



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

**EFEITO COMBINADO DE CURCUMINA E TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA
POR NANOEMULSÃO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA EM LINHAGENS DE *C.*
*neoformans***

FABIANA CHAGAS COSTA

BRASÍLIA – DF

2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

FABIANA CHAGAS COSTA

**EFEITO COMBINADO DE CURCUMINA E TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA
POR NANOEMULSÃO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA EM LINHAGENS DE *C.*
*neoformans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia .

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

BRASÍLIA, DF.
2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C838e Chagas Costa, Fabiana
EFEITO COMBINADO DE CURCUMINA E TERAPIA FOTODINÂMICA
MEDIADA POR NANOEMULSÃO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA EM
LINHAGENS DE C. neoformans. / Fabiana Chagas Costa;
orientador Luis Alexandre Muehlmann; co-orientador Marcio
Marcio José Poças Fonseca. -- Brasília, 2024.
77 p.

Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)
-- Universidade de Brasília, 2024.

1. CURCUMINA . 2. TERAPIA FOTODINÂMICA . 3. NANOEMULSÃO
DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA. 4. C. neoformans. 5. Epigenética.
I. Alexandre Muehlmann, Luis , orient. II. Marcio José Poças
Fonseca, Marcio , co-orient. III. Título.

FABIANA CHAGAS COSTA

**EFEITO COMBINADO DE CURCUMINA E TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA
POR NANOEMULSÃO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA EM LINHAGENS DE *C.*
*neoformans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia .

Aprovado em _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann - PPGNANO/UnB
(Presidente)

Profa. Dra. Sônia Nair Bão – PPGNANO/UnB
(Examinadora, membro efetivo interno ao PPGNANO/UnB)

Profa. Dra. Sandra Milena Leal Pinto – Universidad de Santander, Colômbia
(Examinadora, membro efetivo externo ao PPGNANO/UnB)

Profa. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva – FAR/UnB
(Examinadora suplente)

*A Deus, que sempre foi o autor da minha história.
A minha família que é meu porto seguro.
Ao meu filho Mateus, que me ensina a ser melhor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço eternamente a Deus por me dar forças nos momentos mais difíceis da minha vida, por me oferecer amor genuíno e verdadeiro.

Agradeço à minha mãe Cremilda Peres das Chagas por todo o apoio, durante minha jornada. Por me orientar e sempre me ensinar o caminho do bem, por me ajudar em qualquer situação e por me amar, mesmo com meus defeitos.

Agradeço ao pai do meu filho Moisés Nunes Freire, pela dedicação e apoio nesse momento, sem a ajuda dele, seria muito mais complicado alcançar os meus objetivos.

Agradeço ao meu amigo, Lourival Carvalho Nunes, que me ajudou e me incentivou em todas etapas do mestrado, compartilhando seu conhecimento, paciência e carinho. É um verdadeiro amigo, que com certeza, estará para sempre comigo.

Agradeço à minha irmã Luana Chagas Costa, por estar comigo em todos meus processos de crescimento, por me escutar, me ajudar, me orientar e me acalmar.

Agradeço ao meu orientador, Luís Alexandre Muehlmann, pelo apoio, ajuda e amizade oferecidos durante meu processo. Aproveito para expressar minha gratidão pela paciência.

Agradeço ao meu co-orientador Marcio José Poças Fonseca pelos conhecimentos partilhados e apoio oferecido.

Por fim, agradeço ao meu filho Mateus Chagas Freire, que me ensinou a ser um ser humano melhor. Me ensina diariamente a paciência e o amor. Faço tudo por você, meu filho.

"As pessoas costumam dizer que a motivação não dura sempre. Bem, nem o efeito do banho, por isso recomenda-se diariamente."

Zig Ziglar

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Fungos Leveduriformes.....	16
1.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	16
1.2.1 Morfologia e Ciclo de vida de <i>Cryptococcus neoformans</i>	17
1.2.2 Fatores de Virulência.....	18
1.3 Doença e Epidemiologia	20
1.4 Tratamentos Convencionais.....	21
1.5 Linhagens <i>Cryptococcus neoformans</i> estudadas.....	22
1.6 Epigenética	24
1.7 Curcumina	26
1.7.1 Propriedades Medicinais – História e Origem	26
1.7.2 Propriedades Físico-Químicas da Curcumina	26
1.7.3 Curcumina como antifúngico.....	26
1.7.4 Curcumina como Modulador Epigenético.....	27
1.8 Terapia Fotodinâmica	30
1.8.1 Terapia Fotodinâmica em fungos leveduriformes	32
1.8.2 Uso da Nanotecnologia em TFD	33
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Preparo da Nanoemulsão de Cloreto de Alumínio-Ftalocianina (NE-AlFtCl)	35
4.2 Caracterização das nanoemulsões	35
4.3 Linhagens de Microorganismos Utilizados.....	35
4.4 Preparo dos meios de cultivo e fármacos.....	36

4.5	Inóculo e semeadura das leveduras	36
4.6	Avaliação de CIM de curcumina por ensaios de microdiluição em caldo.	36
4.7	Avaliação da CIM de NE-AIFtCl.	37
4.8	TFD combinada com curcumina sobre linhagens de <i>Cryptococcus</i> spp.	37
4.9	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
4.10	Análises Estatísticas	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Concentração inibitória mínima de Curcumina verificada para linhagens de <i>C. neoformans</i>	40
5.2	Concentração inibitória mínima de NE-AIFtCl em TFD para linhagens de <i>C. neoformans</i>	46
5.3	Efeitos da exposição às CIM ₁₀₀ de curcumina e de NE-AIFtCl em <i>C. neoformans</i> H99 e mutantes <i>hda1Δ</i> e <i>hos2Δ</i>	49
5.4	Combinação de Tratamentos em <i>C. neoformans</i> H99	53
5.5	Combinação de Tratamentos em <i>C. neoformans hda1Δ</i>	55
5.6	Combinação de Tratamentos em <i>C. neoformans hos2Δ</i>	62
6.	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Eventos de Brotamento do *C. neoformans*.Pg. 17
- Figura 2.** Ilustração esquemática da remodelação de cromatina por acetilação e desacetilação das histonas por HATs e HDACs.....Pg. 25
- Figura 3:** Esquema ilustrativo dos principais mecanismo de alterações epigenéticas causadas pela ação da curcumina.Pg. 30
- Figura 4.** Diagrama de Jablonski.....Pg. 31
- Figura 5.** Imagens de Microscopia de Varredura (MEV) de *C. neoformans*, linhagem H99 e mutantes *hda* Δ e *hos2* ΔPg. 43
- Figura 6.** Crescimento de *C. neoformans*, linhagem H99 e mutantes *hda* Δ e *hos2* Δ em CIM de curcumina.....Pg. 49
- Figura 7.** Crescimento de *C. neoformans*, linhagem H99, após exposição à curcumina (CURC) e/ou à nanoemulsão contendo alumínio-ftalocianina (NE), seguida de incubação no escuro ou de irradiação com luz vermelha.....Pg. 53
- Figura 8.** Crescimento de *C. neoformans*, mutante *hda1* Δ , após exposição à curcumina (CURC) e/ou à nanoemulsão contendo alumínio-ftalocianina (NE), seguida de incubação no escuro ou de irradiação com luz vermelha.....Pg. 56
- Figura 9.** Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da Histona Desacetilase HDA1.....Pg. 59
- Figura 10.** Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da Histona Desacetilase HOS2.....Pg. 63
- Figura 11.** Crescimento de *C. neoformans*, mutante *hos2* Δ , após exposição à curcumina (CURC) e/ou à nanoemulsão contendo alumínio-ftalocianina (NE), seguida de incubação no escuro ou de irradiação com luz vermelha.....Pg. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de virulência de <i>Cryptococcus neoformans</i>	Pg. 20
Tabela 2. Genes específicos relacionados ao metabolismo e à sobrevivência celular que podem ser afetados pela curcumina.....	Pg. 29
Tabela 3. Classes de fotossensibilizantes utilizados na terapia fotodinâmica e suas descrições.....	Pg. 32
Tabela 4. Determinação de Concentração Inibitória Mínima de curcumina em diferentes linhagens de <i>Cryptococcus neoformans</i>	Pg. 40
Tabela 5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Nanoemulsão de Cloruro de Alumínio-ftalocianina.....	Pg. 47
Tabela 6. Diferenças entre os efeitos de desacetilação por histonas desacetilases HDA1 e HOS2.....	Pg. 66

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (inglês).
ASC – Área sob a Curva
BHE - Barreira Hematoencefálica
C. neoformans - *Cryptococcus neoformans*
CIM – Concentração Inibitória Mínima
DH - Hidrodinâmico
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (inglês).
DNMTs – DNA Metiltransferases
DO – Densidade Ótica
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
EUA – Estados Unidos da América
GXM – Glucuronoxilomanana
h – Hora
HATs - *Histone Acetyltransferase* (inglês).
HDACs - *Histone Acetyltransferase* (inglês).
HIV - *Human Immunodeficiency Virus* (inglês).
LED – *Light Emitting Diode* (inglês).
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
MOPS - Ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico
NEAIFtCl - Nanoemulsão de Cloruro de alumínio-ftalocianina
nm – Nanômetro
nM – Nanomolar
°C -Graus Celsius
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – *Phosphate Buffered Saline* (inglês).
PdI - Índice de Polidispersão
pH – Potencial de Hidrogênio
PLB1 - Fosfolipase B
RNA - *Ribonucleic Acid* (inglês).
RPMI - meio *Gibco Roswell Park Memorial Institute* (inglês).
SNC – Sistema Nervoso Central
SOD - Superóxido Dismutase
TFD - Terapia Fotodinâmica
UnB – Universidade de Brasília
USA – *United States of America* (inglês).
YPD - Yeast Extract Peptone Dextrose (inglês).

RESUMO

COSTA, F. C. Efeito combinado de curcumina e terapia fotodinâmica mediada por nanoemulsão de alumínio-ftalocianina em linhagens de *Cryptococcus neoformans*. [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília – UnB, 2024.

Os fungos leveduriformes são organismos unicelulares e heterotróficos, caracterizados por suas células arredondadas ou ovais, conhecidas como leveduras. Eles se reproduzem por brotamento ou divisão celular. *Cryptococcus neoformans* é uma levedura encapsulada encontrada no meio ambiente e é um patógeno humano oportunista. Dados epidemiológicos recentes indicam que a criptococose é uma das infecções fúngicas mais comuns em pacientes com HIV/AIDS no Brasil, com variações na incidência conforme a região e o acesso a cuidados médicos, resultando em alta taxa de mortalidade se não tratada adequadamente. Novos medicamentos e tecnologias são necessários para superar a resistência e garantir tratamentos eficazes, explorando abordagens como terapias combinadas e imunoterapias, que podem ser mais eficazes do que os tratamentos tradicionais, reduzindo o tempo de tratamento e os efeitos colaterais. A epigenética oferece uma abordagem promissora no tratamento antifúngico ao focar na modulação das HDACs (histonas desacetilases). As HDACs são essenciais na regulação da expressão gênica em fungos patogênicos, e sua inibição pode causar desestabilização celular e morte do fungo. Ao direcionar as HDACs, é possível interferir na adaptação e resistência dos fungos, tornando-os mais vulneráveis ao tratamento. Essa estratégia abre caminho para terapias antifúngicas mais eficazes e específicas. Inicialmente foram pesquisadas as linhagem H99 de *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A), as linhagens T1-5796 e 89-6105797 são conhecidas por sua tolerância ao fluconazol. E as linhagens mutantes como *hda1Δ*, *hos2Δ*, *hda1Δ/hos2Δ* e *hda1Δ+HDA1* que foram produzidas por técnicas de biologia molecular para remover genes responsáveis pela codificação de histonas desacetilases (HDACs) para a verificação de comportamentos diferentes entre elas. O uso de curcumina e TFD apresenta potencial significativo como alternativa terapêutica para o controle de infecções por fungos leveduriformes. Foram investigadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de curcumina e NE-AIFtCl em terapia fotodinâmica (TFD) nestas linhagens. Após a determinação de CIM₁₀₀, foram utilizadas CIM₅₀ e CIM₇₅ de cada tratamento, testadas em três linhagens de *C. neoformans* (H99, *hda1Δ* e *hos2Δ*) com exposição prévia à curcumina e tratamento posterior com TFD. A curcumina em CIM₅₀ e CIM₁₀₀ causou mudanças morfológicas na cápsula das linhagens expostas ao tratamento. Os resultados mostraram que o uso individual de cada tratamento foi eficaz, mas o uso combinado nem sempre foi mais efetivo. Em linhagens mutantes como *hda1Δ*, a curcumina em baixas concentrações (CIM₅₀) protegeu as leveduras contra a TFD, provavelmente por mecanismos de antioxidação e modulação epigenética, regulando a repressão da transcrição, o ciclo celular e a resposta ao estresse. Na linhagem *hos2Δ*, os resultados foram diferentes, com a linhagem se desenvolvendo em concentrações menores de NE-AIFtCl, independentemente da concentração de curcumina, demonstrando a atividade da TFD. Esses achados sugerem mecanismos epigenéticos da curcumina, especialmente em concentrações mais baixas, e apoiam a continuação da investigação dessa abordagem como possível opção para o tratamento de infecções fúngicas causadas por *C. neoformans*, com potencial para melhorar a eficácia dos tratamentos existentes e enfrentar a crescente resistência antifúngica.

Palavras-chave: Curcuma Longa; fungos; leveduras; fotossensibilizante; epigenética; biotecnologia.

ABSTRACT

COSTA, F. C. Combined effect of curcumin and photodynamic therapy mediated by aluminum-phthalocyanine nanoemulsion on *Cryptococcus neoformans* strains. [Dissertation]. Graduate Program in Nanoscience and Nanobiotechnology, Institute of Biology, University of Brasília – UnB, 2024.

Yeast-like fungi are unicellular, heterotrophic organisms characterized by their round or oval cells, known as yeasts. They reproduce by budding or cell division. *Cryptococcus neoformans* is an encapsulated yeast found in the environment and is an opportunistic human pathogen. Recent epidemiological data indicate that cryptococcosis is one of the most common fungal infections in HIV/AIDS patients in Brazil, with variations in incidence depending on the region and access to medical care, resulting in a high mortality rate if not treated properly. New drugs and technologies are needed to overcome resistance and ensure effective treatments, exploring approaches such as combination therapies and immunotherapies, which may be more effective than traditional treatments, reducing treatment time and side effects. Epigenetics offers a promising approach to antifungal treatment by focusing on the modulation of HDACs (histone deacetylases). HDACs are essential in regulating gene expression in pathogenic fungi, and their inhibition can cause cellular destabilization and fungal death. By targeting HDACs, it is possible to interfere with the adaptation and resistance of fungi, making them more vulnerable to treatment. This strategy paves the way for more effective and specific antifungal therapies. Initially, the H99 strain of *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A), and the T1-5796 and 89-6105797 strains, known for their fluconazole tolerance, were researched. Mutant strains such as *hda1Δ*, *hos2Δ*, *hda1Δ/hos2Δ*, and *hda1Δ*+HDA1 were produced using molecular biology techniques to remove genes responsible for encoding histone deacetylases (HDACs) to verify different behaviors among them. The use of curcumin and PDT (photodynamic therapy) shows significant potential as a therapeutic alternative for controlling yeast-like fungal infections. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of curcumin and NE-AIFtCl in PDT were investigated in these strains. After determining MIC₁₀₀, MIC₅₀, and MIC₇₅ of each treatment were used, tested in three strains of *C. neoformans* (H99, *hda1Δ*, and *hos2Δ*) with prior exposure to curcumin and subsequent treatment with PDT. Curcumin at MIC₅₀ and MIC₁₀₀ caused morphological changes in the capsule of the strains exposed to the treatment. The results showed that the individual use of each treatment was effective, but the combined use was not always more effective. In mutant strains like *hda1Δ*, curcumin at low concentrations (MIC₅₀) protected the yeasts against PDT, probably through antioxidant mechanisms and epigenetic modulation, regulating transcription repression, cell cycle, and stress response. In the *hos2Δ* strain, the results were different, with the strain developing at lower concentrations of NE-AIFtCl, regardless of curcumin concentration, demonstrating PDT activity. These findings suggest epigenetic mechanisms of curcumin, especially at lower concentrations, and support the continued investigation of this approach as a possible option for treating fungal infections caused by *C. neoformans*, with the potential to improve the efficacy of existing treatments and address the growing antifungal resistance.

Keywords: Curcuma Longa; fungi; yeasts; photosensitizer; epigenetics; biotechnology.

**EFEITO COMBINADO DE CURCUMINA E TERAPIA FOTODINÂMICA MEDIADA
POR NANOEMULSÃO DE ALUMÍNIO-FTALOCIANINA EM LINHAGENS DE
Cryptococcus neoformans.**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fungos Leveduriformes

Os fungos leveduriformes são unicelulares e heterotróficos, e se caracterizam por terem células arredondadas ou ovais, conhecidas como leveduras. A reprodução pode acontecer por brotamento ou divisão celular (DURAN *et al.*, 2022).

Quando cultivadas, as leveduras possuem uma aparência macroscópica pastosa ou cremosa. Esses fungos são encontrados em diversos ambientes como na microbiota de humanos e animais, solo, água, vegetais, plantas, detritos etc. Embora algumas leveduras sejam benéficas, outras podem causar doenças em humanos. Essas doenças são em sua maioria superficiais e são conhecidas como micoses, entretanto, outras infecções sistêmicas ou locais podem ser desenvolvidas, o que pode causar complicações nos pacientes acometidos (SUDARSHAN *et al.*, 2022).

Um dos principais fungos patogênicos aos humanos é o *Cryptococcus neoformans*, um patógeno comumente associado à criptococose, uma infecção sistêmica. Esse fungo pode afetar o sistema nervoso central, levando pacientes a quadros de meningites graves. Também pode afetar outros órgãos como pulmões, pele, ossos, articulações, baço, rins e próstata. Outro importante patógeno leveduriforme é *Candida albicans*, agente causador da candidíase que se manifesta geralmente na região genital feminina e masculina, mas que pode se tornar invasiva e levar os pacientes a quadros de complicações severas. *Malassezia spp.*, é outro fungo leveduriforme encontrado na pele humana e pode causar pitiríase versicolor, uma infecção superficial caracterizada por manchas na pele (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

1.2 *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans é comumente encontrado no meio ambiente e é um patógeno humano oportunista. Foi inicialmente descrito entre 1894 e 1895, isolado de uma infecção óssea e de suco de frutas fermentado (BARBOSA *et al.*, 2015). Atualmente, esse basidiomiceto é ubíquo no ambiente e é comumente isolado de excrementos de aves, solo e árvores. Consequentemente, a exposição por inalação de esporos ou células de levedura desidratadas é comum na população, levando a quadros de infecção assintomática, mas pode levar à criptococose pulmonar e sistêmica, ou meningites em indivíduos com sistemas imunitários comprometidos. A meningoencefalite criptocócica apresenta-se como manifestação clínica mais comum em criptococose sistêmica e causa, no mundo, cerca de 15% das mortes em indivíduos soropositivos para vírus da imunodeficiência humana - HIV e portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida - AIDS

(ZHAO & LIN, 2021).

1.2.1 Morfologia e Ciclo de vida de *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans é uma levedura unicelular encapsulada. Sua morfologia característica inclui uma cápsula de polissacarídeos, principalmente a glucuronoxilomanana (GXM), que envolve a célula fúngica, conferindo-lhe tolerância aos estresses do meio ambiente e capacidade de evadir a resposta imunológica do hospedeiro. Essa estrutura de cápsula é composta por três camadas concêntricas: a membrana plasmática, a parede celular e a cápsula de polissacarídeos. A parede celular das células de *C. neoformans* contém principalmente proteínas e carboidratos, incluindo quitina, quitosana e glucanos. Essa organização é fundamental para sua virulência e adaptação ao ambiente do hospedeiro (RISTOW *et al.*, 2023).

C. neoformans cresce como uma levedura unicelular e normalmente multiplica-se por brotamento, onde uma célula mãe dá origem a uma célula-filha (**Figura 1**). No entanto, durante o ciclo sexual, ele produz hifas (estruturas filamentosas) e, no final das hifas, cria basidiósporos, que são propagadores infecciosos. Esses basidiósporos podem colonizar os pulmões de um hospedeiro. Embora a reprodução sexuada ocorra, ela é menos frequente na natureza em comparação com a reprodução assexuada ou vegetativa (HU *et al.*, 2020).

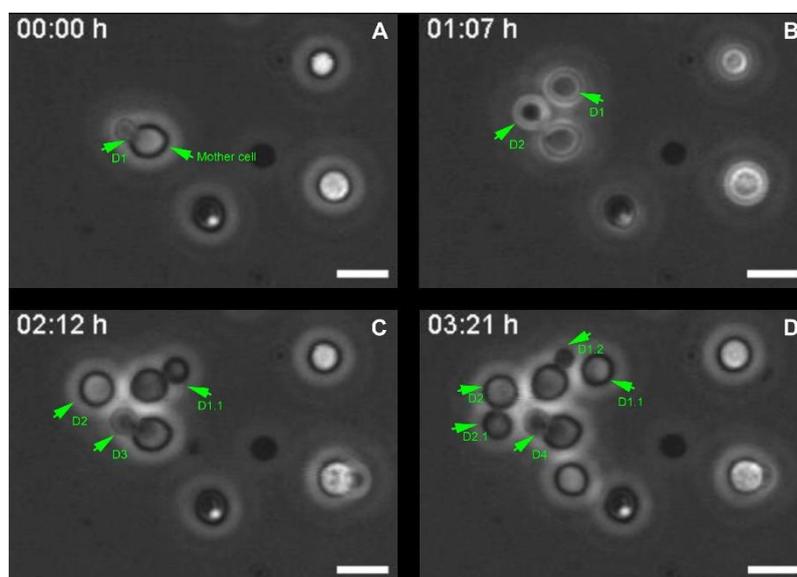


Figura 1: Eventos de Brotamento do *C. neoformans*. Imagens selecionadas de um filme de microscopia de vídeo de *C. neoformans*, cultivado em meio Sabouraud, que ilustram a evolução do processo de brotação. As imagens (A–D) foram capturadas em intervalos de 0, 1h07min, 2h12min e 3h21 min, respectivamente, demonstrando a progressão dos eventos de brotamento ao longo do tempo. As setas verdes indicam as leveduras durante a divisão celular, um processo que dura aproximadamente $1,3 \pm 0,3$ horas por célula. As imagens também revelam que as células-filhas (D) brotam sempre de forma unipolar e repetidamente da mesma região da célula-mãe. (ARAÚJO *et al.*, 2021)

1.2.2 Fatores de Virulência

Entre os fatores de virulência desse patógeno podem-se destacar a presença de cápsula de polissacarídeo que é um fator crucial para a virulência de *C. neoformans*. O envoltório capsular protege o fungo contra a resposta imunológica do hospedeiro e é utilizada no diagnóstico. Estudos recentes investigaram a regulação gênica associada à expressão do fenótipo de cápsula, propriedades imunogênicas e interação com células fagocíticas (LEE *et al.*, 2023).

