UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

Isabella Letícia Barcelos Fontenele Santos

Avaliação da atividade antifúngica do composto LMM6, um inibidor de tioredoxina redutase sobre *Cryptococcus neoformans*

BRASÍLIA, 2025

Universidade de Brasília

Faculdade de Ceilândia – FCE/ UnB

Curso de Farmácia

Isabella Letícia Barcelos Fontenele Santos

Avaliação da atividade antifúngica do composto LMM6, um inibidor de tioredoxina redutase sobre *Cryptococcus neoformans*

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof(a). Larissa Fernandes Matos

BRASÍLIA, 2025

Universidade de Brasília

Faculdade de Ceilândia – FCE/ UnB

Curso de Farmácia

Isabella Letícia Barcelos Fontenele Santos

Avaliação da atividade antifúngica do composto LMM6, um inibidor de tioredoxina redutase sobre *Cryptococcus neoformans*

BANCA EXAMINADORA
Orientador(a): Prof(a). Larissa Fernandes Matos
Prof(a). Aldo Henrique F. P. Tavares
Prof(a). Alex Leite Pereira

BRASÍLIA, 2025

Sumário

RESUMO 05

ABSTRACT 06

1. Introdução 07

1.2. Revisão bibliográfica do tema a ser estudado 10

2. Justificativa.....12

3. Objetivos (gerais e específicos) 12

4. Metodologia..... 13

5. Resultados e Discussão..... 13

6. Considerações Finais..... 19

7. Referências Bibliográficas.....20

Resumo: O *Cryptococcus neoformans* é uma levedura que causa criptococose e em casos graves, a meningite criptocócica. Estima-se, de acordo com dados levantados em 2024, que mundialmente cerca de 194 mil indivíduos são acometidos por *C. neoformans* por ano e, desses, 118 mil vem à óbito. O tratamento atualmente disponível se baseia no uso de Anfotericina B e Fluconazol, contudo, é altamente tóxico e, além disso, observou-se um aumento da resistência do *C. neoformans* a esses antifúngicos. Logo, são necessárias novas buscas por novos compostos que possam atuar junto aos antifúngicos já usados no tratamento da doença. Assim, foi feita uma busca *in silico* de novas moléculas e o composto LMM6, um oxadiazol, foi identificado como um inibidor de TRR1 (tioredoxina redutase), responsável pela oxidorredução de fungos. Este composto já foi testado em outros modelos de infecções fúngicas como candidíase e paracoccidioidomicose, apresentando baixa toxicidade e eficácia com diminuição da carga fúngica. *In vitro* foi capaz de reduzir o crescimento fúngico de *P. brasiliensis*, se comportando como um composto fungistático e provocou mudanças morfológicas que resultaram em danos à parede celular. O projeto buscou avaliar LMM6 como uma nova alternativa antifúngica para a criptococose. Para isso, foi utilizado o protocolo CLSI M27-A3 para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), onde obteve-se a média geométrica de LMM6 de 32,7 µg/mL para os isolados de *C. neoformans*, com intervalo de 4-64 µg/mL, mostrando que o composto LMM6 possui atividade antifúngica contra *C. neoformans*. Esses resultados foram validados por meio do ensaio de Concentração Fungicida Mínima (CFM), que sugere que LMM6 apresente perfil fungicida.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*; Criptococose; TRR1; Antifúngicos; Oxadiazóis.

Abstract: *Cryptococcus neoformans* is a yeast that causes cryptococcosis and, in severe cases, cryptococcal meningitis. According to data collected in 2024, it is estimated that around 194,000 individuals worldwide are affected by *C. neoformans* each year, and of these, 147,000 die. The currently available treatment is based on the use of Amphotericin B and Fluconazole. However, it is highly toxic and, in addition, an increase in the resistance of *C. neoformans* to these antifungals has been observed. Therefore, new searches are needed for new compounds that can act together with the antifungals already used in the treatment of the disease. Thus, an *in-silico* search for new molecules was carried out and the compound LMM6, an oxadiazole, was identified as an inhibitor of TRR1 (thioredoxin reductase), responsible for the oxidoreduction of the fungus. This compound has already been tested in other models of fungal infections such as candidiasis and paracoccidioidomycosis, showing low toxicity and efficacy with a reduction in the fungal load. In vitro, it was able to reduce fungal growth of *P. brasiliensis*, behaving as a fungistatic compound and causing morphological changes that resulted in damage to the cell wall. The project sought to evaluate LMM6 as a new antifungal alternative for cryptococcosis. For this purpose, the CLSI M27-A3 protocol was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), where the geometric mean of LMM6 of 32.7 µg/mL was obtained in Cryptococcus neoformans isolates, with a range of 4-64 µg/mL, showing that the compound LMM6 has antifungal activity against C. neoformans. These results were validated through the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) assay, which suggests that LMM6 has a fungicidal profile.

Key words: *Cryptococcus neoformans*; Cryptococcosis; TRR1; Antifungals; Oxadiazoles.

1. Introdução

A criptococose é uma infecção fúngica sistêmica causada pelo fungo patogênico *Cryptococcus neoformans* que atinge indivíduos em escala mundial, de acordo com dados fornecidos do ano de 2024, anualmente cerca de 194 mil indivíduos no mundo são acometidos pela criptococose, com aproximadamente 147 mil óbitos. Como já dito, o fungo *C. neoformans* causa uma micose sistêmica oportunista que é conhecida como Criptococose, a qual pode ser subaguda, crônica, atingindo principalmente pulmões e sistema nervoso central com possibilidade de chegar em outros tecidos do corpo (Rajasingham, 2022; Dao et al., 2024; Denning, 2024). A infecção por *C. neoformans* ocorre, normalmente, por meio da inalação de propágulos fúngicos (esporos ou leveduras), sendo que os indivíduos mais acometidos por esta micose são os imunocomprometidos, especialmente portadores de AIDS, indivíduos que fazem uso de imunossupressores e aqueles em tratamento com quimioterápicos (Ngan et al., 2022; Rathore et al.,2022; Brummer et al.,1998-1999).

Inicialmente, nos pulmões, em resposta ao fungo são ativadas as primeiras linhas de defesa do sistema imunológico do organismo. Porém, esse sistema pode não ser eficiente para eliminar o fungo pois ele possui diversos atributos de virulência como cápsula polissacarídica, melanina, produção de urease e fosfolipase, entre outros, os quais contribuem para que o patógeno escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro, desta forma, estabelecendo o quadro infeccioso e, por conseguinte, podendo ocorrer a disseminação fúngica para o SNC (Ngan et al., 2022; Rathore et al., 2022; Ilnait-Zaragozi et al., 2014; Grossman et al., 2017).

