



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

**EFEITO DO USO COMBINADO DE INIBIDOR DE HISTONA  
DESACETILASE E TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE O  
CRESCIMENTO DE *Cryptococcus* spp. *IN VITRO***

BRASÍLIA

2019

JOSÉ ATHAYDE VASCONCELOS MORAIS

**EFEITO DO USO COMBINADO DE INIBIDOR DE HISTONA  
DESACETILASE E TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE O  
CRESCIMENTO DE *Cryptococcus* spp. *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Nanociências e Nanobiotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann.

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Marcio José Poças-Fonseca

BRASÍLIA

2019

*Dedico esse trabalho a meus pais, José Arimateia e Abigail, meu irmão João Gabriel, minha namorada Amanda e todos meus familiares pelo incentivo e apoio durante toda esta jornada.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, discernimento e resiliência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho e para o meu crescimento profissional.

Em especial, agradeço aos meus pais, José Arimatéia e Abigail e meu irmão João Gabriel, pelos ensinamentos e por acreditarem em mim e me apoiarem.

A minha namorada Amanda, pelo incentivo, apoio, torcida, motivação e meu porto seguro. Inspiração como cientista e na forma de ver o mundo.

A todos meus familiares, padrinho De Assis, madrinha Zeneide, e todos os tios, tias, primos e amigos que me apoiam.

Agradeço ao professor Dr. Luís Alexandre Muehlmann pela confiança, oportunidade e paciência. Muito obrigado pelos ensinamentos, e inspiração na dedicação à pesquisa

Ao professor Dr. Marcio José Poças-Fonseca pela oportunidade e compreensão. Admiro a seriedade que você faz ciência e pela postura tão profissional para conduzir o Laboratório. Sem dúvidas, aprendi muito e me inspirou a ser um profissional melhor.

Ao professor Ricardo Bentes por ter cedido a infraestrutura e materiais do seu laboratório para realização desse estudo.

Ao professor João Paulo pelo carisma e atenção de sempre.

A todos os professores da BIOMOL que cederam espaço para o desenvolvimento desse trabalho. Vocês me ensinaram que ciência não é lugar para individualismo.

Ao grupo de pesquisa Imuno Nano (Prof. Patrícia, Mosar, Camila, Giulia, Kissia, Rayane, Victor Mello e Victor Hugo). Obrigado pelo companheirismo e cumplicidade.

Ao grupo de pesquisa RGM (Kunal, Camilas, Deleep, Túlio, Marcus e Fernanda) obrigado por toda ajuda e receptividade.

Aos demais colegas e amigos cientistas do grupo de nanobiotecnologia, os quais foram indispensáveis nesta caminhada.

À Universidade de Brasília e seus professores. Ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia. Às agências de fomento: Capes, CNPq, INCT e FAPDF, pelo financiamento de todo esse trabalho.

*“Caminhe e o caminho se abrirá”  
(Confúcio).*

## RESUMO

*Cryptococcus neoformans* é um fungo patogênico oportunista encontrado mundialmente e é capaz de causar infecções potencialmente fatais, especialmente em pessoas com imunodeficiência. Limitações para o tratamento da infecção por *C. neoformans* envolvem a seleção de isolados resistentes aos antifúngicos convencionais, o tempo prolongado de tratamento e efeitos colaterais como nefrotoxicidade. Abordagens alternativas como a terapia fotodinâmica (TFD) e a intervenção epigenética poderiam contornar esses problemas. A TFD combina um agente fotossensibilizante (FS) não tóxico com luz vermelha e oxigênio molecular. A nanoemulsão de cloreto de ftalocianina de alumínio (NE-AIFtCl), desenvolvida por nosso grupo de pesquisa, demonstrou atividade inibitória sobre várias linhagens de células de câncer humano. Inibidores de histona desacetilase (HDACis), como o butirato de sódio (NaBut) e a tricostatina A (TSA), são frequentemente utilizados em tratamentos combinados com fármacos antineoplásicos visando a ação sinérgica e a redução de efeitos colaterais. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da TFD mediada por NE-AIFtCl, combinada a NaBut ou a TSA, sobre o crescimento de *C. neoformans* linhagens H99 e T1 (resistente a fluconazol) e de *C. gattii* NIH198. As leveduras foram cultivadas na presença de NaBut ou TSA, expostas a diferentes concentrações de NE-AIFtCl, lavadas e semeadas em placas de 96 poços para aplicação de luz no comprimento de onda de 660 nm. A incorporação do agente fotossensibilizante foi avaliada após lise celular com dimetilsulfóxido (DMSO), detecção da fluorescência no lisado por espectrofluorímetro e por microscopia confocal. A proliferação celular em resposta a diferentes tratamentos foi avaliada pela densidade óptica a 600 nm. O efeito da TFD sobre a viabilidade celular foi avaliado por meio do teste colorimétrico de brometo de 3(4,5 dimetiliazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e por diluição em série, seguida de semeadura em YPD sólido. O tempo de 30 min de incubação demonstrou-se suficiente para a incorporação máxima de NE-AIFtCl pelas leveduras. A microscopia confocal revelou que, em *C. neoformans* H99 e *C. gattii* NIH198, o AIFtCl se apresentou difuso pelo citoplasma. A linhagem T1 de *C. neoformans* apresentou menor incorporação do FS, que se concentrou na periferia celular. A TFD levou a redução da proliferação celular e essa redução foi acentuada pelo pré-tratamento das leveduras com NaBut ou TSA. A TFD demonstrou ainda citotoxicidade, dependente da concentração de FS, sobre as leveduras tratadas. O ensaio de diluição seriada demonstrou que o pré-tratamento com HDACi intensificou o efeito citotóxico da TDF. A linhagem T1 de *C. neoformans* demonstrou-se a mais resistente à ação de TFD em combinação com HDACi, enquanto *C. gattii* NIH 198 se mostrou mais sensível. Os resultados apresentados indicam a eficácia da TFD mediada por NE-AIFtCl, em combinação com o tratamento com HDACi, sobre o controle da proliferação de *C. neoformans* e *C. gattii in vitro*, podendo vir a representar uma proposta terapêutica alternativa para o tratamento de infecções fúngicas.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus*, terapia fotodinâmica, cloreto de ftalocianina de alumínio, inibidores de histona desacetilase

## ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* is an opportunistic pathogenic fungus found worldwide and is capable of causing life-threatening infections, especially in people with immunodeficiency. Limitations for the treatment of *C. neoformans* infection involve selection of isolates resistant to conventional antifungals, prolonged treatment time and side effects such as nephrotoxicity. Alternative approaches such as photodynamic therapy (PDT) and epigenetic intervention could circumvent these problems. PDT combines a non-toxic photosensitizing agent (PS) with red light and molecular oxygen. Aluminum phthalocyanine chloride (NE-AIPcCl) nanoemulsion, developed by our research group, demonstrated inhibitory activity on various human cancer cell lines. Histone deacetylase inhibitors (HDACis), such as sodium butyrate (NaBut) and trichostatin A (TSA), are often used in combination treatments with antineoplastic drugs for synergistic action and reduction of side effects. The aim of the present study was to evaluate the effect of NE-AIPcCl-mediated PDT, combined with NaBut or TSA, on the growth of *C. neoformans* strain H99 and T1 (fluconazole resistant) and *C. gattii* NIH198. Yeasts were cultured in the presence of NaBut or TSA, exposed to different concentrations of NE-AIPcCl, washed and seeded in 96-well plates for application of light at 660 nm wavelength. The incorporation of the photosensitizing agent was evaluated after cell lysis with dimethylsulfoxide (DMSO), detection of fluorescence in the lysate by spectrofluorimeter and by confocal microscopy. Cell proliferation in response to different treatments was evaluated by optical density at 600 nm. The effect of PDT on cell viability was evaluated by the colorimetric test of 3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and by serial dilution, followed by seeding in solid YPD. The time of 30 min of incubation was demonstrated sufficient for the maximum incorporation of NE-AIPcCl by the yeasts. Confocal microscopy revealed that, in *C. neoformans* H99 and *C. gattii* NIH198, AIPcCl diffuse through the cytoplasm. The T1 line of *C. neoformans* presented a lower incorporation of PS, which was concentrated in the cellular periphery. PDT reduced cell proliferation and this reduction was accentuated by yeast pretreatment with NaBut or TSA. PDT also demonstrated PS-dependent cytotoxicity on treated yeasts. The serial dilution assay demonstrated that pretreatment with HDACi enhanced the cytotoxic effect of PDT. The T1 line of *C. neoformans* was shown to be more resistant to the action of PDT in combination with HDACi, whereas *C. gattii* NIH198 was more sensitive. The results presented indicate the efficacy of NE-AIPcCl-mediated PDT, in combination with HDACi treatment, on the control of *C. neoformans* and *C. gattii* proliferation in vitro, and may represent an alternative therapeutic proposal for the treatment of fungal infections.

**Key words:** *Cryptococcus*; photodynamic therapy; aluminum phthalocyanine chloride, histone deacetylase inhibitors

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação da estrutura química do butirato de sódio (NaBut).....	7
<b>Figura 2</b> - Representação da estrutura química da tricostatina A (TSA).....	8
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática do mecanismo de ação da terapia fotodinâmica (TFD).....	9
<b>Figura 4</b> – Representação da estrutura química do cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) .....	
<b>Figura 5</b> – Imagem da câmara para obtenção de imagens da placa Petri. ....	21
<b>Figura 6</b> - Caracterização do tamanho e carga superficial das nanopartículas contendo cloreto de ftalocianina de alumínio, dispersas em meio aquoso.....	24
<b>Figura 7</b> - Incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio por <i>C. neoformans</i> H99. ....	25
<b>Figura 8</b> - Porcentagem de incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio por leveduras de <i>C. neoformans</i> H99 tratadas com butirato de sódio (NaBut). ....	26
<b>Figura 9</b> - Porcentagem de incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) por leveduras de <i>C. neoformans</i> H99 tratadas com tricostatina A (TSA).....	27
<b>Figura 10</b> – Imagem de microscopia confocal de células de <i>C. neoformans</i> H99 após incorporação do cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl).....	28
<b>Figura 11</b> – Incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) pela linhagem T1 de <i>C. neoformans</i> . ....	48
<b>Figura 12</b> - Porcentagem de incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) pela linhagem T1 de <i>C. neoformans</i> previamente tratada com butirato de sódio. ....	50
<b>Figura 13</b> - Porcentagem de incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) pela linhagem T1 de <i>C. neoformans</i> previamente tratada com tricostatina A (TSA) ....	52
<b>Figura 14</b> - Imagem de microscopia confocal de células de <i>C. neoformans</i> T1 após incorporação do cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl).....	40
<b>Figura 15</b> - Incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) pela linhagem NIH198 de <i>C. gattii</i> .. ....	43
<b>Figura 16</b> - Porcentagem de incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) pela linhagem NIH198 de <i>C. gattii</i> previamente tratada com butirato de sódio. Incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) pela linhagem T1 de <i>C. neoformans</i> .....	30
<b>Figura 17</b> - Porcentagem de incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) pela linhagem NIH198 de <i>C. gattii</i> previamente tratada com tricostatina A (TSA). ....	31
<b>Figura 18</b> - Imagem de microscopia confocal de células <i>C. gattii</i> após incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl).....	32
<b>Figura 19</b> - Efeito da terapia fotodinâmica (TFD) mediada por diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AlFtCl) sobre o crescimento, em RPMI, de <i>C. neoformans</i> H99 tratado com butirato de sódio (NaBut) ou com tricostatina A (TSA).....	33
<b>Figura 20</b> – Efeito da terapia fotodinâmica (TFD) mediada por diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AlFtCl) sobre o crescimento, em meio RPMI, de <i>C. neoformans</i> T1 tratado previamente com butirato de sódio (NaBut) ou com tricostatina A (TSA). ....	54

<b>Figura 21</b> – Efeito da terapia fotodinâmica (TFD) mediada por diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AlFtCl) sobre o crescimento, em RPMI, de leveduras de <i>C. gattii</i> NIH198 previamente tratadas com butirato de sódio (NaBut) ou com tricostatina A (TSA). .....	56
<b>Figura 22</b> – Viabilidade de leveduras de <i>C. neoformans</i> H99 tratadas com butirato de sódio (NaBut) ou tricostatina A (TSA) e posteriormente submetidas à terapia fotodinâmica (TFD). .....	58
<b>Figura 23</b> - Viabilidade de leveduras de <i>C. neoformans</i> T1 tratadas com butirato de sódio (NaBut) ou tricostatina A (TSA) e posteriormente submetidas à terapia fotodinâmica (TFD). .....	41
<b>Figura 24</b> - Viabilidade de leveduras de <i>C. gattii</i> NIH198 tratadas com butirato de sódio (NaBut) ou tricostatina A (TSA) e submetidas à terapia fotodinâmica (TFD). .....	45
<b>Figura 25</b> - Crescimento, em meio sólido, de <i>C. neoformans</i> H99 após terapia fotodinâmica (TFD). .....	35
<b>Figura 26</b> - Crescimento, em meio sólido, de <i>C. neoformans</i> H99 após tratamento com butirato de sódio (NaBut). .....	36
<b>Figura 27</b> - Crescimento, em meio sólido, de <i>C. neoformans</i> H99 após tratamento com tricostatina A (TSA) .....	37
<b>Figura 28</b> - Crescimento, em meio sólido, de leveduras de <i>C. neoformans</i> T1 após terapia fotodinâmica (TFD). .....	38
<b>Figura 29</b> – Crescimento, em meio sólido, de leveduras de <i>C. neoformans</i> T1 tratadas com butirato de sódio (NaBut) .....	60
<b>Figura 30</b> – Crescimento, em meio sólido, de leveduras de <i>C. neoformans</i> T1 tratadas com tricostatina A (TSA) .....	62
<b>Figura 31</b> - Crescimento, em meio sólido, de leveduras de <i>C. gattii</i> NIH198 após terapia fotodinâmica (TFD). .....	64
<b>Figura 32</b> - Crescimento, em meio sólido, de leveduras de <i>C. gattii</i> NIH198 tratadas com butirato de sódio (NaBut). .....	42
<b>Figura 33</b> - Crescimento, em meio sólido, de leveduras de <i>C. gattii</i> NIH198 tratadas com tricostatina A (TSA). .....	46

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Linhagens de <i>Cryptococcus</i> utilizadas nesse trabalho .....	16
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[ ]	Concentração do fármaco
~	Aproximadamente
<	Menor
>	Maior
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio Singlete
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AlFtCl	Cloreto de ftalocianina de alumínio
ANOVA	Análise de variância
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Dispersão dinâmica de luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E.P.M	Erro padrão médio
FS	Agente fotossensibilizante
HDAC	Histona desacetilase
HDACi	Inibidor de histona desacetilase
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
PdI	Índice de polidispersão
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro quadrado
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MTT	Brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
mV	Milivolts
mW	Miliwatt
NE-AlFtCl	Nanoemulsão com cloreto de ftalocianina de alumínio
nm	Nanômetro

O <sub>2</sub>	Oxigênio
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por mininuto
SNC	Sistema nervoso central
TFD	Terapia fotodinâmica
YPD	Meio de cultura Yeast extract - Peptone - Dextrose
Zp	Potencial zeta
$\lambda$	Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. CRIPTOCOCOSE.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. <i>Cryptococcus</i> spp.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. HISTONA DESACETILASES (HDAC).....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASES (HDACi).....</b>	<b>6</b>
<b>1.5. TERAPIA FOTODINÂMICA.....</b>	<b>8</b>
<b>1.6. AGENTE FOTOSSENSIBILIZANTE.....</b>	<b>10</b>
<b>1.7. NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA.....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. PREPARAÇÃO DAS NANOESTRURAS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS DA NE-AIFtCI QUANDO EXPOSTAS ÀS SOLUÇÕES E CONDIÇÕES UTILIZADAS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. LINHAGENS DE MICRO-ORGANISMOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO E SOLUÇÕES.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4. MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS.....</b>	<b>18</b>
<b>3.5. INÓCULO E SEMEADURA DAS LEVEDURAS.....</b>	<b>18</b>
<b>3.6. DETECÇÃO DA INCORPORAÇÃO INTRACELULAR DE AIFtCI NAS CÉLULAS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.7. TERAPIA FOTODINÂMICA.....</b>	<b>20</b>
<b>3.7.1. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....</b>	<b>20</b>
<b>3.7.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MEIO DE SEMEADURA APÓS DILUIÇÃO SERIADA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.7.3. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL PELO ENSAIO DE MTT.....</b>	<b>22</b>
<b>3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</b>	<b>22</b>

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2. INCORPORAÇÃO DE AlFtCl.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2.1. RESULTADOS COM A LINHAGEM H99 DE <i>C. neoformans</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2.2. RESULTADOS COM A LINHAGEM T1 DE <i>C. neoformans</i> .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.3. RESULTADOS COM A LINHAGEM NIH198 DE <i>C. gattii</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3.1. RESULTADOS COM A LINHAGEM H99 DE <i>C. neoformans</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3.2. RESULTADOS COM A LINHAGEM T1 DE <i>C. neoformans</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3.3. RESULTADOS COM A LINHAGEM NIH198 DE <i>C. gattii</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL POR MEIO DO ENSAIO DE MTT.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4.1. RESULTADOS COM A LINHAGEM H99 DE <i>C. neoformans</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4.2. RESULTADOS COM A LINHAGEM T1 DE <i>C. neoformans</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>4.4.3. RESULTADOS COM A LINHAGEM NIH198 DE <i>C. gattii</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>4.5. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MEIO DE SEMEADURA EM DILUIÇÃO SERIADA.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5.1. RESULTADOS COM A LINHAGEM H99 DE <i>C. neoformans</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5.2. RESULTADOS COM A LINHAGEM T1 DE <i>C. neoformans</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>4.5.3. RESULTADOS COM A LINHAGEM NIH198 DE <i>C. gattii</i> .....</b>	<b>59</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Criptococose

A criptococose é uma doença causada por *Cryptococcus* spp., um gênero de fungos geralmente oportunistas, que acometem majoritariamente pacientes imunocomprometidos, mas que também podem infectar indivíduos imunocompetentes (IDNURM *et al.*, 2005; PAPPAS, 2013). A manifestação da doença dependerá da resposta imunológica do hospedeiro, podendo o patógeno ficar contido em granulomas e ser reativado posteriormente, levando à forma aguda da doença (LEOPOLD WAGER *et al.*, 2016; MAZIARZ; PERFECT, 2016). A eventual infecção por *C. neoformans* não obrigatoriamente provoca a doença, podendo levar a um estado latente não sintomático (revisto por MAZIARZ; PERFECT, 2016; ALMEIDA *et al.*, 2017).

Com o surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a criptococose deixou de ser uma doença rara, chegando a ocupar o 4º lugar entre as doenças infecciosas que acometem os indivíduos que vivem com HIV/AIDS (revisto por PERFECT; CASADEVALL, 2002). Outros fatores colaboraram para o aumento na incidência da doença como, por exemplo, o aumento do número de transplantes de órgãos e terapias imunossupressoras (LOW; ROTSTEIN, 2011).

A forma de disseminação de *C. neoformans* pelo organismo hospedeiro ainda não foi totalmente elucidada. Normalmente a infecção se inicia por inalação de leveduras ou de esporos. O fungo pode se alojar em outras partes do corpo, apresentando tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), onde causa meningites e encefalites (VILCHEZ; FUNG; KUSNE, 2002; CASALI *et al.*, 2003). *C. neoformans* é um dos causadores mais comuns de meningite fúngica, quadro clínico mais grave da doença (FRASER *et al.*, 2005; BICANIC *et al.*, 2006). Estima-se que a cada ano

cerca de 230.000 casos de meningite criptocócica ocorram em todo o mundo e cerca de 60% desses pacientes cheguem a óbito (RAJASINGHAM *et al.*, 2017).