Como componente principal da cápsula, a GXM desempenha um papel importante na patogenicidade de *C. neoformans*, ela se acumula extensivamente nos tecidos do hospedeiro, comprometendo as respostas imunológicas. *C. neoformans* se prolifera e evade dos pulmões para a corrente sanguínea e, em seguida, invade o cérebro rompendo a barreira hematoencefálica (BHE), pois o GXM pode facilitar a passagem do fungo através das células endoteliais da BHE por meio de um processo chamado transcitose. Isso envolve a internalização do fungo em vesículas endocíticas, que atravessam a célula endotelial e são liberadas no lado oposto (LEE *et al.*, 2023).

O GXM tem propriedades imunomoduladoras que ajudam o fungo a evadir a resposta imune do hospedeiro. Isso inclui a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e a indução de apoptose em células imunes, o que pode facilitar a invasão da BHE. Outro mecanismo que pode ser citado é a disrupção das junções de oclusão em que o GXM afeta as junções de oclusão entre as células endoteliais, aumentando a permeabilidade da BHE e permitindo a passagem do fungo. Por fim, a GXM pode interagir com receptores específicos nas células endoteliais, promovendo a adesão e a invasão do fungo (TIAN *et al.*, 2018).

A produção da enzima lacase é um outro fator de virulência importante para *C. neoformans*. Essa enzima está envolvida na patogênese da criptococose e possui várias características estruturais, biológicas e genéticas. A lacase é expressa na parede celular de *C. neoformans* e possui um amplo espectro de atividade, oxidando tanto compostos polifenólicos quanto ferro. Existem dois genes parálogos de lacase, *CNLAC1* e *CNLAC2*, presentes no fungo. O primeiro parálogo expressa a atividade enzimática dominante sob condições de privação de glicose, oferecendo outras vias de produção de energia. Ela sintetiza a melanina, um pigmento antioxidante que protege o fungo contra danos oxidativos e outros estressores ambientais, como calor, frio, compostos antimicrobianos e radiação ionizante. Enquanto o segundo, o *CNLAC2* também codifica uma lacase, mas sua atividade é menos dominante em comparação com a *CNLAC1*. A *CNLAC2* pode ter um papel complementar ou redundante na biologia do fungo. A expressão de *CNLAC1* e *CNLAC2* é regulada por várias condições ambientais, como a disponibilidade de nutrientes, a presença de cátions multivalentes e o estresse térmico (CORDEIRO *et al.*, 2020).

A melanina é um pigmento que protege o fungo contra danos causados por radicais livres e outros agentes oxidantes. Isso é particularmente importante no ambiente hostil do corpo humano, onde o sistema imunitário utiliza espécies reativas de oxigênio (EROs) para combater infecções. A melanina pode conferir resistência a certos antifúngicos, tornando o tratamento das infecções mais desafiador e, também, ajuda o fungo a sobreviver em condições adversas, como altas temperaturas e radiação UV, que podem ser encontradas tanto no ambiente externo quanto dentro do hospedeiro (ALMEIDA-PAES, 2015).

As fosfolipases são enzimas importantes na patogenicidade de *C. neoformans*, auxiliando na invasão e disseminação do fungo no hospedeiro. A principal enzima é fosfolipase B (PLB1), por isso é mais estudada em *C. neoformans*. A PLB1 hidrolisa ligações éster em glicerofosfolipídios, o que ajuda na degradação das membranas celulares do hospedeiro. Sua atividade facilita a penetração do fungo nos tecidos do hospedeiro, degradando as membranas celulares e permitindo a disseminação do fungo. Sua atividade é crítica para a sobrevivência de *C. neoformans* no sistema nervoso central. Mutações na PLB1 resultam em menor virulência e menor carga fúngica no cérebro. A PLB1 também desempenha um papel na modulação da resposta imune do hospedeiro, ajudando o fungo a evitar a detecção e destruição pelas células imunológicas (HAMED, *et al.*, 2023).

As proteinases em *C. neoformans* desempenham um papel na patogenicidade e na capacidade do fungo de invadir e causar infecções no hospedeiro. Como funções das proteinases, podem se citar a degradação de proteínas do hospedeiro, facilitando a invasão tecidual e a disseminação do fungo. Essas enzimas podem danificar as células endoteliais do cérebro, aumentando a permeabilidade da BHE e promovendo a invasão do sistema nervoso central. Ao degradar componentes do sistema imunitário, as proteinases ajudam o fungo a evitar a detecção e a destruição pelas células de defesa do hospedeiro (MUSELIUS, *et al.*, 2021).

A produção de urease, também é um fator de virulência importante, pois essa enzima degrada a ureia em amônia e bicarbonato. Essa reação aumenta o pH do ambiente, onde o fungo está presente. Esse aumento do pH no organismo do hospedeiro pode ter vários efeitos, dependendo da extensão da mudança e da área afetada. Muitas enzimas funcionam de forma ótima em um pH específico. Alterações significativas no pH podem levar à desnaturação dessas enzimas, reduzindo sua atividade e afetando processos metabólicos essenciais como o catabolismo e anabolismo de reações. O pH afeta a ionização de moléculas dentro das células, o que pode alterar a função celular e a comunicação entre células (MARANHÃO *et al.*, 2020).

Porém o aumento do pH é benéfico para *C. neoformans*, uma vez que pode ajudar o fungo a sobreviver dentro dos fagolisossomos dos macrófagos, que normalmente são ácidos, a urease,

também influencia a interação do *C. neoformans* com os macrófagos. A presença de urease está associada a uma menor permeabilização da membrana do fagolisossomo e a uma exocitose não-lítica mais frequente, o que pode facilitar a disseminação do fungo dentro do hospedeiro e permite que o *C. neoformans* utilize a ureia como fonte de nitrogênio, o que é crucial para seu crescimento e sobrevivência em diferentes ambientes, incluindo o hospedeiro. Esses fatores combinados tornam a urease uma enzima chave na capacidade do *C. neoformans* de causar infecções graves, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (TOPLIS *et al.*, 2020).

E por fim, a capacidade de crescer a 37 °C, essa termotolerância está associada à virulência do fungo e é essencial para a sobrevivência de *C. neoformans* no ambiente interno do corpo humano, onde pode causar infecções sistêmicas, como meningite criptocócica. Além de crescer a 37 °C, *C. neoformans* pode crescer em uma faixa de temperaturas que varia de 25 °C a 40 °C, mostrando uma grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes (YANG *et al.*, 2017).

Tabela 1: Fatores de virulência de *Cryptococcus neoformans*.

Fator de Virulência	Descrição	Função
Cápsula de Polissacarídeo	Composta principalmente de glucuronoxilomanana (GXM)	Protege contra a fagocitose e a resposta imune do hospedeiro.
Melanina	Pigmento produzido pela enzima lacase	Protege contra o estresse oxidativo e a radiação UV
Fosfolipase	Enzima que degrada fosfolipídios	Facilita a invasão e disseminação nos tecidos do hospedeiro
Proteinase	Enzima que degrada proteínas	Contribui para a invasão tecidual e evasão imunológica
Urease	Enzima que hidrolisa a ureia	Ajuda na sobrevivência em ambientes ácidos, como o trato gastrointestinal
Capacidade de Crescimento a 37°C	Adaptabilidade à temperatura do corpo humano	Permite a sobrevivência e proliferação no hospedeiro humano

Fonte: Autoria própria.

1.3 Doença e Epidemiologia

Dados epidemiológicos recentes mostram que a criptococose é uma das infecções fúngicas mais comuns em pacientes com HIV/AIDS no Brasil. Estudos indicam que a incidência das infecções pode variar conforme a região e o acesso a cuidados médicos resultando alta taxa de mortalidade se não tratada adequadamente (BADDLEY, *et al.*, 2021; CARRIJO, *et al.*, 2021).

Os Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) indicam que a criptococose representa uma parte significativa das infecções fúngicas notificados. Já no mundo a incidência global da criptococose afeta principalmente pessoas com HIV/AIDS, e é estimado que

anualmente ocorram cerca de 223.000 casos em todo o mundo, com mais de 180.000 mortes associadas. A maioria dos casos ocorre em países em desenvolvimento, especialmente na África Subsaariana, nessa região a criptococose é uma das principais causas de meningite em pacientes com HIV. A prevalência é alta devido à alta carga de HIV em muitos pacientes com AIDS e ao acesso limitado a cuidados médicos. Houve um aumento na conscientização e na disponibilidade de testes e tratamentos, mas a doença continua a ser um problema de saúde pública significativo, especialmente em áreas com altos índices de HIV/AIDS e recursos limitados. Porém problemas como resistência a antifúngicos, dificuldades no diagnóstico precoce e acesso limitado a tratamentos são desafios contínuos (GUSHIKEN, *et al.*, 2021).

1.4 Tratamentos Convencionais

A Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu *C. neoformans* na sua lista de Patógenos Fúngicos Prioritários, destacando a necessidade de vigilância aumentada, melhor diagnóstico e tratamento, e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Organização Mundial da Saúde - OMS).

O tratamento da criptococose depende da gravidade da infecção e do estado imunitário do paciente. Para o tratamento de infecções leves a moderadas, especialmente aquelas sem comprometimento do sistema nervoso central (SNC), o fluconazol oral é frequentemente o tratamento de primeira linha, já para infecções graves, incluindo aquelas que envolvem o SNC, a terapia de indução geralmente envolve a combinação de anfotericina B e flucitosina. Esta fase é seguida por uma terapia de consolidação com fluconazol (BONGOMIN *et al.*..., 2018; RATHORE *et al.*, 2022).

O tratamento pode durar de 6 a 10 semanas, dependendo da resposta do paciente e da gravidade da infecção. Em casos com manifestações neurológicas e/ou oculares, o fluconazol é preferido devido à sua melhor penetração nesses tecidos. É essencial monitorar a resposta ao tratamento e ajustar a terapia conforme necessário. Em alguns casos, pode ser necessário realizar exames de imagem, como tomografia computadorizada ou ressonância magnética, para avaliar a extensão da infecção (MOREIRA, *et al.*, 2006).

O tratamento da criptococose apresenta várias dificuldades, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Os efeitos colaterais dos medicamentos utilizados na terapia podem trazer prejuízos aos outros sistemas do organismo, dificultando assim a melhora do paciente. A anfotericina B pode causar nefrotoxicidade (danos aos rins), hipocalcemia (baixos níveis de potássio) e outras reações adversas mais comumente relatadas em estudos clínicos controlados e abertos foram calafrios, aumento de creatinina sérica, pirexia, hipocalcemia, náusea e vômito. A

flucitosina pode levar a toxicidade hematológica, como leucopenia (diminuição dos leucócitos) e trombocitopenia (diminuição das plaquetas). O fluconazol pode acarretar complicações gastrointestinais, como dor abdominal, diarreia, náuseas e vômitos, neurológicas como dor de cabeça, tontura e sonolência, e dermatológicas como vermelhidão na pele e coceira (BRIZENDINE & PAPPAS, 2010).

Além das dificuldades citadas, o tratamento medicamentoso com antifúngicos convencionais apresenta outros desafios como da resistência moderada do *C. neoformans* a antifúngicos como fluconazol e anfotericina B, o que pode complicar o tratamento. O diagnóstico tardio devido aos sintomas inespecíficos, como os sintomas iniciais da criptococose, podem levar a diagnósticos tardios e, conseqüentemente, a um tratamento mais complicado. O tratamento pode ser longo, exigindo adesão rigorosa ao regime terapêutico, o que pode ser difícil para alguns pacientes. Por fim em pacientes com HIV/AIDS, a criptococose pode ser recorrente, exigindo tratamento antifúngico prolongado e manejo cuidadoso da terapia antirretroviral (SLOAN *et al.*, 2009).

Esses desafios destacam a necessidade de um manejo cuidadoso e individualizado dos pacientes com criptococose. Há pesquisas em andamento para desenvolver novos medicamentos antifúngicos que sejam mais eficazes e tenham menos efeitos colaterais. Novos triazóis (como isavuconazol) e equinocandinas (como anidulafungina) têm mostrado ser potentes e menos tóxicos. Esses fármacos são recomendados como fármacos de primeira linha para várias infecções fúngicas invasivas. Muitos dos novos antifúngicos têm menor toxicidade renal e hepática em comparação com os tratamentos tradicionais, como a anfotericina B. Tais fármacos também possuem melhor penetração em tecidos, o que é decisivo para tratar infecções fúngicas sistêmicas e do sistema nervoso central (LAHMER *et al.*, 2021).

Novos medicamentos e tecnologias são necessários para superar essa resistência e garantir tratamentos eficazes. A pesquisa pode explorar novas abordagens, como terapias combinadas e imunoterapias, que podem ser mais eficazes do que os tratamentos tradicionais, reduzindo tempo de tratamento, efeitos colaterais e adversos.

1.5 Linhagens *Cryptococcus neoformans* estudadas

A linhagem H99 de *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A) é uma linhagem de referência amplamente utilizada em pesquisas sobre este fungo patogênico. Isolada pela primeira vez em 1978, a H99 tem sido fundamental para estudos devido à sua capacidade de causar doenças graves, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (FERNANDES *et al.*, 2022).

Estudos mostram que cepas derivadas da H99 podem variar em termos de virulência, com

algumas apresentando cápsulas maiores e maior variação no tamanho das células. Durante a infecção, as células de *C. neoformans* podem sofrer mudanças morfológicas significativas, incluindo aumento do tamanho da cápsula e da célula, produção de células micro e titan, e liberação de cápsulas (FERNANDES *et al.*, 2022).

As linhagens T1-5796 e 89-6105797 de *C. neoformans* são conhecidas por sua tolerância ao fluconazol um antifúngico amplamente utilizado no tratamento de infecções fúngicas, devido à presença de bombas de efluxo. Essa tolerância pode ocorrer devido a mutações genéticas que afetam a eficácia do medicamento. O fluconazol atua inibindo a enzima lanosterol 14- α -demetilase, essencial para a síntese de ergosterol, um componente crucial da membrana celular fúngica. Mutações no gene *ERG11*, que codifica essa enzima, podem reduzir a afinidade do fluconazol pela enzima, diminuindo sua eficácia (VU & GELI, 2010).

As bombas de efluxo são proteínas que expõem substâncias tóxicas da célula. A superexpressão dos genes *CDR1* e *CDR2* pode aumentar a capacidade do fungo de expelir o fluconazol, reduzindo sua concentração intracelular e, conseqüentemente, sua eficácia e as mudanças na composição da membrana celular podem afetar a entrada do fluconazol na célula, tornando o fungo menos suscetível ao tratamento (VU & GELI, 2010).

As linhagens *hda1* Δ , *hos2* Δ , *hda1* Δ /*hos2* Δ e *hda1* Δ +*HDA1* foram produzidas por pesquisadores que utilizaram técnicas de biologia molecular para remover os genes responsáveis pela codificação de histonas desacetilases (HDACs) (BRANDÃO *et al.*, 2018).

A deleção do gene *HDA1* no *C. neoformans* gerou a linhagem *hda1* Δ e demonstrou mudanças na capacidade do fungo de crescer a temperaturas elevadas, como as encontradas no corpo humano, resultou em uma cápsula menos eficiente, tornando o fungo mais suscetível à resposta imune do hospedeiro, afetou a produção de melanina, diminuindo a resistência do fungo ao estresse oxidativo e a radiação ultravioleta, reduziu a atividade de protease, limitando a capacidade do fungo de invadir tecidos do hospedeiro e provocou alterações na integridade da parede celular, que podem tornar o fungo mais vulnerável a agentes antifúngicos e ao sistema imunitário do hospedeiro (BRANDÃO *et al.*, 2018).

A deleção do gene *HOS2*, implicou em importantes fatores de virulência do fungo. A ausência do gene *HOS2* pode afetar negativamente o crescimento vegetativo e a formação de conídios, que são estruturas reprodutivas importantes para a disseminação do fungo, esse gene está envolvido na resposta a múltiplos estresses, como estresse oxidativo e osmótico, a sua deleção pode tornar o fungo mais vulnerável a esses estresses (ELÍAS-VILLALOBOS *et al.*, 2015).

A parede celular é decisiva para a sobrevivência do fungo em diferentes ambientes. A ausência do gene *HOS2* pode comprometer a integridade da parede celular, tornando o fungo mais

suscetível a agentes antifúngicos e ao sistema imunitário do hospedeiro. Sua deleção, também, pode levar a alterações na expressão de genes responsáveis pela expressão gênica, afetando a capacidade do fungo de causar infecções. Essas mudanças podem reduzir a virulência do *C. neoformans*, tornando-o menos capaz de causar infecções graves. Esses estudos são importantes para entender os mecanismos de patogenicidade e podem ajudar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (BRANDÃO *et al.*, 2018).

Outra linhagem desenvolvida a partir de deleção de genes de HDAC foi a *hda1Δ/hos2Δ*, onde os dois genes foram removidos de forma simultânea. As histonas desacetilases HDA1 e HOS2 desempenham papéis distintos e redundantes na regulação da virulência do fungo. A deleção de cada gene individualmente (*HDA1Δ* ou *HOS2Δ*) resulta em alterações na expressão de genes associados à virulência, mas a deleção simultânea (*hda1Δ/hos2Δ*) tem um efeito ainda mais pronunciado (BRANDÃO *et al.*, 2018).

A mutação *hda1Δ* resulta na perda da função da *HDA1*, reintrodução do gene *HDA1* permite observar como a restauração dessa função afeta a expressão gênica e a virulência do patógeno. A linhagem *hda1Δ+HDA1* é utilizada para investigar como a modulação da atividade de HDA1 influencia a capacidade do *Cryptococcus* de causar infecção. Isso inclui a análise de fatores de virulência, como a produção de cápsula e a resistência a condições adversas (ZACCHI *et al.*, 2010).

1.6 Epigenética

A epigenética trata de eventos de expressão gênica que não envolvem alterações na sequência de resíduos de nucleotídeos do DNA. Essas mudanças são frequentemente mediadas por modificações químicas no DNA e nas proteínas associadas, como as histonas. As histonas são proteínas que ajudam a compactar o DNA dentro do núcleo celular, formando a cromatina. A modificação pós-traducional das histonas é um mecanismo importante na regulação da expressão gênica (IRACANE *et al.*, 2021).

As modificações pós-traducionais das histonas incluem acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação. Essas modificações podem alterar a estrutura da cromatina e, conseqüentemente, a acessibilidade do DNA para a maquinaria de transcrição. As histonas desacetilases (HDACs) removem grupos acetil das histonas, resultando em uma cromatina mais compacta e menos acessível para a transcrição gênica. A atividade das HDACs está frequentemente associada à repressão gênica. Enquanto as histonas acetilases (HATs) adicionam grupos acetil, neutralizando a carga positiva das lisinas na cauda N-terminal das histonas. Isso enfraquece as interações eletrostáticas entre as histonas e o DNA, resultando em uma cromatina

mais relaxada e acessível para a transcrição (**Figura 2**) (SINGH *et al.*, 2024).

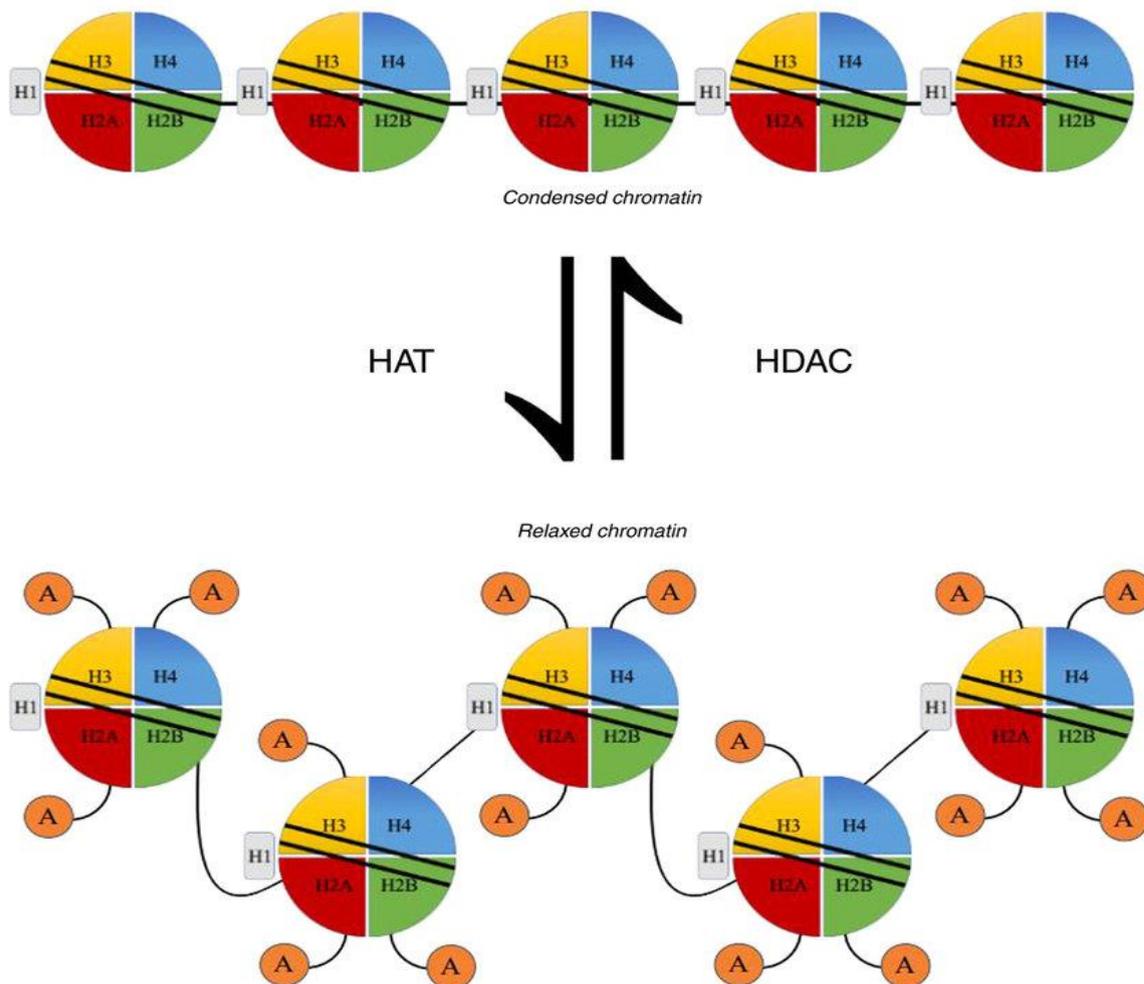


Figura 2: Ilustração esquemática da remodelação de cromatina por acetilação e desacetilação das histonas por histonas acetilases e histonas desacetilases, respectivamente. A acetilação promove um relaxamento da cromatina, facilitando a transcrição e a desacetilação deixa a cromatina mais compacta, dificultando esse processo (GARMPPI *et al.*, 2022).

As HDACs são classificadas em quatro classes principais (I, IIa, IIb, IV) com base em suas semelhanças estruturais e funcionais, auxiliam o fungo a adaptar-se a diferentes condições ambientais, como mudanças de temperatura e disponibilidade de nutrientes. Essa adaptação ajuda a sobrevivência do fungo no hospedeiro e para a sua capacidade de causar infecção. A atividade das HDACs pode influenciar a forma como o fungo é reconhecido pelo sistema imunitário do hospedeiro. Alterações na expressão de genes de virulência podem modificar a resposta imune, facilitando a evasão do sistema imunitário e aumentando a virulência do fungo. Além dessas, existe um grupo separado conhecido como sirtuínas (Classe III), que são dependentes de NAD⁺ e têm funções distintas das HDACs clássicas (PATRA *et al.*, 2022).