O quadro mais grave da doença é a meningite criptococcica (MC), esta ocorre quando há invasão fúngica do tecido cerebral. Quando a infecção atinge este estágio a terapia medicamentosa e a recuperação do indivíduo são mais árduas, e muitos com esse quadro vão a óbito. Atualmente, a terapia antifúngica é constituída, principalmente, por anfotericina B (droga principal), fluconazol (consolidação) e 5-fluocitosina (sinergismo com anfotericina B), além disso o tratamento é dividido em três fases: 1) fase de indução (duração de 2 semanas); 2) fase de consolidação (duração de 8 semanas); 3) fase de manutenção (duração de 6-12 meses). O tratamento medicamentoso para a criptococose é limitado, pois existem poucas classes terapêuticas e as drogas em circulação comercial são de alto custo, alta toxicidade, baixa tolerabilidade, com interações medicamentosas, e há também uma crescente resistência fúngica

a estas drogas como tem sido observado certa resistência de *C. neoformans* ao fluconazol. (Ngan et al., 2022; Rathore et al., 2022; illnait-Zaragozi et al., 2014; Grossman et al., 2017; Mpouza et al, 2018).

A urgência da busca de novas drogas antifúngicas é notória. No processo *in silico*, um potencial alvo promissor para a droga é uma enzima essencial para o patógeno que, contudo, deve estar ausente em humanos, desta maneira, gerando toxicidade seletiva contra o agente infeccioso. Com isso, duas isoformas de Trr1 foram caracterizadas, porém foi selecionada apenas uma isoforma que possui baixo peso molecular e está presente apenas em procariotos, plantas, alguns parasitas e fungos, sendo assim um alvo seletivo para o desenvolvimento de novas drogas. Uma nova droga que seja seletiva aos fungos patogênicos sem produzir danos às células de mamíferos é um dos grandes obstáculos farmacológicos. Contudo, com as metodologias *in silico* são reduzidos o custo e o tempo de desenvolvimento de uma nova droga. Desta maneira, foi selecionada a tiorredoxina redutase (Trr1), uma flavoenzima que atua na manutenção celular, sendo importante na resistência ao estresse oxidativo e, além disso, é essencial para o crescimento celular (Capoci et al., 2019; Leelananda et al., 2016; Rodrigues-Vendramini et al., 2019).

Por modelagem molecular e triagem virtual, vários compostos foram selecionados como ligantes Trr1. Resultados anteriores mostraram que dois compostos, LMM5 e LMM11, que pertencem à classe dos oxadiazóis, apresentaram atividade antifúngica contra fungos patogênicos importantes como *Candida spp*., *C. neoformans* e *Paracoccidioides spp*. O composto LMM5 apresentou uma atividade antifúngica contra *Paracoccidioides spp.,* com intervalo de 8 a 32 µg/mL, enquanto LMM11 teve CIM de 8 µg/mL para a maioria dos isolados usados no teste com LMM5. Nos testes de citoxicidade de *Candida albicans*, ambos os compostos LMM5 e LMM11, apresentaram CIM de 32 µg/mL e foi observado que o composto LMM5 não apresentou nenhuma atividade tóxica significante contra as linhagens de células, no entanto, o composto LMM11, em altas concentrações (256 e 128 µg/ml) reduziu 50% da viabilidade das linhagens de células *in vitro* (Capoci et al., 2019 e Rodrigues-Vendramini et al., 2019). O derivado de oxadiazol da classe de 1,3,4-oxadiazol, composto 4-(N-ciclo-hexil-N-etilsulfamoil)-N-(5-(4-fluorofenil)-1,3,4 oxadiazol-2-il) benzamida, denominado LMM6 foi também selecionado *in silico*, utilizando triagem virtual de moléculas devido à semelhança estrutural com outro oxadiazol, o LMM11 (Capoci et al., 2019 e Rodrigues-Vendramini et al., 2019).

Trr1 é uma flavoenzima importante na manutenção do estado redox do citoplasma, dessa maneira, contribuindo principalmente com a resistência ao estresse oxidativo. Os compostos oxadiazois que são ligantes de Trr1 possuem baixa toxicidade para o organismo do hospedeiro e alta toxicidade ao fungo patógeno, demonstrando toxicidade seletiva. Em relação ao composto

LMM6, este apresentou-se muito efetivo *in vivo* e *in vitro* contra *C. albicans*, e ainda apresentou sinergismo com anfotericina B e caspofungina. (Faria et al., 2021; Simões, 2021; Melo, 2019).

Além de sua importância na defesa contra o estresse oxidativo, o sistema de tiorredoxina de bactérias, leveduras e mamíferos está envolvido na regulação da síntese de DNA, transcrição genética, crescimento celular e apoptose. A tiorredoxina redutase, um homodímero de flavoenzima que se liga ao FAD e NADPH, reduz a oxidorredutase tiorredoxina e é encontrada em duas formas. A isoforma de alto peso molecular, que provavelmente evoluiu da glutationa redutase em vez da tiorredoxina redutase procariótica, está presente em mamíferos e alguns parasitas, enquanto a isoforma de baixo peso molecular é encontrada na maioria das bactérias, plantas e fungos. Acredita-se que essas duas isoformas tenham evoluído independentemente para ter perfis de especificidade de substrato semelhantes. Embora essas isoformas tenham funções semelhantes, elas têm estruturas proteicas muito distintas; portanto, a tiorredoxina redutase pode ser um alvo seletivo de drogas para os patógenos que abrigam a forma de baixo peso molecular (Missal et al, 2005; Becker et al, 2000).

Foi identificado o gene de tioredoxina redutase em *C. neoformans*, o qual codifica uma enzima da forma de baixo peso molecular. Em *C. neoformans*, Trr1 é induzida durante estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio e estresse nitrosativo por óxido nítrico. Embora o Trr1 seja bem induzido com estresse oxidativo, observou-se uma indução maior durante o estresse nitrosativo. Isso pode implicar que o sistema de tiorredoxina é a defesa primária contra o estresse do óxido nítrico, enquanto outros sistemas podem responder ao estresse oxidativo. *C. neoformans*, não codifica um sistema de tiorredoxina mitocondrial separado, a enzima tiorredoxina redutase está presente nas formas citoplasmáticas e mitocondriais. Além disso, também pode ser visto que a Trr1 é expressa quando *C. neoformans* é fagocitado. Isso sugere que a tiorredoxina redutase é importante para a virulência desse fungo patógeno e possui papel essencial para o crescimento vegetativo. (Missal et al., 2005)

Diante dos dados promissores obtidos a partir do modelo de infecção por *C. albicans*, o composto LMM6 foi avaliado *in vitro* contra diferentes isolados clínicos de *C. neoformans*. Considerando que este fungo causa uma doença fatal de alta incidência mundial, e que o arsenal terapêutico para tratar as doenças fúngicas é restrito, esse plano de trabalho teve como foco a avaliação de uma nova opção terapêutica para o tratamento das infecções fúngicas. Vale ressaltar que o *Cryptococcus* sp., foi incluído em 2020 pela OMS na lista prioritária de fungos patogênicos de importância para saúde pública que está sendo utilizada para definir prioridades de P, D&I relacionadas ao desenvolvimento de fármacos (WHO, 2020).