A meningite criptocócica ainda é um grande problema em países com recursos limitados, de acordo com dados do CDC (Center for Disease Control and Prevention, EUA)(<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-neoformans/statistics.html#four>; acesso em 29/01/2019) , a África subsaariana é o local mais prevalente dos casos de meningite criptocócica associadas à HIV/AIDS, sendo a segunda maior causa de mortes em adultos, podendo matar mais pessoas por ano que a tuberculose. Em contrapartida, em países desenvolvidos, a mortalidade de criptococose é de cerca de 12%, devido a disponibilidade de tratamentos antifúngicos.

No Brasil, segundo estudo da Fundação Oswaldo Cruz (<https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-brasilia-integra-rede-de-pesquisa-sobre-criptococose>; acesso em 29/01/2019), quatro a cada 10 pacientes morrem depois de infectados. A pesquisa estima que ocorram, em média, 20 casos por ano só no Distrito Federal. No entanto, como a criptococose não é doença de notificação compulsória, é provável que o número de casos seja ainda maior.

A manifestação de infecção cutânea por *Cryptococcus* é menos comum, porém tem sido relatada em diversos estudos. (KUMAR *et al.*, 2005; DU *et al.*, 2015; ARJONA-AGUILERA *et al.*, 2017). O diagnóstico da infecção primária é prejudicado devido à variedade das formas das lesões e dos locais acometidos (KUMAR *et al.*, 2005). Esse tipo de manifestação acomete cerca de 10% a 15% dos casos de criptococose disseminada associada à AIDS e a terapias imunossupressoras. (revisado por MARTINEZ; GARCIA-RIVERA; CASADEVALL, 2001; NEGRONI, 2012). A maior prevalência se dá no norte da Europa e tem sido relacionada ao sorotipo D (DURDEN; ELEWSKI, 1994; DU *et al.*, 2015;). **A criptococose cutânea é geralmente secundária à disseminação sistêmica**

podendo ser o primeiro indicador de infecção. A identificação dessas lesões pode, portanto, agilizar o diagnóstico e o acesso ao tratamento. Normalmente as lesões cutâneas se apresentam como lesões papulo-nodulares, no entanto podem variar na aparência das lesões (SIVARAJ *et al.*, 2018). A criptococose cutânea primária foi relatada mais recentemente, tanto em pacientes imunossuprimidos como não imunossuprimidos (ALLEGUE; LIS; PÉREZ-ÁLVAREZ, 2007; SUN *et al.*, 2010; TWEDE; PETERS, 2018). Normalmente a infecção primária se inicia após traumas, com exposição da lesão a materiais contaminados, em regiões de prevalência do fungo e de más condições sanitárias (CHRISTIANSON, 2013). Para ser diagnosticada como uma doença primária, ela deve apresentar somente lesões na pele com cultura positiva para *Cryptococcus spp.* e nenhuma evidência de doença sistêmica (MARQUES *et al.*, 2012)

## 1.2. *Cryptococcus spp.*

Com os métodos atuais de identificação molecular, foram descritas variedades dentro do gênero. A separação dos isolados de *C. neoformans* foi feita inicialmente em quatro sorotipos: A, B, C e D (DIAZ *et al.*, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2000). Segundo Chen *et al.*, (1996), esses quatro sorotipos pertenceriam a duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A e D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C). *C. neoformans* var. *gattii* foi posteriormente classificado como uma espécie distinta das demais, chamada de *C. gattii* (KWON-CHUNG *et al.*, 2002; HAGEN *et al.*, 2015).

*C. neoformans* é de ampla distribuição mundial e já foi isolado em diversos nichos ambientais, bem como material vegetal em decomposição e excretas de aves, normalmente pombos (revisto por MARTINEZ; GARCIA-RIVERA; CASADEVALL,

2001; PERFECT; CASADEVALL, 2002). *C. gattii* apesar de encontrado frequentemente em países tropicais e subtropicais, aparece também em países de clima temperado, como os casos relatados em Vancouver, Canadá (KIDD *et al.*, 2004; FRASER *et al.*, 2005). No Brasil, o sorotipo A é o mais prevalente (77,95% dos casos), seguido pelo sorotipos B (18,2%), D (0,4%) e C (0,2%) (NISHIKAWA *et al.*, 2003).

Apesar da diversidade de *Cryptococcus*, acredita-se que somente *C. neoformans* e *C. gattii* possam ser consideradas como espécies que consistentemente causam criptococose (KWON-CHUNG *et al.*, 2015). Para essas espécies, são descritas algumas diferenças, como habitat natural, características fenotípicas (como o tamanho da cápsula), epidemiologia, manifestações clínicas e resposta aos antifúngicos (SORRELL, 2001). Observou-se uma resposta mais lenta aos antifúngicos nas infecções causadas por *C. gattii*, que provoca mais lesões neurológicas e intervenções neurocirúrgicas mais frequentes (SEVERO; DE MATTOS OLIVEIRA; LONDERO, 1999; SORRELL, 2001).

O tratamento convencional contra esses patógenos inclui a anfotericina B, o fluconazol e a flucitosina, ou uma combinação desses fármacos. Embora se obtenha algum sucesso no tratamento contra *Cryptococcus* com esses fármacos, o tratamento é longo, apresenta efeitos tóxicos potenciais e propicia a seleção de isolados resistentes (FUCHS *et al.*, 2007). **Leveduras resistentes a esses principais fármacos são cada vez mais relatados na literatura (SOARES *et al.*, 2010; CALZAVARA-PINTON *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2014), células de *C. neoformans* resistentes a fluconazol, apresentam ainda uma menor susceptibilidade a EROs, devido o fluconazol alterar o metabolismo celular em resposta ao estresse oxidativo nas leveduras.** (PENG *et al.*, 2018). Fármacos mais recentes e eficazes, como o E1210,

um inibidor de glicosilfosfatidilinositol (GPI) da parede celular, o VT-1129, um bloqueador de enzimas na via de produção do ergosterol e o T-2307, que desestabiliza a membrana mitocondrial dos fungos, estão disponíveis. No entanto, esses são caros e inviáveis para a população que geralmente é acometida pelo *Cryptococcus* (revisto por MAY *et al.*, 2016).

### **1.3. Histona desacetilases (HDAC)**

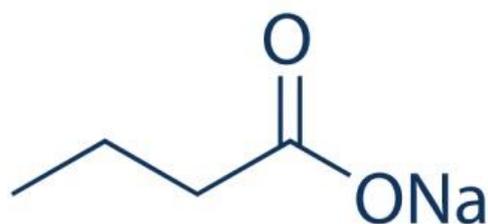
Devido às limitações da terapia atual, estudos apontam a necessidade de se encontrar novas alternativas para o tratamento de infecções por fungos e de se elucidar a resposta das células fúngicas a diferentes estímulos, bem como os mecanismos de resistência. Nesse contexto, uma alternativa que vem sendo explorada na última década é a regulação da expressão de genes por remodelação da cromatina (JAENISCH; BIRD, 2003; SAWAN *et al.*, 2008).

Os mecanismos de regulação epigenética em fungos patogênicos são pouco elucidados. Fármacos capazes de interferir na dinâmica de compactação e descompactação da cromatina vêm sendo estudados (HSIEH; FISCHER, 2005; CLAPIER; CAIRNS, 2009; BRANDÃO *et al.*, 2015). A cromatina é um complexo de DNA compactado em torno de proteínas, dentre elas histonas (revisto por JENUWEIN; ALLIS, 2001; GORDON *et al.*, 2013;). O mecanismo de remodelação da cromatina envolve histonas acetiltransferases (HATs), que neutraliza a carga positiva dos terminais de histonas com adição do grupo acetil, diminuindo a sua interação com o DNA, o que promove uma conformação menos compactada, facilitando, assim, o acesso dos fatores de transcrição e da enzima RNA polimerase ao DNA. Inversamente, as histonas desacetilases (HDACs) removem o grupo acetil das histonas, possibilitando uma maior

interação dessas com o DNA, o que deixa a cromatina mais compactada. (SMITH; EDLIND, 2002; JAENISCH; BIRD, 2003;). A alternância entre esses estados acetilado e desacetilado das histonas relacionadas à transcrição do DNA, silenciamento genético, bem como da progressão do ciclo celular como, por exemplo, em metástases de câncer de mama (GUERRIERO *et al.*, 2017). Em *C. albicans* as histonas desacetilases estão envolvidas, por exemplo, na regulação da resistência a azóis, transição entre os fenótipos branco-opaco e adesão as células do pulmão ( KLAR *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2015).

#### **1.4. Inibidores de histonas desacetilases (HDACi)**

Inibidores de histonas desacetilases (HDACi) são estudados como fármacos para o tratamento de câncer e de células em cultura infectadas por HIV, despertando grande interesse na indústria farmacêutica (revisto por WEST E JOHNSTONE, 2014). Diversos HDACi vêm sendo isolados de fontes naturais ou sintetizados em laboratórios. O butirato de sódio (NaBut) (Fig. 1) é um ácido graxo de cadeia curta, pertencente ao grupo dos ácidos alifáticos, produzido pela fermentação de bactérias anaeróbicas e que inibe diferentes classes de HDACs (revisto por SAWAN *et al.*, 2008; HALSALL *et al.*, 2012; SIMON-O'BRIEN *et al.*, 2015). O butirato de sódio também foi capaz de induzir a regressão de células-tronco embrionárias humanas a um estágio mais indiferenciado (WARE *et all*, 2009), além de induzir apoptose em células Raji pelo aumento da expressão de DAPK (ZHANG *et al.*, 2007).

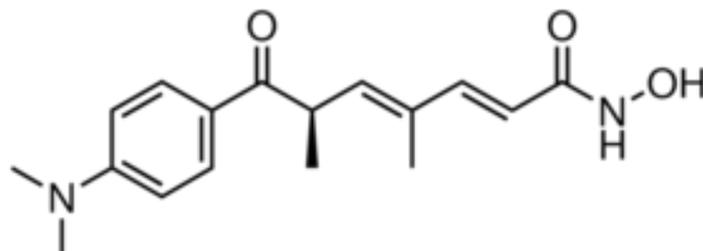


**Figura 1** - Representação da estrutura química do butirato de sódio (NaBut).

A tricostatina A (TSA) (Fig. 2) é um derivado de hidroxamato caracterizado inicialmente como um produto do metabolismo de *Streptomyces hygroscopicus* (TSUJI *et al.*, 1976). Embora os ácidos hidroxâmicos sejam conhecidos por agirem sem especificidade, afetando todas as classes de HDACs (HU *et al.*, 2003; SCHNEIDER-STOCK & OCKER 2007; MARKS, 2010;), seu mecanismo de ação permanece pouco esclarecido.

Dados apresentados no trabalho de Brandão *et al* 2015 claramente mostraram que *C. neoformans*, em resposta aos inibidores de HDAC NaBut e TSA, tem os principais atributos de virulência atenuados, como o tamanho da cápsula, taxa de crescimento, capacidade de crescimento a 37 °C, melanização, produção de fosfolipases ativas, formação de hifas de acasalamento e a progressão no ciclo celular. A atividade de urease não foi alterada. Em prosseguimento a esses estudos, a deleção individual de 08 genes de histona desacetilase, assim como a construção de alguns mutantes duplos, confirmou a importância das HDACs para a regulação da virulência de *C. neoformans in vitro* e no

modelo de infecção de larvas de *Galleria mellonella* e de camundongos (BRANDÃO *et al.* 2018).



**Figura 2-** Representação da estrutura química da tricostatina A (TSA)

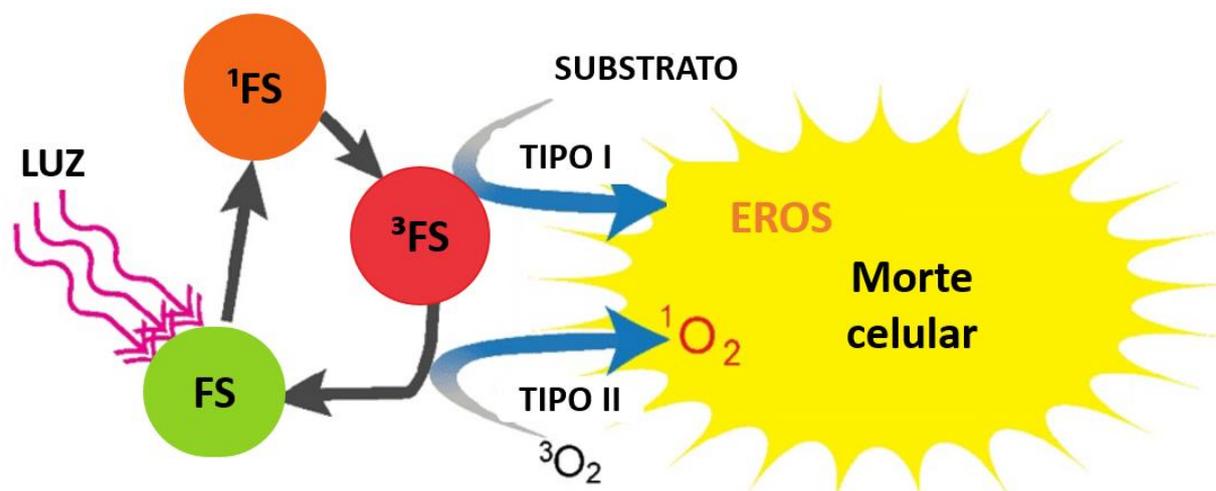
Estudos recentes demonstraram a capacidade dos HDACi em interagir com a fototerapia, intensificando o efeito citotóxico da terapia fotodinâmica (TFD) sobre células de câncer humano (SUNG; VERVERIS; KARAGIANNIS, 2014; YE *et al.*, 2014; HALABURKOVÁ *et al.*, 2017). Não existem estudos a respeito da resposta de células de fungos à exposição combinada de HDACi e TFD.

### 1.5. Terapia fotodinâmica

A TFD é uma abordagem terapêutica promissora baseada no estresse oxidativo gerado por fotorreações do tipo I e do tipo II, desencadeadas pela fotoativação de um agente fotossensibilizante em um meio contendo oxigênio molecular. A aplicação da TFD na prática clínica da infecção por micro-organismos ainda é bastante limitada ( FUCHS *et al.*, 2007; DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009).

A TFD é um procedimento que consiste na combinação de três componentes: um

fotossensibilizante (FS), luz de comprimento de onda apropriado para excitar o FS e oxigênio molecular. A luz, ao excitar o FS, promove mecanismos oxidativos por duas vias (Fig 3): a via do tipo I envolve reações de transferência de elétrons do estado ativado do FS para um substrato, o que resulta na produção de radicais livres que podem reagir com oxigênio para produzir espécies citotóxicas, incluindo o ânion superóxido, bem como radicais derivados de lipídios e hidroxila (DĄBROWSKI, 2017). A via do tipo II envolve transferência de energia do estado excitado do fotossensibilizante para o oxigênio molecular no estado triplete fundamental, produzindo oxigênio singlete excitado (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009).



**Figura 3** - Representação esquemática do mecanismo de ação da terapia fotodinâmica (TFD). O FS é excitado com luz em comprimento de onda específico ocasionando, a partir do O<sub>2</sub> tecidual, a formação de espécies reativas de oxigênio. EROS: espécies reativas de oxigênio; FS: fotossensibilizante. Imagem adaptada de Silva *et al.* (2012).

O efeito citotóxico do oxigênio singlete é devido à sua alta reatividade com biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membrana (DEMIDOVA;

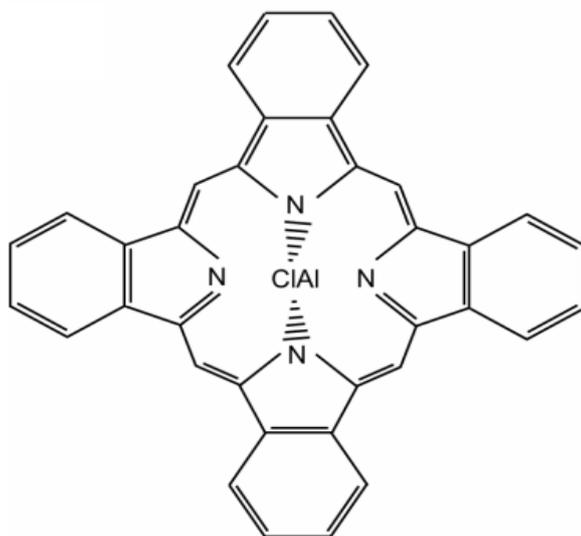
HAMBLIN, 2004). Principalmente nas reações do tipo II, a molécula do fotossensibilizador retorna ao seu estado fundamental, podendo produzir continuamente altos níveis de EROs, enquanto a exposição a luz perdurar. Em condições aeróbicas, as reações do tipo II são provavelmente as principais responsáveis pelo dano oxidativo causado pela TFD em células microbianas (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008a). Depois que o FS se liga à parede celular, pode permanecer adsorvido ou ser translocado para a membrana celular interna ou para o meio intracelular, onde exercerá eventualmente sua fototoxicidade (FUCHS *et al.*, 2007; GONZALES *et al.*, 2010). A TFD é economicamente viável, geralmente segura, com eficácia demonstrada contra diferentes infecções fúngicas superficiais e de efeitos geralmente limitados às áreas irradiadas. A seleção de isolados resistentes é pouco provável devido à multiplicidade de sítios-alvo (MAISCH *et al.*, 2004; KÖMERIK; MacROBERT, 2006). Não há relatos na literatura científica a respeito do desenvolvimento de resistência à TFD por fungos (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009; DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008b). Portanto, a TFD pode representar uma alternativa para a terapia combinada com antifúngicos, em particular em infecções superficiais. Tendo em vista o desenvolvimento de sondas que conseguem levar a luz a órgãos internos do corpo, é possível também utilizar essa terapia para as demais manifestações clínicas.

## 1.6 Fotossensibilizante

As características ideais de um fotossensibilizante incluem a pureza química, ausência de toxicidade no escuro, fototoxicidade, captação e eliminação celular, acúmulo nos tecidos de interesse, ativação em comprimento de onda de luz altamente penetrante em tecidos biológicos, além da capacidade de gerar elevada quantidade de espécies

reativas de oxigênio (MUEHLMANN *et al.*, 2015; BERLANDA *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2018)

Os fotossensibilizantes mais usados em TFD incluem clorinas, porfirinas, fenotiazinas e ftalocianinas. Um FS que vem ganhando destaque é o cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl, fig. 4) devido a suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas. Com comprimento de onda máximo de absorção de 650-850 nm, a penetração de luz é um aspecto importante na TFD, já que a luz precisa atingir o fotossensibilizante dentro da célula (HEALY *et al.*, 2009). A luz na região do vermelho, que excita o AlFtCl, tem um poder de penetração em tecidos biológicos de cerca de 3,0 mm (ZHANG *et al.*, 2006).



**Figura 4** – Representação da estrutura química do cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl)

## 1.7 Nanociência e nanobiotecnologia

A nanotecnologia aborda o desenvolvimento de materiais em escala nanométrica, que apresentem ao menos uma propriedade resultante de suas nanodimensões, não observada no material bruto, não nanoestruturado (GÓRSKI, 2015; DURÁN; MARCATO, 2013). Tal tecnologia vem sendo empregada em aplicações biológicas e terapêuticas (SALATA, 2004; SAHOO *et al.*, 2007). Diversas nanoestruturas já foram desenvolvidas (lipossomas, lipídicas sólidas, nanoemulsões, nanocápsulas, de ouro, poliméricas, magnéticas e outras) e seu uso levou a avanços nas pesquisas sobre o controle de infecções microbianas, pois permite o encapsulamento de fármacos, o direcionamento aos patógenos, a passagem por barreiras biológicas e a liberação controlada desses agentes (BAETKE *et al.*, 2015; SPRING *et al.*, 2015; HODGKINSON *et al.*, 2017; GANASSIN *et al.*, 2018).