1.7 Curcumina

1.7.1 Propriedades Medicinais – História e Origem

A curcumina é um polifenol que ocorre naturalmente na planta *Curcuma longa*, mais conhecida como cúrcuma ou açafrão-da-terra. A cúrcuma é nativa do sul e sudeste asiáticos, especialmente da Índia e Indonésia, onde é amplamente cultivada e utilizada tanto na culinária quanto na medicina tradicional. A curcumina foi isolada pela primeira vez em 1815 e é o principal composto responsável pela cor amarela vibrante da cúrcuma. Além de ser usada como tempero, a curcumina é conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e por seus potenciais e benefícios terapêuticos (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

Há muitas pesquisas científicas sobre os efeitos da curcumina, por possuir propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, ela é amplamente estudada, porque podem ajudar a combater doenças crônicas como artrite, doenças cardíacas e câncer. O foco de pesquisas recentes tem sido a melhoria da biodisponibilidade da curcumina, ou seja, da quantidade que é absorvida e utilizada pelo corpo. Isso inclui o uso de nanopartículas e outras tecnologias para aumentar sua eficácia (YEUNG *et al.*, 2019; BERTONCINI-SILVA *et al.*..., 2024).

Estudos em culturas celulares e animais indicam que a curcumina pode ter atividades preventivas e terapêuticas em doenças como câncer, obesidade, diabetes, doenças hepáticas, doenças neurodegenerativas (como Alzheimer e Parkinson), entre outras. A curcumina também tem mostrado benefícios em aplicações tópicas para doenças de pele, infecções e cicatrização de feridas. Esses estudos mostram o potencial da curcumina como um composto terapêutico promissor (BERTONCINI-SILVA *et al.*, 2024).

1.7.2 Propriedades Físico-Químicas da Curcumina

A curcumina é um polifenol com dois anéis aromáticos, cada um contendo um grupo hidroxila e um grupo metoxila. Esses anéis são ligados por uma cadeia de sete carbonos com dois grupos carbonila α,β -insaturados. Sua fórmula molecular é $C_{21}H_{20}O_6$ e seu peso molecular é 368,38 g/mol. Seu ponto de fusão é de aproximadamente 183 °C. Ela é pouco solúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos como etanol, metanol, acetona e dimetilsulfóxido (DMSO) (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

1.7.3 Curcumina como antifúngico

A curcumina atua contra fungos através de vários mecanismos específicos. Ela pode alterar a permeabilidade da membrana celular dos fungos ao se inserir nessa membrana, levando à perda

de íons e outras moléculas essenciais, comprometendo a integridade celular e, eventualmente, causando a morte celular. Ela promove também a inibição da síntese de ergosterol, um componente lipídico da membrana celular dos fungos importante para a integridade e fluidez dessa membrana, comprometendo a sua estrutura e função. O ergosterol, devido à sua presença exclusiva em fungos e ausência em células animais, é um alvo ideal para fármacos antifúngicos (CHEN *et al.*..., 2018).

A curcumina pode afetar vias de sinalização celular, como as mediadas por MAP-quinase e calcineurina, essenciais para a integridade da parede celular dos fungos. Além disso, atua como sequestrador de radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo nas células fúngicas e induzindo a morte celular. O estresse oxidativo é uma resposta natural das células a danos e infecções; sua redução compromete uma via crucial de defesa celular. A curcumina também inibe a adesão de espécies de *Candida* às células epiteliais humanas, prevenindo infecções. Esses mecanismos destacam a curcumina como uma opção promissora para o tratamento de infecções fúngicas. (MARTINS *et al.*, 2009; AZARI *et al.*, 2021; CRUZ *et al.*, 2024).

1.7.4 Curcumina como Modulador Epigenético

Os fármacos epigenéticos são substâncias que podem modificar a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA. Elas atuam em mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e a modificação de histonas, que regulam quais genes são ativados ou desativados. Esses fármacos têm mostrado grande potencial no tratamento de diversas doenças, incluindo câncer, doenças neurodegenerativas e distúrbios metabólicos. Por exemplo, inibidores de histona desacetilase (HDAC) e inibidores de DNA metiltransferase (DNMT) são duas classes de fármacos epigenéticos que estão sendo estudadas e utilizadas em terapias contra o câncer (HOGG *et al.*, 2020).

A aplicação médica dos fármacos epigenéticos é promissora porque elas podem reverter alterações epigenéticas anormais que contribuem para a progressão de doenças. No câncer, por exemplo, esses fármacos podem reativar genes supressores de tumor que foram silenciados por modificações epigenéticas. Além disso, elas têm o potencial de melhorar a eficácia de outras terapias, como a quimioterapia e a imunoterapia, tornando os tratamentos mais eficazes e personalizados. A pesquisa contínua nesse campo pode levar ao desenvolvimento de novas terapias que não apenas tratam os sintomas, mas também atacam as causas subjacentes das doenças (HOGG *et al.*, 2020).

A curcumina, um composto bioativo encontrado no açafrão-da-terra, tem se destacado como um potente modulador epigenético. Ela atua principalmente através da inibição das DNMTs e da regulação de modificações de histonas, como a acetilação e desacetilação, mediadas por HATs e HDACs (HASSAN *et al.*, 2019). Além disso, a curcumina pode influenciar a expressão de

microRNAs (miRNAs), que são pequenos RNAs não codificantes envolvidos na regulação pós-transcricional de genes (REUTER, *et al.*, 2011). Essas propriedades tornam a curcumina uma candidata promissora para o tratamento de diversas doenças, incluindo câncer, doenças neurodegenerativas, inflamatórias e infecciosas, ao reverter alterações epigenéticas anormais e restaurar a expressão gênica normal, e também pode atuar como agente de ligação ao DNA e interagir com fatores de transcrição, modulando a expressão de genes envolvidos em processos como inflamação, apoptose e proliferação celular (LÚCIO, *et al.*, 2017; MASSARANI & LOBO, 2021).

A curcumina pode modular a expressão de miRNAs, que são pequenas moléculas de RNA não codificantes, geralmente com cerca de 17 a 25 nucleotídeos, que desempenham um papel crucial na regulação da expressão gênica. Eles funcionam ligando-se a RNAs mensageiros (mRNAs) específicos, geralmente resultando na repressão da tradução ou na degradação do mRNA alvo. Essa regulação é essencial para muitos processos biológicos, incluindo desenvolvimento, diferenciação celular e resposta ao estresse (FREITAS, 2017).

A pesquisa sobre os efeitos da curcumina em miRNAs especificamente em leveduras ainda é limitada. No entanto, estudos têm mostrado que a curcumina possui propriedades antifúngicas e pode afetar a expressão gênica em leveduras, como as do complexo *C. neoformans*, interferindo na síntese de ergosterol. O ergosterol é produzido através de uma via biossintética complexa, que é essencial para a formação da membrana celular fúngica (MATHA *et al.*, 2024).

Esse processo envolve várias etapas enzimáticas, começando com a conversão de acetil-CoA em mevalonato, que é então transformado em farnesil pirofosfato. Este composto é convertido em esqualeno, que passa por ciclização para formar lanosterol. Finalmente, o lanosterol é modificado por várias enzimas para produzir ergosterol, causando danos à célula. Embora a modulação direta de miRNAs por curcumina em leveduras não esteja bem documentada, a capacidade da curcumina de alterar a expressão gênica sugere que ela pode ter efeitos indiretos sobre os miRNAs e podem estar envolvidos na regulação da biossíntese de ergosterol (**Figura 3.A**) (FREITAS, 2017; LÚCIO, *et al.*, 2017; MATHA *et al.*, 2024).

A curcumina pode inibir a atividade das HATs e HDACs, enzimas que adicionam ou removem grupos acetila das histonas. A inibição das HDACs pela curcumina resulta em um aumento da acetilação das histonas, isso leva a uma estrutura de cromatina mais aberta e acessível, facilitando a transcrição de genes que podem estar envolvidos em processos de resposta ao estresse e reparo do DNA. Por outro lado, a inibição das HATs pode reduzir a acetilação das histonas, resultando na repressão de genes que promovem a proliferação celular (**Figura 3.B**) (LÚCIO, *et al.*, 2017).

A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos que pode ser afetado pela curcumina, por sua capacidade de inibir as DNMTs, que são enzimas responsáveis pela metilação do DNA. Esse processo epigenético afeta a expressão de genes importantes no metabolismo fúngico, e a inibição das DNMTs pela curcumina pode levar à desmetilação do DNA, resultando na reativação de genes que foram silenciados (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

Estudos *in vitro* e *in silico* demonstraram que a curcumina pode se ligar diretamente às DNMTs, bloqueando sua atividade catalítica. Isso impede a transferência de grupos metil para o DNA, gerando uma hipometilação e assim revertendo as modificações epigenéticas associadas ao desenvolvimento das células (**Figura 3.C**). Além disso, a curcumina pode influenciar a expressão de genes envolvidos em processos celulares críticos, como a apoptose e a proliferação celular. Em leveduras, a curcumina pode interferir na atividade das DNMTs, resultando em alterações epigenéticas que podem impactar processos celulares importantes. (LÚCIO, *et al.*, 2017; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; CARDONA ECHEVERRY *et al.*, 2016).

Para mais, a curcumina pode influenciar a expressão de genes relacionados ao metabolismo e à sobrevivência celular em leveduras. Estudos têm mostrado que a curcumina pode modular a expressão de genes que regulam a apoptose e a resposta antioxidante, contribuindo para a resistência ao estresse oxidativo (**Figura 3.D**). A **Tabela 2** mostra alguns exemplos de genes que podem ter sua expressão influenciada pela curcumina (FREITAS, 2017; LÚCIO, *et al.*, 2017).

Tabela 2: Genes específicos relacionados ao metabolismo e à sobrevivência celular que podem ser afetados pela curcumina.

<i>SOD1 e SOD2</i>	Genes que codificam superóxido dismutases, enzimas que protegem contra o estresse oxidativo.
<i>HSP30</i>	Gene que codifica uma proteína de choque térmico, ajudando na resposta ao estresse celular.
<i>ATP2</i>	Envolvido na produção de ATP, essencial para o metabolismo energético.
<i>CYT1</i>	Codifica a citocromo c1, uma proteína importante na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.
<i>YCA1</i>	Gene que codifica uma caspase, envolvida na apoptose ou morte celular programada.

Fonte: autoria própria com adaptação de FREITAS, 2017; LÚCIO, *et al.*, 2017.

Figura 3: Esquema ilustrativo dos principais mecanismo de alterações epigenéticas causadas pela ação da curcumina.

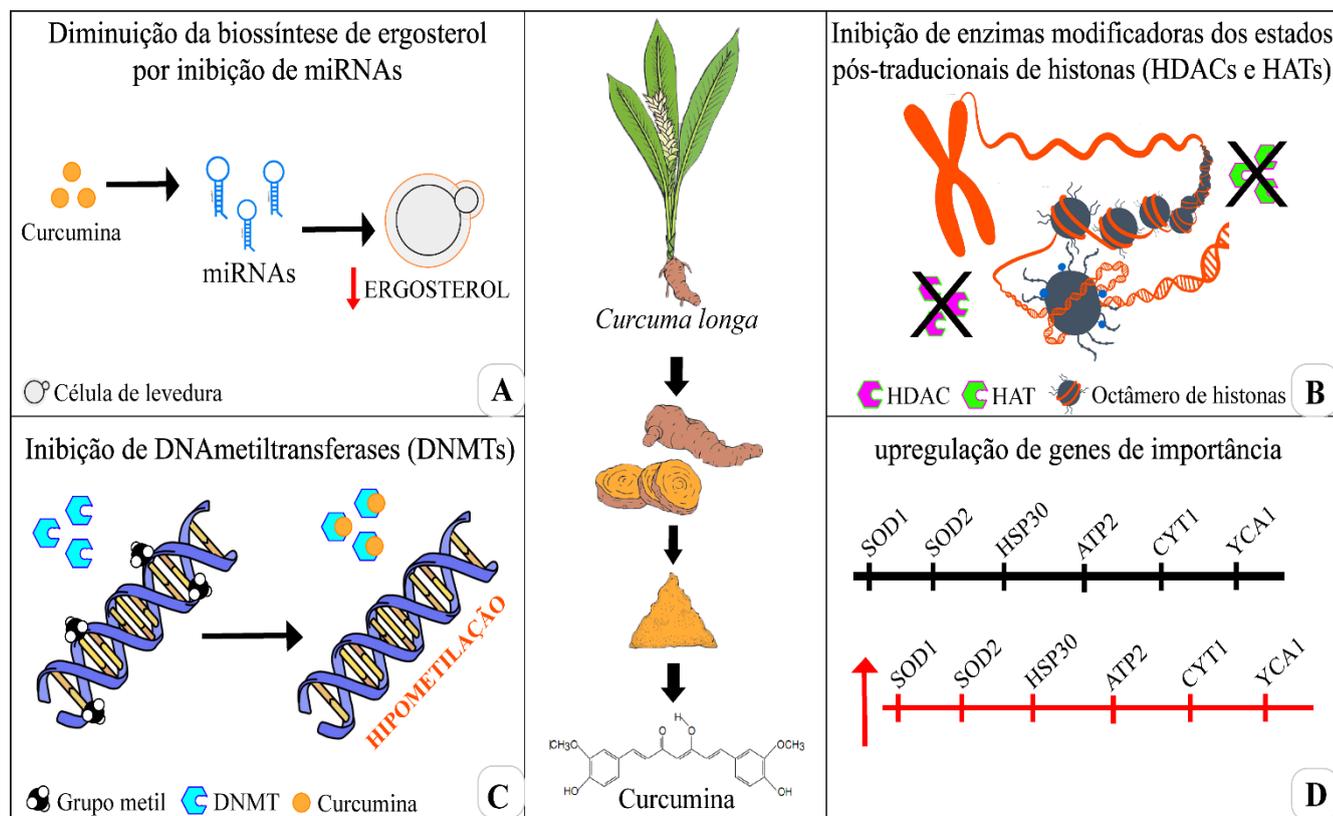


Figura 3: A – A curcumina pode diminuir a síntese de ergosterol, por inibição dos microRNAs, a alteração da expressão gênica sugere que ela pode ter efeitos indiretos sobre os miRNAs e podem estar envolvidos na regulação da biossíntese de ergosterol, deixando a levedura mais susceptível à morte celular. B - A inibição das histonas desacetilases (HDACs) pela curcumina aumenta a acetilação das histonas, abrindo a cromatina e facilitando a transcrição de genes de resposta ao estresse e reparo do DNA. Já a inibição das histonas acetilases (HATs) reduz a acetilação, reprimindo genes que promovem a proliferação celular. C - A curcumina pode se ligar às DNA metiltransferases (DNMTs), bloqueando sua atividade e causando hipometilação, revertendo modificações epigenéticas celulares. D – A curcumina pode modular a expressão de genes que regulam a apoptose e a resposta antioxidante, contribuindo para a resistência ao estresse oxidativo. Fonte: Adaptação de MING, *et al.*, 2022.

1.8 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica que combina um agente fotossensibilizante, luz e oxigênio molecular para eliminar células patogênicas, incluindo células fúngicas. Inicialmente desenvolvida para o tratamento de tumores, a TFD tem se mostrado eficaz no controle de infecções fúngicas devido à possibilidade de limitar seus efeitos citotóxicos às células alvo (ISSA & MANELA-AZULAY, 2010; NUNES, 2023).

O mecanismo de ação da TFD se baseia geralmente na combinação de três componentes: 1) um composto químico fotossensibilizante que se acumula nas células alvo, 2) uma fonte de luz, que geralmente é um laser ou LED que emite luz em um comprimento de onda específico, e 3) oxigênio molecular. Quando o fotossensibilizante é ativado pela luz, ele reage com o oxigênio presente nos tecidos para produzir EROs. Essas espécies reativas são altamente tóxicas para as

células, causando danos às membranas celulares, proteínas e DNA, levando à morte celular. (TOREZAN & FESTA NETO, 2010)

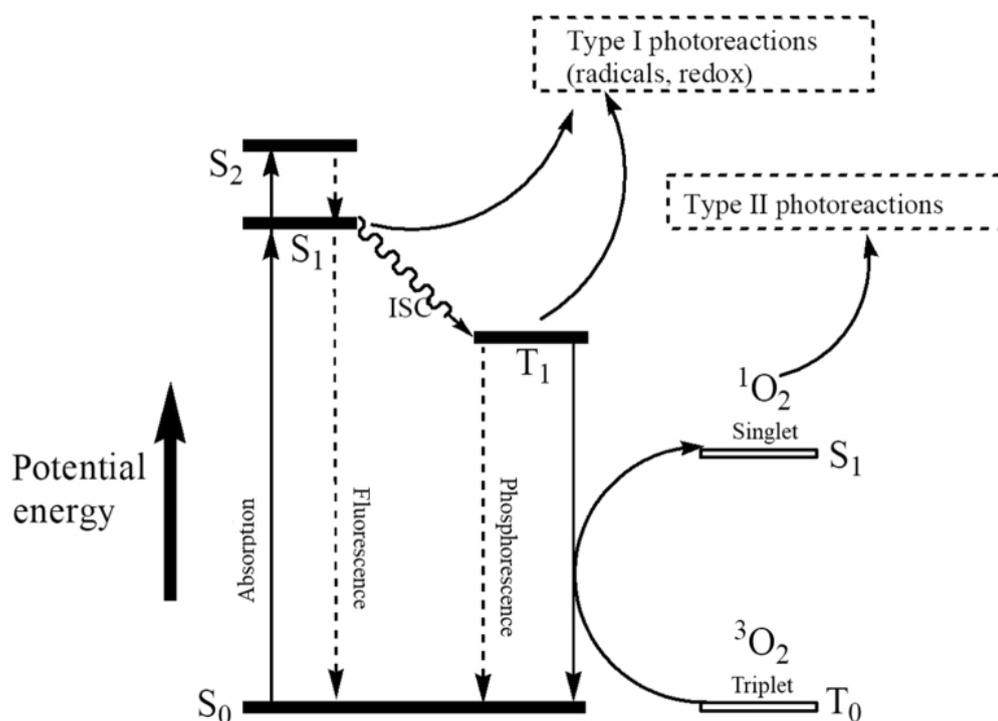


Figura 4: Diagrama de Jablonski mostrando os principais eventos que levam às reações fotoquímicas do tipo I e do tipo II, que eventualmente podem resultar em dano oxidativo às células. S₀, estado fundamental do fotossensibilizante (FS); S₁, primeiro estado singlete excitado do FS; S₂, segundo estado singlete excitado do FS; T₁, primeiro estado tripleto excitado do FS; ISC, cruzamento intersistêmico; ³O₂, oxigênio tripleto; ¹O₂, oxigênio singlete (ZHANG, *et al.*, 2018).

Comparada a outras terapias, a TFD é relativamente acessível financeiramente e pode ser altamente eficaz na eliminação de células fúngicas, especialmente quando os tratamentos convencionais falham. Como desafios pode-se dizer que a eficácia da TFD pode ser limitada pela capacidade da luz de penetrar em tecidos mais profundos e que a escolha do agente fotossensibilizante é decisiva para o sucesso do tratamento (TOREZAN & FESTA NETO, 2010).

Essas substâncias fotossensibilizantes são escolhidas com base em suas propriedades fotofísicas, como alto rendimento quântico de produção de EROs e absorção em comprimentos de onda específicos, que permitem uma penetração eficaz da luz nos tecidos. Na tabela 3, estão listados os principais fotossensibilizantes e suas respectivas utilidades (MACHADO, 2000).

Tabela 3. Classes de fotossensibilizantes utilizados na terapia fotodinâmica e suas descrições.

Classe	Fotossensibilizante	Descrição
Porfirinas	Hematoporfirina (Hp)	Um dos primeiros fotossensibilizantes utilizados, derivado da hemoglobina.
	Porfimer sódico (Photofrin®)	Utilizado principalmente no tratamento de cânceres superficiais.
Clorinas	Clorina e6	Derivada da clorofila, eficaz devido à sua alta absorção de luz.
	Talaporfina (Laserphyrin®)	Utilizada em várias aplicações clínicas devido à sua alta eficiência.
Ftalocianinas	Ftalocianina de alumínio	Possui alta absorção de luz e é eficaz em profundidades maiores de tecido.
	Ftalocianina de zinco	Utilizada para tratar tumores devido à sua alta eficácia fotodinâmica.
Outros	Metilaminolevulinato (Metvix®)	Aprovado para uso em dermatologia, especialmente para tratamento de queratoses actínicas.
	5-ALA (Ácido 5-aminolevulínico)	Utilizado como precursor fotossensibilizante em várias aplicações clínicas

Fonte: Autoria própria, 2024. Adaptação de Zhang, *et al.*, 2018.

1.8.1 Terapia Fotodinâmica em fungos leveduriformes

Na área de micologia, a TFD tem sido estudada principalmente para o tratamento de infecções causadas por *Candida albicans*, um fungo leveduriforme comum que pode causar candidíase. Estudos experimentais demonstraram a eficácia da TFD em reduzir significativamente a carga fúngica em modelos animais. Pode ser direcionada especificamente para as células fúngicas, minimizando danos aos tecidos circundantes. Ao contrário de alguns antifúngicos tradicionais, a TFD não induz facilmente resistência nos fungos e ainda pode ser utilizada em diferentes tipos de infecções e em várias partes do corpo (SOUSA, *et al.*, 2023).

A TFD também tem sido explorada como uma abordagem potencial no tratamento de infecções causadas por fungos do gênero *Cryptococcus*, incluindo *C. neoformans* e *C. gattii*. Pesquisas preliminares indicam que a TFD pode ser eficaz contra esse gênero, reduzindo a viabilidade dos fungos em culturas laboratoriais. No entanto, a aplicação clínica ainda está em fases iniciais de estudo, e mais pesquisas são necessárias para determinar a eficácia e segurança do tratamento em humanos. Em resumo, a TFD representa uma abordagem promissora e inovadora no tratamento de infecções por fungos leveduriformes, com potencial para complementar ou substituir tratamentos antifúngicos convencionais em certos casos (MORAIS *et al.*, 2020).

1.8.2 Uso da Nanotecnologia em TFD

Uma das principais aplicações da nanotecnologia na TFD é o uso de nanopartículas como carreadores de fotossensibilizantes. Essas nanopartículas podem ser projetadas para melhorar a solubilidade, estabilidade e especificidade dos fotossensibilizantes, permitindo uma entrega mais eficiente e direcionada às células alvo. Elas podem ser funcionalizadas com ligantes específicos que reconhecem e se ligam a marcadores presentes em células tumorais ou patogênicas, como microrganismos. Isso aumenta a especificidade da TFD, reduzindo os danos aos tecidos saudáveis e minimizando os efeitos colaterais (DIAS, *et al.*, 2021).

A nanotecnologia também pode ajudar a melhorar a penetração da luz nos tecidos. Nanopartículas podem ser usadas para converter luz de um comprimento de onda para outro, permitindo que a luz penetre mais profundamente nos tecidos e ative os fotossensibilizantes de maneira mais eficaz (OLIVEIRA, *et al.*, 2022).