1.2. Revisão bibliográfica do tema a ser estudado

Nos últimos anos tem crescido consideravelmente o número de indivíduos com infecções fúngicas sistêmicas por decorrência do aumento da população imunocomprometida, principalmente como consequência de transplantes de órgãos, tratamento de câncer e AIDS. Em conjunto, há poucos antifúngicos disponíveis para tratamento destas doenças e os antifúngicos, como vistos na literatura, ou são tóxicos ou possuem pouca eficácia no tratamento. Contudo, não há apenas estes obstáculos no tratamento antifúngico, pois tem se observado o crescimento na resistência fúngica à terapia presente no mercado, a qual é agravada pela necessidade do uso prolongado de antifúngicos em indivíduos imunocomprometidos de alto risco, assim como a baixa vigilância e negligencia por organizações mundiais tem contribuído como fatores que dificultam o combate a infecções fúngicas. As taxas de mortalidade de infecções fúngicas sistêmicas são altas durante tratamentos de antifúngicos, pois geralmente o tratamento é muito longo e bem agressivo ao organismo que já está debilitado por conta da infecção. Por exemplo, a maioria dos pacientes diagnosticados com aspergilose invasiva vêm à óbito apesar de terapias antifúngicas agressivas. (Lin et al., 2009; Dao et al., 2024; Melhem et al., 2024)

A entrada de *Cryptococcus spp*. no hospedeiro ocorre por meio da inalação dos esporos ou células de leveduras desidratadas, porém podem colonizar e somente apresentar sinais e sintomas meses ou anos depois do contato com o mesmo. Todavia, uma exposição de a um grande número de células fúngicas pode acarretar no desenvolvimento da criptococose aguda. As células fúngicas podem permanecer em estado latente sem gerar nenhum sintoma por serem eliminadas ou restritas ao pulmão dentro de granulomas, porém, quando há um comprometimento da imunidade do hospedeiro, pode ocorrer a ativação destas células que, em seguida, podem se disseminar hematologicamente, desta forma, gerando infecções sistêmicas envolvendo quaisquer órgãos. No entanto, o *C. neoformans* tem preferência pelo sistema nervoso central (SNC) que, por conseguinte, desenvolve a meningite criptocócica, cujos sintomas são febre, coma, disfunções comportamentais, entre outros. A natureza do neurotropismo de *C. neoformans* é um tópico de pesquisa ativo e permanece uma questão em aberto neste campo, alguns grupos sugerem que seja pela abundante presença de catecolaminas no SNC que contribui para a produção de melanina, que é um importante fator de virulência do fungo (Lin et al., 2009, Dao et al., 2024; Costa et al., 2023).

As infecções fúngicas invasivas e doenças tropicais negligenciadas são de grande preocupação atualmente. A disponibilidade de drogas para o tratamento das micoses humanas ainda é precária. O tratamento para essas infecções conta apenas com algumas classes

antifúngicas. Os medicamentos antifúngicos mais utilizados para o tratamento são a anfotericina B, o fluconazol, e a 5-fluocitosina. A anfotericina B tem sido administrada como droga principal e o fluconazol como uma droga de consolidação do tratamento. Porém, a escolha terapêutica para o tratamento dependerá da forma clínica de cada paciente e do estado imunológico do indivíduo. Dentre os principais tratamentos disponíveis para criptococose há o tratamento de criptococose pulmonar (Fluconazol) e o tratamento de meningite criptocócica, que é dividida em três fases: indução (anfotericina B associada à flucitosina), consolidação (fluconazol) e manutenção (fluconazol). O tempo de tratamento varia de 6 a 12 meses, na maioria dos casos. O longo tratamento e o uso de medicamentos antifúngicos que possuem alta toxicidade e grandes efeitos deletérios para o patógeno acarretam na baixa adesão do tratamento dos indivíduos acometidos pela criptococose e, este é um dos agravantes que causam o aumento da resistência fúngica aos antifúngicos administrados (Ministério da Saúde; Mpouza et al., 2018; Dao et al., 2024).

Vários métodos que avaliam a suscetibilidade antifúngica (de referência e comerciais) foram estabelecidos para a detecção de resistência antifúngica que desempenha um papel importante no cenário clínico. Dentre estes, o prinicpal é o CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute), cuja metodologia tem sido revisada ao longo dos anos, desde então, para determinar concentrações inibitórias mínimas (CIMs). Este método é o mais difundido e usado, podendo até mesmo ser considerado como o método padrão-ouro. A CIM pode ser determinada pelo espectrofotômetro, onde é definida a menor concentração de fármaco que reduz o crescimento fúngico em comparativo ao grupo controle (sem fármaco), assim como também pode ser utilizado para a leitura a resazurina, que é um composto usado em muitos ensaios, especialmente, bioquímicos e microbiológicos, servindo tanto para avaliar a viabilidade celular e quanto a atividade metabólica,com alta sensibilidade mesmo em baixas concentrações. (Espinel-Ingroff et al., 2023; Sousa et al., 2023; Mpouza et al., 2018; Iyer et al., 2021; Cui et al., 2022)

A necessidade de novos medicamentos antifúngicos nunca foi tão grande. Por isso, houve um aumento na busca e desenvolvimento de novas estratégias antifúngicas, além do mais tem sido bem promissor e tem contribuído para o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos o direcionamento de genes essenciais/funções celulares, desta forma, auxiliando das seguintes formas: impedindo a expressão de fatores de virulência, inibindo a sinalização de resposta ao estresse, empregando combinações de compostos e desenvolvendo terapias imunomoduladoras. Isto somado a terapia medicamentosa será fundamental para o auxílio e assistência para os indivíduos que sofrem de infecções por *C. neoformans* em todo o mundo. (Espinel-Ingroff et al., 2023; Sousa et al., 2023; Mpouza et al., 2018; Iyer et al., 2021; Cui et al., 2022)

Por meio de seleção *in silico* (virtual), o composto LMM6 foi selecionado. Este composto faz parte da nova classe de 1,3,4-oxadiazol, como LMM5 e LMM11 (dos quais foi derivado). A classe 1,3,4-oxadiazol foi selecionada por ter como potencial alvo a Tioredoxina redutase (Trr1), que é uma flavoenzima essencial na manutenção no estresse oxidativo do citoplasma. A Trr1 compõe o sistema antioxidante (um dos principais sistemas antioxidantes nas células), conhecido como sistema tioredoxina, em conjunto com tioredoxina peroxidase (Tsa) e NADPH. O sistema tioredoxina possui função na transferência de elétrons fornecida pelo NADPH por meio da oxidação reversível de dois grupos sulfidrila de proteína (OSH) para uma ponte dissulfeto (S-S). Além disso, estudos prévios mostraram que o sistema tioredoxina está envolvido em diversas funções fisiológicas e bioquímicas, incluindo síntese de desoxirribonucleotídeos, dobramento de proteínas, reparo de DNA e proteínas, metabolismo de enxofre e redução de espécies reativas de oxigênio (ROS). Ademais, a tiorredoxina é necessária para estabilidade genômica, resistência ao calor e estresse oxidativo e longevidade celular. (Ma H, 2018, Faria et al., 2021; Simões, 2021; Melo, 2019)

2. Justificativa

Nas últimas décadas, as infecções fúngicas estão se tornando cada vez mais frequentes. Entretanto, há vários desafios neste contexto, tais como arsenal terapêutico limitado, tratamento prolongado, toxicidade e interações medicamentosas e o surgimento de isolados resistentes. Diante desta problemática, esta proposta se baseiou na avaliação de um composto de uma nova classe química, os oxadiazólicos, que possam ser usados na prática clínica como opções terapêuticas antifúngicas contra o alvo tiorredoxina redutase (TRR1) para a criptococose.