A maioria dos FS, como o AlFtCl e grande parte das outras ftalocianinas, é insolúvel em água ou em solventes compatíveis com os sistemas biológicos. Assim, no meio fisiológico, tendem a se agregar, o que reduz as propriedades fotoquímicas de forma significativa desse fotossensibilizante (MUEHLMANN *et al.*, 2015; LONGO *et al.*, 2009; JAYME *et al.*, 2016). Neste contexto, a associação de fototerápicos a sistemas nanoparticulados melhora a atividade de FS em meios fisiológicos (NUNES, *et al.*, 2004; JOANITTI, *et al.*, 2016; RODRIGUES, *et al.*, 2015). Alguns estudos têm demonstrado uma maior eficácia do FS associado a nanopartículas tanto em testes *in vitro* quanto em modelos *in vivo* (GANASSIN, 2016; RODRIGUES, 2018). De acordo com Muehlmann *et al* (2014), a associação de AlFtCl a nanopartículas poliméricas resultou em maior eficiência da TFD sobre células de câncer de mama. Dentre os diferentes tipos de nanopartículas, a nanoemulsão se destaca, pois é de fácil obtenção, produzida com componentes que geralmente são de baixo custo e se apresentam estáveis em meios

biológicos sob diferentes temperaturas e condições (PY-DANIEL, 2017, LONGO, 2009; RODRIGUES 2018). As nanoemulsões são sistemas coloidais com capacidade de encapsular, proteger e liberar componentes lipofílicos e têm sido utilizadas cada vez mais na indústria farmacéutica, alimentícia e cosmética (MCCLEMENTS, 2011, BORRIN, 2015). Em nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A), a parte interna, denominada fase dispersa, constitui um compartimento com diâmetros geralmente menores que 1000 nm, dimensionalmente restrito e hidrofóbico, onde podem ser mantidas moléculas apolares (BOUCHEMAL *et al.*, 2004; PRIMO; BENTLEY; TEDESCO, 2008).

Diante do exposto, a TFD tem-se demonstrado grande potencial para o tratamento de diversas doenças, dentre elas as causadas por fungos. Os HDACi também apresentam potencial terapêutico, tendo em vista que causaram a atenuação dos fatores de virulência de *C. neoformans*. Na literatura científica ainda não há relatos sobre a combinação dessas duas abordagens na biologia de *Cryptococcus* spp., o que justifica a realização desse trabalho.

## **2. OBJETIVO GERAL**

- Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica mediada por NE-AIFtCl e dos inibidores de histona desacetilase (NaBut e TSA), isolados ou em combinação, sobre o crescimento e viabilidade de células das linhagens H99 e T1 de *C. neoformans* e NIH198 de *C. gattii*.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar se o AIFtCl seria incorporado pelas células de *Cryptococcus*.
- Quantificar a incorporação celular de AIFtCl por células de levedura tratadas ou não com HDACi.
- Avaliar a proliferação das leveduras após TFD mediada por NE-AIFtCl, em combinação ou não a HDACi.
- Avaliar a viabilidade das células de levedura após TFD mediada por NE-AIFtCl, em combinação ou não a HDACi.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. PREPARAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS**

As nanoemulsões foram desenvolvidas no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília – UnB pelo Professor Doutor Luis Alexandre Muehlmann (MUEHLMANN *et al*, 2015). As nanoemulsões foram produzidas por emulsificação espontânea. Adicionou-se em um béquer o surfactante, o óleo e o FS, na sequência, adicionou-se água destilada. Em seguida, a mistura foi deixada sob agitação magnética branda a 60 °C por uma hora. Para a nanoemulsão contendo cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) foi utilizado Kolliphor EPL® como tensoativo e o óleo de rícino como solubilizante, na proporção de 3:1, respectivamente. A concentração de AlFtCl na nanoformulação final (NE-AlFtCl) foi de 40 µM. Também foi obtida, nas mesmas condições, nanoformulação sem AlFtCl (NE-B). As diferentes concentrações utilizadas das soluções de NE-AlFtCl foram preparadas em PBS imediatamente antes do uso.

##### **3.1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS**

A mensuração de parâmetros coloidais das nanoemulsões, especificamente o diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersão (PdI) e o potencial zeta, foi realizada com o equipamento ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcester-shire, UK) a 25 °C, no Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia da UnB. As amostras sempre foram diluídas em água tipo 1 (1:100, v:v) e a leitura realizada em triplicata.

### 3.1.2. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE NE-AIFtCl

A fim de verificar se as amostras das nanoemulsões (NE-AIFtCl) mantêm suas estabilidades sob a influência das diferentes temperaturas e em contato com a solução utilizada nos ensaios biológicos com cultivo de células, as amostras foram incubadas por 30 min nas condições de temperatura de 30 °C, com a solução utilizada, *phosphate buffered saline* (PBS). Em seguida, os parâmetros físicos (DH, PdI e Zp) foram mensurados como descritos no item 3.1.1. As amostras utilizadas neste experimento estavam armazenadas a 4 °C. O experimento foi realizado com amostras em triplicada.

### 3.2. LINHAGENS DE MICRO-ORGANISMOS

As leveduras de *Cryptococcus* utilizadas nesse trabalho foram: H99 e T1 de *C. neoformans* e NIH198 de *C. gattii* (Tabela 1). Tais linhagens foram gentilmente cedidas pelo Laboratório do Prof. Joseph Heitman, Departamento de Genética Molecular de Micro-organismos, Duke University Medical Center, Durham-NC, EUA.

**Tabela 1** - Linhagens celulares utilizadas para o estudo de terapia fotodinâmica

LINHAGENS	ESPÉCIES
H99	<i>C. neoformans</i> , empregada como referência em estudos de virulência
T1	<i>C. neoformans</i> , linhagem resistente a fluconazol
NIH198	<i>Cryptococcus gattii</i>

### **3.3. PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO E FÁRMACOS**

As células de *Cryptococcus* foram cultivadas em meio Extrato de levedura-Peptona-Dextrose (YPD) líquido (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose, pH 5,6) a 70 rpm; ou em meio YPD sólido (com adição de 1,8% de ágar). Estoques das linhagens foram mantidos em YPD 35% de glicerol a -80 °C.

O meio de cultura utilizado nos ensaios de densidade celular e de viabilidade celular foi RPMI 1610, preparado para um volume de 500 mL (2x), tamponado com MOPS, pH ajustado para 5,6, em seguida filtrado em 0,45 µM, armazenado em garrafas de vidro e mantido em 4-8 °C.

O butirato de sódio (Cayman Chemical Company) foi preparado em água destilada na concentração de 500 mM e filtrado em 0,22 µM. Alíquotas foram estocadas a 4-8 °C.

A tricostatina A (Sigma Aldrich) solubilizada em DMSO na concentração de 5 mM foi mantida em -20 °C e imediatamente antes do uso, foi descongelada e diluída.

### **3.4. INÓCULO E SEMEADURA DAS LEVEDURAS**

As leveduras foram descongeladas e semeadas em placas Petri contendo YPD sólido para crescimento por 72 h a 30 °C, em seguida armazenadas em 4-8 °C por no máximo 15 dias. Colônias isoladas foram semeadas em 5 mL de YPD líquido com ou sem HDACi em uma concentração final de 10 mM para NaBut e 10 µM para TSA (concentrações definidas por Brandão *et al.*, 2015), a 70 rpm a 30 °C por 24 h. Após o crescimento, as leveduras foram centrifugadas por 5 min, 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com mesmo volume de PBS, procedimento

repetido 1X a fim de se remover resquícios de YPD e de NaBut ou TSA. Em seguida, foi feita diluição 1:100 da suspensão celular, 10 µL foram retirados e a contagem celular ocorreu em hemocitômetro.

### **3.5. DETECÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE AlFtCl PELAS CÉLULAS DE LEVEDURA**

#### **3.5.1. QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA**

As leveduras de cada linhagem foram ajustadas a uma concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL e em seguida foram expostas a NE-AlFtCl 300 nM e incubadas a 30 °C por diferentes períodos de tempo (15, 30, 60, 120 e 240 min). Após cada um desses períodos de exposição, as células foram centrifugadas, e lavadas duas vezes com PBS. Ao sedimento foram adicionados 300 µL de DMSO seguindo-se 30 min de agitação em vórtex, no escuro. Cem µL de cada solução foram então transferidos para placa 96 poços para leitura em espectrofotômetro de fluorescência com excitação de 370 nm e emissão de 680 nm (Xpectramax, USA). A intensidade de fluorescência da NE-AlFtCl diluída em DMSO na concentração final de 300 nM foi considerada como 100% para fins de normalização. Células não expostas à NE-AlFtCl foram utilizadas como branco, cujo valor de fluorescência foi subtraído do valor obtido das demais leituras.

#### **3.5.2. MICROSCOPIA CONFOCAL**

A microscopia confocal foi utilizada na tentativa de se determinar o compartimento celular no qual o AlFtCl estava presente. Cinquenta µL da suspensão de

células ( $5 \times 10^7$  células/mL) e 50  $\mu$ L da NE-AIFtCl (em concentração de 900 nM) foram homogeneizado em microtubos de polipropileno, incubados por 30 min a 30 °C e mantidos no escuro. A seguir, a amostra foi centrifugada (13000 rpm, 5 min) e lavada com PBS duas vezes para retirada do fotossensibilizante não incorporado. Em seguida, montou-se as lâminas que foram observadas ao microscópio confocal (LEICA, SP5, BRA).

### **3.6. APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA**

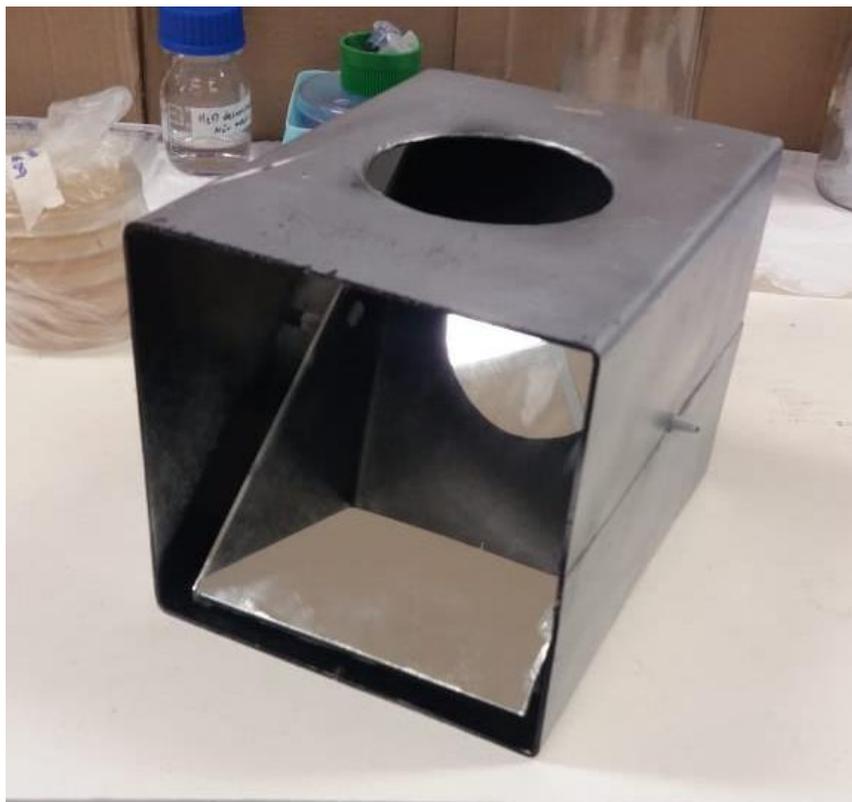
Nesse experimento,  $1 \times 10^5$  células/mL foram expostas a diferentes concentrações de NE-AIFtCl (0,02; 0,06; 2,00; 5,00; 10,00; 20,00; 40,00; 80,00; 300,00 nM), incubadas por 30 min a 30 °C, sob agitação de 70 rpm no escuro. Realizou-se duas lavagens em PBS. Em microplacas de 96 poços, foram colocados 100  $\mu$ L da solução de células em PBS e realizada a exposição a luz. As células foram irradiadas com um equipamento LED 660 nm por 30 min, atingindo-se a densidade de 107 J/cm<sup>2</sup>. O equipamento de LED, desenvolvido pelo Prof. Dr. Paulo Eduardo Narciso de Souza e colaboradores (Laboratório de Softwares e Instrumentação do Instituto de Física da Universidade de Brasília, DF), propicia iluminação em comprimento de onda específico de 660 nm e permite a configuração da fluência, tempo e distância da exposição. Após a irradiação, 100  $\mu$ L de meio YPD líquido ou RPMI foram adicionados e as células incubadas a 30 °C, em períodos de tempo variáveis, de acordo com o experimento.

#### **3.6.1. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR**

As leveduras após irradiação ou não (seção 3.4), foram mantidas em meio RPMI, 30 °C, sob agitação e no escuro. A proliferação celular foi verificada por densidade óptica, com o uso de um espectrofotômetro (EON Microplate, Biotek Inc, USA), em comprimento de onda de 600 nm após 24 h de crescimento. Os valores de densidade óptica de cada linhagem, tratada ou controle, foram subtraídos da leitura inicial, no tempo zero. Esse ensaio foi realizado em três experimentos independentes, cada um com triplicata técnica.

### **3.6.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MEIO DE SEMEADURA APÓS DILUIÇÃO SERIADA**

Cinco  $\mu\text{L}$  de células tratadas ou não com terapia fotodinâmica foram semeadas em YPD sólido, em diluição seriada (5000, 500, 50 e 5 células). As células foram então incubadas a temperatura de 30 °C e fotografadas em uma câmara (Fig. 5) a cada 24 h. Todos os testes foram realizados em três experimentos independentes.



**Figura 5** - Imagem da câmara para obtenção de imagens da placa Petri.

### **3.6.3. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL POR MEIO DO ENSAIO DE MTT**

A viabilidade das células foi avaliada ainda por meio do ensaio de redução do sal de tetrazólio, como descrito por MOSMANN (1983).

Vinte e quatro h após a aplicação da TFD (seção 3.4.), adicionou-se 22  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (0,5 mg/mL). As células foram então incubadas a 30 °C por 4 h. Seguiu-se a remoção da solução de MTT e a adição de 200  $\mu\text{L}$  de DMSO (Sigma-Aldrich Co., EUA) para a solubilização dos cristais de formazan. A formação desse composto foi quantificada em espectrofotômetro (Bio-Rad, model 3550-UV, USA) no comprimento de onda de 595 nm. Todos os testes foram realizados em três experimentos independentes, cada um em triplicata técnica.

### 3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

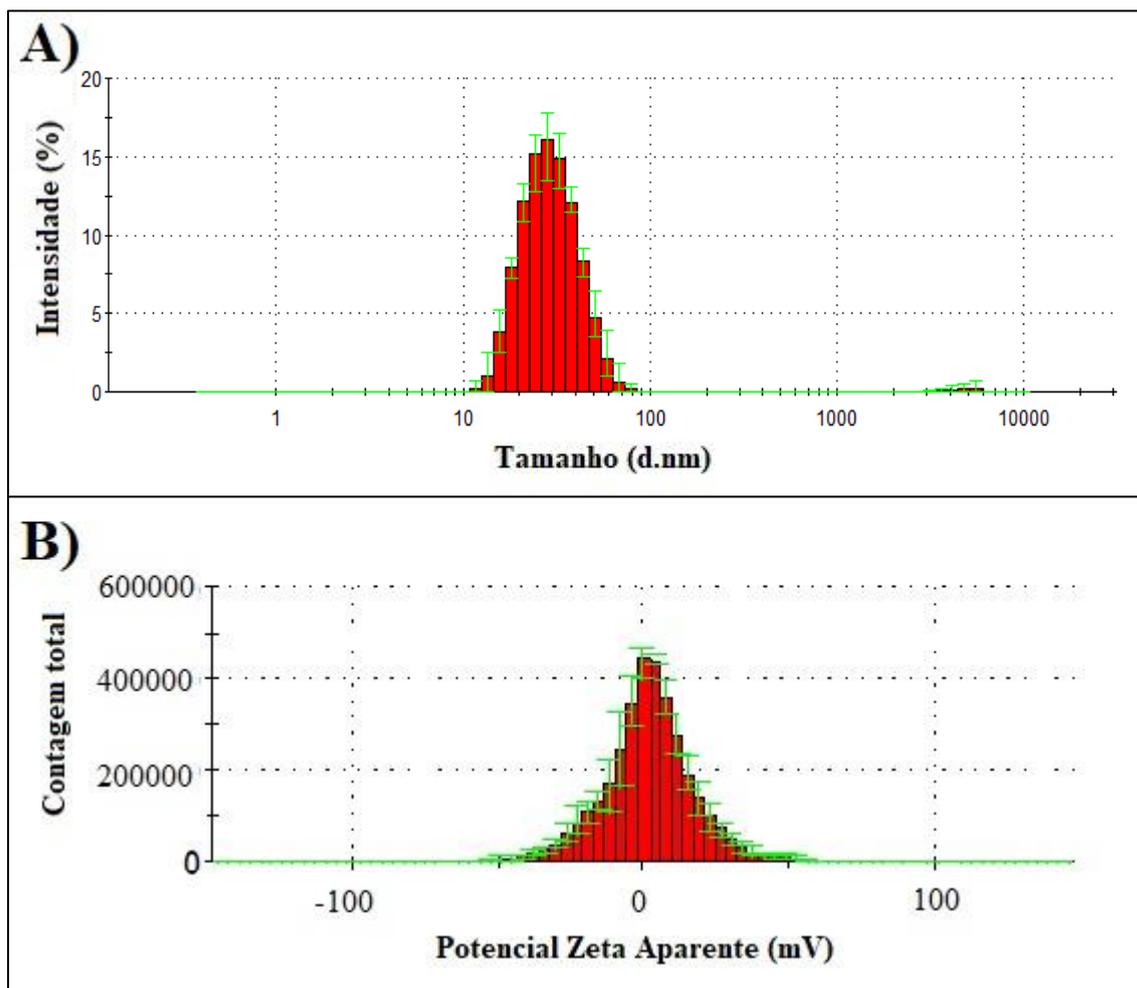
Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e avaliados estatisticamente: para dados quantitativos normais foi utilizada a análise de variância (ANOVA two-way), seguida de pós-teste de Tukey e para dados não normais foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Para a análise estatística entre pares de colunas, foi realizado o teste t-*student*. Para todas as análises, o nível de significância ( $\alpha$ ) utilizado foi de 0,05. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados com o *software* GraphPad Prism 6.0 (Califórnia, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

Após o preparo da nanoformulação, foram verificadas as características coloidais, especificamente o diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta (Zp).

As nanogotículas da NE-AlFtCl apresentaram o DH médio de  $27,15 \text{ nm} \pm 1,070$ , o PdI de  $0,178 \pm 0,026$  e potencial zeta de  $-0,340 \pm 0,188$  (Fig. 6), o que significa que há uma distribuição homogênea do DH das nanogotículas, mostrando que elas são monodispersas, e que possuem uma carga superficial desprezível, indicando que estas nanoestruturas possuem superfície praticamente neutra. Observou-se, ainda, que as propriedades físicas das nanoemulsões contendo AlFtCl não sofreram alterações substanciais pelas condições utilizadas nos tratamentos ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , diluição em PBS). Tais características estão de acordo com as descritas por (MUEHLMANN *et al.*, (2015).