A integração da nanotecnologia na TFD tem mostrado resultados promissores em várias áreas, incluindo oncologia, dermatologia e odontologia. Estudos clínicos estão em andamento para avaliar a eficácia e segurança dessas abordagens combinadas. Com o avanço contínuo da nanotecnologia, espera-se que a TFD se torne ainda mais eficaz e amplamente aplicável no tratamento de diversas condições médicas (OLIVEIRA, *et al.*, 2022; RANJAN *et al.*, 2021; NUNES, 2023).

A nanotecnologia possibilita o preparo de nanoemulsões, que são emulsões com gotículas pequenas, com diâmetros geralmente entre 20 e 200 nm. Essas nanoemulsões encapsulam substâncias fotossensibilizantes, permitindo sua entrega precisa e direcionada às células-alvo. Nosso grupo de pesquisa tem utilizado a nanoemulsão de alumínio-ftalocianina (NEAIFtCl) para tratar células tumorais de melanoma murino, controlar o crescimento de *Cryptococcus* spp. *in vitro* e testar atividade em combinação com fármacos epigenéticos em espécies de *Candida* spp (MUEHLMANN *et al.*, 2015; MORAIS *et al.*, 2020; RANJAN *et al.*, 2021; NUNES, 2023).

2. JUSTIFICATIVA

Embora a TFD tenha sido amplamente estudada e aplicada em várias áreas médicas, sua eficácia e aplicabilidade no tratamento de infecções fúngicas causadas por leveduras ainda estão em desenvolvimento, com informações limitadas disponíveis na literatura. Infecções como a criptococose representam um desafio significativo para a prática clínica devido à sua crescente incidência, resistência dos isolados aos antifúngicos e altas taxas de morbidade e mortalidade associadas. O tratamento tradicional com antifúngicos tem limitações, como toxicidade e a seleção de linhagens resistentes desses patógenos. Portanto, novas abordagens terapêuticas são

necessárias para auxiliar no combate a essas infecções.

A curcumina, um composto bioativo encontrado na cúrcuma, tem mostrado potencial no combate a infecções fúngicas, incluindo aquelas causadas por *Cryptococcus* spp. Além disso, a curcumina tem demonstrado sinergia quando combinada com antifúngicos tradicionais, como o fluconazol e a anfotericina B, aumentando a eficácia desses tratamentos. Essa combinação pode ser particularmente útil no tratamento de infecções resistentes, como a criptococose, que é causada por *C. neoformans* e *C. gattii*.

A combinação de nanoemulsões de alumínio-ftalocianina e curcumina tem mostrado resultados promissores em estudos de terapia fotodinâmica (TFD) antimicrobiana envolvendo fungos. Informações valiosas sobre os efeitos dessa terapia, a otimização dos protocolos de tratamento, a avaliação de combinações terapêuticas e o desenvolvimento de novos agentes fotossensibilizantes têm sido publicadas, destacando seu potencial como alternativas eficazes de tratamento. Esses estudos não apenas elucidam os mecanismos de ação, mas também fornecem diretrizes para a aplicação clínica, tornando essa abordagem uma opção viável e inovadora no combate a infecções fúngicas

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Esse estudo tem por objetivo principal investigar a eficácia do tratamento combinatório com curcumina e da aplicação TFD mediada por nanoemulsão de cloreto de alumínio-ftalocianina (NE-AIFtCl) sobre *Cryptococcus neoformans* e verificar o eventual envolvimento de vias epigenéticas sobre a resposta celular contra esta terapia.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse estudo são:

- Definir a CIM (concentração inibitória mínima) da curcumina nos fungos *C. neoformans* linhagens: H99 (selvagem), 89-610 e T1 (tolerantes ao fluconazol), das mutantes *hda1Δ*, *hos2Δ*, *hda1Δ/hos2Δ* e a linhagem reconstituída *hda1Δ + HDA1*.
- Estabelecer concentrações adequadas de NE-AIFtCl capazes de diminuir ou inibir a proliferação durante a aplicação de TFD nas linhagens estudadas.
- Verificar os efeitos da combinação de TFD e da curcumina sobre a proliferação das linhagens: H99 (selvagem) e das mutantes *hda1Δ*, *hos2Δ*.
- Verificar por MEV (microscopia eletrônica de varredura) as possíveis alterações

morfológicas na superfície das células de *C. neoformans* nas linhagens H99 (selvagem) e das mutantes *hda1Δ*, *hos2Δ*, após exposição a concentrações CIM₅₀ E CIM₁₀₀ de curcumina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo da Nanoemulsão de Cloreto de Alumínio-Ftalocianina (NE-AIFtCl)

A nanoemulsão foi desenvolvida no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília – UnB pelo Professor Doutor Luis Alexandre Muehlmann segundo protocolo estabelecido pelo grupo (MUEHLMANN *et al.*, 2015). Para a nanoemulsão contendo cloreto de ftalocianina de alumínio (AIFtCl) foi utilizado Kolliphor EPL® como tensoativo e o óleo de rícino como solubilizante, na proporção de 3:1, respectivamente. A concentração de AIFtCl na nanoformulação final foi de 40 µM. As diferentes concentrações de NE-AIFtCl utilizadas foram preparadas por diluição em PBS imediatamente antes do uso.

4.2 Caracterização das nanoemulsões

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 dos resultados foi realizada em triplicata.

4.3 Linhagens de Microorganismos Utilizados

C. neoformans tipo selvagem H99 e as linhagens 89-610 e T1 resistentes ao fluconazol foram fornecidos pelo Dr. Joseph Heitman Laboratory (Duke University Medical Center, Durham-EUA).

As linhagens *hda1Δ*, *hos2Δ*, *hda1Δ/hos2Δ* e a linhagem reconstituída *hda1Δ + HDA1* foram geradas e caracterizadas fenotipicamente por nosso grupo. (BRANDÃO, 2018).

As linhagens do estudo foram armazenadas como estoques em glicerol a 35% e mantidas a -80 °C. Para os experimentos, as linhagens foram descongeladas e cultivadas em placas de ágar YPD a 30 °C por 3 dias.

4.4 Preparo dos meios de cultivo e fármacos

As células de *C. neoformans* foram cultivadas em meio Extrato de Levedura-Pepton-Dextrose (YPD) líquido (1% de extrato de levedura, 2% de pepton, 2% de glicose, pH 5,6) a 30 rpm por 24h ou em meio YPD sólido (com adição de 1,8% de ágar) por 72h.

O meio de cultura utilizado nos ensaios de densidade celular foi o Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, preparado para um volume de 500 mL [2x], tamponado com ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico (MOPS) e pH ajustado para 5,6 em seguida filtrado em 0,45 µM, armazenado em garrafas de vidro e mantido em 4-8 °C. O protocolo CLSI M27-A4 utilizado foi padronizado pelo próprio grupo de pesquisa, porém foi utilizada cultura Yeast-Peptide-Dextrose (YPD) para determinar a MIC de *Cryptococcus*, pois é um meio adequado para o crescimento dessa levedura. O YPD é comumente utilizado em testes de suscetibilidade para fungos. (NUNES, 2023).

A curcumina (*Curcuma longa* [65%]) foi adquirida da Sigma Aldrich (MO, EUA). A solução de curcumina foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) 100% e utilizada nas concentrações de 0,1% a 0,4% nos meios de cultivo, e em todos os testes a toxicidade do DMSO foi testada.

4.5 Inóculo e semeadura das leveduras

As leveduras foram descongeladas e semeadas em placas de 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 4 mL de YPD líquido a 30 rpm a 28 °C por 24 h. Após o crescimento, as leveduras foram centrifugadas por 5 min, a 3500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram resuspensas com mesmo volume de Phosphate-buffered saline (PBS), procedimento repetido 2X a fim de se remover resquícios de YPD. A concentração de células foi ajustada para 2×10^5 células/mL em PBS para determinação da CIM, sendo 4×10^4 células para cada poço de 200 microlitros.

4.6 Avaliação de CIM de curcumina por ensaios de microdiluição em caldo.

A curcumina foi dissolvida em DMSO para obtenção de solução estoque e mantida congelada. Para a investigação da CIM foram utilizadas diluições de curcumina em meio RPMI, inicialmente estabelecida por diluição seriada (1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62.5 µg/mL; 31.25 µg/mL; 15.6 µg/mL; 7.8 µg/mL; 3,9 µg/mL; 1,9 µg/mL e 1 µg/mL) e refinada nas concentrações de 1 a 30 µg/mL.

Controles de células expostas ou não a fármacos, bem como controles sem células foram estabelecidos. As placas foram protegidas da luz e incubadas a 37 °C, simulando temperatura corporal de mamíferos. O crescimento ou a ausência de crescimento em cada poço foi avaliado de forma visual após 72 horas de incubação a 37 °C sob agitação orbital de 150 rpm. Foram realizados três experimentos independentes para cada condição experimental. A concentração da CIM foi definida como a concentração mais baixa que inibiu completamente o crescimento fúngico em placa de poliestireno de 96 poços.

4.7 Avaliação da CIM de NE-AIFtCl.

Para avaliar a concentração de nanoemulsão que mais proporciona impactos significativos na diminuição da proliferação das linhagens de leveduras, foram utilizadas diferentes concentrações de NE-AIFtCl como fotossensibilizante [1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 300 ou 400 nM], seguindo de diluição refinada nas concentrações de 1 a 20 nM. As leveduras foram expostas a diferentes concentrações de nanoemulsão e incubadas a 28 °C sob agitação em plataforma inclinada a 50 rpm por 30 min, seguindo protocolos do melhor tempo de internalização da nanoemulsão previamente estabelecidos pelo nosso grupo de pesquisa. Após o período de exposição à nanoemulsão, as células foram centrifugadas por 5 min a 12000 rpm, lavadas em PBS para remoção de resíduos da nanoemulsão não internalizada e ressuspensas em meio RPMI com as devidas concentrações.

As leveduras foram distribuídas em duas microplacas de poliestireno com 96 poços. Uma das placas foi irradiada com LED a 8 cm de distância no comprimento de onda de 660 nm e potência de 59,71 mW/cm² pelos seguintes tempos: 5 min com fluência de 17,91 J/cm², 10 min com fluência de 35,83 J/cm², 20 min com fluência de 71,66 J/cm² e 30 min com fluência de 107,49 J/cm² (aparelho desenvolvido pelo Professor Paulo Eduardo Souza, no Laboratório de Softwares e Instrumentalização do Departamento de Física Aplicada da UnB). A outra placa foi mantida no escuro a fim de avaliar os efeitos da aplicação de TFD sobre a proliferação das leveduras utilizando diferentes concentrações de nanoemulsão como fotossensibilizante em diferentes tempos.

4.8 TFD combinada com curcumina sobre linhagens de *Cryptococcus* spp.

Para avaliar o impacto da TFD associada à pré-exposição à curcumina sobre o crescimento de *Cryptococcus* spp., as leveduras foram estriadas em meio ágar YPD e incubadas a 28 °C por 2 a 5 dias a fim de obter colônias isoladas. Antes de cada experimento, foi realizado um inóculo em 2 mL de meio líquido YPD adicionados de concentrações de 0%, 50% e 75% da CIM encontrado

previamente para a curcumina. Esse inóculo em meio de cultura mais curcumina foi incubado a 28 °C em plataforma giratória inclinada por 24 horas.

Após a incubação, a cultura foi centrifugada por 5 min a 3500 rpm e o sobrenadante descartado, seguindo-se de duas lavagens com 4 mL de tampão fosfato salino (PBS) para remover o excesso de componentes do meio de cultura e da curcumina não internalizada nas células. Logo após a lavagem, as células foram ressuspensas em PBS, homogeneizadas e contadas em câmara de newbauer para ajuste de concentração de células a 2×10^5 células/mL. As células foram tratadas nas concentrações de 50% e 75% das CIM de NE-AlFtCl e incubadas a 28 °C sob agitação em plataforma inclinada a 50 rpm por 30 min. Após o período de exposição à nanoemulsão, as células foram centrifugadas por 5 min a 12000 rpm, lavadas em PBS para remoção de resíduos da nanoemulsão não internalizada e ressuspensas em meio RPMI.

As leveduras foram distribuídas em duas placas de poliestireno de 96 poços, uma foi mantida no escuro, e outra foi irradiada com LED a 8 cm de distância no comprimento de onda de 660 nm por 10 min, com potência de $59,71 \text{ mW/cm}^2$ e fluência de $35,83 \text{ J/cm}^2$ (aparelho desenvolvido pelo Professor Paulo Eduardo Souza, no Laboratório de Softwares e Instrumentalização do Departamento de Física Aplicada da UnB). Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C sob agitação orbital em espectrofotômetro/incubadora (Epoch 2 EON Microplate reader, Biotek Inc, USA), com leitura de densidade óptica a 600 nm a cada hora por 72 horas.

4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As leveduras foram estriadas em meio ágar YPD e incubadas a 28 °C por 3 dias a fim de obter colônias isoladas. Antes do experimento, foi realizado um inóculo em 2 mL de meio líquido YPD adicionados de concentrações de 0%, 50% e 100% da CIM encontrado previamente para a curcumina. Esse inóculo, meio de cultura mais curcumina, foi incubado a 28 °C em plataforma giratória inclinada por 72 horas.

As amostras biológicas foram fixadas para preservar sua estrutura. Isso foi feito usando fixador KARNOVSKY'S (2% de glutaraldeído + 2% de paraformaldeído em Solução Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M (PH 7,2 – 7,4) a 4 °C. (JEOL Jsm 7001). Após fixação em tetróxido de ósmio 0,1%, pH 7,2 por 1h no escuro, em temperatura ambiente. Então, foram desidratadas em uma série crescente de concentrações de etanol. A desidratação final foi feita usando um secador de ponto crítico para evitar a deformação da amostra. As amostras foram montadas em suportes de alumínio usando adesivo condutor.

As amostras são revestidas com uma fina camada de ouro para torná-las condutoras e

melhorar a qualidade da imagem, em seguida é colocada na câmara de vácuo do MEV.

Foram feitos ajustes da voltagem de aceleração, corrente do feixe e outros parâmetros para otimizar a resolução e o contraste. Foram capturadas imagens em aumentos de 15.000x, 1.500x e 500x de células individuais e em grupos.

4.10 Análises Estatísticas

Os gráficos e a análise de variância (ANOVA de dois fatores) foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. As curvas de crescimento celular foram obtidas e comparadas com os respectivos controles. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, sendo as médias das triplicatas técnicas de três experimentos independentes avaliadas estatisticamente. Gráficos de linha foram gerados para ilustrar as curvas de crescimento dos microrganismos, enquanto histogramas foram utilizados para representar a área sob a curva.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Concentração inibitória mínima de Curcumina verificada para linhagens de *C. neoformans*

As CIMs de curcumina que aboliram completamente o crescimento das linhagens de *C. neoformans* são mostrados na **Tabela 4**. As linhagens 89-6105797 (tolerante ao fluconazol) e *hos2* Δ (mutante) foram as mais suscetíveis à curcumina, enquanto a *hda1* Δ (mutante) e *hda1* Δ /*hos2* Δ (duplo mutante) foram as mais resistentes. As linhagens H99 (selvagem), T1-5796 (tolerante ao fluconazol) e a *hda1* Δ +*HDA1* (reconstituída) apresentaram os mesmos valores de CIM.

Tabela 4: Determinação de Concentração Inibitória Mínima de curcumina em diferentes linhagens de *Cryptococcus neoformans*

LINHAGEM	CIM – CURCUMINA LIVRE ($\mu\text{g/mL}$)
H99	22
T1-5796	22
89-6105797	20
<i>hda1</i> Δ	25
<i>hos2</i> Δ	20
<i>hda1</i> Δ / <i>hos2</i> Δ	25
<i>hda1</i> Δ + <i>HDA1</i>	22

Fonte: Autoria própria, dados da pesquisa. 2024.

As diferentes suscetibilidades à curcumina entre as diferentes linhagens de *C. neoformans* podem ser explicadas pelas funções dos genes deletados e reintroduzidos, bem como pela interação entre eles. As linhagens 89-6105797 (tolerante ao fluconazol) e *hos2* Δ (mutante) foram as mais suscetíveis à curcumina. A linhagem 89-6105797, embora tolerante ao fluconazol, por conter bombas de efluxo que externalizam esse fármaco, pode ter outras vias metabólicas ou de resistência comprometidas que aumentam sua suscetibilidade à curcumina.

Algumas possíveis vias comprometidas incluem as vias de detoxificação, nas quais as enzimas responsáveis pela neutralização de compostos tóxicos podem estar menos ativas ou ausentes, reduzindo a capacidade da célula de lidar com a curcumina. Além disso, deficiências em mecanismos de reparo de DNA podem aumentar a sensibilidade a agentes que causam danos ao DNA, como a curcumina. As vias de resposta ao estresse oxidativo também podem estar comprometidas, o que aumenta a suscetibilidade, já que a curcumina pode induzir estresse

oxidativo (QUEMEL, *et al.*, 2021).

A curcumina pode atuar como antioxidante ao neutralizar radicais livres e reduzir o dano oxidativo nas células. No entanto, em leveduras, ela pode promover estresse oxidativo ao interferir com a função mitocondrial e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse efeito dual depende da concentração de curcumina e do contexto celular (QUEMEL, *et al.*, 2021). Por fim, alterações em transportadores de efluxo de fármacos podem reduzir a capacidade da célula de expelir a curcumina, aumentando sua concentração intracelular e, conseqüentemente, sua toxicidade. Essas hipóteses ajudam a explicar a maior suscetibilidade da linhagem 89-6105797 à curcumina (SILVA, *et al.* 2021).

Já a linhagem *hos2Δ*, com a deleção do gene *HOS2*, pode ter a regulação da expressão gênica e a integridade celular afetadas, aumentando a suscetibilidade à curcumina. Sem essa enzima, a estrutura da cromatina pode se tornar mais aberta e acessível, levando a alterações na expressão de vários genes. Essas mudanças podem afetar processos celulares importantes, como a integridade da parede celular porque a regulação inadequada da expressão gênica pode resultar em uma parede celular menos robusta, tornando a célula mais vulnerável a agentes externos, como a curcumina e a resposta ao estresse oxidativo pode ser prejudicada, já que genes envolvidos na neutralização de espécies reativas de oxigênio podem não ser expressos adequadamente, aumentando a suscetibilidade ao dano oxidativo induzido pela curcumina (BRANDÃO *et al.*..., 2018; STEMPINSKI *et al.*, 2023).

Por outro lado, as linhagens *hda1Δ* (mutante) e *hda1Δ/hos2Δ* (duplo mutante) foram as mais resistentes. A deleção do gene *HDA1* pode desencadear uma série de respostas compensatórias na célula, aumentando a resistência à curcumina. *HDA1* codifica uma HDAC, uma enzima crucial para a modificação da cromatina e regulação da expressão gênica. Sem *HDA1*, a célula pode ativar outras HDAC, como *HOS2*, para assumir suas funções. Além disso, a perda de *HDA1* pode resultar em mudanças na expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo e na detoxificação, bem como na modificação da estrutura da cromatina, permitindo a expressão de genes anteriormente reprimidos. Essas alterações podem aumentar a capacidade da célula de resistir aos efeitos da curcumina (BAHL & SETO, 2021).

Quando há uma deleção dupla de *HDA1* e *HOS2* na linhagem *hda1Δ/hos2Δ*, a célula pode ativar ainda mais vias de resistência ou mecanismos de sobrevivência e pode levar à ativação de outras HDACs, das classes I e II, como *Rpd3*, *Hos1*, *Hos3*, *Hda2*, *Hda3* e *Sir2*, ou proteínas relacionadas para compensar a perda de ambas as enzimas (ZACCHI, *et al.*, 2010). Além disso, a deleção de ambos os genes pode aumentar a expressão de genes de resistência à curcumina e provocar alterações metabólicas que melhoram a capacidade da célula de lidar com

o estresse oxidativo. Esses mecanismos mostram a complexidade da adaptação celular e a capacidade de sobreviver a condições adversas, como a presença de curcumina (SPECKBACHER, *et al.*, 2021).

As linhagens H99 (selvagem), T1-5796 (tolerante ao fluconazol) e *hda1Δ*+HDA1 (reconstituída) apresentaram os mesmos valores de CIM. A linhagem H99 representa a resposta típica à curcumina sem modificações genéticas. A linhagem T1-5796, embora tolerante ao fluconazol, pode não ter outras vias de resistência afetadas, resultando em uma resposta semelhante à da linhagem selvagem. A reconstituição do gene *HDA1* na linhagem *hda1Δ* restaura as funções normais da histona desacetilase, resultando em uma resposta à curcumina semelhante à da linhagem selvagem. Essas diferenças refletem como a modificação genética pode influenciar a resposta a tratamentos antifúngicos, destacando a complexidade das interações genéticas e metabólicas em *C. neoformans* (RANJAN, *et al.*, 2024).

O estudo de Martins *et al.*, 2009, verificou uma CIM de 32 µg/mL para a curcumina contra *C. neoformans*, também demonstrou que a curcumina apresentou atividade antifúngica significativa contra várias cepas de fungos patogênicos. Especificamente, a curcumina foi eficaz contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* e *M. canis*. A curcumina inibiu o crescimento desses fungos, indicando seu potencial como um agente antifúngico clínico promissor. Além disso, naquele mesmo trabalho, foi reportado que a curcumina inibiu significativamente a adesão de espécies de *Candida* às células epiteliais humanas, especialmente na mucosa bucal de pacientes com AIDS.

Em sua tese de doutorado, Freitas 2017, verificou que a curcumina exibiu atividade antifúngica significativa contra isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*. Os compostos testados foram a curcumina e a morina e atuaram principalmente na membrana celular dos fungos, inibindo a síntese de ergosterol e causando danos à membrana. Além disso, ambos os compostos mostraram interações sinérgicas com antifúngicos convencionais, como o fluconazol e a anfotericina B, sem apresentar antagonismo em nenhuma combinação. Esses resultados indicam que a curcumina e a morina têm grande potencial como bioativos naturais para o desenvolvimento de novos tratamentos antifúngicos. A CIM verificada para as linhagens estudadas variaram na faixa de 8 a 64 µg/mL.

A curcumina apresentou atividade sobre isolados de *C. neoformans* com CIMs entre 20 a 25 µg/mL. Levando em consideração as CIMs encontradas em outros estudos, esta é uma faixa aceitável, mas é menor do que os valores relatados. Isso pode indicar uma maior eficácia da curcumina nas condições do experimento ou uma variação nas linhagens

de *Cryptococcus* utilizadas. Infere-se então que as condições experimentais e as características das linhagens possam interferir nesses resultados.

Para entender melhor os danos que a curcumina pode causar no fungo, a **figura 5** demonstra diferenças morfológicas analisadas por MEV em magnificação de 15.000x das linhagens *C. neoformans* H99, *hda1Δ* e *hos2Δ*, não expostas à curcumina e exposta à CIM₅₀ e CIM₁₀₀. Notavelmente, há alterações estruturais nas células, tanto entre si, quanto na diferença concentração em que ficaram expostas.