3. Objetivos (Objetivo geral e objetivos específicos)

Esta proposta teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do composto LMM6 da família dos oxadiazóis, em *C. neoformans*. Assim, este projeto teve como objetivos específicos: determinar Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) de LMM6 para isolados clínicos de *C. neoformans.*

4. Metodologia detalhada

1) Manutenção dos isolados clínicos: Foram utilizadas 2 cepas referências (H99 e B3501) e 4 isolados clínicos da Coleção Micológica de *Cryptococcus* de provenientes do HC-FMRP, sob curadoria da Prof. Anamelia Bocca da LIA-UnB. Os isolados foram mantidos a -80º C e para a realização dos experimentos foram crescidos em caldo Sabouraud sob agitação 150 rpm, por 24h. Em seguida as leveduras foram coletadas, lavadas com solução salina e contadas em câmara de Neubauer para ajuste do inóculo para os testes de drogas.

2) Determinação da suscetibilidadede *C.neoformans* à molécula LMM6: para a realização do teste de susceptibilidade foi utilizado o método de microdiluição em caldo, conforme descrito por CLSI M27-A3 - Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Third Edition. O meio utilizado foi RPMI 1640 (com L-glutamina e um indicador de pH, sem bicarbonato) sem suplementação de glicose. A incubação foi realizada em temperatura de 35º C. LMM6 (diluído em DMSO e Pluronic 1%) foi avaliado nas concentrações de 0,5 a 64 µg/mL. Além disto foi utilizado o fluconazol (diluído em DMSO; antifúngico usado para tratamento de diversas infecções fúngicas) como droga controle (0,0625-32 µg/mL) para determinação da concentração mínima inibitória (CIM). A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada pela transferência de alíquotas de 3-5µL da cultura das leveduras previamente expostas a cada um dos compostos avaliados no teste de microdiluição para uma placa contendo Agar YPD (1,5% agar, 2% dextrose, 2% peptona, 1% extrato de levedura). Essas placas foram incubadas a 30°C por 72 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração de cada droga capaz de impedir o crescimento fúngico. Foram realizados dois ensaios em duplicata e a leitura foi realizada por meio do Éon no comprimento de onda de 540 nm. A percentagem de inibição de crescimento foi calculada com relação a absorbância do controle sem os compostos antifúngicos com a seguinte fórmula: $\%\ inibição\ crescimento = \frac{Abs\ teste - Abs\ cont\ neg}{Abs\ cont\ posit - Abs\ cont\ neg} \times 100$.

5. Resultados e Discussão

Para determinar a suscetibilidade dos isolados clínicos de *C. neoformans* ao composto LMM6, foi utilizado o protocolo de CLSI M27A3, e os valores de CIM e CFM estão representados na Tabela 1. Além disto, para cada composto testado foram plotados em gráficos a Porcentagem de inibição do crescimento versus concentração do composto avaliado (FIG.01). A CFM foi avaliada pelo aparecimento de colônias após plaqueamento de amostras coletadas em cada

poço do ensaio (FIG.02).

Tabela 01. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para isolados clínicos de *C. neoformans* frente a LMM6 e fluconazol (FLC).

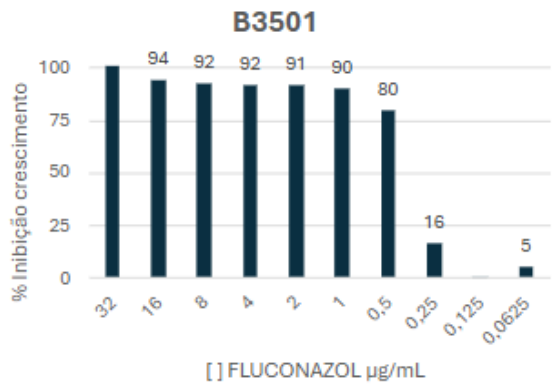
	CIM (µg/mL)		CFM (µg/mL)	
Isolados Clínicos	**FLC**	**LMM6**	**FLC**	**LMM6**
B3501	1	16	1	16
H99	2	64	2	64
RP Nº01	4	32	4	32
RP Nº02	4	64	4	64
RP Nº03	2	4	2	4
RP Nº04	1	16	1	16
Média geométrica	2,3	32,7	2,3	32,7
Intervalo	1-4	4-64	1-4	4-64

Conforme observado nos gráficos (FIG.01.), as cepas referências e os isolados clínicos apresentaram diferenças de suscetibilidade ao composto LMM6, sendo que B3501, RP nº03 e RP nº04 apresentaram-se mais sensível, enquanto outros mais resistentes (H99, RP nº01 e RP nº02). Os valores de CIM e CFM para fluconazol variaram de 1-4 µg/mL, com média geométrica de 2,3 µg/mL, já para o LMM6 a variação foi de 4-64 µg/mL, com média geométrica de 32,7 µg/mL (Tabela 1). Estes dados mostram que a suscetibilidade de *C.neofomans* a LMM6 é menor quando comparados com CIMs obtidas para *Paracoccidioides brasiliensis*, que foi 1,5 µg/mL (Simões, 2021). Já para *Candida tropicalis*, a média geométrica de CMI foi de 16 µg/mL para o composto LMM6 (Melo, 2019). Os gráficos que mostram a porcentagem de inibição de crescimento para os isolados clínicos de *C. neoformans* (FIG.1) sugerem um efeito dose dependente de LMM6, uma vez que em concentrações próximas a CIM (2 a 4 concentrações abaixo) pode-se observar redução significativa do crescimento. Com relação a CFM, observou-se para todos os isolados de *C. neoformans* que o valor da CIM coincidiu com o da CFM, indicando que possivelmente o composto LMM6 tenha um perfil fungicida. Dados do ensaio de time kill são necessários para confirmação deste resultado.