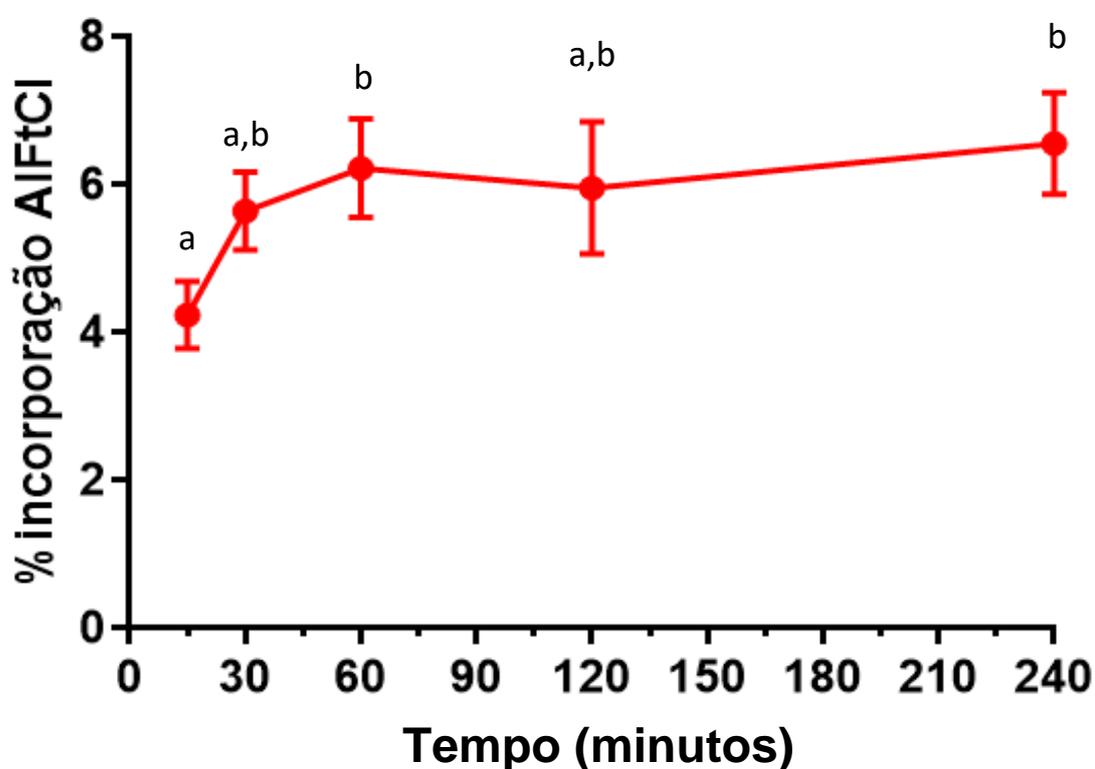
**Figura 6** - Caracterização do tamanho e carga superficial das nanopartículas contendo cloreto de alumínio ftalocianina (NE-AIFtCl), dispersas em meio aquoso. Sendo, (A) tamanho hidrodinâmico; (B) potencial zeta. Onde, (nm) nanômetro; (mV) milivolts.

## 4.2. INCORPORAÇÃO DE AIFtCl

### 4.2.1. LINHAGEM H99 DE *C. neoformans*

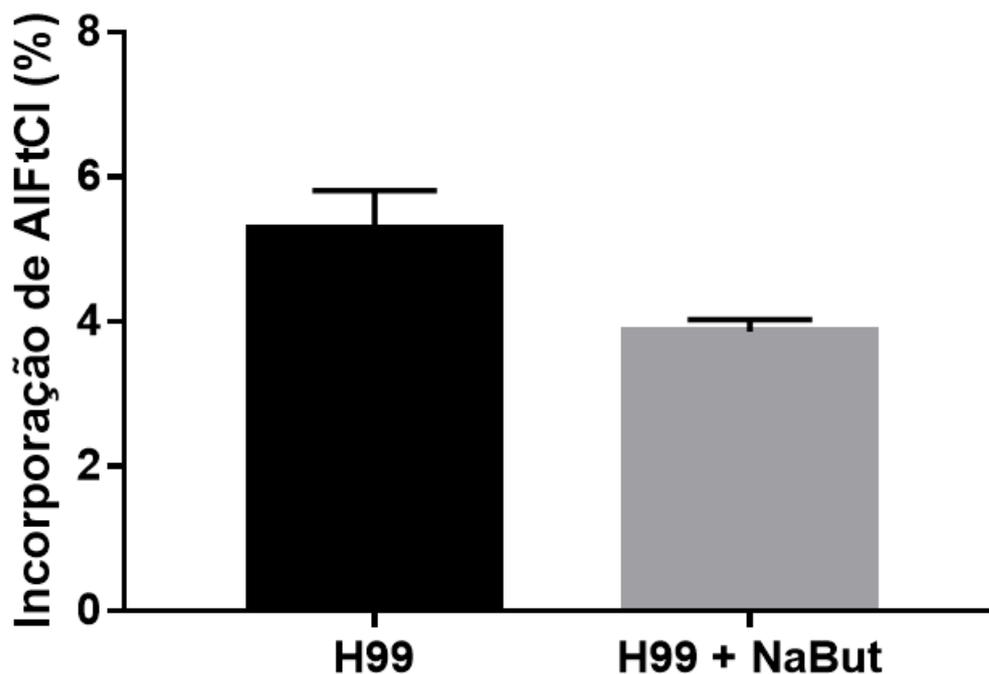
Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar se o AIFtCl é incorporada pelas células H99. Foi observada uma rápida internalização do AIFtCl pelas leveduras após 15 min de exposição a 300 nM de NE-AIFtCl. A fluorescência manteve-se estável ao longo do tempo: 30, 60, 120 e 240 min (Fig. 7). Não foi observada

fluorescência significativa ( $p < 0,01$ ) nas células de H99 não expostas a NE-AIFtCl. A intensidade de fluorescência não diferiu entre os tempos de 15 e 30 min, assim como entre 30 e 60 min. Observou-se diferença significativa na fluorescência ( $p < 0,05$ ) entre os tempos de 15 e 60 min. Assim, o tempo de exposição dos fungos à formulação foi padronizado em 30 min para os experimentos subsequentes. Nesse período, a quantidade média de AIFtCl incorporada foi de 5,29%.



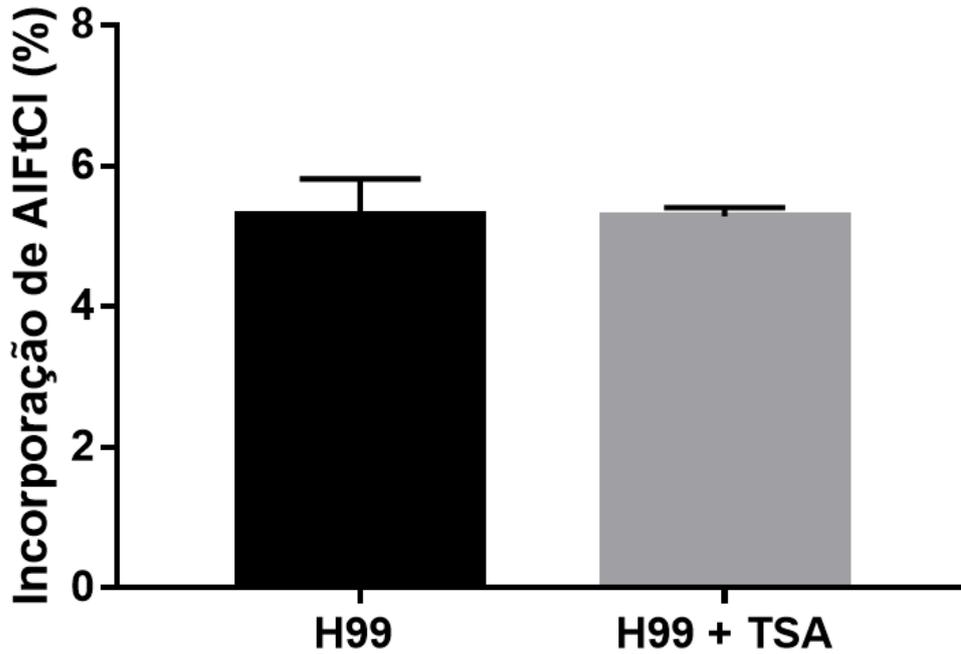
**Figura 7** - Incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio (AIFtCl) por *C. neoformans* H99 expostas à cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão por diferentes tempos. Letras iguais correspondem a grupos sem diferença estatística. Dados plotados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para triplicatas.

Não houve diferença significativa na incorporação de AIFtCl entre leveduras não tratadas e tratadas com NaBut 10 mM, no tempo de 30 min (Fig. 8).



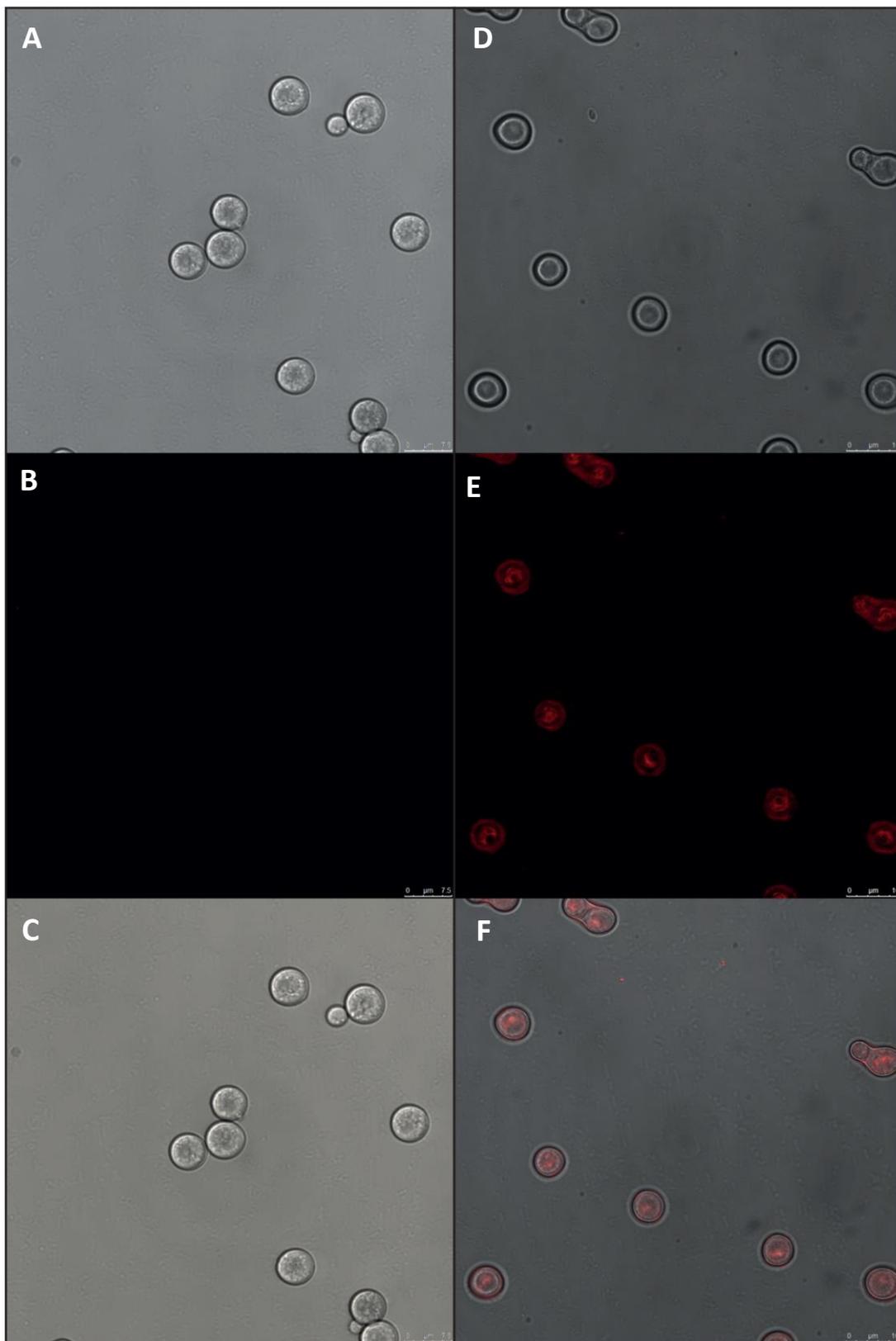
**Figura 8** - Porcentagem de incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio por leveduras de *C. neoformans* H99 tratadas com butirato de sódio (NaBut). Leveduras expostas a cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AlFtCl) na concentração de 300 nM por 30 min. Dados plotados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para triplicatas.

A percentagem de incorporação de AlFtCl foi semelhante entre leveduras não tratadas (5,29 %) e tratadas com TSA 10  $\mu$ M (5,28 %), como se pode observar na Fig. 9.



**Figura 9** - Porcentagem de incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) por leveduras de *C. neoformans* H99 tratadas com tricostatina A (TSA). Leveduras expostas a cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AlFtCl) na concentração de 300 nM por 30 min. Dados plotados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para triplicatas.

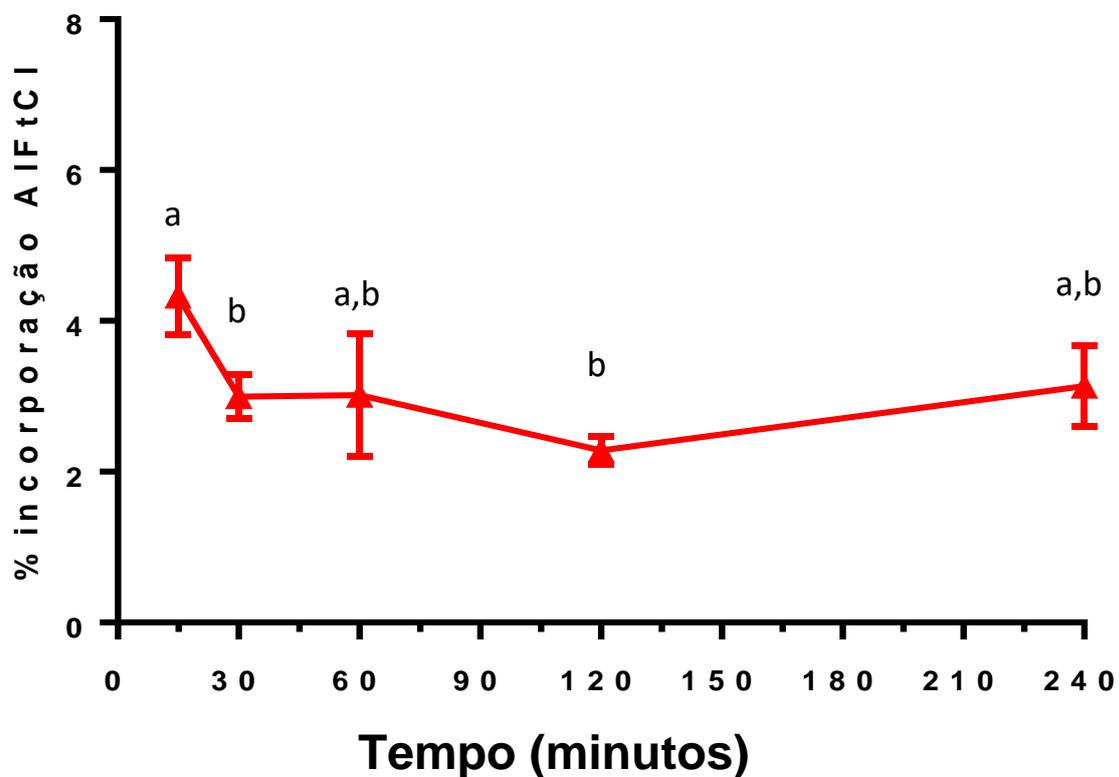
Em seguida, detectou-se a presença do AlFtCl nas células por microscopia confocal. Com esse experimento demonstrou-se a incorporação e o padrão disperso para a distribuição de AlFtCl no interior das células de *C. neoformans* H99 (Fig. 10).



**Figura 10** - Imagem de microscopia confocal de células de *C. neoformans* H99 após incorporação do cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl). Na coluna da esquerda células não expostas a cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (controle negativo). Na coluna da direita, células expostas a cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão. (A) e (D) correspondem a imagens de campo claro. (B) e (E) representam as imagens confocais. (C) e (F), a sobreposição das imagens.

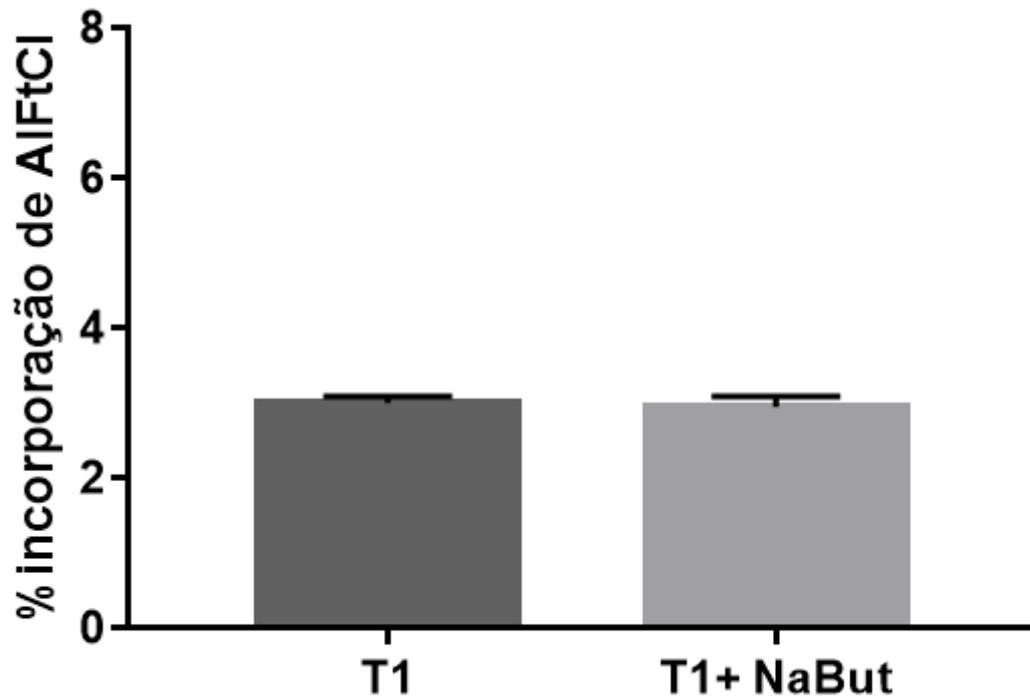
#### **4.2.2. LINHAGEM T1 DE *C. neoformans***

Observou-se uma rápida internalização do AlFtCl pelas leveduras de *C. neoformans* T1 em 15 min de exposição a 300 nM de NE-AlFtCl, seguida de redução da intensidade de fluorescência nos tempos seguintes. A fluorescência manteve-se estável entre os períodos de 30, 60, 120 e 240 min, sem diferença estatística entre esses (Fig. 11). Não foi observada fluorescência para as células de não expostas a NE-AlFtCl. Como parâmetro para os experimentos seguintes, utilizou-se então o tempo de 30 min de exposição à formulação de NE-AlFtCl, correspondente a uma fluorescência incorporada de 3,02%.