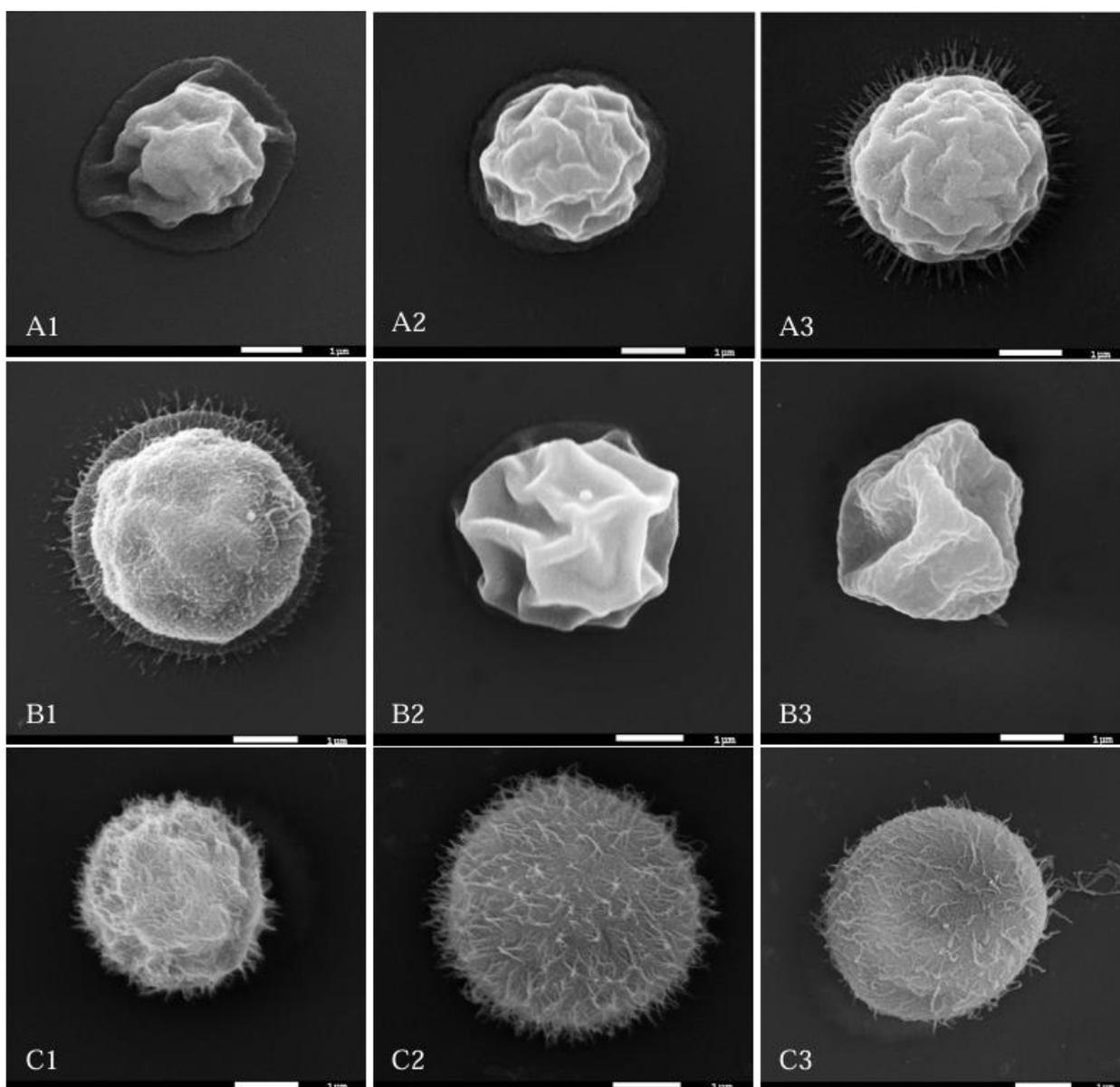


Figura 5. Imagens de microscopia de varredura (MEV) de *C. neoformans*, linhagem H99 e mutantes *hda1Δ* e *hos2Δ*. A linha A apresenta imagens de *C. neoformans* – H99 não expostas a fármaco (A1), expostas a 50% da concentração inibitória mínima de curcumina (A2) e expostas a concentração inibitória mínima de curcumina (A3). A linha B apresenta imagens da mutante – *hda1Δ*, não expostas a fármaco (B1), exposta a 50% da concentração inibitória mínima de curcumina (B2) e exposta a concentração inibitória mínima de curcumina (B3). A linha C apresenta imagens da mutante – *hos2Δ*, não expostas a fármaco (C1), expostas a 50% da concentração inibitória

mínima de curcumina (C2) e expostas a concentração inibitória mínima de curcumina (C3). Fonte: dados da pesquisa, 2024.

A curcumina pode reduzir o tamanho da cápsula polissacarídica do *C. neoformans*. A cápsula é um importante fator de virulência, pois ajuda o fungo a evadir o sistema imunitário do hospedeiro, impede que as células do sistema imunitário, como macrófagos e neutrófilos, fagocitem o fungo. Isso permite que o fungo sobreviva e se multiplique no organismo infectado (FREITAS, 2017).

Na figura 5, na linha A, pode-se observar que a linhagem H99 sem exposição à curcumina apresenta a levedura sem qualquer tratamento com uma cápsula íntegra, a célula parece ter uma superfície lisa e compacta, indicando sua forma típica e saudável (A1). Quando exposta à CIM₅₀, observa-se que a estrutura celular da levedura está relativamente semelhante ao controle, mas pode haver uma leve alteração na forma e textura da superfície, o que sugere que o CIM₅₀ de curcumina está começando a impactar a célula, mas sem causar danos estruturais extremos e CIM₁₀₀, cujo as mudanças são mais evidentes. A levedura apresenta uma superfície com filamentos ou projeções ao redor, indicando uma possível ruptura ou dano na membrana celular devido à concentração mais alta de curcumina. Esse efeito provavelmente compromete a integridade da célula, sugerindo que a CIM₁₀₀ tem um efeito letal ou quase letal.

A curcumina pode afetar a síntese de GXM, seu principal componente polissacarídico, essas alterações podem ser causadas por inibição de enzimas responsáveis pela síntese de GXM, pela interferência em várias vias de sinalização celular que regulam a produção de componentes da cápsula, pelas propriedades antioxidantes da curcumina, que podem reduzir o estresse oxidativo nas células fúngicas. Isso pode afetar a expressão de genes responsáveis pela síntese de GXM e pela alteração a permeabilidade da membrana celular, afetando o transporte de precursores necessários para a síntese desse polissacarídeo (PESSOA, *et al.*, 2012; FREITAS, 2017; JANBON, 2024).

Na figura 5, na linha B, observando as imagens das leveduras *C. neoformans* com a deleção do gene *HDA1* em três condições distintas (B1, B2 e B3), pode-se notar as seguintes diferenças: em B1 (sem tratamento), a célula parece ter uma superfície intacta, porém apresenta algumas projeções ao redor, o que pode indicar mudanças estruturais devido à deleção de *HDA1*, mesmo sem o tratamento com curcumina. Em B2 (CIM₅₀ de curcumina), observa-se uma modificação notável na estrutura da célula. A levedura parece mais enrugada e com uma deformação mais acentuada na superfície, indicando que a curcumina começa a impactar significativamente a célula, talvez alterando sua integridade de forma moderada e por fim em B3 (CIM₁₀₀ de curcumina), a célula apresenta uma forma ainda mais alterada, com uma

aparência mais colapsada e enrugada. A superfície parece ter sofrido danos graves, possivelmente indicando perda de viabilidade e integridade da membrana celular devido à alta concentração de curcumina.

O estudo de Brandão e colaboradores, 2018 discutiram as características morfológicas da cápsula do *C. neoformans*, linhagem mutante *hda1Δ*. A principal característica encontrada foi uma cápsula significativamente menor em comparação com a cepa selvagem. Isso sugere que a proteína HDA1 desempenha um papel crucial na regulação da síntese e manutenção da cápsula. Houve uma modificação na composição e redução dos polissacarídeos da cápsula, especialmente na GXM, que é o principal componente da cápsula. Devido à redução do tamanho e alterações na composição da cápsula, a linhagem *hda1Δ* foi facilmente fagocitada por macrófagos, indicando uma diminuição na virulência.

A curcumina já é conhecida por reduzir o tamanho da cápsula ao inibir a síntese de GXM. Na linhagem *hda1Δ*, que já apresenta uma cápsula reduzida, a curcumina pode diminuir ainda mais o tamanho da cápsula, e afetar a composição dos polissacarídeos da cápsula, exacerbando as alterações já presentes nas células. Isso pode resultar em uma cápsula menos eficaz na proteção contra o sistema imunitário. Com uma cápsula ainda mais reduzida e alterada, a linhagem *hda1Δ* tratada com curcumina pode se tornar ainda mais suscetível à fagocitose por macrófagos e neutrófilos. E ainda pode interferir nas vias de sinalização celular que regulam a produção de componentes da cápsula, potencialmente agravando os efeitos da mutação *hda1Δ* (QUEMEL, *et al.*, 2021; FREITAS, 2017; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

E por último, observando as imagens da levedura *C. neoformans* com a deleção do gene *HOS2* sob três condições diferentes (C1, C2 e C3), pode-se notar as seguintes diferenças em C1 (Sem tratamento), a célula parece apresentar uma superfície com algumas projeções, o que pode estar relacionado à deleção de *HOS2*. Essas projeções podem indicar alterações estruturais na membrana da célula, mesmo na ausência de curcumina. Em C2 (CIM₅₀ de curcumina, a célula mostra um aumento significativo no número e tamanho das projeções na superfície. A célula parece mais "espinhosa" e densa, indicando que a curcumina está causando alterações na integridade da superfície celular, possivelmente afetando a parede celular ou a membrana de maneira notável e em C3 (CIM₁₀₀ de curcumina), observa-se uma estrutura ainda mais alterada. A célula continua com muitas projeções, e algumas parecem estar mais longas e mais definidas. Além disso, parece haver uma alteração na forma geral da célula, indicando que a alta concentração de curcumina está causando danos estruturais mais graves, possivelmente comprometendo a viabilidade da célula.

O estudo de Brandão (2018) revelou que a deleção do gene *HOS2* em *Cryptococcus*

neoformans resulta em uma cápsula reduzida e menor produção de GXM, tornando a linhagem *hos2Δ* mais suscetível à fagocitose e menos virulenta.

Comparando as três imagens de leveduras *Cryptococcus neoformans* sem tratamento, observamos as seguintes diferenças entre os diferentes genótipos: **A1** (H99 - linhagem selvagem) apresenta uma superfície relativamente lisa e sem muitas projeções. Essa é a forma típica da levedura selvagem, com uma aparência compacta e sem alterações morfológicas evidentes. **B1** (*HDA1* deletada), a célula com a deleção do gene *HDA1* exibe uma série de projeções ao redor da superfície, o que não é observado na linhagem selvagem (A1).

Essas projeções indicam que a ausência de *HDA1* provoca alterações na estrutura da parede celular ou da membrana, possivelmente tornando a célula mais vulnerável e com uma superfície menos uniforme e em **C1** (*HOS2* deletada), a célula com a deleção do gene *HOS2* também apresenta uma superfície com várias projeções, mas essas são mais densas e menos uniformes do que as vistas em B1. Em C1, as projeções parecem mais irregulares e numerosas, sugerindo que a deleção de *HOS2* causa ainda mais instabilidade estrutural do que a deleção de *HDA1*, levando a uma superfície mais "espinhosa" e rugosa.

Essas diferenças sugerem que tanto *HDA1* quanto *HOS2* desempenham papéis importantes na manutenção da integridade da parede celular ou da membrana, sendo que a deleção de *HOS2* parece ter um impacto estrutural mais pronunciado do que a de *HDA1*.

5.2 Concentração inibitória mínima de NE-AIFtCl em TFD para linhagens de *C. neoformans*

Para verificação da melhor dose de energia para a TFD, foram irradiadas placas de 96 poços a 8 cm de distância no comprimento de onda de 660 nm e potência de 59,71 mW/cm² pelos seguintes tempos: 5 min com fluência de 17,91 J/cm², 10 min com fluência de 35,83 J/cm², 20 min com fluência de 71,66 J/cm² e 30 min com fluência de 107,49 J/cm². O melhor tempo definido foi de 10 min, com fluência de 35,83 J/cm², pois foi observado que assim era atingido o efeito máximo, visto que tempos maiores não alteravam o perfil de crescimento.

A aplicação de TFD sobre as leveduras do gênero *C. neoformans* inibiu até 100% do crescimento a partir de 3 nM de NE-AIFtCl. A concentração de nanoemulsão que inibiu totalmente o crescimento após aplicação da TFD foi determinada para as linhagens H99, *hda1Δ* e *hos2Δ*, as linhagens T1-5796, 89-6105797, *hda1Δ/hos2Δ* e *hda1Δ+HDA1* não tiveram suas CIMs estabelecidos nas condições testadas (**Tabela 4**).

Tabela 5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Nanoemulsão de Cloreto de

Alumínio-ftalocianina

LINHAGEM	CIM – NE-AIFtCl (nM)
H99	6
T1-5796	N/A
89-6105797	N/A
<i>hda1</i> Δ	3
<i>hos2</i> Δ	3
<i>hda1</i> Δ/ <i>hos2</i> Δ	N/A
<i>hda1</i> Δ+HDA1	N/A

Fonte: Autoria própria, dados da pesquisa. 2024.

A resposta de *C. neoformans* H99 à TFD foi relatada anteriormente por nosso grupo, no estudo do Morais *et al...*, 2020. O estudo de Ranjan, 2021 demonstrou que as linhagens H99 e *hos2*Δ apresentaram uma CIM de 12,5 nM, enquanto a *hda1*Δ apresentou de 6,25 nM. Em geral, as linhagens mutantes de genes de remodelação de cromatina foram mais suscetíveis ao tratamento com TFD do que a selvagem. Isso comprova que as HDACs estão envolvidas nas defesas celulares contra danos causados por este protocolo de TFD, possivelmente contra danos oxidativos, característicos do mecanismo dessa terapia (RANJAN, 2021). A CIM com valores em nanomolar indica que a formulação fotossensibilizante usada nesse trabalho, NE-AIFtCl, é significativamente ativa contra *C. neoformans*.

Estudos mostram que derivados de porfirinas têm sido eficazes em concentrações variando de 0,5 a 10 µg/mL contra diferentes cepas de fungos. A CIM para clorinas em fungos como *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* varia entre 1 e 5 µg/mL. Já os fotossensibilizantes do tipo ftalocianinas apresentam CIMs de 0,1 a 2 µg/mL contra várias espécies de fungos, incluindo *Cryptococcus neoformans*. A utilização de nanoestruturas de cloreto de ftalocianina em concentrações nanomolares pode oferecer vantagens significativas, como maior eficácia antifúngica com menor toxicidade, além de uma melhor penetração e distribuição no tecido alvo, potencializando os efeitos terapêuticos e reduzindo os efeitos colaterais (OLIVEIRA, *et al.*, 2015).

As HDACs desempenham um papel importante na defesa celular contra danos oxidativos, regulando a expressão gênica e a estabilidade de proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo. Elas removem grupos acetil das histonas, resultando na condensação da cromatina e repressão da transcrição de genes. Isso pode incluir genes que codificam proteínas antioxidantes e enzimas de reparo de DNA (WALTON, *et al.*, 2024).

Quando as HDACs estão ativas, elas ajudam a manter a expressão controlada de genes que são críticos para a resposta ao estresse oxidativo, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (BARBOSA, *et al.*, 2010). Essas enzimas são essenciais para neutralizar ROS e minimizar danos celulares. Além disso, HDACs também podem desacetilar proteínas não-histônicas, incluindo fatores de transcrição e proteínas de sinalização, modulando suas atividades e estabilidade (WALTON, *et al.*, 2024).

A inibição ou deleção de HDACs, como observado nas linhagens mutantes de *C. neoformans*, pode levar a uma desregulação dessas vias de defesa, resultando em uma maior suscetibilidade ao estresse oxidativo induzido por tratamentos como a terapia fotodinâmica (TFD). Isso explica por que as linhagens mutantes de genes de remodelação de cromatina, como *hos2Δ* e *hda1Δ*, são mais suscetíveis ao tratamento com TFD em comparação com a linhagem selvagem (BARBOSA, *et al.*, 2010).

O uso de NE-AIFtCl como fotossensibilizante na TFD gera espécies reativas de oxigênio (EROs), causando danos oxidativos às estruturas celulares, como as membranas, aumentando a permeabilidade e causando vazamento de componentes celulares vitais, e também danificando proteínas e DNA do fungo, reduzindo a viabilidade das células fúngicas e impedindo a proliferação do patógeno. Isso eventualmente leva à morte celular. Como as linhagens mutantes apresentam falhas nas HDACs, elas apresentaram uma CIM menor, sugerindo que as desacetilases desempenham um papel importante na sobrevivência do fungo sob estresse oxidativo (RANJAN, 2021; BRANDÃO *et al.*, 2018).

Segundo Brandão e colaboradores, 2018, dados de análises filogenéticas mostraram que HOS2 pertence à família classe I, enquanto a HDA1 pertence a classe II. A HDA1 é essencial para a regulação de vários fatores de virulência em *C. neoformans*, incluindo a termotolerância, formação de cápsula, síntese de melanina, atividade de proteases e integridade da parede celular. Esses fatores são críticos para a sobrevivência do fungo no hospedeiro e para a progressão da infecção. A HOS2 tem atividade na produção de melanina, reduzindo essa produção em relação a linhagem selvagem, essa molécula protege contra danos oxidativos e pode também absorver luz, o que pode justificar a CIM menor de TFD, uma vez que as células ficam mais sensíveis aos efeitos oxidativos da TFD. A deleção dos genes *hda1* e *hos2* leva ao comprometimento da atividade de proteases secretadas, além de problemas na termotolerância. Isso sugere que essas HDACs têm funções redundantes na regulação desse fenótipo. A HOS2 também está envolvida na resposta ao estresse oxidativo e osmótico, ajudando o fungo a sobreviver em condições adversas dentro do hospedeiro.

5.3 Efeitos da exposição às CIM₁₀₀ de curcumina e de NE-AlFtCl em *C. neoformans* H99 e mutantes *hda1Δ* e *hos2Δ*.

As leveduras foram expostas às CIM de curcumina e de NE-AlFtCl, com ou sem irradiação com luz, e a turbidez de seu meio foi mensurada em espectrofotômetro por 72h, de hora em hora para obtenção de gráfico de crescimento e área sob a curva (**Figura 6**).

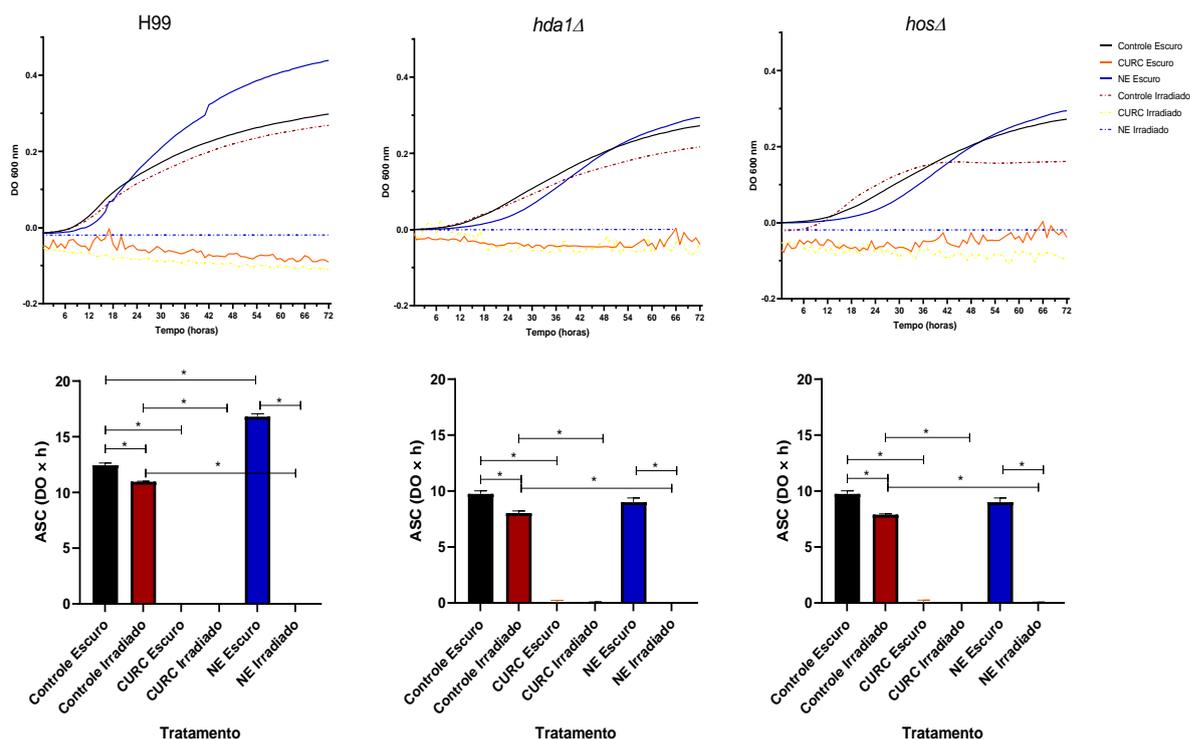


Figura 6. Crescimento de *C. neoformans*, linhagem H99 e mutantes *hda1Δ* e *hos2Δ* tratados com concentração inibitória mínima (CIM) de curcumina ou de nanoemulsão contendo alumínio-ftalocianina (NE). A linha superior apresenta as curvas de crescimento como densidade óptica em 600 nm (DO 600 nm) em função do tempo em horas. A linha inferior apresenta o resultado como área sob a curva de crescimento (ASC em DO x h) para as mesmas linhagens. O grupo Controle consistiu de células não expostas a fármacos. As células dos outros grupos foram expostas à CIM de curcumina (CURC) ou de NE, e então mantidas no escuro ou irradiados com luz vermelha (660 nm, 35,83 J/cm²). Significância estatística: *p < 0,0001.

Nas linhagens H99, *hda1Δ* e *hos2Δ*, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle mantidos no escuro e os irradiados. As células expostas à CIM de curcumina foram eliminadas, independente de irradiação ou não, mostrando assim o efeito antifúngico do fármaco. As leveduras tratadas com NE-AlFtCl e não expostas ao LED, não apresentaram alterações de crescimento, com exceção da linhagem H99, que apresentou um crescimento anômalo no experimento. Já aquelas que sofreram TFD, ou seja, que foram expostas à NE-AlFtCl e então irradiadas, foram totalmente eliminadas.

Alguns fungos apresentam fotossensibilidade intrínseca, o que significa que a luz pode desencadear respostas biológicas que inibem seu crescimento ou até mesmo os eliminam. Estudos indicam que a luz LED azul, com comprimento de onda de 470 nm, provoca uma redução significativa no crescimento de microrganismos nas amostras analisadas após 15 minutos de exposição, o que pode explicar a diminuição observada no crescimento dos fungos irradiados, já esses foram tratados com luz LED vermelha com comprimento de onda de 660 nm (SAVOLDI PICOLI & RUZZENE, 2023). Estas células podem apresentar biomoléculas que absorvam luz vermelha e funcionem como fotossensibilizante. Porém, a redução do crescimento celular ocasionado pela luz apenas foi significativamente inferior à ocasionada pela TFD com NE-AlFtCl (grupo NE-irradiado).