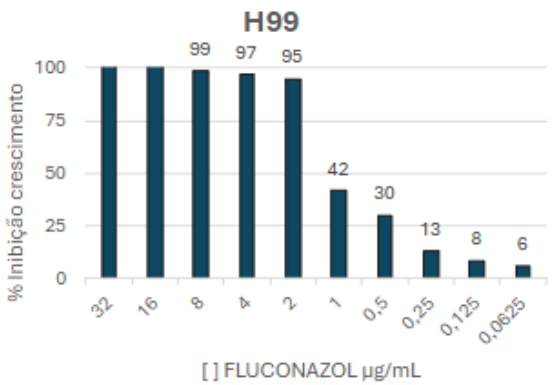
Em estudos anteriores em que o LMM6 foi avaliado contra *C. tropicalis*, as CIMs variaram de 8 a 32 ug/mL e outros compostos da classe 1, 3, 4-oxadiazol (LMM5 e LMM11) tiveram atividade contra *C. albicans* (CIM= 8 a 64 ug/mL) e em *Paracoccidioides spp* (CIM= 8 a 32 µg/mL). Em *C. tropicalis*, observou-se com a análise quantitativa e a cinética de crescimento um perfil fungicida de LMM6, comprovado pelo ensaio de time kill; da mesma maneira como foi visto nos testes de suscetibilidade do composto LMM6 em *C. neoformans* deste projeto. Além disso, houve danos significativos à membrana celular de *C. tropicalis*, após o tratamento com LMM6, corroborando o perfil fungicida (Capoci et al., 2019; Rodrigues-Vendramini et al., 2019; Melo, 2019).

Faria e colaboradores (2021) mostraram que o composto LMM6 que foi altamente efetivo em *Candida albicans*, onde apresentou característica fungicida e atividade anti-biofilme e a CIM variou de 8 a 32 µg/mL. Além disso, o grupo determinou pelos ensaios de interação entre o composto LMM6 com anfotericina B, sinergismo, entretanto, observaram que não houve interação positiva com fluconazol e caspofungina. A atividade anti-biofilme foi vista nas concentrações de CIM mais altas, 32-64 µg/mL, cuja atividade levou a desorganização estrutural do biofilme de *C. albicans*. Em *C. albicans*, o composto LMM6 em ensaio *in vivo* apresentou resultados promissores por controlar a infecção fúngica, onde foi possível observar uma redução significativa da carga fúngica no baço e nos rins (Faria et al., 2021).

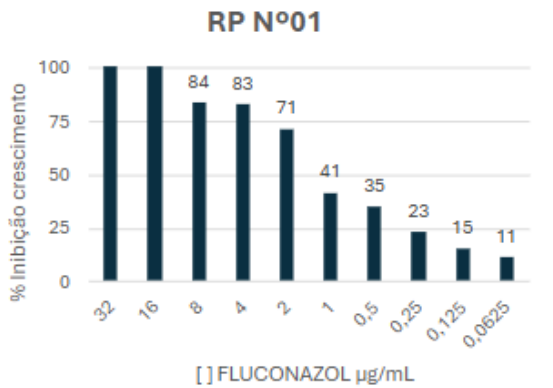
A)


B3501
% Inibição crescimento
100
75
50
25
0
94
92
92
91
90
80
16
5
32
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
0,0625
[ ] FLUCONAZOL µg/mL

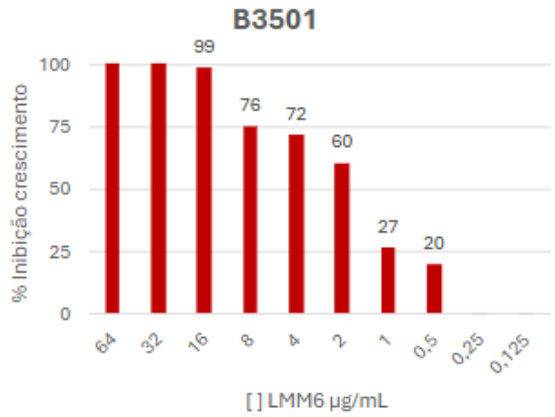
B)


H99
% Inibição crescimento
100
75
50
25
0
99
97
95
42
30
13
8
6
32
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
0,0625
[ ] FLUCONAZOL µg/mL

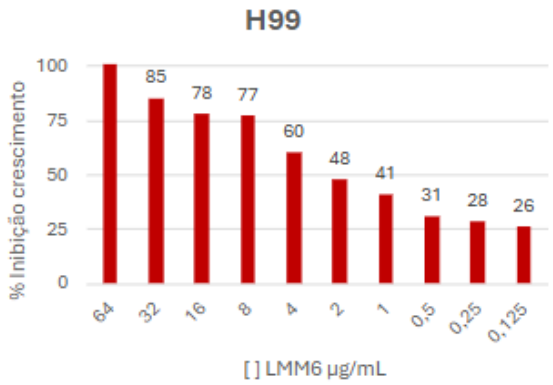
C)


RP Nº01
% Inibição crescimento
100
75
50
25
0
84
83
71
41
35
23
15
11
32
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
0,0625
[ ] FLUCONAZOL µg/mL

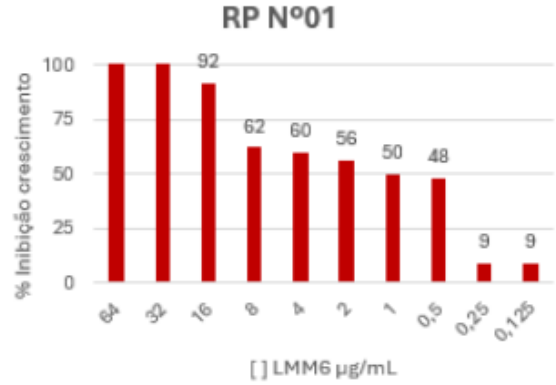
D)


B3501
% Inibição crescimento
100
75
50
25
0
99
76
72
60
27
20
64
32
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
[ ] LMM6 µg/mL

E)


H99
% Inibição crescimento
100
75
50
25
0
85
78
77
60
48
41
31
28
26
64
32
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
[ ] LMM6 µg/mL

F)


RP Nº01
% Inibição crescimento
100
75
50
25
0
92
62
60
56
50
48
9
9
64
32
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
[ ] LMM6 µg/mL