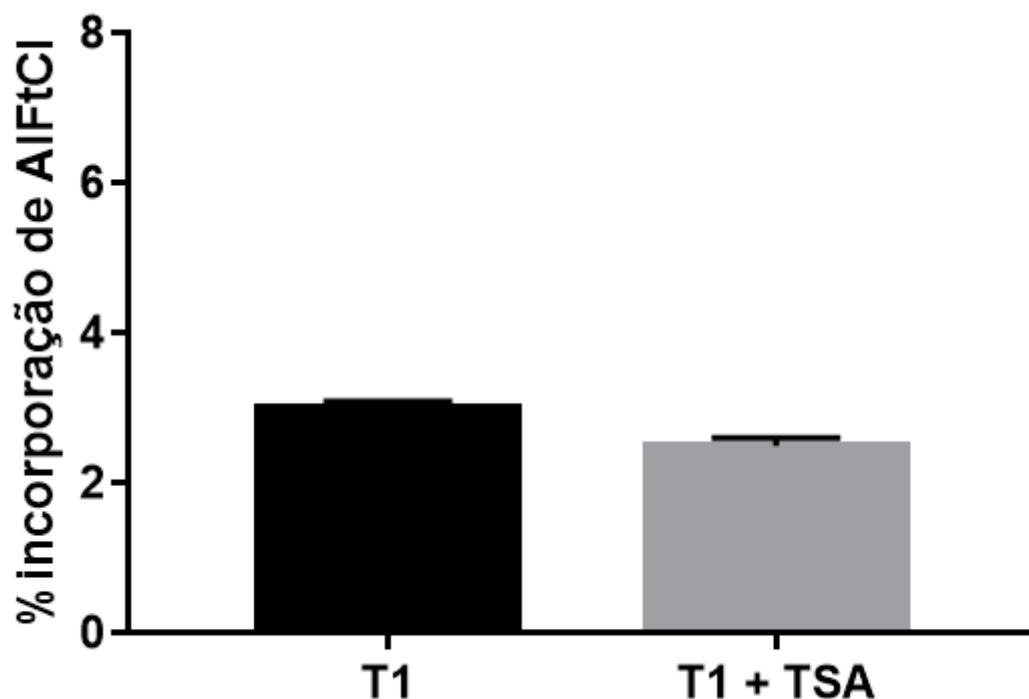
**Figura 11** - Incorporação de cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl) pela linhagem T1 de *C. neoformans* em diferentes tempos de incubação. Letras iguais correspondem a grupos sem diferença estatística. Dados plotados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para triplicatas.

Não houve diferença significativa na incorporação de AlFtCl, em relação ao controle, quando as leveduras foram tratadas com NaBut 10 mM previamente à incubação por 30 min (Fig. 12).



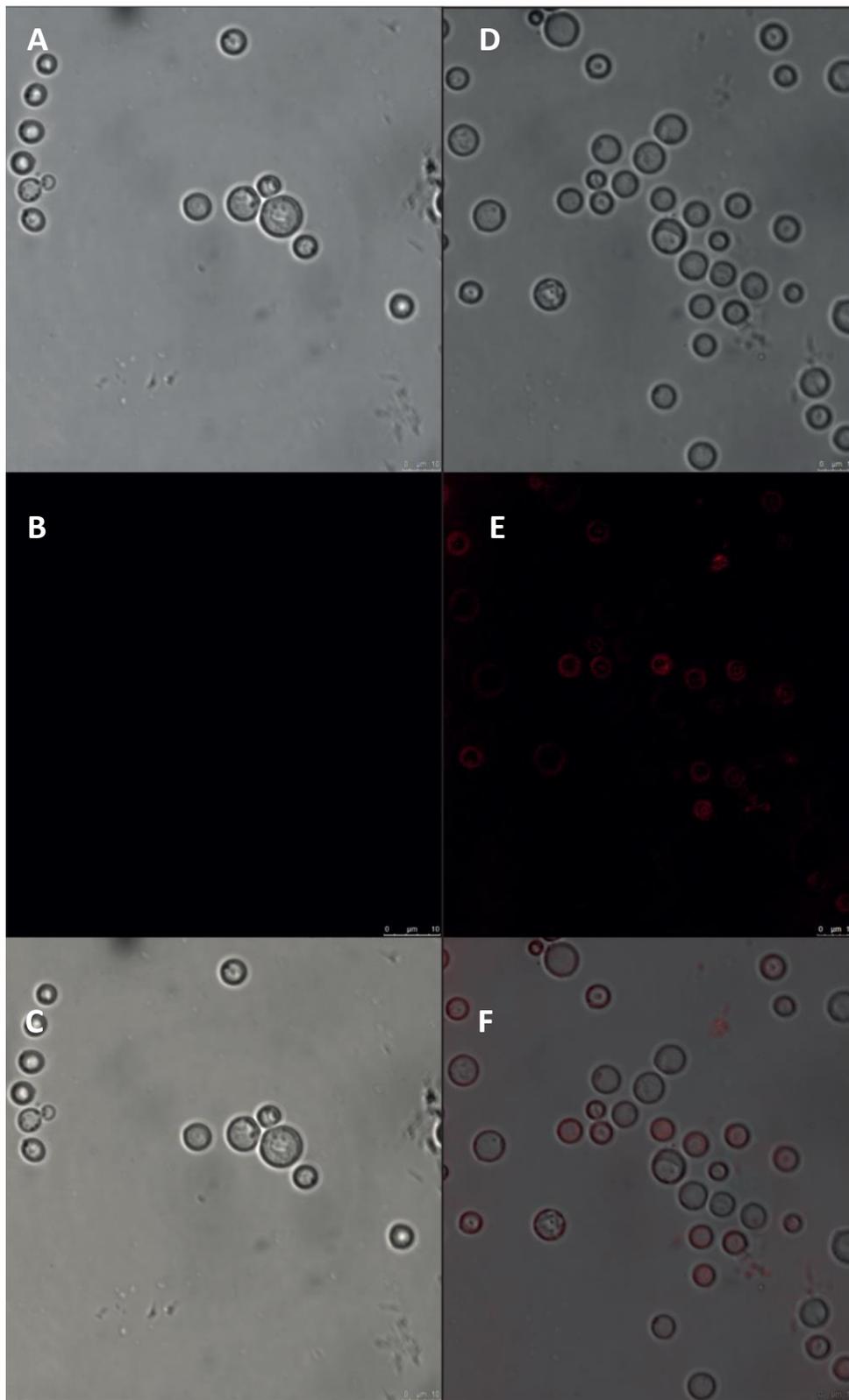
**Figura 12** - Porcentagem de incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio por leveduras de *C. neoformans* T1 tratadas com butirato de sódio 10 mM (NaBut). As leveduras foram expostas a cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AlFtCl) na concentração de 300 nM por 30 min. Dados plotados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para triplicatas.

A porcentagem de incorporação de AlFtCl também foi semelhante entre leveduras não tratadas (3,09 %) e tratadas com TSA 10  $\mu$ M (2,58 %), como se pode observar na Fig. 13.



**Figura 113** - Porcentagem de incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio por leveduras de *C. neoformans* T1 tratadas com tricostatina A (TSA) 10  $\mu$ M. As leveduras foram expostas a cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AlFtCl) na concentração de 300 nM por 30 min. Dados plotados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para triplicatas.

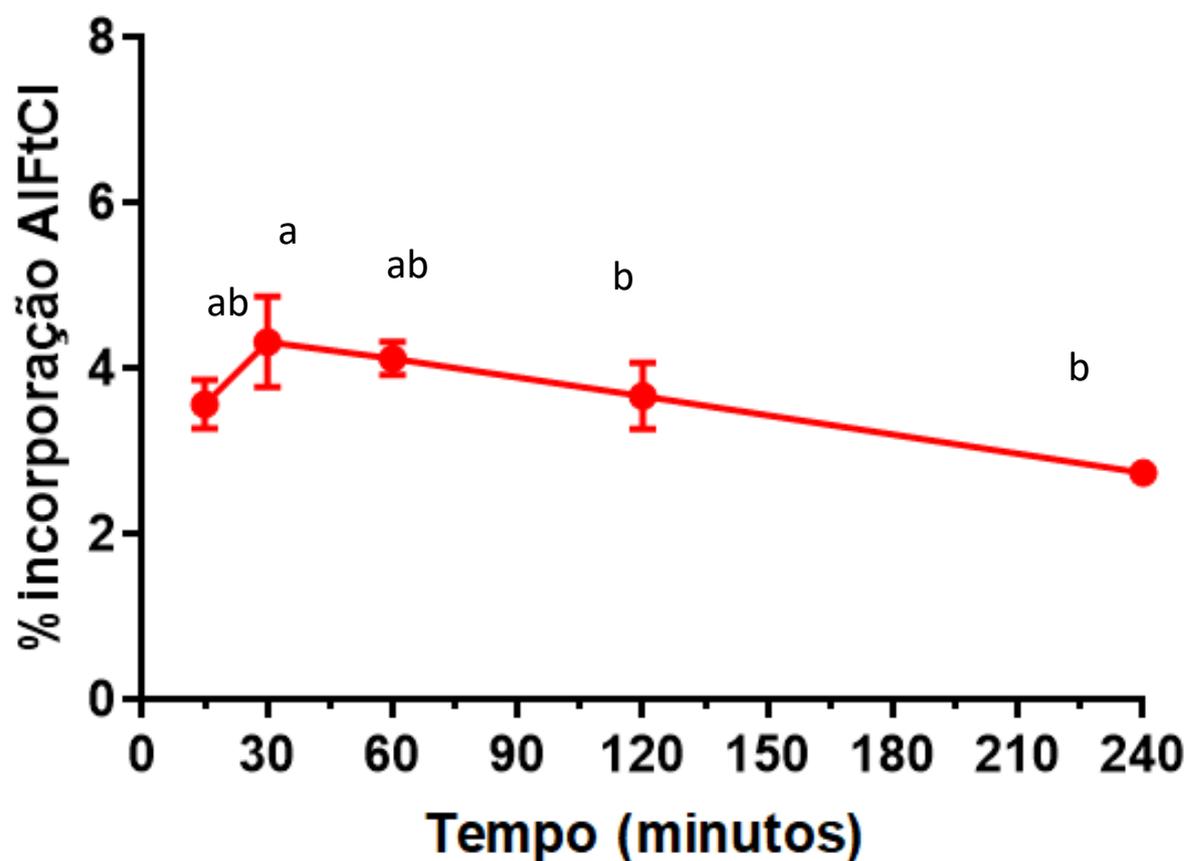
A presença do AlFtCl restrita à periferia das células de *C. neoformans* T1 foi demonstrada por microscopia confocal, como ilustrado na Fig. 14.



**Figura 1412** - Imagem de microscopia confocal de células de *C. neoformans* T1 após incorporação do cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl). Na coluna da esquerda células não expostas a cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (controle negativo). Na coluna da direita, células expostas a cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão. (A) e (D) correspondem a imagens de campo claro. (B) e (E) representam as imagens confocais. (C) e (F), a sobreposição das imagens.

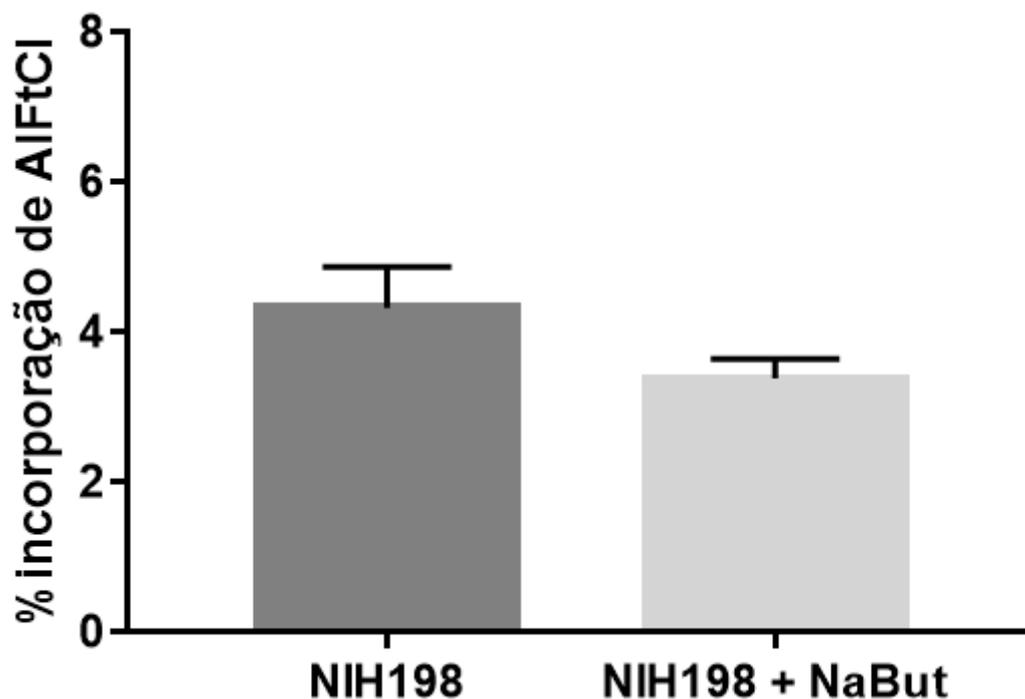
#### **4.2.3. LINHAGEM NIH198 DE *C. gattii***

Observou-se uma rápida internalização do AlFtCl pelas leveduras de *C. gattii* NIH198 após 15 min de exposição a 300 nM de NE-AlFtCl (Fig. 15). Não foi observada fluorescência significativa ( $p < 0,01$ ) nas células de NIH198 não expostas a NE-AlFtCl. Observou-se uma maior intensidade de fluorescência no tempo de 30 min e, apenas nos tempos de 120 e 240 min, foi observada uma internalização significativamente menor ( $p < 0,05$ ). No tempo de 30 min de exposição, a quantidade de AlFtCl incorporada alcançou 4,3% do total ao qual as células foram expostas.



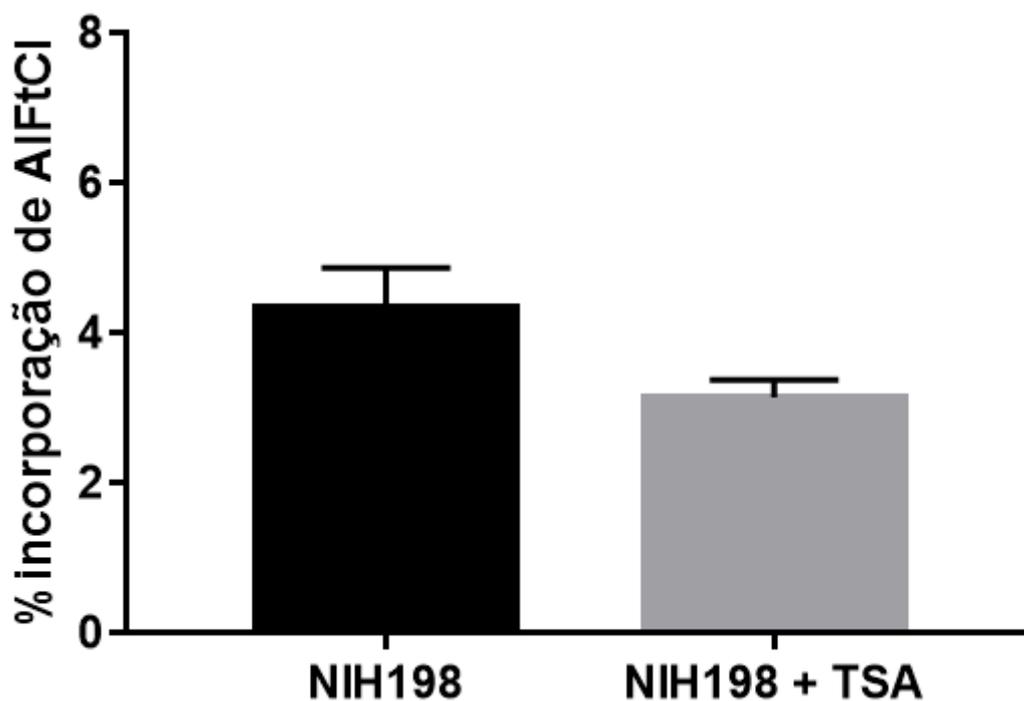
**Figura 15** - Intensidade de fluorescência de cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) em leveduras de *C. gattii* NIH198 com cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão. Letras iguais correspondem a grupos sem diferença estatística. Dados plotados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para triplicatas.

Não houve diferença significativa na incorporação de AlFtCl entre leveduras não tratadas e tratadas com NaBut 10 mM, no tempo de 30 min (Fig. 16).



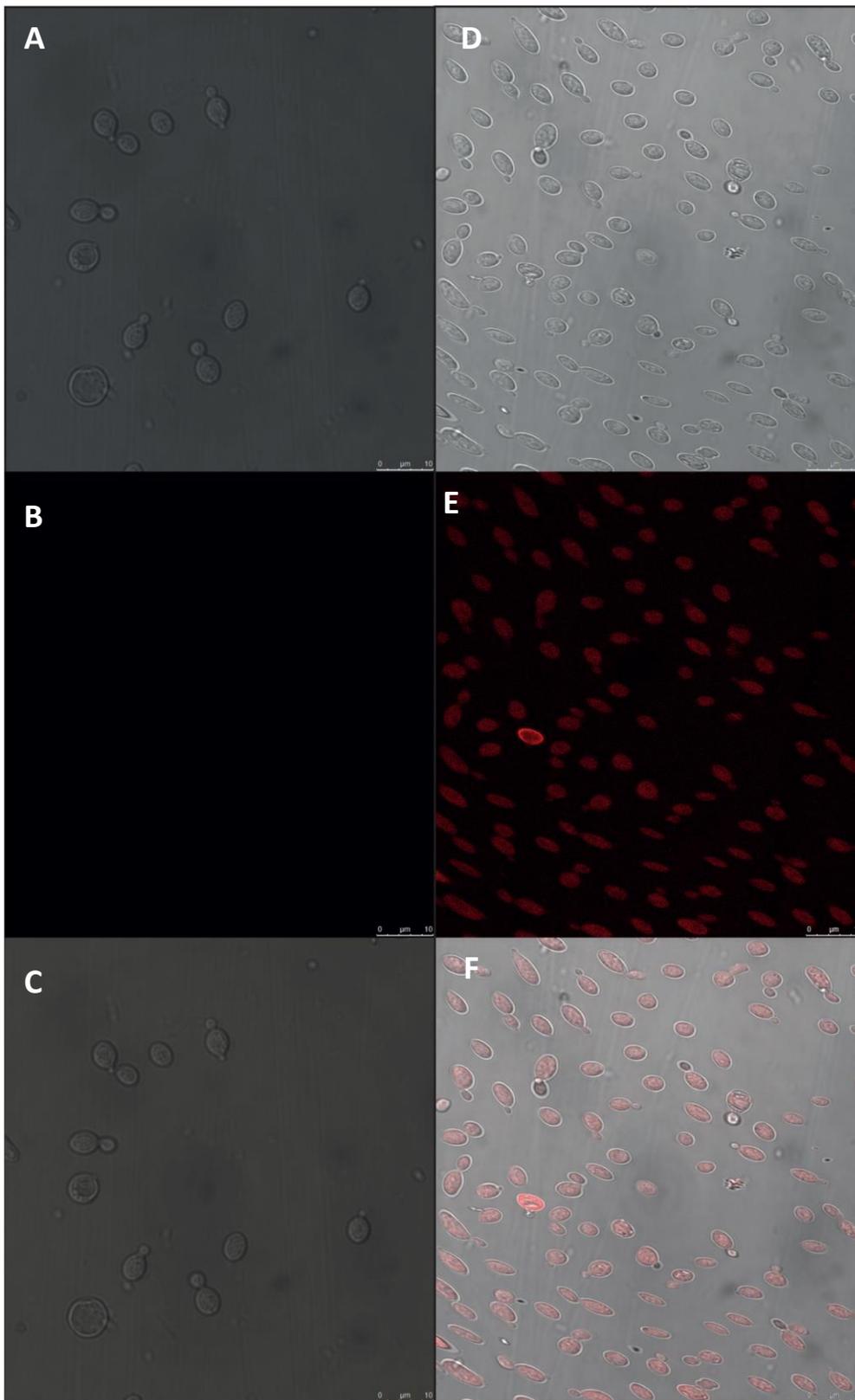
**Figura 16** - Porcentagem de incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio (AlFtCl) por leveduras de *C. gattii* NIH198 tratadas com butirato de sódio (NaBut). Leveduras expostas a cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AlFtCl) na concentração de 300 nM por 30 min. Dados plotados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para triplicatas.