Dentre as moléculas de *C. neoformans* que poderiam atuar como fotossensibilizantes que absorvem luz vermelha, destacam-se a melanina e as porfirinas. A melanina é um pigmento que atua na proteção do fungo contra diversos estresses ambientais, incluindo a radiação ultravioleta e os radicais livres. Ela tem a capacidade de absorver luz em uma ampla faixa de comprimentos de onda, incluindo a luz vermelha. Quando exposta à luz, a melanina pode gerar EROs, que são moléculas altamente reativas capazes de causar danos celulares. Esse processo de geração de EROs pode ser explorado para desenvolver terapias fotodinâmicas, onde a luz vermelha é utilizada para ativar a melanina e induzir a morte celular no fungo (CASTRO *et al.*, 2022)

As porfirinas são outra classe de moléculas que podem atuar como fotossensibilizantes. Embora menos estudadas em *C. neoformans*, as porfirinas são conhecidas por sua capacidade de absorver luz vermelha e gerar EROs. Em outros organismos, as porfirinas têm sido amplamente utilizadas em terapias fotodinâmicas devido à sua eficiência na geração de EROs quando expostas à luz. A presença de porfirinas em *C. neoformans* sugere que elas também poderiam ser exploradas para aumentar a sensibilidade do fungo à luz vermelha, potencialmente levando a novas abordagens terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas (FONSECA, SILVA & MARANHÃO, 2024).

As CIMs de curcumina foram confirmadas nas três linhagens pela ausência de crescimento fúngico, tanto no escuro quanto nas células irradiadas, demonstrando a toxicidade da curcumina para as leveduras estudadas. Além disso, observou-se uma oscilação na leitura da densidade óptica nos grupos tratados com curcumina. Isso ocorreu devido à baixa solubilidade deste composto em água. A curcumina tende a precipitar em soluções aquosas, o que pode interferir em experimentos e aplicações terapêuticas. A turbidez causada pela curcumina pode interferir em medições espectrofotométricas e outras técnicas analíticas, dificultando a obtenção

de dados precisos, o que justifica as oscilações observadas nas curvas de medição (KAZANTZIS *et al.*, 2020).

Em relação aos resultados obtidos com NE-AIFtCl, verificou-se que sua eficácia é observada apenas quando irradiada, o que é esperado, visto que um fotossensibilizante ideal deve ser inócuo no escuro. Na ausência de exposição à luz, não houve redução no crescimento ou morte das células nas linhagens mutantes *hda1Δ* e *hos2Δ*. No entanto, na linhagem H99, foi observado um aumento inesperado no seu crescimento celular. Dado que não há precedentes descritos na literatura, essa resposta pode ser considerada anômala para células expostas ao fotossensibilizante, sendo provavelmente devida a alguma variação pontual no experimento. Outra hipótese que pode ser considerada é que a presença da nanoestrutura pode ter influenciado o metabolismo do fungo, levando-o a uma resposta adaptativa ao estresse celular, resultando em proliferação. (SPECIAN *et al.*, 2015).

As CIMs de TFD foram comprovadas nas três linhagens testadas. Demonstrando assim a atividade do fotossensibilizante que é um componente essencial da TFD, pois é o responsável por absorver a luz e transferir essa energia para o oxigênio presente nos tecidos, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) quando exposto ao LED. Estudos realizados por Nunes (2023), Ranjan (2021) e Morais *et al.* (2020) também confirmaram a atividade da TFD em fungos leveduriformes e filamentosos.

Usar nanopartículas como mediadoras fotossensibilizantes na TFD para matar fungos oferece várias vantagens em relação à dose do fármaco. Primeiramente, as nanopartículas podem direcionar o fotossensibilizante diretamente para as células fúngicas, aumentando a concentração do agente terapêutico no local da infecção e reduzindo a quantidade necessária para alcançar o efeito desejado. Além disso, a ativação do fotossensibilizante por luz específica permite uma liberação controlada e precisa do fármaco, o que pode melhorar a eficácia do tratamento e minimizar os danos aos tecidos saudáveis. Essa abordagem também pode reduzir a frequência de dosagem, pois a liberação sustentada do medicamento mantém níveis terapêuticos constantes por períodos mais longos (OLIVEIRA, *et al.*, 2015; QUEIROZ, 2020)

Para ilustrar esse efeito, pode-se citar os estudos de Ranjan, 2018 que determinou CIM para linhagens de *C. neoformans*, as linhagem H99 apresentou uma CIM para TFD mediada por NE-AIFtCl de 12,5 nM, enquanto as linhagens mutantes *hda1Δ* e *hos2Δ* apresentaram CIM de 6,25 nM, Morais *et al.*, 2021 demonstrou em seus experimentos que na faixa de 10 nM de TFD mediada por NE-AIFtCl houve eliminação total das leveduras. No presente estudo, as CIMs verificadas foram de 6 nM para H99 e 3 nM para linhagens mutantes.

Com base nos estudos mencionados, o uso de NE-AIFtCl na TFD apresenta vantagens

significativas em relação à dose necessária para eliminar fungos, especialmente por ser eficaz em concentrações nanomolares. A utilização de doses tão baixas reduz a quantidade total de agente terapêutico necessário, minimizando os efeitos colaterais e a toxicidade sistêmica. Além disso, a alta eficácia em concentrações nanomolares permite uma ação mais direcionada e precisa, aumentando a eficiência do tratamento. Essas características tornam o NE-AIFtCl uma abordagem promissora para o tratamento de infecções fúngicas, proporcionando uma terapia mais segura e eficaz.

Alguns estudos como o de Kazantzis *et al.* (2020) utilizaram derivados de curcumina como fotossensibilizantes na terapia fotodinâmica (TFD) para o tratamento de células de câncer de próstata. O estudo demonstrou que os derivados de curcumina avaliados apresentaram propriedades fotofísicas promissoras e eficácia fotocitotóxica significativa. A curcumina absorve luz principalmente na região do espectro visível, com um pico de absorção em torno de 400 nm, correspondente à luz violeta, sendo aplicada a 430 nm no estudo.

No entanto, como no experimento a faixa utilizada foi de 660 nm, a curcumina não foi considerada como sensibilizante para TFD, inferindo-se que os resultados da TFD não foram mediados por curcumina, uma vez que nas três linhagens estudadas, os controles apresentaram crescimento, sendo irradiados ou não. As células tratadas com curcumina apresentaram crescimento prejudicado com eliminação das células, comprovando a CIM previamente testada, sendo CIM para H99 de 22 µg/mL, *hda1Δ* de 25 µg/mL e *hos2Δ* de 20 µg/mL, independentemente de irradiação. Em contraste, as células expostas à NE-AIFtCl no escuro não mostraram diminuição no crescimento, enquanto as expostas à luz tiveram seu crescimento totalmente abolido.

Com base nos resultados do experimento, conclui-se que a curcumina não apresentou efeito fotodinâmico na faixa de 660 nm utilizada. Os controles das três linhagens estudadas (H99, *hda1Δ* e *hos2Δ*) mostraram crescimento, independentemente de serem irradiados ou não. As células tratadas com curcumina apresentaram crescimento prejudicado e eliminação das células, confirmando a CIM previamente testada, mas sem influência da irradiação. Em contraste, as células expostas à NE-AIFtCl no escuro não mostraram diminuição no crescimento, enquanto aquelas expostas à luz tiveram seu crescimento totalmente abolido, evidenciando o efeito fotodinâmico específico do NE-AIFtCl. Portanto, os resultados indicam que a curcumina não atuou como fotossensibilizante eficaz nas condições testadas.

5.4 Combinação de Tratamentos em *C. neoformans* H99

A exposição prévia das leveduras às CIM₅₀ e CIM₇₅ de curcumina, seguida da aplicação de TFD mediada por CIM₅₀ e CIM₇₅ de NE-AlFtCl levou à diminuição significativa da proliferação celular de *C. neoformans* H99, quando irradiadas. A inibição do crescimento celular foi observada em todas as combinações testadas, mas não no emprego individual de curcumina em valores inferiores à CIM (Figura 7). Quando comparada à aplicação individual de NE-AlFtCl, a associação de nanoemulsão, curcumina e luz se mostrou menos eficiente no controle da proliferação celular. Todas as condições foram testadas em triplicata técnica e foram realizados três experimentos independentes para cada condição experimental.

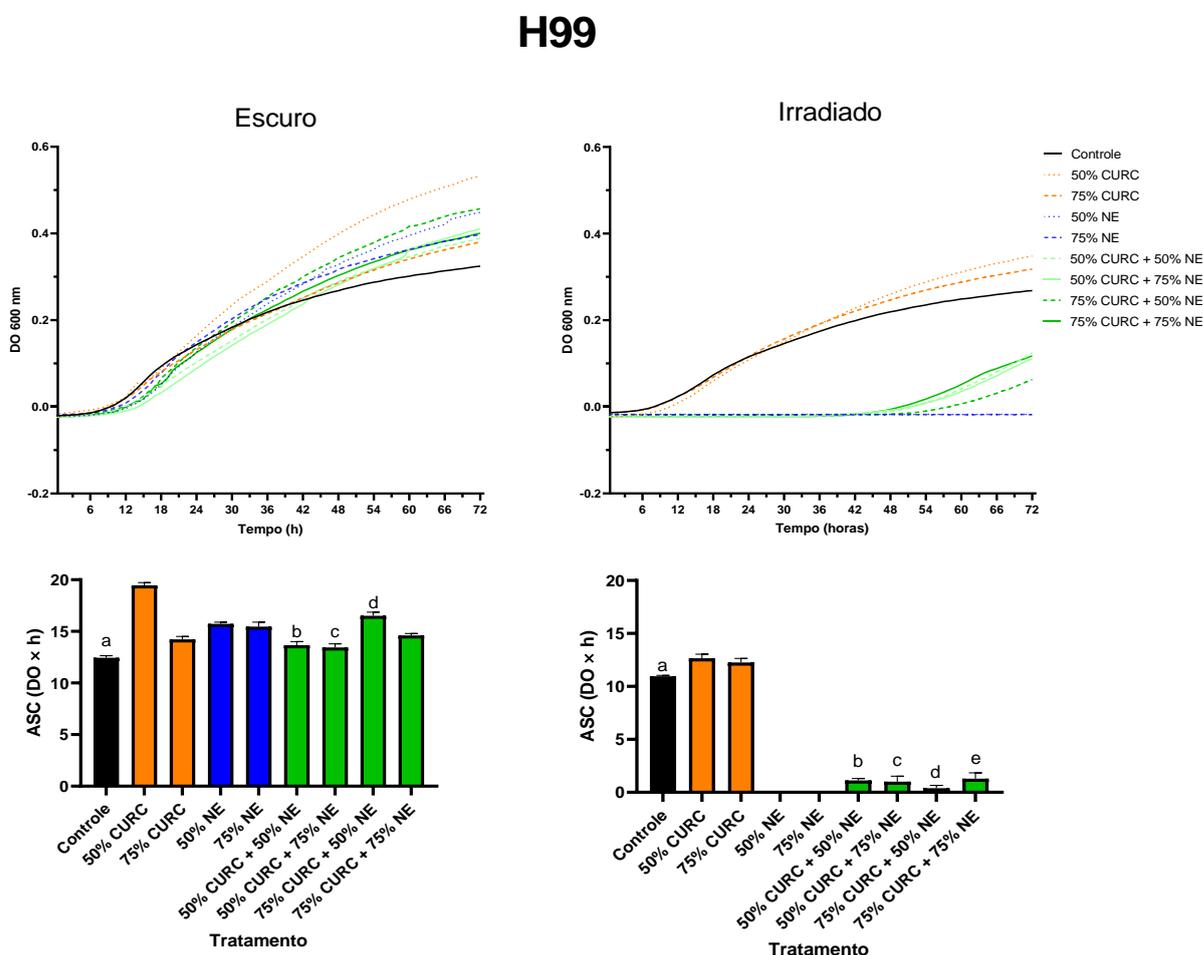


Figura 7. Crescimento de *C. neoformans*, linhagem H99, após exposição à curcumina (CURC) e/ou à nanoemulsão contendo alumínio-ftalocianina (NE), seguida de incubação no escuro ou de irradiação com luz vermelha (660 nm, 35,83 J/cm²). Os fungos foram expostos a 50 ou 75% da concentração inibitória mínima de cada composto isoladamente ou em combinação. Na linha superior são apresentadas as curvas de crescimento como densidade óptica em 600 nm (DO 600 nm) em função do tempo em horas. Na linha inferior estão os gráficos com as áreas sob estas curvas de crescimento (ASC, DO x h) para cada grupo. Significância estatística: **Escuro** – ^ap < 0,05 vs todos os grupos; ^bp < 0,001 vs 50% CURC, e vs 50% NE; ^cp < 0,01 vs 75% NE, ^dp < 0,05 vs 75% CURC. **Irradiado** – ^ap < 0,01 vs todos os grupos; ^bp < 0,001 vs 50% CURC; ^cp < 0,001 vs 75% CURC.

Na linha superior pode-se observar que a combinação de fármacos não foi suficiente para abolir o crescimento da linhagem, mas houve um atraso quanto ao crescimento, enquanto o controle (células sem tratamento) iniciaram seu crescimento por volta das 12h de incubação, todas as células expostas às combinações de tratamentos, tiveram o início do seu crescimento por volta das 42 h de incubação. O que pode indicar que os tratamentos podem estar interferindo em processos essenciais para o crescimento e a divisão celular, como a síntese de proteínas, ácidos nucleicos ou componentes da parede celular, sem causar danos letais imediatos.

Na linha inferior estão os gráficos com as áreas sob estas curvas de crescimento (ASC, DO × h) para cada grupo. O grupo não exposto ao LED apresentou um aumento no crescimento celular. A hipótese levantada por esse resultado é que a presença da curcumina e da nanoestrutura pode ter influenciado o metabolismo do fungo, levando-o a uma resposta adaptativa ao estresse celular com a modulação da produção de proteínas, regulando DNA ou ainda respondendo ao estresse ativando enzimas que participam do processo antioxidativo da célula (SPECIAN *et al.*, 2015).

O grupo previamente tratado com curcumina e exposto ao LED, apresentou resultados de inibição de crescimento. Porém em nenhuma das combinações testadas houve inibição completa do crescimento das leveduras. Isso pode ter ocorrido devido ao efeito antioxidante da curcumina. Por ser um poderoso antioxidante, a curcumina tem capacidade de neutralizar os radicais livres no organismo, sua estrutura química que lhe permite neutralizar esses radicais, que são moléculas instáveis e que podem causar danos às células e tecidos. Além de neutralizar diretamente os radicais livres, a curcumina também pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes no organismo, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase. Ao combater os radicais livres, ela ajuda a proteger as células contra danos oxidativos (CÔRREA, *et al.*, 2021).

A formulação NE-ALFtCl é empregada em TFD devido às suas propriedades fotossensibilizantes (MUEHLMANN *et al.*, 2015). Quando ativada por luz vermelha, o mecanismo de ação envolve o acúmulo preferencial nas células-alvo, como células tumorais ou microrganismos. Após a acumulação, a área tratada é exposta a uma fonte de luz específica, que é absorvida pela formulação, resultando em sua ativação. Esta ativação promove a produção de EROs, como radicais livres e oxigênio singlete, que causam danos às estruturas celulares, incluindo membranas, proteínas e DNA, culminando na morte das células-alvo (SANTOS, 2020).

Nesse experimento, infere-se que a curcumina pode ter tido um efeito antioxidante, reduzindo os danos causados pela TFD, assim justificaria o crescimento reduzido de células nos tratamentos combinados e a não abolição das leveduras, pelos mecanismos da curcumina

citados acima. Como em valores menores que a CIM₁₀₀, a curcumina não se apresentou tóxica, ela pode ter se internalizado nas leveduras e neutralizado os EROs formados pela TFD, reduzindo os danos às organelas e membranas das leveduras, além disso ainda pode ter aumentado atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD e a catalase.

5.5 Combinação de Tratamentos em *C. neoformans hda1Δ*

A linhagem *hda1Δ* foi também previamente tratada com CIM₅₀ e CIM₇₅ de curcumina e em seguida com CIM₅₀ e CIM₇₅ de NE-AIFtCl, sendo uma placa irradiada com o LED e a outra não. No escuro, as células tratadas com CIM₇₅ de curcumina e CIM₅₀ de NE-AIFtCl apresentaram um aumento no crescimento celular, enquanto as outras combinações não demonstraram significância de resultados. Igualmente ao que ocorreu com a linhagem selvagem, a presença da curcumina e da nanoestrutura pode ter influenciado o metabolismo do fungo, levando-o a uma resposta adaptativa ao estresse celular com a modulação da produção de proteínas, regulando DNA ou ainda respondendo ao estresse ativando enzimas que participam do processo antioxidativo da célula, fazendo assim as células se proliferarem (SPECIAN *et al.*, 2015).

Na presença de irradiação por LED, os tratamentos com CIM₅₀ e CIM₇₅ de curcumina isolada apresentam valores mais altos de ASC, indicando uma menor atividade específica, os tratamentos com CIM₅₀ e CIM₇₅ de NE-AIFtCl isolada mostram valores mais baixos de ASC, indicando uma atividade maior e inibição de crescimento celular. As combinações de curcumina e nanoemulsão apresentam valores intermediários, sugerindo que a presença de curcumina em CIM₅₀ pode reduzir a eficácia da NE-AIFtCl. (**Figura 8**).

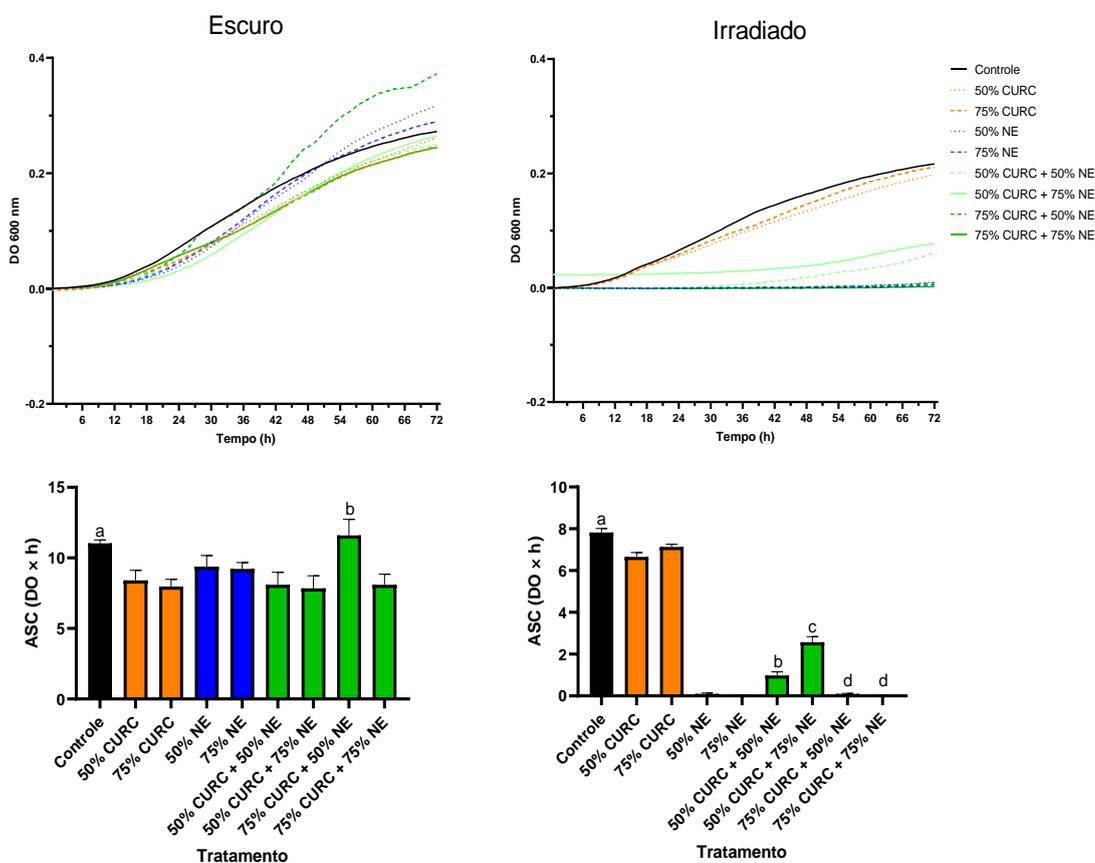


Figura 8. Crescimento de *C. neoformans*, mutante *hda1Δ*, após exposição à curcumina (CURC) e/ou à nanoemulsão contendo alumínio-ftalocianina (NE), seguida de incubação no escuro ou de irradiação com luz vermelha (660 nm, 35,83 J/cm²). Os fungos foram expostos a 50 ou 75% da concentração inibitória mínima de cada composto isoladamente ou em combinação. Na linha superior são apresentadas as curvas de crescimento como densidade óptica em 600 nm (DO 600 nm) em função do tempo em horas. Na linha inferior estão os gráficos com as áreas sob estas curvas de crescimento (ASC, DO × h) para cada grupo. Significância estatística: Escuro – ^ap < 0,01 vs 50% CURC, 75% CURC, 50% CURC + 75% NE, e 75% CURC + 75% NE; ^bp < 0,01 vs 75% CURC, e 50% NE. Irradiado – ^ap < 0,01 vs todos os grupos, com exceção de 75% CURC; ^bp < 0,001 vs 50% CURC, e 50% NE; ^cp < 0,001 vs 50% CURC, e 75% NE; ^dp < 0,001 vs 75% CURC.

A TFD mediada por NE-AIFtCl sozinha parece ter um efeito mais significativo na atividade específica das células *hda1Δ* comparado às combinações com curcumina CIM₅₀. Isso pode indicar que a NE-AIFtCl é mais eficaz sem a presença de curcumina em baixas dosagens, ou que a combinação dos dois pode interferir na eficácia da TFD, como ocorreu com as células da linhagem H99, com os mecanismos de antioxidação celular. Já em concentração maior (CIM₇₅), a curcumina não apresentou nenhum efeito que protegesse a levedura, eliminando assim o crescimento das células.

Pode-se sugerir que a curcumina possa ter dois tipos de mecanismos que interferem no tratamento: sua atividade antioxidante e seus efeitos deletérios ao fungo, que podem não ser

relacionados à essa atividade. A curcumina é amplamente reconhecida por sua potente atividade antioxidante. Esse mecanismo permite que a curcumina neutralize os radicais livres, que são moléculas instáveis capazes de causar danos celulares. Ao reduzir o estresse oxidativo, a curcumina protege as células saudáveis e melhora a resposta imunitária do organismo. Além disso, a curcumina aumenta a atividade das enzimas antioxidantes naturais do corpo, como a superóxido dismutase e a catalase, potencializando ainda mais sua capacidade de combater os danos oxidativos (CORRÊA *et al.*, 2021).

Por outro lado, além de sua atividade antioxidante, estudos demonstram que a curcumina pode interferir na integridade da membrana celular dos fungos, levando à perda de viabilidade celular. Esse efeito é particularmente importante no combate a infecções fúngicas, onde a curcumina pode atuar diretamente sobre as células patogênicas, comprometendo sua estrutura e função (HASSAN *et al.*, 2019)

Outro mecanismo pelo qual a curcumina exerce seus efeitos antifúngicos é através da inibição de vias metabólicas essenciais para a sobrevivência dos fungos. A curcumina pode afetar a função de miRNAs, interferindo na síntese de ergosterol, um componente decisivo na produção de membrana celular fúngica, resultando em uma membrana menos funcional e mais suscetível a danos. Esse efeito específico da curcumina sobre os fungos destaca sua potencialidade como um agente terapêutico multifuncional, capaz de atuar em diferentes frentes para combater infecções (COLLINO, 2014; HASSAN *et al.*, 2019; KHAYATAN, *et al.*, 2024).

