p. 83 – 90, jan-fev, 1994.

MEDNICK, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* Affects Lung Inflammatory Responses during Cryptococcal Infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2012-2019, 2005.

MENDONÇA, A. *et al.* Fungal infections diagnosis – Past, present and future. **Research in Microbiology**, v. 173, n. 3, p. 103915, 2022.

MENOZZI, C. A. C. *et al.* Otimização da Síntese do Fluconazol: um Importante Fármaco Antifúngico da Classe dos Azóis. **Revista Virtual de Química**. Rio de Janeiro. v. 9, n. 3, p. 1216–1234, 2017.

MOMIN, M.; WEBB, G. The Environmental Effects on Virulence Factors and the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Molecular Sciences** **2021**, Vol. **22**, Page **6302**, v. 22, n. 12, p. 6302, 2021.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda., 2020.

NAICKER, S. D. *et al.* Decreasing fluconazole susceptibility of clinical South African *Cryptococcus neoformans* isolates over a decade. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 3, 1 mar. 2020.

NASCIMENTO, I. C. M.; GONÇALVES, T. B. O uso do Minoxidil Oral no Tratamento das Alopecias. **BWS Journal**, v. 4, p. 1–11, 2021.

NOSANCHUK, J. D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p.1463, 22 dez, 2015.

OLSZEWSKI, M. A. *et al.* Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761, 2004.

OLIVEIRA, N. K. *et al.* New nanotechnological formulation based on amiodarone-loaded lipid core nanocapsules displays anticryptococcal effect. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 162, p. 105816, 2021.

O'MEARA, T. R.; ANDREW ALSPAUGH, J. The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387, 2012.

OMS. **Guidelines for the diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children**: Supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Geneva: World Health Organization, p. 51, 2018. Disponível em: file:///C:/Users/Natasha/Downloads/9789241550277-eng.pdf. Acesso em: 15 maio 2023.

OMS. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. Geneva: World Health Organization; 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>. Acesso em: 26 out. 2022.

PEDROSO, R. S.; CÂNDIDO, R. C. Diagnóstico laboratorial da criptococose. **News Lab**, v. 14, n. 77, p. 94-100, 2006.

PEREIRA, T. C. D.; BARROS, R. A. M. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*: Perspectivas sobre a eco-epidemiologia e novos nichos ecológicos. **FACIDER - Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2012.

POSTERARO, B. *et al.* Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 357–371, 1 jan., 2003.

PUBCHEM. **Amiodarone**. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, 2004. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amiodarone>. Acesso em: 20 abr., 2023.

PUKKILA-WORLEY, R. P. *et al.* Transcriptional network of multiple capsule and melanin genes governed by the *Cryptococcus neoformans* cyclic AMP cascade. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 1, p. 190–201, 2005.

PUSHPAKOM, S. *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery** 2018 18:1, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2018.

RAJASINGHAM, R. *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious diseases**, v. 17, n. 8, p. 873, 1 ago. 2017.

RHEIN, J. *et al.* Efficacy of adjunctive sertraline for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: An open-label dose-ranging study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 809–818, 1 jul., 2016.

RITTER, James M. *et al.* **Rang & Dale: Farmacologia**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2022.

RIEDEL, S. *et al.* **Microbiologia Médica**. Tradução: Cláudio M. Rocha de Souza. 28 ed. Porto Alegre: AMGH, 2022.

SALATA, C. *et al.* Amiodarone and metabolite MDEA inhibit Ebola virus infection by interfering with the viral entry process. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 5, p. 32, 7 jul. 2015.

SANTANGELO, R. *et al.* Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infection and immunity**, v. 72, n. 4, p. 2229–2239, 2004.

SANTOS, R. G. *et al.* Prescrições de antimicrobianos de uso restrito para pacientes internados em um hospital de ensino. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 7, n. 1, p. 8-12, jan-mar, 2016.

SECOLI, S. R. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 35, n. 1, p. 28–34, 2001.

SETIANINGRUM, F.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; DENNING, D. W. Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. **Medical Mycology**, v. 57, n. 2, p. 133–150, 2019.

SHI, M. *et al.* Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 5, p. 1683–1693, 2010.

SILVEIRA, M. B. *et al.* Diagnóstico Laboratorial de Criptococose em Indivíduos Imunodeprimidos. **SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO**, v. 4, n. 1, p. 103–116, 2018.

SINGH, A. *et al.* Factors Required for Activation of Urease as a Virulence Determinant in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 4, n. 3, p. 220–233, 2013.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: Emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 5127–5130, 2013.

SORRELL, T. C.; ELLIS, D. H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Rev Iberoam Micol**, v. 14, p. 42–43, 1997.

SOUZA, N. P. *et al.* Avaliação de *Cryptococcus neoformans* em Excretas de Pombos (*Columba Livia*) no Perímetro Urbano do Município de Ji-Paraná, Rondônia, Brasil. **Saúde (Santa Maria)**, v. 3, n. 44, 2018.

SQUIZANI, E. D. *et al.* Cryptococcal dissemination to the central nervous system requires the vacuolar calcium transporter Pmc1. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 2, p. e12803, 2017.

SQUIZANI, E. D. *et al.* Calcium: a central player in *Cryptococcus* biology. **Fungal Biology Reviews**, v. 36, p. 27–41, 2021.

STEVENS, D. A. Advances in systemic antifungal therapy. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 657–661, 2012.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

URAI, M. *et al.* Evasion of Innate Immune Responses by the Highly Virulent *Cryptococcus gattii* by Altering Capsule Glucuronoxylomannan Structure. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 101, 6 Jan. 2016.

VALLIÈRES, C. *et al.* Repurposing Nonantifungal Approved Drugs for Synergistic Targeting of Fungal Pathogens. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 11, p. 2950–2958, 13 nov. 2020.

VAN-DUIN, D. V.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394–3400, nov. 2002.

WALL, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Screening repurposing libraries for identification of drugs with novel antifungal activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 9, 2020.

YAUCH, L. E.; LAM, J. S.; LEVITZ, S. M. Direct Inhibition of T-Cell Responses by the *Cryptococcus* Capsular Polysaccharide Glucuronoxylomannan. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 11, p. 1060–1068, nov. 2006.

ZAFAR, H. *et al.* A titanic drug resistance threat in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 158–164, 2019.

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

ZARAGOZA, O. *et al.* Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2043, 2008.

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

ZHAI, B. *et al.* The Antidepressant Sertraline Provides a Promising Therapeutic Option for Neurotropic Cryptococcal Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 3758, jul. 2012.

ZHANG, Q. *et al.* Drug repurposing strategies in the development of potential antifungal agents. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2021 **105:13**, v. 105, n. 13, p. 5259–5279, 2021.

ZHAO, Y. *et al.* *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2023.