A porcentagem de incorporação de AlFtCl foi semelhante entre leveduras não tratadas (4,3 %) e tratadas com TSA 10  $\mu$ M (3,3 %), como se pode observar na Fig. 17.



**Figura 1713** - Porcentagem de incorporação de cloreto de ftalocianina de alumínio por leveduras de *C. gattii* NIH198 tratadas com tricostatina A (TSA). Leveduras expostas a cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AlFtCl) na concentração de 300 nM por 30 min. Dados plotados como  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para triplicatas.

Em seguida, detectou-se a presença do AlFtCl nas células por microscopia confocal. Com esse experimento, demonstrou-se a incorporação e a distribuição de AlFtCl de forma dispersa no interior das células de *C. gattii* NIH198 (Fig. 18).

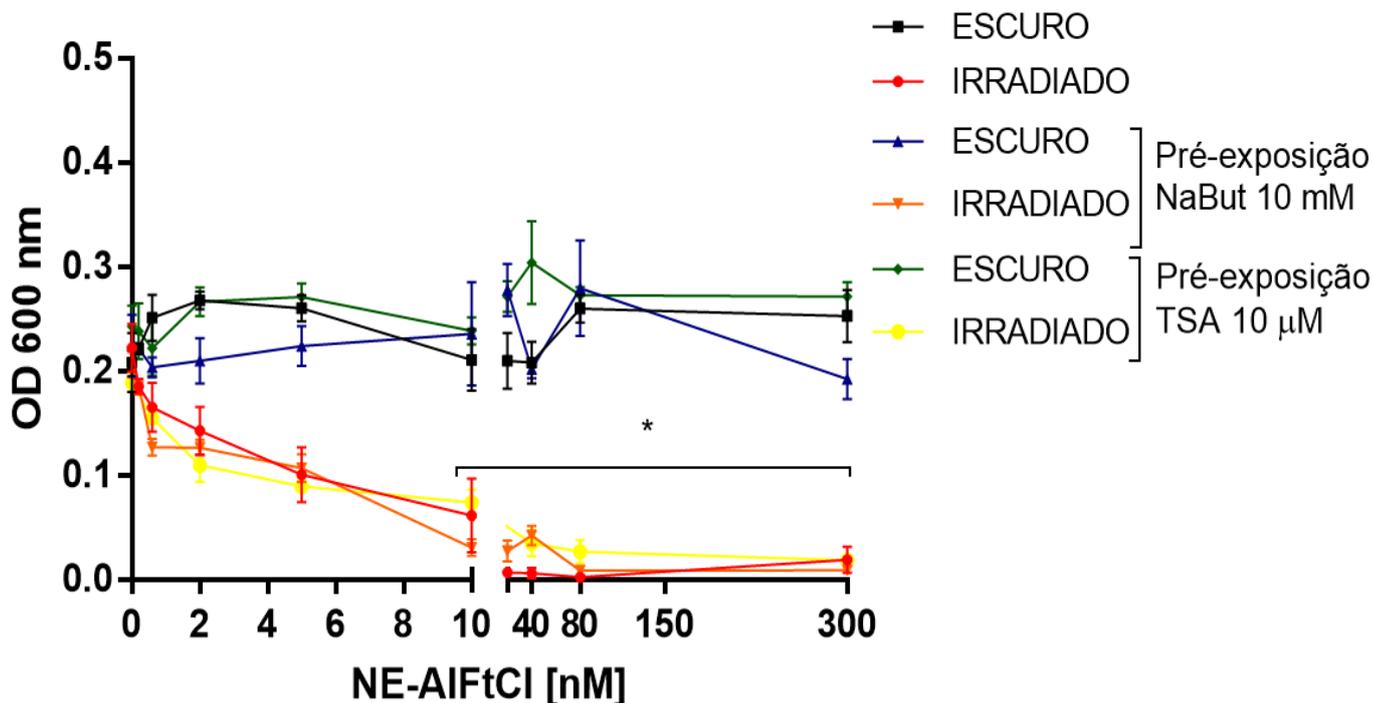


**Figura 1814** - Imagem de microscopia confocal de células de *C. gattii* NIH198 após incorporação do cloreto de ftalocianina de alumínio (AlPcCl). Na coluna da esquerda células não expostas a cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (controle negativo). Na coluna da direita, células expostas a cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão. (A) e (D) correspondem a imagens de campo claro. (B) e (E) representam as imagens confocais. (C) e (F), a sobreposição das imagens.

### 4.3. ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

#### 4.3.1. LINHAGEM H99 DE *C. neoformans*

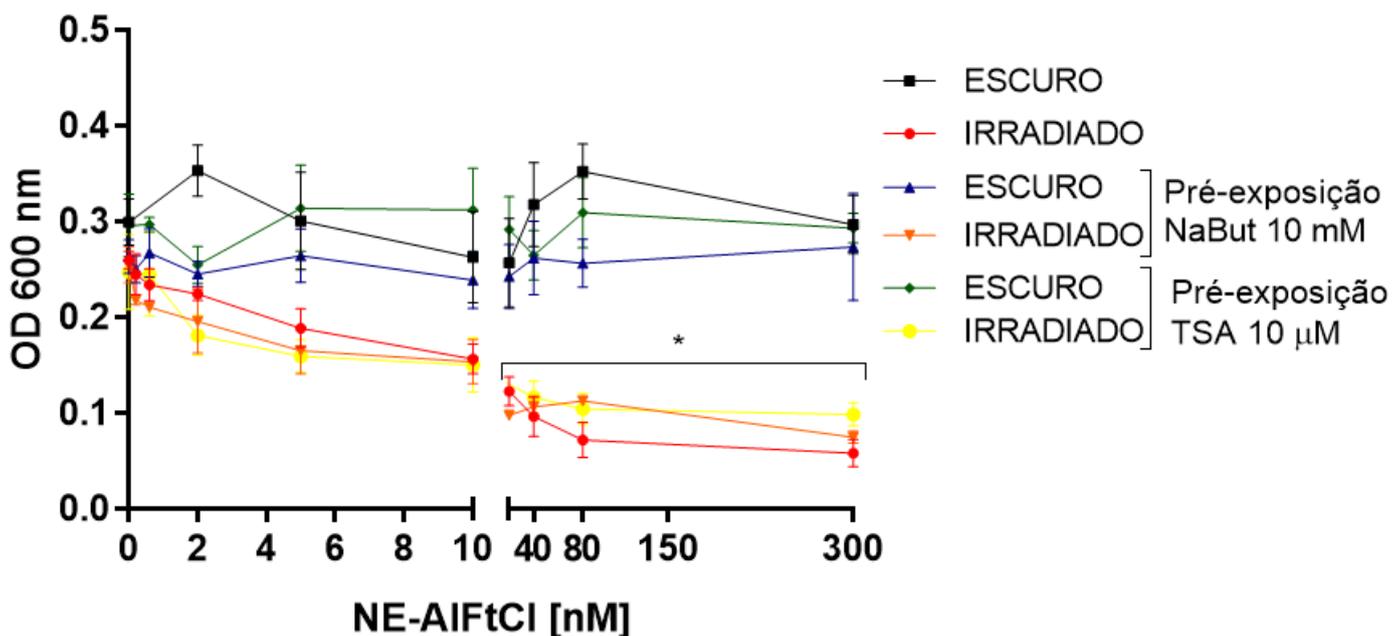
Foi avaliada a proliferação de leveduras de *C. neoformans* H99 tratadas ou não com NaBut, ou TSA, e submetidas à TFD com NE-AIFtCl (Fig. 19). Foi possível avaliar o efeito fotodinâmico após 24 h de cultivo das células em concentrações de AIFtCl superiores a 10 nM. As células expostas a NE-AIFtCl 10 nM reduziu significativamente o crescimento de *C. neoformans* foi reduzido significativamente ( $p < 0,01$ ) quando as células foram expostas a tais concentrações e irradiadas em relação às células não expostas ao FS e mantidas no escuro. Observou-se um efeito concentração-dependente para o FS fotoativado na inibição da proliferação celular. Não houve efeito quando as células foram expostas à NE-AIFtCl mas não foram irradiadas, o que indica o efeito fotodinâmico dessa formulação. Efeitos similares foram observados quando as leveduras foram tratadas com HDACi previamente à TFD. Não houve efeito aditivo entre o tratamento com HDACi e a TFD.



**Figura 1915** - Efeito da terapia fotodinâmica (TFD) mediada por diferentes concentrações de cloreto de alumínio ftalocianina em nanoemulsão (NE-AIFtCl) sobre o crescimento, em RPMI líquido, de *C. neoformans* H99 previamente tratado com butirato de sódio (NaBut) ou com tricostatina A (TSA). O eixo Y indica o valor da absorbância em 24 horas após a irradiação. O eixo X representa as diferentes concentrações de NE-AIFtCl em nM. (\*) <math>< 0,01</math>, correspondendo à significância estatística em relação ao controle (0nM NE-AIFtCl - Escuro), determinado pelo teste ANOVA em duas vias e múltiplas comparações pelo teste de Tukey.

#### 4.3.2. LINHAGEM T1 DE *C. neoformans*

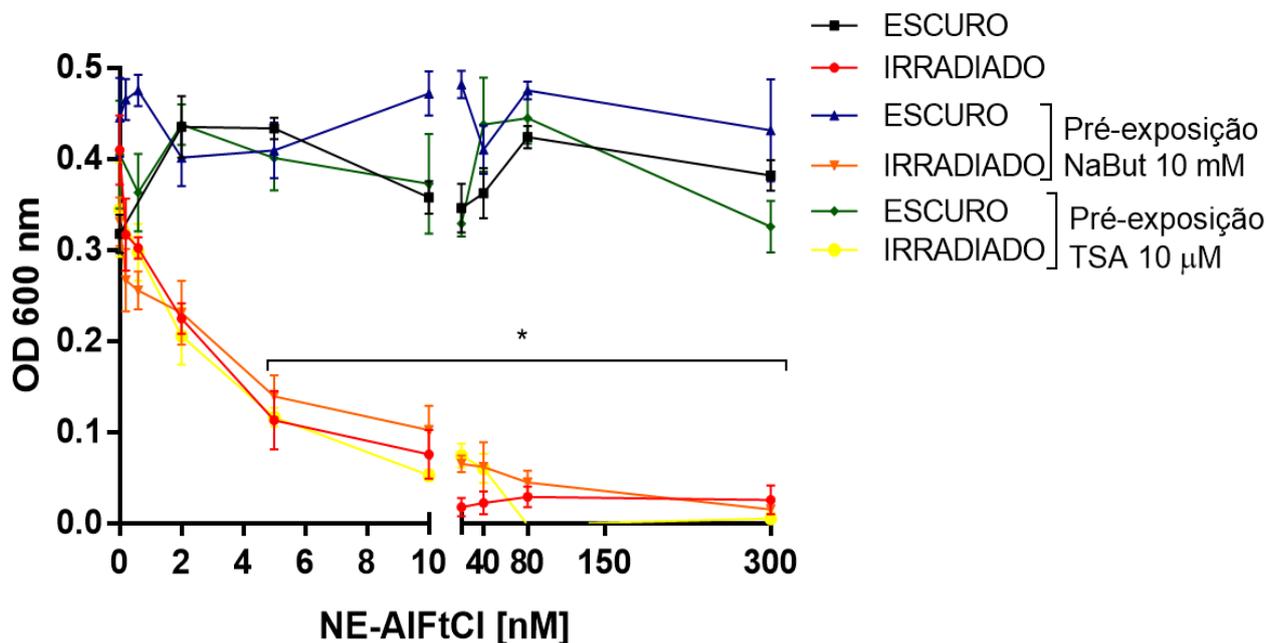
Também foi avaliada a proliferação de leveduras de *C. neoformans* T1 tratadas ou não com NaBut ou TSA e submetidas à TFD com NE-AIFtCl. O efeito fotodinâmico foi verificado após 24 h de cultivo das células em concentrações a partir de 20 nM de AIFtCl e o pré-tratamento com HDACi não exerceu influência sobre essa resposta (Fig. 20). Um efeito inibitório concentração-dependente foi detectado para a proliferação de células incubadas com NE-AIFtCl e irradiadas, em comparação aos controles.



**Figura 16** - Efeito da terapia fotodinâmica (TFD) mediada por diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl) sobre o crescimento, em RPMI líquido, de *C. neoformans* T1 previamente tratado com butirato de sódio 10 mM (NaBut) ou com tricostatina A 10 μM (TSA). O eixo Y indica o valor da absorbância 24 horas após a irradiação. O eixo X representa as diferentes concentrações de NE-AIFtCl em nM. (\*) <0,01 corresponde à significância estatística em relação ao controle (0 nM NE-AIFtCl - Escuro), determinada pelo teste ANOVA em duas vias e múltiplas comparações pelo teste de Tukey.

#### 4.3.3. LINHAGEM NIH198 DE *C. gattii*

A de proliferação de leveduras *C. gattii* NIH198 tratadas ou não com NaBut ou TSA e submetidas à TFD com NE-AIFtCl foi avaliada. O efeito fotodinâmico foi verificado após 24 h de cultivo das células em concentrações a partir de 5 nM de AIFtCl e o pré-tratamento com HDACi não exerceu influência sobre essa resposta (Fig. 21). Um efeito inibitório concentração-dependente foi detectado para a proliferação de células incubadas com NE-AIFtCl e irradiadas, em comparação aos controles.



**Figura 21** - Efeito da terapia fotodinâmica (TFD) mediada por diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl) sobre o crescimento, em RPMI líquido, de *C. gattii* NIH198 previamente tratado com butirato de sódio (NaBut) ou com tricostatina A (TSA). O eixo Y indica o valor da absorbância em 24 h após a irradiação. O eixo X representa as diferentes concentrações de NE-AIFtCl em nM. (\*) <math>< 0,01</math> correspondendo à significância estatística em relação ao controle (0nM NE-AIFtCl - Escuro), determinado pelo teste ANOVA em duas vias e múltiplas comparações pelo teste de Tukey.

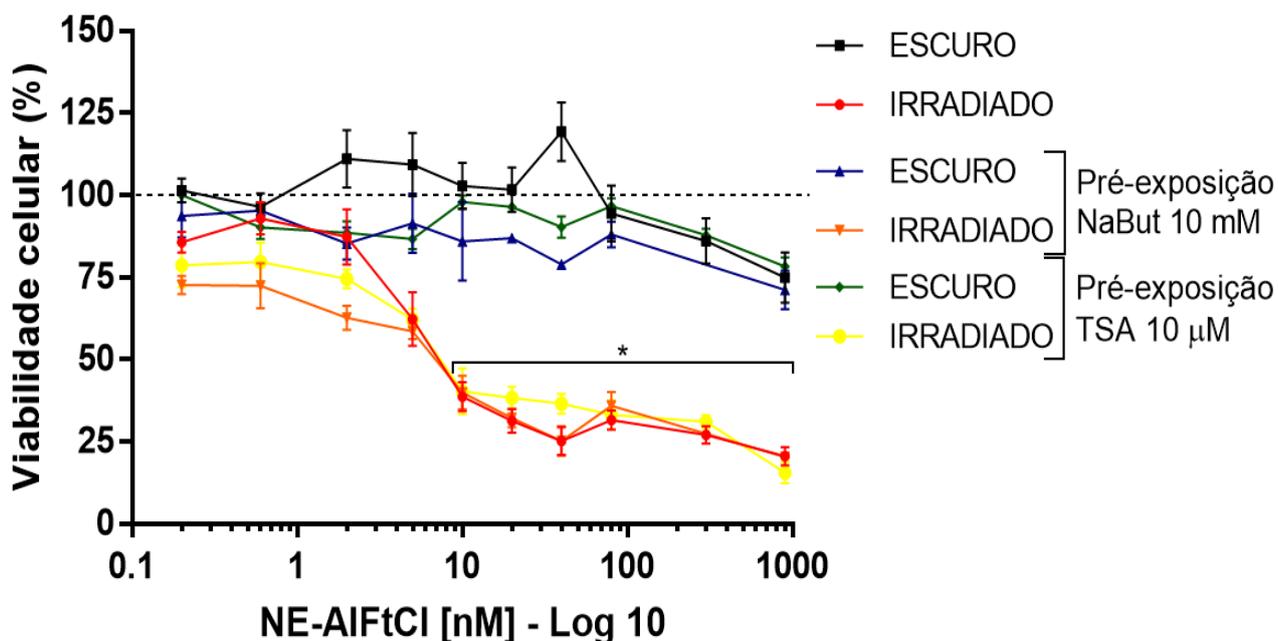
#### 4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL POR MEIO DO ENSAIO DE MTT.

##### 4.4.1. LINHAGEM H99 DE *C. neoformans*

Leveduras previamente tratadas com HDACi, e incubadas com AIFtCl, foram avaliadas pelo ensaio de MTT, 24 h após a irradiação com luz vermelha (Fig. 22). Na ausência de HDACi, células incubadas com o FS, porém mantidas no escuro,

apresentaram atividade mitocondrial semelhante às células controle incubadas apenas com PBS. Para as células incubadas com NE-AIFtCl e expostas à luz, houve redução dessa atividade a partir da concentração de 10 nM de FS, indicando efeito fotodinâmico do tratamento.

O pré-tratamento das leveduras com NaBut ou TSA intensificou o efeito da TFD, nas concentrações menores de FS (0,2; 0,6 e 2,0 nM). Para concentrações superiores de FS, a TFD isoladamente já exerceu efeito citotóxico máximo.

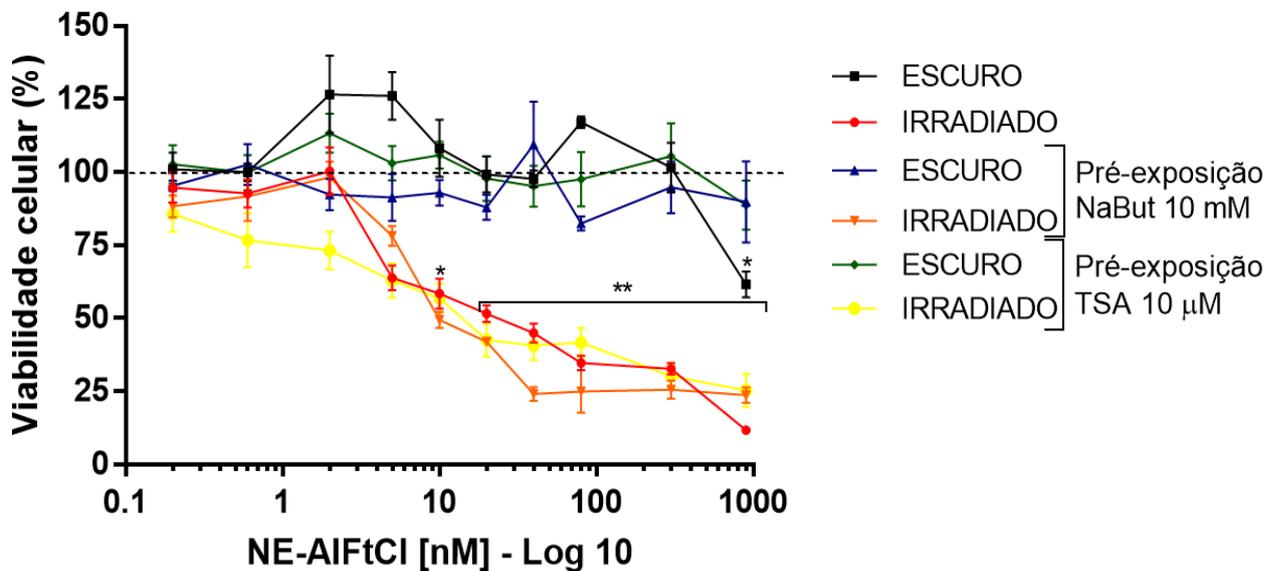


**Figura 2217** – Viabilidade celular de *C. neoformans* H99 tratadas com NaBut (butirato de sódio) ou TSA (tricostatina A) e incubadas com diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl), 24 h após a exposição a LED ( $\lambda$  660 nm, 107,8 J / cm<sup>2</sup>). (\*) <math>< 0,01</math>, corresponde à significância estatística em relação ao controle (0 nM NE-AIFtCl/ESCURO), determinado por ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey.