Portanto, a curcumina apresenta uma dupla abordagem no tratamento de infecções fúngicas: sua atividade antioxidante protege as células saudáveis e melhora a resposta imunitária, enquanto seus efeitos deletérios diretos sobre os fungos comprometem a viabilidade e a funcionalidade das células patogênicas. Essa combinação de mecanismos torna a curcumina uma opção promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos antifúngicos, oferecendo uma abordagem mais abrangente e eficaz no combate a infecções.

A curcumina em baixa concentração pode tornar as células menos sensíveis à TFD. A curcumina modula os estados epigenéticos das leveduras e altera os padrões de virulência (HASSAM, *et al.*, 2019). Essa linhagem apresenta deleção de uma HDAC importante, as HDACs são responsáveis por desacetilar as histonas, esse fenômeno faz com que a levedura tenha seu DNA menos enovelado e mais exposto. A curcumina pode alterar a acetilação das histonas, fazendo um mecanismo de compensação, afetando a expressão gênica e protegendo a célula dos efeitos da TFD (LÚCIO, *et al.*, 2020).

No artigo de 2018, Brandão *et al.*, foi investigado o papel dos genes de HDACs em *C. neoformans*, no qual os autores identificaram e deletaram sete genes HDAC no genoma de

C. neoformans para entender como a remodelação da cromatina afeta a expressão de características relacionadas à virulência. A linhagem mutante *hda1Δ*, cujo gene *HDA1* foi deletado, mostrou que esse gene é um mediador central que controla vários processos celulares, incluindo o acasalamento e a virulência.

A análise do perfil global de expressão gênica comparando a linhagem mutante *hda1Δ* com a linhagem selvagem revelou alterações na transcrição de genes específicos associados aos atributos de virulência mais proeminentes. Quando consideramos a resposta à curcumina, a ausência do gene *hda1* pode levar a uma desregulação na expressão de genes que são críticos para a defesa contra o estresse oxidativo e outros danos induzidos pela curcumina. Portanto, a maior suscetibilidade da linhagem *hda1Δ* à curcumina pode ser atribuída à incapacidade de regular adequadamente a expressão gênica em resposta ao estresse oxidativo e outros danos causados pela curcumina. Isso destaca a importância das HDACs na manutenção da homeostase celular e na defesa contra agentes antifúngicos.

A HDA1 desempenha um papel crucial na regulação epigenética, modulando a expressão gênica através da remoção de grupos acetil, principalmente das lisinas nas histonas H3 e H4. Especificamente, as lisinas K9 e K14 na histona H3 e as lisinas K5, K8, K12 e K16 na histona H4 são os principais alvos de desacetilação. Esse processo de desacetilação resulta em uma estrutura de cromatina mais compacta, o que geralmente leva à repressão da transcrição gênica. A HDA1 remove grupos acetil da lisina N-terminal das histonas H3 e H4, restaurando a carga positiva das histonas e aumentando a interação histona-DNA, resultando em uma cromatina menos acessível para a maquinaria de transcrição. Esse mecanismo gera a formação da heterocromatina para proteção do genoma (RIVAS, TEIXEIRA, & KREPISCHI, 2019).

Além disso, a HDA1 atua em conjunto com complexos de repressão transcricional, como o complexo Sin3, que recrutam a HDA1 para regiões específicas do genoma onde a repressão gênica é necessária. Essa interação permite uma regulação mais precisa e específica da expressão gênica, influenciando processos celulares como o ciclo celular, diferenciação celular e resposta ao estresse. A HDA1 também responde a sinais ambientais e estresses celulares, ajustando a expressão gênica em resposta a mudanças no ambiente, incluindo a resposta a danos no DNA (RIVAS, TEIXEIRA, & KREPISCHI, 2019).

A **figura 9** mostra os eventos epigenéticos mediados pela presença da HDA1, os genes modulados e seus respectivos efeitos na levedura.

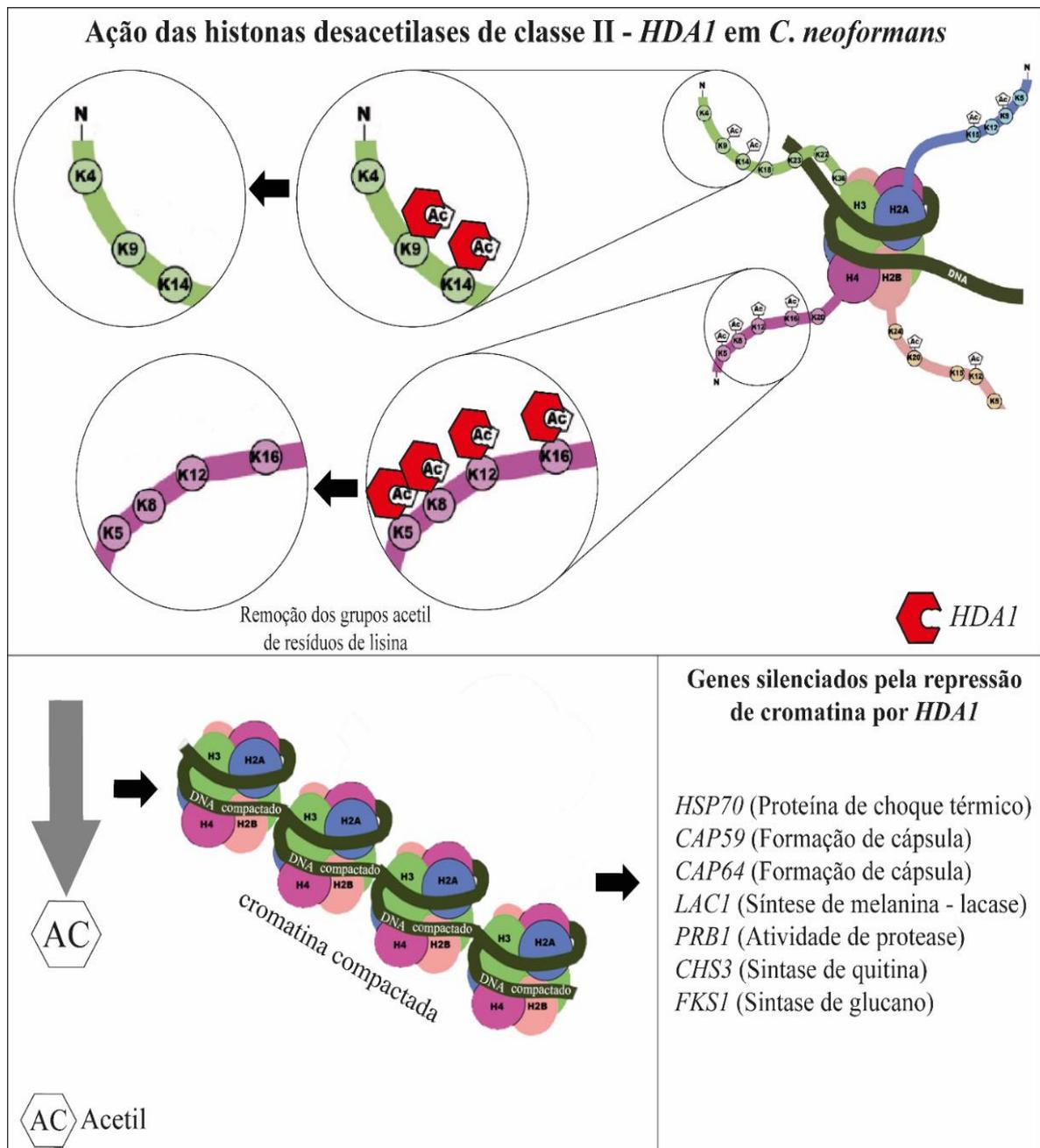


Figura 9: Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da Histona Desacetilase HDA1. A HDA1 remove grupos acetil das histonas, proteínas ao redor das quais o DNA está enrolado, principalmente das lisinas N-terminal nas histonas H3 e H4. Especificamente, as lisinas K9 e K14 na histona H3 e as lisinas K5, K8, K12 e K16 na histona H4 e resulta em uma estrutura de cromatina mais compacta, o que geralmente leva à repressão da transcrição gênica e silencia genes específicos que influenciam na estrutura e metabolismo fúngico (ANANDARADJE *et al.*, 2024).

O gene *HDA1* influencia a capacidade do fungo de se reproduzir sexualmente, regula a expressão de genes, que são críticos para a capacidade do fungo de causar doença e está envolvido na modificação da estrutura da cromatina, o que afeta a expressão gênica global. Nos testes feitos por Brandão *et al.*, 2018, a linhagem *hda1Δ* apresentou baixo crescimento a 39 °C,

pouca resposta ao estresse da parede celular. Além disso, a formação de cápsula, produção de melanina e atividade de protease foi defeituosa. A sobrevivência em macrófagos também foi prejudicada, quando comparadas a linhagem selvagem.

A curcumina pode regular HDACs. Estudos mostram que a curcumina atua como um inibidor de HDAC, o que significa que ela pode interferir na atividade dessas enzimas. A combinação de curcumina com a linhagem *hda1Δ* pode ter vários impactos potenciais, considerando que a curcumina é um inibidor de HDACs e a linhagem *hda1Δ* já possui uma deleção no gene *HDA1*. A curcumina pode alterar a acetilação das histonas, levando a mudanças na expressão de genes que são regulados por essas modificações epigenéticas, resultando em ativação ou repressão de genes específicos (ANANDARADJE *et al.*, 2024).

A combinação de curcumina e NE-AIFtCl pode afetar o crescimento das células, possivelmente inibindo a proliferação devido à regulação alterada dos genes envolvidos no ciclo celular. Além disso, a curcumina pode influenciar a resposta ao estresse celular, potencialmente melhorando a resistência a certos tipos de estresse ou, inversamente, tornando as células mais suscetíveis a outros tipos de estresse. A combinação pode afetar a viabilidade e a sobrevivência das células, especialmente em condições de estresse ou em presença de agentes tóxicos, podendo induzir apoptose em células que já estão comprometidas devido à deleção de *HDA1*. Por fim, a curcumina pode modular outras atividades enzimáticas dentro da célula, afetando processos metabólicos e sinalização celular (CARDONA ECHEVERRY *et al.*, 2016).

A curcumina é conhecida por inibir várias HDACs. Especificamente, ela pode inibir as HDACs dos tipos **1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 11** (SOFLAEI, *et al.*, 2018), levando a um aumento na acetilação das histonas. Na linhagem H99, observou-se que houve inibição do crescimento, quando comparada à linhagem mutante, foi observado que a curcumina em baixa concentração apresentou efeito protetor. Possivelmente a curcumina modulou as outras HDACs que ainda estavam presentes, visto que a linhagem testada é mutante para *HDA1*. Em CIM₅₀, ela pode ter acetilado outros genes que codificam as outras HDACs, resultando em uma cromatina mais aberta e ativa, facilitando a transcrição de genes que podem promover o crescimento celular.

Além de inibir HDACs, a curcumina pode afetar HATs, que adicionam grupos acetil às histonas, promovendo a expressão gênica, assim ela agiu de forma complementar às HDACs, enquanto as HATs adicionam grupos acetil e as HDAC são inibidas, o genoma fica expresso e mais acessível para transcrição e crescimento celular como ocorreu com as leveduras que foram tratadas com CIM₅₀ de curcumina, possivelmente a curcumina inibiu as HDACs e ativou as HATs e assim houve crescimento celular mesmo com irradiação. A curcumina também pode inibir as DNMTs, resultando em hipometilação do DNA, o que pode reativar genes silenciados

importantes para o crescimento celular. Além disso, a curcumina pode alterar a expressão de miRNAs, que são pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente, afetando a proliferação e a apoptose celular, como ocorreu nas células tratadas com CIM₇₅ de curcumina, essa concentração não conferiu efeito modulador de HATs e HDACs, causou eliminação total das leveduras, possivelmente por modulação de miRNAs e problemas de síntese de membrana. Por fim, a curcumina pode interagir diretamente com fatores de transcrição, modulando a expressão de genes específicos que podem influenciar o crescimento celular.

Dessa forma, pode-se inferir do estudo que em baixas concentrações a curcumina modulou, de alguma forma, os efeitos de TFD na células, conferindo assim um fator de proteção quando expostas à luz. Na combinação de CIM₅₀ de curcumina e CIM₅₀ de NE-AIFtCl, houve inibição de crescimento em comparação aos controles, porém as leveduras não foram totalmente abolidas. Na combinação de CIM₅₀ de curcumina e CIM₇₅ de NE-AIFtCl, esse crescimento ainda foi mais expressivo, demonstrando assim, ainda mais os prováveis efeitos protetores da curcumina. Já em CIM₇₅ de curcumina e CIM₅₀ de NE-AIFtCl e CIM₇₅ de curcumina e CIM₇₅ de NE-AIFtCl o crescimento celular foi totalmente inibido, indicando assim que em concentração maior, a curcumina é mais tóxica do que protetora.

Além disso, a célula pode ativar mecanismos de compensação para mitigar os efeitos da perda da função da HDA1, com upregulação de genes homólogos, aumentando a expressão desses genes ou genes com funções similares para compensar a perda. Ela pode ajustar outras vias metabólicas para manter a homeostase. Por exemplo, pode haver uma alteração na expressão de genes envolvidos na acetilação de histonas para equilibrar a perda de desacetilação, ativando outras HDACs. Pode ainda, induzir a ativação de vias de sinalização de estresse celular, como a via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR), para lidar com o estresse resultante da perda de função (KIM, *et al.*,2020).

Dessa forma, na linhagem *hda1Δ* pode-se inferir que em baixas concentrações a curcumina exerceu efeitos protetores, os quais podem envolver vias epigenéticas, e os efeitos de TFD na células foram menos prejudiciais, conferindo assim um fator de proteção quando expostas à luz. Na combinação de CIM₅₀ de curcumina e CIM₅₀ de NE-AIFtCl, houve inibição de crescimento, em comparação aos controles, porém as leveduras não foram totalmente abolidas. Na combinação de CIM₅₀ de curcumina e CIM₇₅ de NE-AIFtCl, esse crescimento ainda foi mais expressivo, demonstrando assim, ainda mais os prováveis efeitos protetores da curcumina. Já em CIM₇₅ de curcumina e CIM₅₀ de NE-AIFtCl e CIM₇₅ de curcumina e CIM₇₅ de NE-AIFtCl o crescimento celular foi totalmente inibido, indicando assim que em

concentração maior na linhagem *hda1Δ*, a curcumina é mais tóxica do que protetora.

5.6 Combinação de Tratamentos em *C. neoformans hos2Δ*

A linhagem *hos2Δ* de *C. neoformans* é uma mutante cujo gene *HOS2* foi deletado. Este gene está envolvido em processos de regulação epigenética e resposta ao estresse. Essa deleção pode afetar a virulência e a capacidade de adaptação do fungo a diferentes ambientes (RANJAN, 2021). A *HOS2* é uma HDAC classe 1, que desempenha um papel crucial na regulação epigenética em *C. neoformans*. Um dos principais mecanismos epigenéticos associados à *HOS2* é a desacetilação de histonas, principalmente as lisinas nas histonas H3 e H4. Especificamente, as lisinas K9 e K14 na histona H3 e as lisinas K5, K8, K12 e K16 na histona H4 são os principais alvos de desacetilação, que resulta em uma cromatina mais compacta e menos acessível para a transcrição gênica. Isso pode levar à repressão de genes específicos que são importantes para a adaptação ao estresse e a virulência. Além disso, a atividade de *HOS2* pode influenciar a expressão de genes relacionados à produção de EROs, resposta ao estresse e transporte de carboidratos, funções essenciais para a sobrevivência e patogenicidade do fungo (LAI, *et al.*, 2022).

Outro mecanismo importante é a modulação da virulência. *HOS2* está envolvida na regulação de genes de virulência, o que pode afetar a capacidade do fungo de causar infecção. A desacetilação de histonas por *HOS2* pode silenciar genes que, se expressos, aumentariam a virulência do fungo. Além disso, *HOS2* pode interagir com outros fatores epigenéticos e proteínas reguladoras, formando complexos que modulam a estrutura da cromatina e a expressão gênica de maneira coordenada. Esses mecanismos ajudam a explicar como *HOS2* contribui para a regulação epigenética em *C. neoformans*, influenciando tanto a adaptação ao ambiente quanto a capacidade de causar doenças (LAI, *et al.*, 2022).

Por fim, *HOS2* pode modular a expressão de genes envolvidos no transporte de carboidratos e na resposta ao estresse, ajustando a capacidade do fungo de sobreviver em condições adversas. A desacetilação de histonas por *HOS2* pode silenciar genes que, se expressos, aumentariam a capacidade do fungo de utilizar carboidratos de forma eficiente, essencial para a sua sobrevivência e virulência. Esses mecanismos epigenéticos permitem que *C. neoformans* adapte-se rapidamente a mudanças no ambiente, mantendo um equilíbrio entre crescimento e defesa contra estresses externos, esses mecanismos estão ilustrados na

Figura 10.

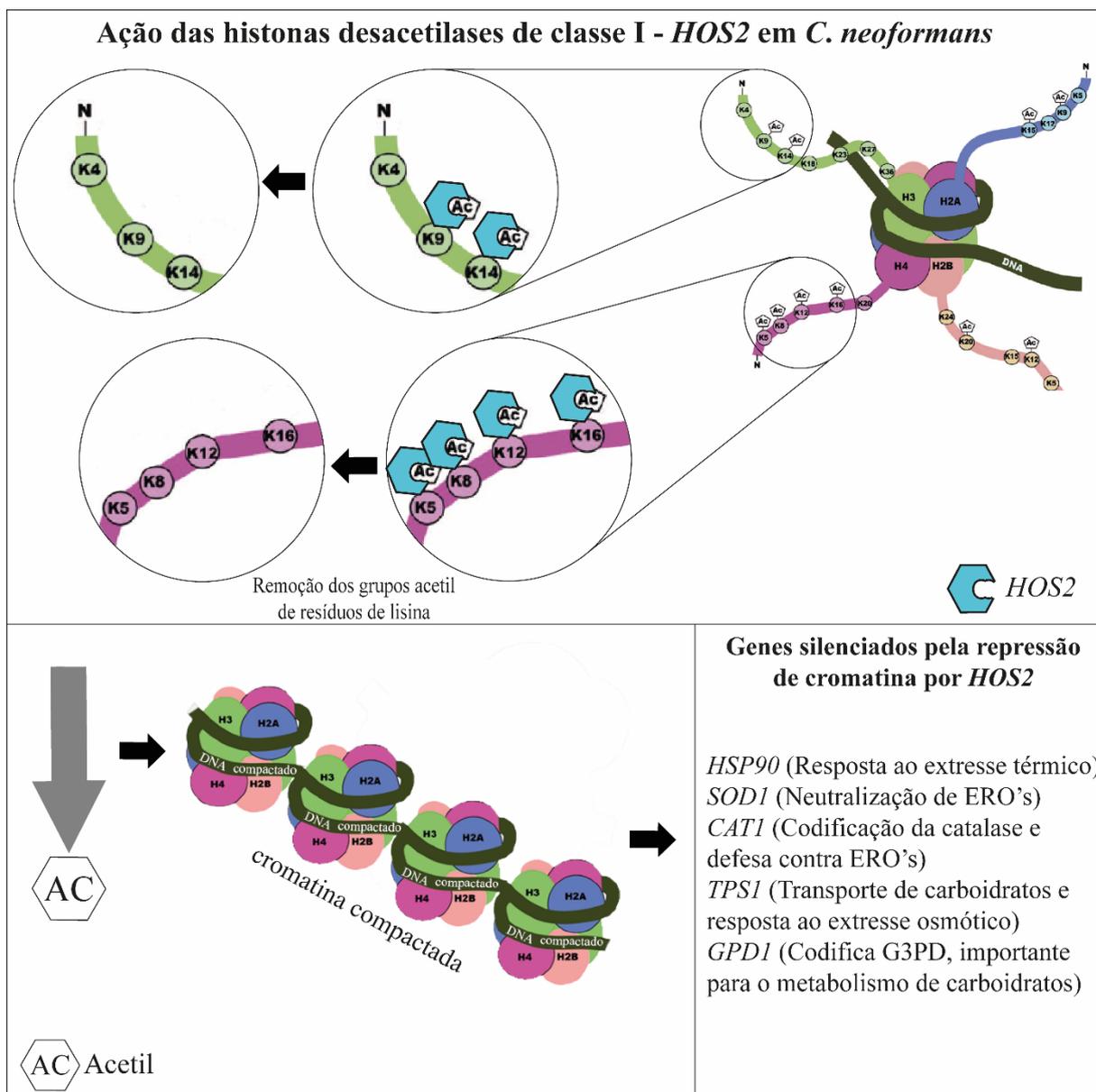


Figura 10. Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da Histona Desacetilase HOS2. A Hos2 remove grupos acetil das histonas, proteínas ao redor das quais o DNA está enrolado, principalmente das lisinas N-terminal nas histonas H3 e H4. Especificamente, as lisinas K9 e K14 na histona H3 e as lisinas K5, K8, K12 e K16 na histona H4 e regula vários processos biológicos, incluindo o ciclo celular, diferenciação celular e resposta ao estresse. Ao desacetilar histonas, a HOS2 pode silenciar genes específicos, modulando a expressão gênica de acordo com as necessidades da célula (LAI, *et al.*, 2022).

Nessa linhagem, a curcumina isolada nos tratamentos com CIM₅₀ e CIM₇₅ apresentam valores mais altos de ASC, indicando uma maior viabilidade das células e menor toxicidade do fármaco. Os tratamentos com CIM₅₀ e CIM₇₅ de NE-AlFtCl isolada mostram valores mais baixos de ASC, indicando uma maior atividade do fármaco sobre as leveduras (Figura 11).

No escuro, ou seja sem irradiação de luz, houve um aumento do crescimento das leveduras expostas à curcumina, inferindo-se que a levedura, por mecanismos já citados, se adapta ao meio e se desenvolve. Em combinações de CIM₅₀ de curcumina com CIM₅₀ e CIM₇₅

de NE-AlFtCl e CIM₇₅ de curcumina com CIM₅₀ e CIM₇₅ de NE-AlFtCl houve uma redução significativa de crescimento, inferindo que a combinação pode ter sido tóxica para as leveduras mesmo sem a exposição ao LED.