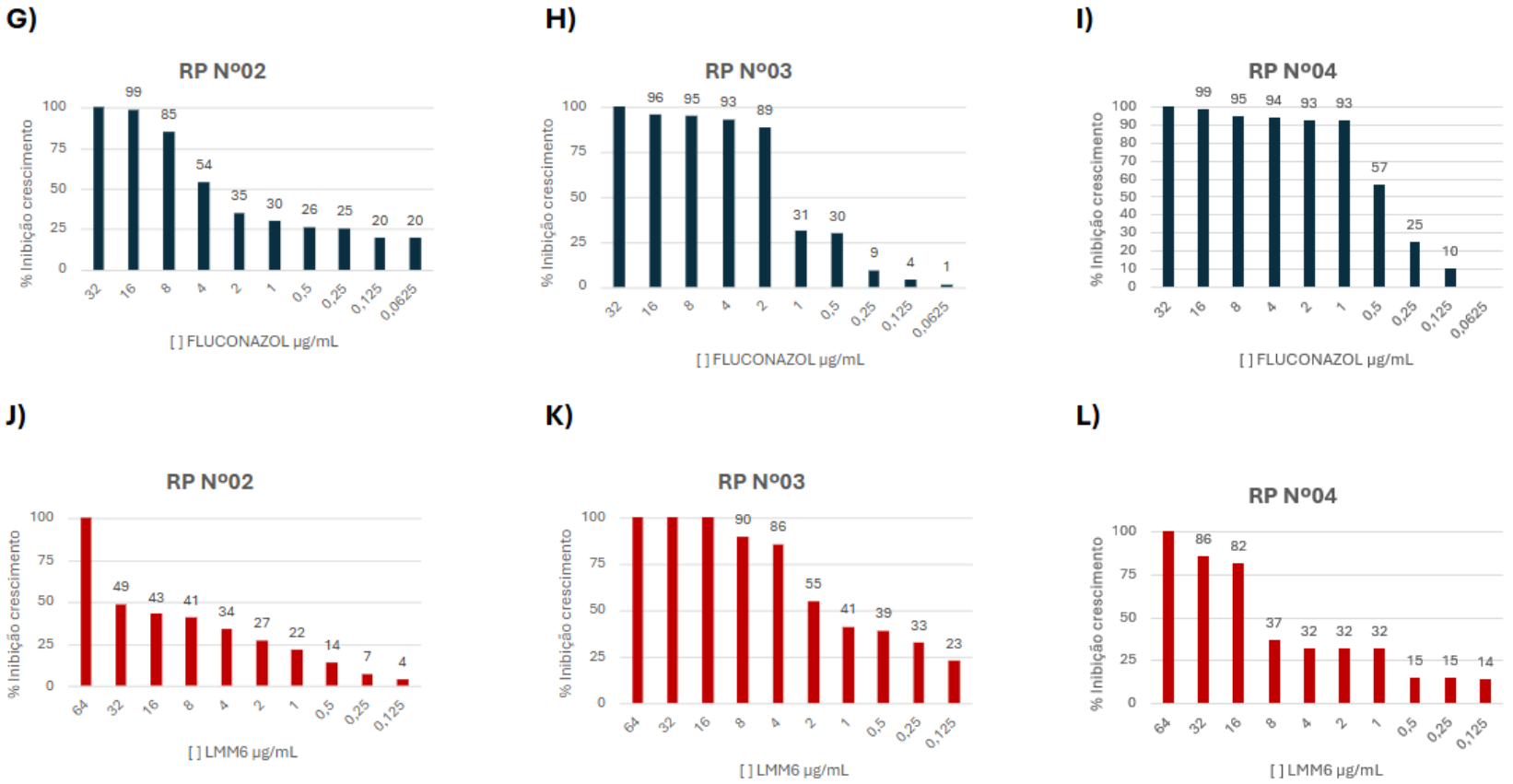


FIG. 01. Avaliação da Inibição do crescimento de *C. neoformans* após exposição a LMM6 e fluconazol. Gráficos representativos de 2 experimentos independentes realizados em duplicata. Dados coletados pela medida da absorbância a 540 nm de cada um dos poços após incubação a 35º C por 72h. No eixo X: é a concentração de droga utilizada em µg/mL e eixo Y a porcentagem de inibição de crescimento calculada através da fórmula apresentada na seção de materiais de métodos. Os nomes dos isolados testados estão indicados na figura.

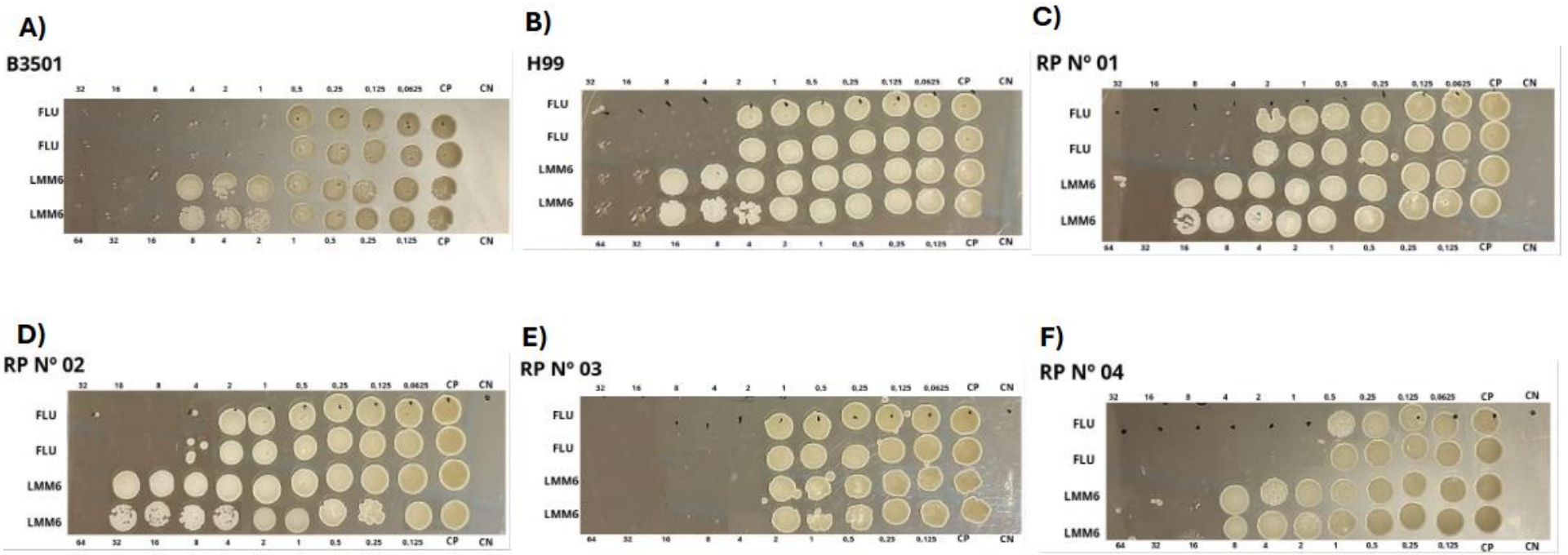


FIG. 02. Avaliação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) de *C. neoformans*, submetido a crescimento na presença de LMM6 e fluconazol. O ensaio foi realizado em duplicata e, posteriormente, selecionado o primeiro teste como representativo. Na parte superior e inferior, encontra-se as concentrações das drogas utilizadas: Fluconazol (32-0,0625 µg/mL) e LMM6 (64-0,125 µg/mL). FLU (Fluconazol); CP (Controle Positivo, meio com fungo); CN (Controle Negativo, apenas o meio RPMI).

Diferentemente do observado para as espécies de *Candida* e para o *Cryptococcus* neste presente trabalho, o *P. brasiliensis* foi o fungo que mais se mostrou susceptível ao LMM6, com mudanças morfológicas que resultaram no extravasamento da matriz celular e danos à parede celular, porém os resultados demonstraram um efeito fungistático do composto (Melo, 2019). Apesar disto, em modelo animal observou-se, por meio de ensaios *in vivo* e análises histopatológicas, que o composto LMM6 obteve menores taxas de toxicidade em comparação com as drogas antifúngicas convencionais no tratamento da paracoccidioidomicose (como por exemplo, anfotericina B e fluconazol) e pode ser visto uma redução da carga fúngica nos ensaios de *P. brasiliensis* (Simões, 2021).