#### 4.4.2. LINHAGEM T1 DE *C. neoformans*

Leveduras de *C. neoformans* T1 previamente tratadas com NaBut 10 mM ou TSA 10  $\mu$ M e incubadas com AlFtCl, foram avaliadas pelo ensaio de MTT, 24 h após a irradiação com luz vermelha (Fig. 23). Na ausência de HDACi, células incubadas com o FS, porém mantidas no escuro, apresentaram atividade mitocondrial semelhante às células controle incubadas apenas com PBS. Para as células incubadas com NE-AlFtCl e expostas à luz, houve redução dessa atividade a partir da concentração de 10 nM de FS, indicando efeito fotodinâmico do tratamento, bem como concentração dependente.

O pré-tratamento das leveduras com TSA intensificou o efeito da TFD nas concentrações 0,6 e 2,0 nM do FS. Observou-se ainda que o pré-tratamento com NaBut obteve efeito máximo da TFD com 40 nM do FS.

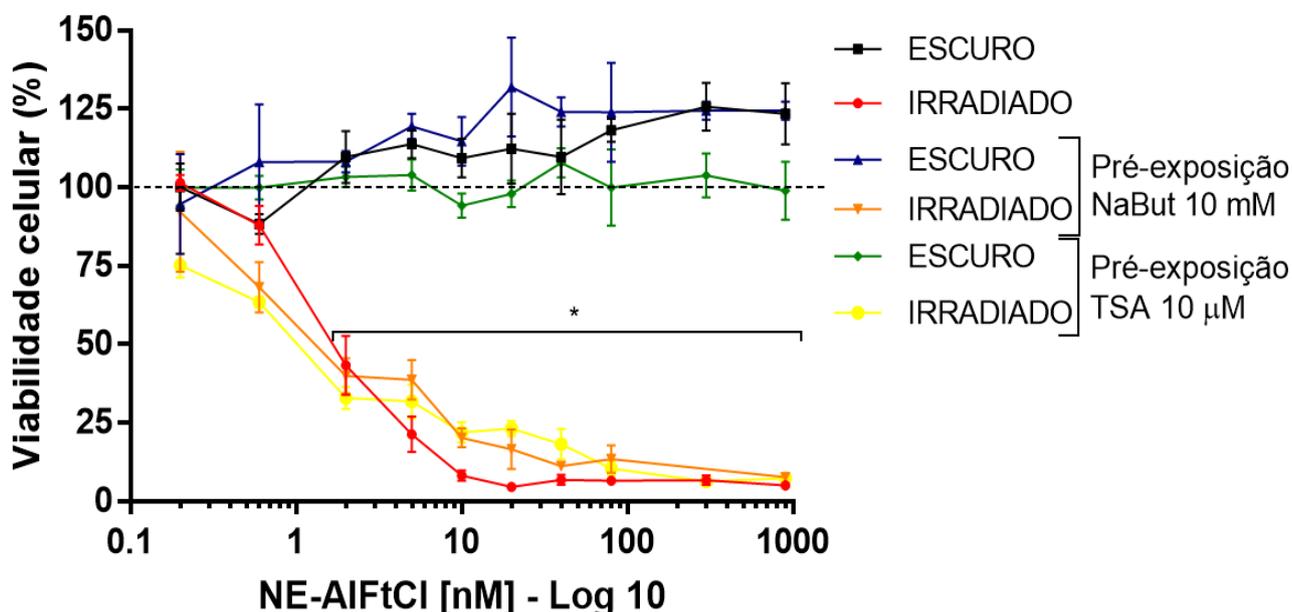


**Figura 23** - Viabilidade celular de *C. neoformans* T1 tratadas com butirato de sódio (NaBut) ou tricostatina A (TSA) e incubadas com diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl), 24 h após a exposição a LED ( $\lambda$  660 nm, 107,8 J / cm<sup>2</sup>). (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*\*)  $< 0,01$  correspondem à significância estatística em relação ao controle (0 nM NE-AIFtCl/ESCURO), determinado por ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey.

#### 4.4.3. LINHAGEM NIH198 DE *C. gattii*

Leveduras de *C. gattii* NIH198 previamente tratadas com NaBut 10 mM ou TSA 10 μM e incubadas com AIFtCl, foram avaliadas pelo ensaio de MTT, 24 h após a irradiação com luz vermelha (Fig. 24). Na ausência de HDACi, células incubadas com o FS, porém mantidas no escuro, apresentaram atividade mitocondrial semelhante às células controle incubadas apenas com PBS. Para as células incubadas com NE-AIFtCl e expostas à luz, houve redução dessa atividade a partir da concentração de 5 nM de FS, indicando efeito fotodinâmico do tratamento, bem como concentração dependente de AIFtCl.

O pré-tratamento das leveduras com NaBut ou TSA intensificou o efeito da TFD, nas concentrações menores de FS (0,2 e 0,6 nM). Para concentrações superiores a 10 nM de FS, a TFD isoladamente já exerceu efeito citotóxico máximo.



**Figura 24** - Viabilidade celular de *C. gattii* NIH198 tratadas com NaBut (butirato de sódio) ou TSA (tricostatina A) e incubadas com diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl), 24 h após a exposição a LED ( $\lambda$  660 nm, 107,8 J / cm<sup>2</sup>). (\*) <math><0,01</math> corresponde à significância estatística em relação ao controle (0 nM NE-AIFtCl/ESCURO), determinado por ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey.

#### 4.5. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MEIO DE SEMEADURA APÓS DILUIÇÃO SERIADA

##### 4.5.1. LINHAGEM H99 DE *C. neoformans*

Leveduras da linhagem H99 de *C. neoformans* foram expostas ao sistema fotossensibilizante (NE-AlFtCl) e à luz vermelha nas condições padronizadas anteriormente, lavadas, diluídas em série e semeadas em YPD sólido. Observou-se efeito citotóxico para todas as concentrações de AlFtCl testadas. Como controles, foram utilizadas leveduras incubadas apenas com PBS, irradiadas ou não (Fig. 25).

		Luz	5000	500	50	5
PBS	-					
	+					
NE-AIFtCl 2 nM	-					
	+					
NE-AIFtCl 5 nM	-					
	+					
NE-AIFtCl 10 nM	-					
	+					
NE-AIFtCl 20 nM	-					
	+					
NE-AIFtCl 40 nM	-					
	+					
NE-AIFtCl 80 nM	-					
	+					
NE-AIFtCl 300 nM	-					
	+					
NE-AIFtCl 900 nM	-					
	+					

**Figura 2518** - Viabilidade de *C. neoformans* H99 após terapia fotodinâmica (TFD) em meio sólido. Leveduras incubadas com cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl) de diferentes concentrações. Irradiadas ou não com LED, na fluência de 107 J/cm<sup>2</sup>. As células foram diluídas e as quantidades de 5000, 500, 50 e 5 células semeadas em YPD sólido a 30 ° C. O crescimento foi avaliado após 48 h de incubação. Como controle, células foram incubadas com tampão fosfato-salino (PBS).

Em um experimento seguinte, as leveduras foram previamente tratadas com 10 nM NaBut, incubadas com 2, 5, 40 ou 300 nM de AlFtCl e então irradiadas. A Fig. 26 indica que houve um efeito aditivo do NaBut com as concentrações mais baixas de AlFtCl (2 e 5 nM) sobre a viabilidade celular. Com as concentrações mais altas do FS (40 e 300 nM), a TFD isoladamente já foi suficiente para matar os fungos.

	NaBut	Luz	5000	500	50	5
PBS	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 2 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 5 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 40 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 300 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				

**Figura 26** - Viabilidade de *C. neoformans* H99 após tratamento com butirato de sódio (NaBut) e TFD. As leveduras foram tratadas com 10 mM de NaBut, incubadas com diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl), irradiadas ou não com LED, na fluência de 107 J/cm<sup>2</sup>. Cerca de 5000, 500, 50 e 5 células foram semeadas em YPD sólido e incubadas a 30 °C e crescimento foi avaliado ao longo de 48 h. Como controle, células foram incubadas apenas com tampão fosfatossalino (PBS).

Para as leveduras tratadas previamente com TSA 10  $\mu$ M e incubadas com 2, 5 ou 40 nM de AlFtCl, observou-se resultado comparável ao tratamento com NaBut: as concentrações 2 e 5 nM do FS levaram a uma maior redução da viabilidade celular (Fig. 27), enquanto com 40 nM de AlFtCl, a TFD isoladamente já foi suficiente para matar os fungos.

Os dados anteriores demonstraram um efeito aditivo entre os HDACi e concentrações não citotóxicas de AlFtCl sobre a viabilidade de leveduras de *C. neoformans* H99.

	TSA	LuZ	5000	500	50	5
PBS	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 2 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 5 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 40 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				

**Figura 2719-** Viabilidade de *C. neoformans* H99 após tratamento com tricostatina A (TSA) e TFD. As leveduras foram tratadas com 10  $\mu$ M de TSA, incubadas com diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl), irradiadas ou não com LED, na fluência de 107 J/cm<sup>2</sup>. Cerca de 5000, 500, 50 e 5 células foram semeadas em YPD sólido e incubadas a 30 °C e crescimento foi avaliado ao longo de 48 h. Como controle, células foram incubadas apenas com tampão fosfato-salino (PBS).

#### **4.5.2. LINHAGEM T1 DE *C. neoformans***

Leveduras da linhagem T1 de *C. neoformans* foram expostas ao sistema fotossensibilizante (NE-AlFtCl) e à luz vermelha nas condições padronizadas anteriormente, lavadas, diluídas em série e semeadas em YPD sólido. Observou-se efeito citotóxico para as todas as concentrações de AlFtCl testadas. Como controle, foram utilizadas leveduras de *C. neoformans* T1 incubadas apenas com PBS, com ou sem irradiação com LED. (Fig. 28).

	Luz	5000	500	50	5
PBS	-				
	+				
NE-AIFtCl 2 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 5 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 10 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 20 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 40 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 80 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 300 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 900 nM	-				
	+				

**Figura 28** – Viabilidade de *C. neoformans* T1 após terapia fotodinâmica (TFD) em meio sólido. Leveduras incubadas com cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl) de diferentes concentrações. Irradiadas ou não com LED, na fluência de 107 J/cm<sup>2</sup>. As células foram diluídas e as quantidades de 5000, 500, 50 e 5 células semeadas em YPD sólido a 30 ° C. O crescimento foi avaliado após 48 h de incubação. Como controle, células foram incubadas com tampão fosfato-salino (PBS).

Em um experimento seguinte, as leveduras foram previamente tratadas com 10 nM NaBut, incubadas com 2, 5, 40 ou 300 nM de AlFtCl e então irradiadas. A Fig. 29 indica que houve um efeito aditivo do NaBut com as concentrações mais baixas de AlFtCl (2 e 5 nM) sobre a viabilidade celular. Com as concentrações mais altas do FS (40 e 300 nM), a TFD isoladamente já foi suficiente para matar os fungos.

	NaBut	Luz	5000	500	50	5
PBS	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 2 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 5 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 40 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 300 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				

**Figura 29** – Viabilidade de *C. neoformans* T1 após tratamento com butirato de sódio (NaBut) e TFD. As leveduras foram tratadas com 10 mM de NaBut, incubadas com diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl), irradiadas ou não com LED, na fluência de 107 J/cm<sup>2</sup>. Cerca de 5000, 500, 50 e 5 células foram semeadas em YPD sólido e incubadas a 30 °C e crescimento foi avaliado ao longo de 48 h. Como controle, células foram incubadas apenas com tampão fosfatossalino (PBS).

Para as leveduras tratadas previamente com TSA 10  $\mu$ M e incubadas com 2, 5 ou 40 nM de AlFtCl, observou-se resultado comparável ao tratamento com NaBut: as concentrações 2 e 5 nM do FS levaram a redução intensificada da viabilidade celular (Fig. 30), enquanto com 40 nM de AlFtCl, a TFD isoladamente já foi suficiente para matar os fungos.

Os dados anteriores demonstraram um efeito aditivo entre os HDACi e concentrações não citotóxicas de AlFtCl sobre a viabilidade de leveduras de *C. neoformans* T1.

	TSA	Luz	5000	500	50	5
PBS	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 2 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 5 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 40 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				

**Figura 30** – Viabilidade de *C. neoformans* T1 após tratamento com tricostatina A (TSA) e TFD. As leveduras foram tratadas com 10  $\mu$ M de TSA, incubadas com diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl), irradiadas ou não com LED, na fluência de 107 J/cm<sup>2</sup>. Cerca de 5000, 500, 50 e 5 células foram semeadas em YPD sólido e incubadas a 30 °C e crescimento foi avaliado ao longo de 48 h. Como controle, células foram incubadas apenas com tampão fosfato-salino (PBS).

#### **4.5.3. LINHAGEM NIH198 DE *C. gattii***

Leveduras da linhagem NIH198 de *C. gattii* foram expostas ao sistema fotossensibilizante (NE-AIFtCl) e à luz vermelha nas condições padronizadas anteriormente, lavadas, diluídas em série e semeadas em YPD sólido. Observou-se efeito citotóxico para as todas as concentrações de AIFtCl testadas. Como controle, foram utilizadas leveduras de *C. gattii* NIH198 incubadas apenas com PBS, com ou sem irradiação com LED (Fig. 31).

	Luz	5000	500	50	5
PBS	-				
	+				
NE-AIFtCl 2 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 5 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 10 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 20 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 40 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 80 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 300 nM	-				
	+				
NE-AIFtCl 900 nM	-				
	+				

**Figura 31** – Crescimento de *C. gattii* NIH198 após terapia fotodinâmica (TFD) em meio sólido. As leveduras foram incubadas com diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl), irradiadas ou não com LED, na fluência de 107 J/cm<sup>2</sup>. As células foram diluídas e as quantidades de cerca de 5000, 500, 50 e 5 células foram semeadas em YPD sólido e incubadas a 30 °C. O crescimento foi avaliado ao longo de 48 h de incubação. Como controle, células foram incubadas com tampão fosfato-salino (PBS).

Em seguida, as leveduras foram previamente tratadas com 10 nM NaBut, incubadas com 2, 5, 40 ou 300 nM de AlFtCl e então irradiadas. A Fig. 32 indica que houve um efeito aditivo sobre a viabilidade celular do NaBut com as concentrações mais baixas de AlFtCl (2 e 5 nM). Com as concentrações mais altas do FS (40 e 300 nM), a TFD isoladamente já foi suficiente para matar os fungos.

	NaBut	Luz	5000	500	50	5
PBS	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 2 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 5 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 40 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 300 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				

**Figura 32** – Viabilidade de *C. gattii* NIH198 após tratamento com butirato de sódio (NaBut) e TFD. As leveduras foram tratadas com 10 mM de NaBut, incubadas com diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl), irradiadas ou não com LED, na fluência de 107 J/cm<sup>2</sup>. Cerca de 5000, 500, 50 e 5 células foram semeadas em YPD sólido e incubadas a 30 °C e crescimento foi avaliado ao longo de 48 h. Como controle, células foram incubadas apenas com tampão fosfatossalino (PBS).

Para as leveduras tratadas previamente com TSA 10  $\mu$ M e incubadas com 2, 5 ou 40 nM de AlFtCl, observou-se resultado comparável ao tratamento com NaBut: as concentrações 2 e 5 nM do FS levaram a redução mais intensa da viabilidade celular (Fig. 33), enquanto com 40 nM de AlFtCl, a TFD isoladamente já foi suficiente para matar os fungos.

Os dados anteriores demonstraram um efeito aditivo entre os HDACi e concentrações não citotóxicas de AlFtCl sobre a viabilidade de leveduras de *C. gattii* NIH198.

	TSA	Luz	5000	500	50	5
PBS	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 2 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 5 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				
NE-AIFtCl 40 nM	+	-				
	+	+				
	-	-				
	-	+				

**Figura 33** - Viabilidade de *C. gattii* NIH198 após tratamento com tricostatina A (TSA) e TFD. As leveduras foram tratadas com 10  $\mu$ M de TSA, incubadas com diferentes concentrações de cloreto de ftalocianina de alumínio em nanoemulsão (NE-AIFtCl), irradiadas ou não com LED, na fluência de 107 J/cm<sup>2</sup>. Cerca de 5000, 500, 50 e 5 células foram semeadas em YPD sólido e incubadas a 30 °C e crescimento foi avaliado ao longo de 48 h. Como controle, células foram incubadas apenas com tampão fosfato-salino (PBS).

## 5. DISCUSSÃO

A necessidade de novas alternativas terapêuticas para fungos patogênicos surge principalmente do aumento da ocorrência de isolados resistentes aos fármacos tradicionais, dos efeitos tóxicos de alguns tratamentos, bem como do custo de algumas das terapias (revisto BICANIC *et al.*, 2006; MAY *et al.*, 2016). Abordagens como a TFD e a regulação epigenética estão entre as alternativas relatadas na literatura para contornar esses problemas (WACHOWSKA; GABRYSIK; GOLAB, 2014; SIMON-O'BRIEN *et al.*, 2015; HALABURKOVÁ *et al.*, 2017). Assim, nesse trabalho, foi avaliado o efeito da TFD mediada pela NE-AIFtCl sobre o crescimento e a viabilidade de isolados de *Cryptococcus* spp. previamente tratados com os inibidores de HDAC NaBut ou TSA. Avaliou-se as linhagens H99 e T1 de *C. neoformans* e a linhagem NIH198 de *C. gattii*.

Um componente fundamental da TFD é o FS. Segundo Macdonald *et al.* (2001), os mais efetivos são os que são ativados por luz com comprimento de onda na faixa entre 600 e 800 nm, pois esse tipo de luz possui um maior poder de penetração em tecidos biológicos. Um dos FS apontados como promissores na literatura científica é o AIFtCl, visto que apresenta grande capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando fotoativado, além de rápida captação celular (RODRIGUES, 2018). Porém, uma limitação para o uso desse FS é a natureza hidrofóbica (MOREIRA *et al.*, 2008; CARMELLO *et al.*, 2016), sendo portando necessário veiculá-lo com uma nanoemulsão. No presente trabalho utilizou-se a nanoemulsão.

De acordo com Gupta e colaboradores (2011), a estabilidade das nanoformulações é essencial para preservar as propriedades de FS carreados. As NE-AIFtCl empregadas nesse estudo apresentaram diâmetro hidrodinâmico de 27,15 nm  $\pm$  1,070, índice de

polidispersão de  $0,178 \pm 0,026$  e potencial zeta  $-0,340 \pm 0,188$ , dados compatíveis aos apresentados em trabalhos anteriores (MUEHLMANN *et al.*, 2015; RODRIGUES, 2018). Os estudos da literatura indicam ainda que essa formulação é estável por meses, à temperatura ambiente (MUEHLMANN *et al.*, 2015; RODRIGUES, 2018).