No ensaio *in vivo* para avaliação da atividade de LMM6 na infecção por *C. tropicalis*, foi observado, através da análise histopatológica, uma redução da carga fúngica nos rins dos camundongos tratados com LMM6 e no baço, viu-se o efeito aditivo de do composto com micafungina, onde a carga fúngica foi mais controlada por conta da combinação de ambas as drogas - apresentando resultados significativos (Melo, 2019). No ensaio *in vitro* foi avaliada a atividade citotóxica em três linhagens de células. Nas células HeLa e HaCat, na qual o composto LMM6 apresentou atividade citotóxica apenas nas concentrações mais altas (128, 256 and 512 µg/mL). Todavia, nas células Vero, não ocorreu nenhuma atividade citotóxica. Ou seja, o composto LMM6 demonstra ser mais seletivo ao patógeno que ao hospedeiro, desta forma, sendo considerado um candidato promissor no desenvolvimento de antifungos (Melo, 2019).

6. Considerações finais

Como visto, tem crescido cada vez mais a necessidade de um novo antifúngico no tratamento de infecções fúngicas, pois, atualmente os medicamentos antifúngicos disponíveis são limitados e, muitas vezes, com altos níveis de toxicidade. Dentre os fatores de resistência, existe o fator do hospedeiro que determina a resistência clínica: o local da infecção. Por exemplo, geralmente, o sistema nervoso central (SNC) é o local mais atingido na criptococose, logo, a concentração antifúngica no tecido cerebral ou no fluido cerebrospinal (LCR) pode influenciar a resposta terapêutica (Melhem et al., 2024). Além disso, é possível observar o aumento da escala de resistência fúngica, em especialmente, no tratamento com fluconazol e flucitosina (Mpouza et al., 2018). À vista disso, é esperado com os estudos e análises realizadas com LMM6, um composto antifúngico de uma nova classe, os oxadiazóis, que seja eficaz para tratamento não só da criptococcose mas de outras micoses, com menor toxicidade e direcionado exclusivamente

à TRR1, pois tem sido visto em estudos que este é alvo promissor por ter função sobre o estresse oxidativo e por apenas estar presente em procariontes, plantas, alguns parasitas e fungos.

Apesar de terem sido alcançados resultados promissores, é necessária a realização de mais alguns ensaios para averiguar se o composto LMM6 possui perfil fungistático ou fungicida, se possui potencial de interagir com outras drogas antifúngicas comercializadas (ex. Anfotericina B e Fluconazol), se possui baixa toxicidade *in vivo*, assim como, avaliar se é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, se mantem a integridade do tecido infectado e se causa alguma mudança morfológica no fungo.

O ensaio checkerboard é primordial para avaliação de sinergismo, onde será possível determinar as concentrações de uso aceitáveis do composto oxadiazólico LMM6 e que seu uso em conjunto com outras drogas, como anfotericina B e fluconazol, tenha um efeito sinérgico promissor, de maneira que possa tornar o tratamento mais eficaz e com menor toxicidade, desta maneira servindo de auxílio para verificar a concentração adequada para o tratamento de criptococose. A combinação de medicamentos é uma estratégia promissora que tem sido amplamente utilizada para tratar uma variedade de doenças. A interação sinérgica resultante da combinação de diferentes antifúngicos pode reduzir a dose necessária do medicamento, a toxicidade e, consequentemente, melhorar a eficácia do tratamento. Além de possivelmente retardar o desenvolvimento de resistência fúngica aos antifúngicos utilizados (Campitelli et al., 2017; Spitzer et al., 2017). O ensaio de time-kill é importante para determinar o perfil (fungicida ou fungistático) da droga estudada, auxiliando na análise da relação entre droga e fungo (Nogueira et al., 2012). Por último a avaliação do efeito de LMM6 *in vivo* é de grande importância para se determinar a real eficácia do composto para eliminação do fungo nos tecidos, incluindo o SNC.

7. Referências bibliográficas

Becker K, Gromer S, Schirmer RH, Müller S. Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. Eur J Biochem. 2000 Oct;267(20):6118-25. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01703.x.

Capoci IRG, Sakita KM, Faria DR, Rodrigues-Vendramini FAV, Arita GS, de Oliveira AG, Felipe MS, Maigret B, Bonfim-Mendonça PS, Kioshima ES, Svidzinski TIE. Two New 1,3,4-Oxadiazoles With Effective Antifungal Activity Against *Candida albicans*. Front Microbiol. 2019 Sep 12;10:2130. doi: 10.3389/fmicb.2019.02130.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal

Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition. CLSI document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2008.

Cui X, Wang L, Lü Y, Yue C. Development and research progress of anti-drug resistant fungal drugs. J Infect Public Health. 2022 Sep;15(9):986-1000. doi: 10.1016/j.jiph.2022.08.004.

Dao A, Kim HY, Garnham K, Kidd S, Sati H, Perfect J, Sorrell TC, Harrison T, Rickerts V, Gigante V, Alastruey-Izquierdo A, Alffenaar JW, Morrissey CO, Chen SC, Beardsley J. Cryptococcosis-a systematic review to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. Med Mycol. 2024 Jun 27;62(6):myae043. doi: 10.1093/mmy/myae043.

Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. Lancet Infect Dis. 2024 Jul;24(7):e428-e438. doi: 10.1016/S1473-3099(23)00692-8.

Espinel-Ingroff A, Cantón E. Methods for Antifungal Susceptibility Testing of the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* Complex: Strengths and Limitations. J Fungi (Basel). 2023 May 5;9(5):542. doi: 10.3390/jof9050542.

Faria DR, Sakita KM, Capoci IRG, Arita GS, Rodrigues-Vendramini FAV, de Oliveira Junior AG, Soares Felipe MS, Bonfim de Mendonça PS, Svidzinski TIE, Kioshima ES. Promising antifungal activity of new oxadiazole against *Candida krusei*. PLoS One. 2020 Jan 14;15(1):e0227876. doi: 10.1371/journal.pone.0227876.

Faria DR, Melo RC, Arita GS, Sakita KM, Rodrigues-Vendramini FAV, Capoci IRG, Becker TCA, Bonfim-Mendonça PS, Felipe MSS, Svidzinski TIE, Kioshima ES. Fungicidal Activity of a Safe 1,3,4-Oxadiazole Derivative Against *Candida albicans*. Pathogens. 2021 Mar 7;10(3):314. doi: 10.3390/pathogens10030314.