A eficácia da NE-AIFtCl como fotossensibilizante para TFD em células tumorais de mamíferos já havia sido descrita (MUEHLMANN *et al.*, 2015; MOURA, 2017; RODRIGUES, 2018). Dessa forma, nesse trabalho, expandimos a investigação da eficácia dessa formulação para células de *Cryptococcus* spp. Além disto, foi verificada pela primeira vez, nesse modelo, a combinação da TFD com dois inibidores de histona desacetilase, NaBut e TSA. Tal estratégia foi utilizada porque já havia sido observado que a regulação epigenética é responsável pela modulação de mecanismos de defesa (ROBBINS *et al.*, 2012) e de virulência de fungos patogênicos (BRANDÃO *et al.*, 2015; BRANDÃO *et al.*, 2018), que podem estar envolvidos na resistência a fármacos (KMETZSCH, 2015; LI *et al.*, 2015).

Inicialmente se verificou a internalização do AIFtCl, após exposição das leveduras de *Cryptococcus* a diferentes concentrações de NE-AIFtCl por diferentes períodos de tempo. Assim como nos trabalhos Rodrigues *et al.* (2012) e Rodrigues (2018), a fluorescência do AIFtCl foi utilizada para a detecção intracelular. No trabalho de Rodrigues (2018), que utilizou a mesma nanoformulação desse trabalho, células tumorais de mamíferos foram expostas por 15 min e detectou-se o decaimento do FS com o passar do tempo. No presente estudo, verificou-se que as leveduras de *Cryptococcus* expostas continuamente à NE-AIFtCl por até 240 min apresentaram intensidade de fluorescência constante a partir do período de 30 min (Fig. 7, 16 e 23). O pré-tratamento com NaBut ou TSA não interferiu na captação celular do FS, pois nas mesmas condições experimentais,

as leveduras tratadas ou não com esses HDACi não apresentaram diferença na intensidade de fluorescência (Fig. 8, 9, 17, 18, 26 e 27)

Valores de fluorescência próximos a 5% foram encontrados para a linhagem H99 de *C. neoformans* e NIH198 de *C. gattii* (Fig. 7 e 23). No entanto, para a linhagem de *C. neoformans* resistente a fluconazol (T1), a incorporação foi menor (3,7% Fig. 16). Sabe-se que as propriedades físico-químicas da superfície das leveduras influenciam na seletividade e na eficácia dos FS (HAMBLIN; HASAN, 2004; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; JORI, 2006; FUCHS *et al.*, 2007) e segundo Kontoyiannis *et al.* (2002), isolados de *C. neoformans* resistentes a fluconazol apresentam alteração na estrutura-função de membrana, bem como superexpressão das bombas de efluxo, o que poderia explicar a incorporação do FS pelo isolado T1.

Alguns trabalhos mostraram que o FS pode ou não interagir com as células e, caso aconteça, há diferentes formas dessa interação, podendo o FS estar adsorvido à superfície da célula, à face interna da membrana celular ou ao meio intracelular (FUCHS *et al.*, 2007; SMIJS *et al.*, 2008; GONZALES *et al.*, 2010). Portanto, a lavagem realizada com PBS, após o período de incubação e anterior a aplicação do LED, é um passo importante para garantir que a resposta seja efetivamente devida ao FS incorporado pelo fungo. No trabalho de MANTAREVA *et al.* (2007), a lavagem das células com PBS antes da irradiação reduziu a atividade fotodinâmica sobre células de *Candida albicans* e de *Staphylococcus aureus*.

Para confirmar a presença do FS no interior das células, e tentar definir o compartimento celular no qual esse estivesse localizado, foram realizados experimentos de microscopia confocal. Embora não tenha sido possível especificar a localização exata na célula, foi possível detectar a incorporação celular do AlFtCl, assim como o padrão difuso para as células de *C. neoformans* H99 (Fig. 10) e de *C. gattii* NIH198 (Fig. 28)

porém restrito à periferia das células de *C. neoformans* T1 (Fig. 19). Acreditamos que tal diferença também possa ser atribuída a diferenças estruturais ou funcionais da parede ou membrana das células.

Segundo Adhikari *et al.* (2017) e Bhaskar *et al.* (2010), um fotossensibilizante apropriado apresenta características não tóxicas para os componentes não irradiados. As leveduras de *Cryptococcus*, quando incubadas a NE-AIFtCl no escuro, apresentaram viabilidade semelhante à das leveduras incubadas apenas com PBS (Fig.12, 21 e 30).

O efeito da TFD mediada pela NE-AIFtCl foi avaliado nas células de *Cryptococcus*, pré-tratadas ou não ao NaBut ou TSA, por ensaios *in vitro* e, esses tratamentos combinados, mostraram-se eficientes no controle da proliferação de todas as linhagens analisadas, em concentrações nanomolares do FS. Ressalta-se que a TFD mediada por NE-AIFtCl, combinada a HDACi, em leveduras de *Cryptococcus*, ainda não havia sido descrita na literatura científica.

A partir de nossos dados, observa-se diferença no crescimento (Fig.11, 20 e 29) e na viabilidade (Fig. 15, 24, 33), entre células submetidas a TFD, combinada ou não ao tratamento com HDACi, e aquelas cultivadas em condições controle. Diferentes linhagens apresentaram diferentes respostas aos tratamentos. Fernandes *et al.* (2018) apontam que diferentes isolados de fungo apresentam características próprias e respostas distintas aos mesmos estímulos, o que corrobora os resultados aqui encontrados, visto que as diferentes linhagens apresentaram perfil de crescimento diferente.

De Bedout (1991) havia relatado que as células de *C. gattii* são mais resistentes aos tratamentos antifúngicos convencionais, em comparação *C. neoformans*, havendo assim a necessidade de uma terapia mais prolongada. Um estudo realizado por TRILLES *et al.*, (2004) comparou a susceptibilidade de *C. neoformans* e de *C. gattii* a 9 agentes antifúngicos, constatando que para 7 desses, *C. gattii* foi mais

resistente que *C. neoformans*. Em nosso trabalho, viu-se que *C. gattii* foi tão susceptível a TFD quanto *C. neoformans*, fato esse corroborado pelo trabalho de Soares e colaboradores (2010) onde demonstrou-se que a TFD poderia ser uma alternativa para inibir do crescimento de *C. gattii*. O pré-tratamento dessa espécie com HDACi foi capaz de aumentar sensibilidade a TFD de células de *C. gattii*. Nesse contexto, reitera-se a necessidade de terapias alternativas para o tratamento de infecções provocadas por diferentes espécies e isolados de *Cryptococcus*.

A linhagem T1 de *C. neoformans*, resistente ao fluconazol, teve o crescimento reduzido pela TFD (Fig.24). No entanto, essa resposta foi menor do que a das demais linhagens. MANG *et al.* (2010) demonstraram que células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol também foram sensíveis à citotoxicidade induzida por TFD. Peng e colaboradores (2018) demonstraram que o tratamento de *C. neoformans* com fluconazol levou à indução de EROs. É possível então que a menor resposta à TFD esteja relacionada a diferenças no metabolismo redox entre a linhagem T1 e as outras leveduras estudadas nesse trabalho. Assim, a TFD mostra-se uma alternativa interessante para o controle de crescimento de linhagens de fungos resistentes a fármacos.

Mesmo concentrações baixas de NE-AlFtCl levaram a diminuição de crescimento e de viabilidade de leveduras em resposta à TFD. Esses dados, associados aos de microscopia confocal (Fig. 10, 19 e 28) indicam que a NE-AlFtCl é capaz de atravessar a cápsula polissacarídica e a parede celular, componentes importantes à proteção das leveduras de *Cryptococcus* contra agentes externos (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1996; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001; FUCHS *et al.*, 2007).

A eficiência da TFD está relacionada à concentração do agente FS empregado (RIBEIRO *et al.*, 2012; HANAKOVA *et al.*, 2014). Rodrigues *et al.* (2012) estudaram o efeito de três concentrações diferentes de NE-AlFtCl sobre células de *Candida* e

observaram morte celular mais acentuada nas concentrações maiores. Um efeito concentração-dependente também foi verificado no presente trabalho para *Cryptococcus* spp. (Fig. 15, 24 e 33)

A produção de EROs é diretamente dependente tanto da dose de energia quanto da concentração do FS (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; DĄBROWSKI, 2017). Estudos recentes (ZHANG, 2017) associam baixas concentrações de EROs a ativação de uma variedade de sistemas antioxidantes em leveduras (COLLINSON E DAWES, 1992; TEMPLE *et al.*, 2005), o que poderia explicar a sobrevivência a baixas concentrações de NE-AlFtCl. Por outro lado, estresse oxidativo intenso pode causar uma série de lesões na membrana celular, proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, resultando em perda de viabilidade (REVERTER-BRANCHAT *et al.*, 2004; BRANDUARDI *et al.*, 2007). Vale ressaltar que o estresse oxidativo induzido pela TFD tem efeito sobre diferentes alvos celulares, o que dificulta a seleção de micro-organismos resistentes a essa terapia (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008b).

O pré-tratamento de leveduras de *Cryptococcus* com NaBut ou TSA aumentou a sensibilidade das células à TFD, visto que na concentração mais baixa de FS, o efeito da TFD sobre o crescimento celular foi intensificado comparativamente às células não tratadas com HDACi (Fig. 13, 14, 22, 23, 31 e 32). Resultado similar foi encontrado em células de câncer colo retal humano: Halaburková *et al.* (2017) associaram a remodelação epigenética dessas células a uma maior sensibilidade à TFD. Sung e colaboradores (2014) relataram que a TFD combinada a HDACi resultou em efeito citotóxico mais pronunciado sobre células MyLa (linfoma não-Hodking humano), aumentando a apoptose e as quebras de fita dupla no DNA. Um estudo com células de melanoma humano sugeriu que HDACis

interferem na capacidade de reparo do DNA, o que poderia estar relacionado ao sinergismo com TFD (MUNSHI *et al.*, 2005).

Esse trabalho demonstrou a eficácia da TFD mediada pela NE-AlFtCl sobre o crescimento e viabilidade de leveduras de *Cryptococcus*, assim como o efeito aditivo entre essa terapia e os HDACis NaBut e TSA. Tais informações podem, no futuro, ser traduzidas em uma proposta terapêutica combinada tanto para lesões cutâneas provocadas por fungos desse gênero, como também pulmonares por meio do uso de sondas que possam levar a luz LED até esses órgãos. Deve-se ressaltar ainda o baixo custo da TFD, considerando-se o fato de que os países nos quais as infecções fúngicas prevalecem dificilmente podem arcar com os custos dos tratamentos antifúngicos para infecções mais avançadas.

## 6. CONCLUSÕES

Considerando os dados descritos, conclui-se que *C. neoformans* e *C. gattii* foram capazes de internalizar o AIFtCl. Após irradiação das células tratadas com NaBut e TSA e incubadas com NE-AIFtCl, observou-se uma diminuição da proliferação celular. A TFD mediada pela NE-AIFtCl mostrou um efeito citotóxico concentração-dependente e essa citotoxicidade foi maior nas células incubadas com os inibidores HDAC.

## REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, P. et al. Nano lipid-drug conjugate: An integrated review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 529, n. 1–2, p. 629–641, 2017.
- ALLEGUE, F.; LIS, M. P. DE; PÉREZ-ÁLVAREZ, R. Primary Cutaneous Cryptococcosis Presenting as a Whitlow. v. 87, n. 5, p. 443–444, 2007.
- ALMEIDA, F. et al. Galectin-3 impacts *Cryptococcus neoformans* infection through direct antifungal effects. **Nature Communications**, 2017.
- ARJONA-AGUILERA, C. et al. Primary Cutaneous Cryptococcosis: A New Case of This Rare Entity. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 2–3, 2017.
- BHASKAR, S. et al. **Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: Perspectives on tracking and neuroimaging** *Particle and Fibre Toxicology*, 2010.
- BICANIC, T. et al. Symptomatic Relapse of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis after Initial Fluconazole Monotherapy: The Role of Fluconazole Resistance and Immune Reconstitution. **Clinical Infectious Diseases**, 2006.
- CALZAVARA-PINTON, P. et al. Photodynamic antifungal chemotherapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 512–522, 2012.
- CARMELLO, J. C. et al. In vivo photodynamic inactivation of *Candida albicans* using chloro-aluminum phthalocyanine. **Oral Diseases**, v. 22, n. 5, p. 415–422, 2016.
- CASALI, A. K. et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, 2003.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. **Mechanisms in**

**photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. **Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2005.

CHEN, S. C. et al. Identification by random amplification of polymorphic DNA of a common molecular type of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in patients with AIDS or other immunosuppressive conditions. **J Infect Dis**, 1996.

CLAPIER, C. R.; CAIRNS, B. R. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. **Annual Review of Biochemistry**, 2009.

DĄBROWSKI, J. M. Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. In: **Advances in Inorganic Chemistry**. [s.l.: s.n.].

DAI, T.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3–4, p. 170–188, 2009.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. **Photodynamic therapy targeted to pathogens***International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2004.

DIAZ, M. R. et al. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated with rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. **Systematic and Applied Microbiology**, 2000.

DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 1–12, 2008a.

- DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. **Antifungal photodynamic therapy** *Microbiological Research*, 2008b.
- DU, L. et al. Systemic Review of Published Reports on Primary Cutaneous Cryptococcosis in Immunocompetent Patients. *Mycopathologia*, v. 180, n. 1–2, p. 19–25, 2015.
- DURDEN, F. M.; ELEWSKI, B. Cutaneous involvement with *Cryptococcus neoformans* in AIDS. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 30, n. 5, p. 844–848, 1994.
- FERNANDES, K. E. et al. Phenotypic Variability Correlates with Clinical Outcome in *Cryptococcus* Isolates Obtained from Botswanan HIV/AIDS Patients. *mBio*, 2018.
- FRASER, J. A. et al. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature*, v. 437, n. 27, p. 1360–1364, 2005.
- FUCHS, B. B. et al. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to photodynamic inactivation is associated with cell wall integrity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 8, p. 2929–2936, 2007.
- GORDON, J. A. R. et al. Chromatin. In: **Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition**. [s.l.: s.n.].
- GUERRIERO, J. L. et al. Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages. *Nature*, 2017.
- HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 16–48, 2015.
- HALABURKOVÁ, A. et al. Histone deacetylase inhibitors potentiate photodynamic therapy in colon cancer cells marked by chromatin-mediated epigenetic regulation of

- CDKN1A. **Clinical Epigenetics**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2017.
- HALSALL, J. et al. Genes are often sheltered from the global histone hyperacetylation induced by HDAC inhibitors. **PLoS ONE**, 2012.
- HANAKOVA, A. et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. **Microbiological Research**, v. 169, n. 2–3, p. 163–170, 2014.
- HSIEH, T.-F.; FISCHER, R. L. BIOLOGY OF CHROMATIN DYNAMICS. **Annual Review of Plant Biology**, 2005.
- IDNURM, A. et al. **Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*** **Nature Reviews Microbiology**, 2005.
- JAENISCH, R.; BIRD, A. **Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals** **Nature Genetics**, 2003.
- JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. **Translating the histone code** **Science**, 2001.
- 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**, 2004.
- KMETZSCH, L. Histone deacetylases: Targets for antifungal drug development. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 535–536, 2015.
- KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. **Antifungal drug resistance of pathogenic fungi** **Lancet**, 2002.
- KUMAR, P. et al. Smear morphology of cryptococcosis presenting as a subcutaneous swelling in healthy adults: A report of three cases. **Cytopathology**, v. 16, n. 3, p. 143–

146, 2005.

KWON-CHUNG, K. J. et al. (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, v. 51, n. 4, p. 804–806, 2002.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 7, p. 1–27, 2015.

LEAL, A. L. Diferenciação das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* utilizando a metodologia de PCR multiplex e determinação do perfil epidemiológico de pacientes com meningite criptocócica. p. 100, 2006.

LEOPOLD WAGER, C. M. et al. *Cryptococcus* and phagocytes: Complex interactions that influence disease outcome. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–16, 2016.

LI, X. et al. The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 7, p. 1993–2003, 2015.

LOW, C.-Y.; ROTSTEIN, C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. **F1000 Medicine Reports**, v. 3, n. July, p. 1–8, 2011.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. **Basic principles of photodynamic therapy**. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. **Anais...2001**

MANG, T. S.; MIKULSKI, L.; HALL, R. E. Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 2, p. 98–105, 2010.

- MANTAREVA, V. et al. Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2007.
- MARQUES, S. A. et al. Primary cutaneous cryptococcosis in Brazil : report of 11 cases in immunocompetent and immunosuppressed patients. v. 51, p. 780–784, 2012.
- MARTINEZ, L. R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Cryptococcus neoformans var. neoformans (serotype D) strains are more susceptible to heat than C. neoformans var. grubii (serotype A) strains. **Journal of Clinical Microbiology**, 2001.
- MAY, R. C. et al. **Cryptococcus: From environmental saprophyte to global pathogen** *Nature Reviews Microbiology*, 2016.
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. v. 30, p. 179–206, 2016.
- MOREIRA, L. M. et al. Photodynamic therapy: Porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers. **Australian Journal of Chemistry**, 2008.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 1983.
- MUNSHI, A. et al. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 13, p. 4912–4922, 2005.
- NAKAMURA, Y. et al. Molecular analysis of CAP59 gene sequences from five serotypes of Cryptococcus neoformans. **Journal of Clinical Microbiology**, 2000.
- NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, p. 599–609, 2012.
- NISHIKAWA, M. M. et al. Serotyping of 467 Cryptococcus neoformans isolates from

clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns.

**Journal of Clinical Microbiology**, 2003.

PAPPAS, P. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 124, p. 61–79, 2013.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. **Cryptococcosis Infectious Disease Clinics of North America**, 2002.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **HHS Public Access**, v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017.

SAWAN, C. et al. **Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2008.

SEVERO, L. C.; DE MATTOS OLIVEIRA, F.; LONDERO, A. T. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases. **Rev Iberoam Micol**, 1999.

SIMON-O'BRIEN, E. et al. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate decreases excessive ethanol intake in dependent animals. **Addiction Biology**, 2015.

SIVARAJ, V. et al. Rare presentation of cutaneous cryptococcosis in advanced HIV. v. 11, p. 1–3, 2018.

SMITH, W. L.; EDLIND, T. D. Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azoles and related antifungals: Correlation with reduction in CDR and ERG upregulation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3532–3539, 2002.

SORRELL, T. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Med Mycol.**, 2001.

SUN, H. et al. Cutaneous cryptococcosis in solid organ transplant recipients. v. 48, p. 785–791, 2010.

SUNG, J. J.; VERVERIS, K.; KARAGIANNIS, T. C. Histone deacetylase inhibitors potentiate photochemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma MyLa cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 2014.

TRILLES, L. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4815–4817, 2004.

TWEDE, J. V; PETERS, K. M. Primary Cutaneous Cryptococcosis in an Immunocompetent Iraq War Veteran IS o n o t c o p y o c o . v. 102, n. 5, p. 30–31, 2018.

VILCHEZ, R. A.; FUNG, J.; KUSNE, S. **Cryptococcosis in organ transplant recipients: An overview****American Journal of Transplantation**, 2002.

WACHOWSKA, M.; GABRYSIK, M.; GOLAB, J. Epigenetic remodeling combined with photodynamic therapy elicits anticancer immune responses. **Oncology**, v. 3, n. 5, p. 15–17, 2014.

YE, R. R. et al. Cyclometalated Ir(III) complexes as targeted theranostic anticancer therapeutics: Combining HDAC inhibition with photodynamic therapy. **Chemical Communications**, v. 50, n. 75, p. 10945–10948, 2014.

ZHANG, H. et al. Sodium butyrate-induced death-associated protein kinase expression promote Raji cell morphological change and apoptosis by reducing FAK protein levels. **Acta Pharmacol Sin**, v. 28, n. 11, p. 1783–1790, 2007.