Formagio MD, Silva JVO, Silva AF, Campanerut-Sá PAZ, Urbano A, Bonfim-Mendonça PS, Capoci IRG, Cotica ÉSK, Mikcha JMG. "Antibacterial effect and possible mechanism of action of 1,3,4-oxadiazole in *Staphylococcus aureus*". Lett Appl Microbiol. 2024 Jan 2;77(1):ovad138. doi: 10.1093/lambio/ovad138.

Grossman NT, Casadevall A. Physiological Differences in *Cryptococcus neoformans* Strains In Vitro versus In Vivo and Their Effects on Antifungal Susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Feb 23;61(3):e02108-16. doi: 10.1128/AAC.02108-16.

Illnait-Zaragozi MT, Martínez-Machín GF, Fernández-Andreu CM, Perurena-Lancha MR, Hagen

F, Meis JF. *Cryptococcus* and cryptococcosis in Cuba. A minireview. Mycoses. 2014 Dec;57(12):707-17. doi: 10.1111/myc.12275.

Iyer KR, Revie NM, Fu C, Robbins N, Cowen LE. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. Nat Rev Microbiol. 2021 Jul;19(7):454-466. doi: 10.1038/s41579-021-00511-0.

Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH, Pfaller MA. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Jun;41(6):1392-5. doi: 10.1128/AAC.41.6.1392.

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. Antimicrob Agents Chemother. 1998 May;42(5):1207-12. doi: 10.1128/AAC.42.5.1207.

Kontoyianni M. Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. Methods Mol Biol. 2017;1647:255-266. doi: 10.1007/978-1-4939-7201-2_18.

Ianiri G, Idnurm A. Essential gene discovery in the basidiomycete *Cryptococcus neoformans* for antifungal drug target prioritization. mBio. 2015 Mar 31;6(2):e02334-14. doi: 10.1128/mBio.02334-14.

Leelananda SP, Lindert S. Computational methods in drug discovery. Beilstein J Org Chem. 2016 Dec 12;12:2694-2718. doi: 10.3762/bjoc.12.267.

Lin X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. Infect Genet Evol. 2009 Jul;9(4):401-16. doi: 10.1016/j.meegid.2009.01.013.

Ma H, Wang M, Gai Y, Fu H, Zhang B, Ruan R, Chung KR, Li H. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems Required for Oxidative Stress Resistance, Fungicide Sensitivity, and Virulence of *Alternaria alternata*. Appl Environ Microbiol. 2018 Jul 2;84(14):e00086-18. doi: 10.1128/AEM.00086-18.

Melhem MSC, Leite Júnior DP, Takahashi JPF, Macioni MB, Oliveira L, de Araújo LS, Fava WS, Bonfietti LX, Paniago AMM, Venturini J, Espinel-Ingroff A. Antifungal Resistance in Cryptococcal Infections. Pathogens. 2024 Jan 29;13(2):128. doi: 10.3390/pathogens13020128.

Melo, RC. New oxadiazole with antifungal and antibiofilm activities against *Candida tropicalis*. Universidade de Maringá, Dissertação, 2019.

Missall TA, Lodge JK. Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot Cell. 2005 Feb;4(2):487-9. doi: 10.1128/EC.4.2.487-489.2005.

Missall TA, Lodge JK. Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators. Mol Microbiol. 2005 Aug;57(3):847-58. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04735.x.

Monteiro de Araújo Vilela, V. Tioredoxina redutase de *Aspergillus fumigatus* como alvo para o desenvolvimento de novos antifúngicos. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.eaic.uem.br/eaic2021/anais/artigos/4968.pdf>. Acesso em: 2 ago. 2024.

Mpoza E, Rhein J, Abassi M. Emerging fluconazole resistance: Implications for the management of cryptococcal meningitis. Med Mycol Case Rep. 2017 Nov 26;19:30-32. doi: 10.1016/j.mmcr.2017.11.004.

Ngan NTT, Flower B, Day JN. Treatment of Cryptococcal Meningitis: How Have We Got Here and Where are We Going? Drugs. 2022 Aug;82(12):1237-1249. doi: 10.1007/s40265-022-01757-5.

Nicola AM, Albuquerque P, Paes HC, Fernandes L, Costa FF, Kioshima ES, Abadio AKR, Bocca AL, Felipe MS. Antifungal drugs: New insights in research & development. Pharmacol Ther. 2019 Mar;195:21-38. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.10.008.

Nogueira, LG. Avaliação do potencial antimicrobiano de Pouteria spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori*. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012

Prestel C, Anderson E, Forsberg K, et al. *Candida auris* Outbreak in a COVID-19 Specialty Care Unit — Florida, July–August 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2021;70:56–57. doi: http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7002e3

Rajasingham R, Govender NP, Jordan A, Loyse A, Shroufi A, Denning DW, Meya DB, Chiller TM, Boulware DR. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. Lancet Infect Dis. 2022 Dec;22(12):1748-1755. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00499-6. Epub 2022 Aug 29. Erratum in: Lancet Infect Dis. 2023 Jan;23(1):e1. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00597-7.

Rathore SS, Sathiyamoorthy J, Lalitha C, Ramakrishnan J. A holistic review on *Cryptococcus*

neoformans. Microb Pathog. 2022 May;166:105521. doi: 10.1016/j.micpath.2022.105521.

Rodrigues-Vendramini FAV, Faria DR, Arita GS, Capoci IRG, Sakita KM, Caparroz-Assef SM, Becker TCA, de Souza Bonfim-Mendonça P, Felipe MS, Svidzinski TIE, Maigret B, Kioshima ÉS. Antifungal activity of two oxadiazole compounds for the paracoccidioidomycosis treatment. PLoS Negl Trop Dis. 2019 Jun 4;13(6):e0007441. doi: 10.1371/journal.pntd.0007441.

Sarges Costa, EJ. et al. Estudo da criptococose no sistema nervoso central e seu diagnósrico e tratamento em imunossuprimidos. Zenodo (CERN European Organization for Nuclear Research), Ciências da Saúde, Medicina, Volume 27 - Edição 127, 2023 out. doi: 10.5281/zenodo.10048660

Simões, BL. Promising new therapeutic option for paracoccidioidomycosis. Universidade de Maringá, Dissertação, 2021.

Sousa NSO, Almeida JDR, Frickmann H, Lacerda MVG, Souza JVB. Searching for new antifungals for the treatment of cryptococcosis. Rev Soc Bras Med Trop. 2023 Jul 24;56:e01212023. doi: 10.1590/0037-8682-0121-2023.

WHO. First meeting of the WHO Antifungal Expert Group on Identifying Priority Fungal Pathogens: Meeting report. Geneva, 2020 june. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789240006355. Acesso em: Acesso em: 2 ago. 2024.

Yang L, Liu X, Sui Y, Ma Z, Feng X, Wang F, Ma T. Lycorine Hydrochloride Inhibits the Virulence Traits of *Candida albicans*. Biomed Res Int. 2019 Jun 3;2019:1851740. doi: 10.1155/2019/1851740. Erratum in: Biomed Res Int. 2021 Jan 2;2021:1294536. doi: 10.1155/2021/1294536.