Quando expostas ao LED, pode-se observar que há redução de atividade biológica em todos os tratamentos combinados. Nas combinações de CIM₅₀ de curcumina com CIM₅₀ de NE-AlFtCl e de CIM₇₅ de curcumina com CIM₅₀ de NE-AlFtCl ainda houve crescimento celular, principalmente na menor concentração de curcumina como ocorreu nas outras linhagens testadas, inferindo que curcumina tem um caráter protetor contra a TFD. Nas combinações CIM₅₀ de curcumina com CIM₇₅ de NE-AlFtCl e CIM₇₅ de curcumina com CIM₇₅ de NE-AlFtCl houve a eliminação total dos organismos (**Figura 11**).

hos2 Δ

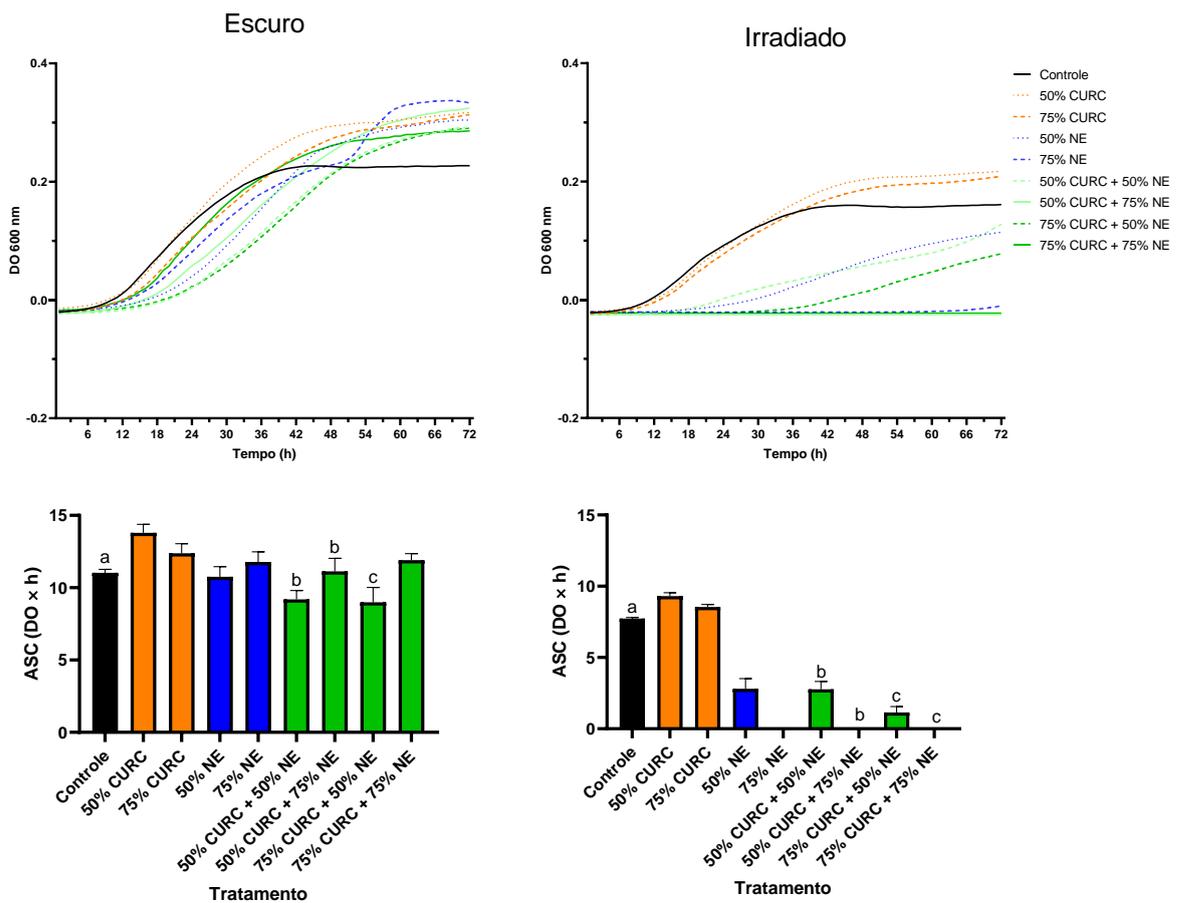


Figura 11. Crescimento de *C. neoformans*, mutante *hos2* Δ , após exposição à curcumina (CURC) e/ou à nanoemulsão contendo alumínio-ftalocianina (NE), seguida de incubação no escuro ou de irradiação com luz vermelha (660 nm, 35,83 J/cm²). Os fungos foram expostos a 50 ou 75% da concentração inibitória mínima de cada composto isoladamente ou em combinação. Na linha superior são apresentadas as curvas de crescimento como densidade óptica em 600 nm (DO 600 nm) em função

do tempo em horas. Na linha inferior estão os gráficos com as áreas sob estas curvas de crescimento (ASC, DO × h) para cada grupo. Significância estatística: **Escuro** – ^ap < 0,05 vs 50% CURC e 75% CURC + 50% NE; ^b p < 0,01 vs 50% CURC; ^cp < 0,01 vs 75% CURC, e 75% NE. **Irradiado** – ^ap < 0,0001 vs todos os grupos, com exceção de 75% CURC; ^bp < 0,001 vs 50% CURC; ^cp < 0,001 vs 75% CURC.

Estudos indicam que linhagens mutantes como a *hos2Δ* podem apresentar alterações na resistência a antifúngicos e na capacidade de causar infecção. (RANJAN, 2021). Porém os resultados podem variar dependendo do antifúngico específico e das condições experimentais. Em alguns estudos, linhagens mutantes como a *hos2Δ* mostraram uma resistência aumentada a certos antifúngicos, enquanto em outros casos, a resistência pode ser reduzida (COUTINHO, 2006; RUIZ, 2009).

Se adicionar curcumina a uma linhagem de *C. neoformans*, onde a *HOS2* foi deletada, os efeitos esperados podem ser diferentes dos observados em linhagens com *HOS2* funcional. Como o gene *HOS2* já foi deletado, a curcumina não teria seu efeito inibidor sobre a enzima específica. No entanto, a curcumina pode ainda inibir outras HDACs presentes na célula, o que pode levar a mudanças na acetilação das histonas e, conseqüentemente, na expressão gênica. Estudos em leveduras mostraram que a curcumina pode aumentar a sensibilidade ao dano de DNA, mesmo em mutantes de HDAC (WANG, *et al.*, 2015).

Portanto, a linhagem de *C. neoformans* sem *HOS2* pode ainda mostrar uma resposta alterada ao dano de DNA na presença de curcumina. Além disso, a ausência de *HOS2* pode afetar a capacidade do fungo de se adaptar a diferentes condições ambientais e de manter sua virulência. A adição de curcumina pode potencialmente exacerbar essas deficiências, tornando o fungo menos virulento e menos capaz de sobreviver em condições adversas (WANG, *et al.*, 2015).

Porém, em CIM₅₀ de curcumina com CIM₅₀ de NE-AIFtCl pode-se observar que a curcumina aumentou a resistência do fungo ao estresse oxidativo gerado pela TFD, provavelmente neutralizando os radicais livres, protegendo as células de danos adicionais, uma vez que a curcumina modula enzimas antioxidantes, em contrapartida a TFD pode aumentar a produção de EROs sob luz, o que pode ser usado para estudar os efeitos do estresse oxidativo em células mutantes, como o que aconteceu em CIM₇₅ de curcumina com CIM₅₀ de NE-AIFtCl, aqui a curcumina intensificou o efeito da TFD.

O efeito das mutações *hos2Δ* e *hda1Δ* pode variar dependendo do contexto específico e do organismo em estudo. A mutação *hos2Δ* afeta a desacetilase de histonas *HOS2*, que está envolvida na regulação de genes relacionados ao estresse e à resposta ao dano ao DNA. A mutação *hda1Δ* afeta a desacetilase de histonas *HDA1*, que também desempenha um papel na

regulação da expressão gênica, mas pode ter funções diferentes e específicas em comparação com *HOS2*. Estudos em organismos como a levedura *Candida albicans* mostram que essas desacetilases podem ter papéis opostos na regulação de traços de virulência. No entanto, a virulência específica de cada mutação pode depender de muitos fatores, incluindo o tipo de célula, o ambiente e a presença de outros genes reguladores (**Tabela 6**) (ZACCHI, *et al.*, 2010).

Tabela 6. Diferenças entre os efeitos de desacetilação por histonas desacetilases HDA1 e HOS2.

	HDA1	HOS2
	HDAC - Classe II	HDAC - Classe I
Principais Funções	Regulação da termotolerância, formação de cápsulas, síntese de melanina, atividade de proteases, integridade da parede celular.	Regulação da resposta ao estresse, produção de EROs, transporte de carboidratos.
Genes Regulados	HSP70, CAP59, CAP64, LAC1, PRB1, CHS3, FKS1	HSP90, SOD1, CAT1, TPS1, GPD1
Impacto na Virulência	Afeta a termotolerância, defeito na formação de cápsulas, síntese de melanina, atividade de proteases, redução da integridade da parede celular.	Afeta a resposta ao estresse e a virulência através da regulação de genes específicos.

Fonte: adaptação de ZACCHI, *et al.*, 2010.

Os possíveis alvos regulatórios de *HOS2* incluem genes envolvidos em processos biológicos cruciais, como a virulência e a adaptação ao ambiente. Em *Ustilago maydis*, *HOS2* regula diretamente os genes de tipo de acasalamento, essenciais para a virulência. Em *Colletotrichum gloeosporioides*, *HOS2* controla a biossíntese de melanina, afetando a formação de apressórios e a capacidade de infecção. Além disso, *HOS2* regula genes que respondem ao estresse ambiental e modula a estrutura da cromatina, influenciando a acessibilidade do DNA para a transcrição. Esses alvos destacam a importância de *HOS2* na regulação de processos críticos para a sobrevivência e patogenicidade dos organismos (ELÍAS-VILLALOBOS *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2022).

Na linhagem H99, a presença da curcumina apresentou uma atividade protetora contra a TFD, houve redução de crescimento nas combinações testadas, porém não houve eliminação total das leveduras em nenhum grupo. Já nas combinações de tratamentos em *hos2Δ*, as combinações CIM₅₀ de curcumina com CIM₇₅ de NE-AlFtCl e CIM₇₅ de curcumina com CIM₅₀

de NE-AIFtCl, apresentaram eliminação total das células, sugerindo assim que a ausência da enzima pode deixar as células mais suscetíveis à TFD, independente da concentração da curcumina em que a célula foi previamente exposta. Com isso, pode-se inferir que HOS2 e HDA1 estão envolvidos no mecanismo de proteção exercido pela curcumina em *C. neoformans* contra os danos oxidativos causados pela TFD.

Em seus estudos, Brandão, 2018 os resultados indicaram que o mutante *hos2* Δ tem dificuldades de crescimento a altas temperaturas, defeitos na produção de melanina, atividade de protease reduzida e menor sobrevivência em macrófagos, mas responde normalmente a estressores da parede celular e mantém a presença de cápsula, o que pode justificar seu crescimento em CIM₅₀ de NE-AIFtCl nos tratamentos combinados.

A geração de EROs, causada pela TFD, pode danificar componentes celulares essenciais, como membranas, proteínas e DNA. No caso do mutante *hos2* Δ , que já apresenta defeitos em vários processos celulares, isso pode resultar em uma maior sensibilidade e danos mais extensos como ocorreu nas combinações que eliminaram as células totalmente, porém para testar a virulência das linhagens *hos2* Δ e *hda1* Δ quando expostas à curcumina e à TFD mediada por NE-AIFtCl, estudos futuros como testes de viabilidade celular, ensaios de estresse oxidativo, adesão e invasão, formação de biofilme e análise de expressão gênica podem ser considerados.

Quando comparam-se os efeitos das combinações de tratamentos nas diferentes linhagens, pode-se observar que na linhagem H99, cuja não há nenhuma mutação, as leveduras tiveram seu crescimento prejudicado, porém não foram eliminadas, considerando assim que a curcumina pode ter exercido dois papéis fundamentais: antioxidante e reguladora epigenética. Na linhagem *hda1* Δ , pode-se inferir que a curcumina em baixas concentrações age da mesma forma que na H99, porém concentrações maiores não conseguem exercer fator protetor, deixando a célula mais vulnerável aos danos causados pela TFD. Já na *hos2* Δ , a curcumina não teve padrão protetor, visto que o crescimento celular se deu independente da concentração desse fármaco e houve desenvolvimento somente nas células expostas a menor concentração de NE – AIFtCl.

6. CONCLUSÃO

O uso de curcumina e de terapia fotodinâmica apresenta um potencial significativo como alternativa terapêutica para o controle de infecções por fungos leveduriformes. Esse estudo investigou a ação dos tratamentos individuais e em combinação no controle de crescimento de linhagens de *C. neoformans*, selvagem, tolerantes ao fluconazol e em mutantes, com genes codificadores de HDACs deletados.

O uso de curcumina em CIM₅₀ e CIM₁₀₀, causou mudanças morfológicas na cápsula das linhagens expostas ao tratamento. Mais estudos devem ser realizados para elucidar os mecanismos que ocorrem para que essas mudanças aconteçam.

O uso individual de cada tratamento foi eficaz nesse controle. Porém, a eficácia do uso combinado destes tratamentos depende da concentração de cada agente. Em *C. neoformans hda1Δ*, curcumina em baixas concentrações (CIM₅₀), protegeu as leveduras contra a TFD, provavelmente por mecanismos de antioxidação e de modulação epigenética da curcumina, com regulação da repressão da transcrição, do ciclo celular e resposta ao estresse. Já em concentrações maiores de curcumina (CIM₇₅), não foi observado um efeito protetor, e a TFD inibiu totalmente o crescimento do fungo.

Na linhagem *hos2Δ*, os resultados foram um pouco diferentes, com a linhagem se desenvolvendo em concentrações menores de NE-AIFtCl, independente da concentração de curcumina, demonstrando assim a atividade de TFD. As diferenças nos resultados sugerem que a curcumina pode ter efeitos protetores em *C. neoformans*, principalmente em concentrações mais baixas, com possível envolvimento de vias epigenéticas.

A curcumina oferece uma abordagem dupla no tratamento de infecções fúngicas: por um lado, sua atividade antioxidante protege as células saudáveis e fortalece a resposta imunológica; por outro, seus efeitos diretos sobre os fungos prejudicam a viabilidade e a funcionalidade das células patogênicas. Essa combinação de mecanismos faz da curcumina uma opção promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos antifúngicos, proporcionando uma abordagem mais completa e eficaz no combate a infecções.

Esses achados dão suporte à continuação da investigação e desenvolvimento dessa abordagem como possível opção para o tratamento de infecções fúngicas causadas por *C. neoformans*, com potencial para melhorar a eficácia dos tratamentos existentes e enfrentar a crescente resistência a antifúngica.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA-PAES, Rodrigo. **Melaninas fúngicas: importância na biologia celular e na patogênese**. Rio de Janeiro, 2015. 38 p.
2. ANANDARADJE, A.; KALITA, B.; COUMAR, M. S. *et al.* Anclagem molecular de curcumina e curcuminoides como inibidores da enzima histona desacetilase (HDAC) dependente de Zn + humana. *In Silico Pharmacol.*, v. 12, p. 47, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40203-024-00221-4>. Acesso em: 10 out. 2024.
3. ARAÚJO, G. R. S.; ALCANTARA, C. L.; RODRIGUES, N.; DE SOUZA, W.; PONTES, B.; FRASES, S. Ultrastructural Study of *C. neoformans* Surface During Budding Events. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 609244, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.609244>. Acesso em: 27 set. 2024.
4. AZARI, B.; ZAHMATKESH MOGHADAM, S.; ZARRINFAR, H.; TASBANDI, A.; JAMIALAHMADI, T.; SAHEBKAR, A. Antifungal Activity of Curcuminoids and Difluorinated Curcumin Against Clinical Isolates of *Candida* Species. In: SAHEBKAR, A.; SATHYAPALAN, T. (eds) **Natural Products and Human Diseases**. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1328. Springer, Cham, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-73234-9_8. Acesso em: 27 set. 2024.
5. BADDLEY, J. W.; CHEN, S. C.; HUISINGH, C.; BENEDICT, K.; DEBESS, E. E.; GALANIS, E.; JACKSON, B. R.; MACDOUGALL, L.; MARSDEN-HAUG, N.; OLTEAN, H.; PERFECT, J. R.; PHILLIPS, P.; SORRELL, T. C.; PAPPAS, P. G. MSG07: An International Cohort Study Comparing Epidemiology and Outcomes of Patients With *Cryptococcus neoformans* or *Cryptococcus gattii* Infections. **Clin Infect Dis.**, v. 73, n. 7, p. 1133-1141, 2021. DOI: 10.1093/cid/ciab268. PMID: 33772538; PMCID: PMC8473583.
6. BAHL, S.; SETO, E. Regulation of histone deacetylase activities and functions by phosphorylation and its physiological relevance. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 78, p. 427–445, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03599-4>. Acesso em: 19 out. 2024.
7. BARBOSA JUNIOR, A. M., MÉLO, D. L. F. M. D., ALMEIDA, F. T. C. D., & TRINDADE, R. D. C.. (2015). Estudo comparativo da susceptibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice, 1895) frente a alguns antifúngicos de uso hospitalar e extratos vegetais obtidos de plantas medicinais da região semiárida sergipana. *Revista Brasileira De Plantas Medicinai*s, 17(1), 120–132. https://doi.org/10.1590/1983-084X/11_177
8. BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>. Acesso em: 19 out. 2024.
9. BERTONCINI-SILVA, C.; OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA, R.; GIACOMO FASSINI, P.; SUEN, V. M. M.; ZINGG, J.-M. Aumentando a biodisponibilidade e a bioatividade da curcumina para prevenção e tratamento de doenças. **Antioxidantes**, v. 13, p. 331, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox13030331>. Acesso em: 27 set. 2024.
10. BONGOMIN, F.; OLADELE, R. O.; GAGO, S.; MOORE, C. B.; RICHARDSON, M. D. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**, v. 61, n. 5, p. 290–297, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.12747>. Acesso em: 27 set. 2024.
11. BRANDÃO, F.; ESHER, S. K.; OST, K. S.; *et al.* Os genes HDAC desempenham papéis distintos e redundantes na virulência de *Cryptococcus neoformans*. **Scientific**

- Reports**, v. 8, n. 1, p. 5209, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-21965-y. PMID: 29581526; PMCID: PMC5979944.
12. BRIZENDINE, K. D.; PAPPAS, P. G. Cryptococcal meningitis: current approaches to management in patients with and without AIDS. **Current infectious disease reports**, v. 12, n. 4, p. 299–305, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11908-010-0113-4>. Acesso em: 27 set. 2024.
 13. CARDONA ECHEVERRY, Andrés Hernán; URIBE YUNDA, Diego Fernando; CORTES-MANCERA, Fabian Mauricio. Actividad antitumoral de la curcumina asociada a la regulación de mecanismos epigenéticos: implicaciones en la vía Wnt/-catenina. **Rev Cubana Plant Med**, Ciudad de la Habana , v. 21, n. 4, dic. 2016 . Disponível en <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962016000400013&lng=es&nrm=iso>. accedido en 06 oct. 2024.
 14. CARRIJO, Amanda; CARRIJO, Beatriz; MACHADO, Lara; ALMEIDA, Rogério; OLIVEIRA, Pedro Paulo. Análise clínico-epidemiológica de criptococose em indivíduos com hiv: uma revisão sistemática / Clinical-epidemiological analysis of cryptococosis and hiv coinfection: a systematic review. **Brazilian Applied Science Review**, v. 5, p. 802-817, 2021. DOI: 10.34115/basrv5n2-014.
 15. CASTRO, R. J. A. de; RÊGO, M. T. A. M.; BRANDÃO, F. S.; PÉREZ, A. L. A.; DE MARCO, J. L.; POÇAS-FONSECA, M. J.; NICHOLS, C.; ALSPAUGH, J. A.; FELIPE, M. S. S.; ALANIO, A.; BOCCA, A. L.; FERNANDES, L. Engineered Fluorescent Strains of *Cryptococcus neoformans*: a Versatile Toolbox for Studies of Host-Pathogen Interactions and Fungal Biology, Including the Viable but Nonculturable State. **Microbiol Spectr**, v. 10, e01504-22, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01504-22>. Acesso em: 19 out. 2024.
 16. CHEN, C.; LONG, L.; ZHANG, F.; CHEN, Q.; CHEN, C.; YU, X.; LIU, Q.; BAO, J.; LONG, Z. Antifungal activity, main active components and mechanism of *Curcuma longa* extract against *Fusarium graminearum*. **PLoS one**, v. 13, n. 3, e0194284, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194284>. Acesso em: 27 set. 2024.
 17. COLLINO, Luma. Curcumina: de Especiaria à Nutracêutico. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, 2014. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/fa5b6916-ec6d-48c9-af37-f3d42526561d>. Acesso em: 27 out. 2024.
 18. CORDERO, R. J. B.; CAMACHO, E.; CASADEVALL, A. Melanization in *Cryptococcus neoformans* Requires Complex Regulation. **mBio**, v. 11, 2020. DOI: 10.1128/mbio.03313-19. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mbio.03313-19>. Acesso em: 27 set. 2024.
 19. CORRÊA, Josiane Santos; FERNANDES, Gabriela Rocha; BATISTA, Maely Oliveira; RAMOS, Denny Vitor Barbosa; OLIVEIRA, Daniel Batasini de; OLIVEIRA, César Augusto Batasini de. Potencial anti-inflamatório e antioxidante da *Curcuma longa* L. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, ano 06, ed. 06, v. 04, p. 87-107, jun. 2021. ISSN: 2448-0959. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/curcuma-longa>. Acesso em: 27 out. 2024. DOI: 10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/saude/curcuma-longa.
 20. COUTINHO, Giovane. **Fatores de virulência e resistência a antifúngicos de amostras clínicas e ambientais de *Cryptococcus neoformans* / Virulence factors and resistance to antifungal in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans***. 2006. 126 p. Tese (Mestrado) - São Paulo, s.n, 2006. Disponível em: LILACS, SES-SP, SESSP-CTDPROD, SES-SP, SESSP-TESESESSP, SES-SP. ID: lil-456688.
 21. CRUZ, A.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, E.; TEIXEIRA, A.; MARTÍN-RAMOS, P.; CUNHA, A.; OLIVEIRA, R. Antifungal and Antioomycete Activities of a *Curcuma*

- longa L. Hydroethanolic Extract Rich in Bisabolene Sesquiterpenoids. **Horticulturae**, v. 10, p. 124, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/horticulturae10020124>. Acesso em: 27 set. 2024.
22. DIAS, B. de P.; RIBEIRO, E. M. de C.; GONÇALVES, R. L.; OLIVEIRA, D. S.; FERREIRA, T. H.; SILVA, B. de M. A nanotecnologia no Brasil e o desenvolvimento de produtos com atividade antimicrobiana. **Química Nova**, v. 44, n. 8, p. 1084–1092, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170743>. Acesso em: 27 set. 2024.
23. DURÁN, M. V.; LANDABURU, M. F. Criptococosis diseminada en un paciente inmunosuprimido [Disseminated cryptococcosis in an immunosuppressed patient]. **Medicina (B Aires)**, v. 82, n. 6, p. 995, 2022. PMID: 36571554.
24. ELÍAS-VILLALOBOS, A.; FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A.; MORENO-SÁNCHEZ, I.; HELMLINGER, D.; IBEAS, J. I. The Hos2 Histone Deacetylase Controls Ustilago maydis Virulence through Direct Regulation of Mating-Type Genes. **PLoS Pathog.**, v. 11, n. 8, e1005134, 2015. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005134. PMID: 26317403; PMCID: PMC4552784.
25. FERNANDES, K. E.; FRASER, J. A.; CARTER, D. A. Linhagens derivadas de *Cryptococcus neoformans* Tipo Cepa H99 suportam uma ligação entre a capacidade de ser pleomórfico e virulência. **mBio**, v. 13, e00283-22, 2022. DOI: 10.1128/mbio.00283-22. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mbio.00283-22>. Acesso em: 27 set. 2024.
26. FONSECA, D. L. H.; SILVA, D. M. W.; MARANHÃO, F. C. A. Molecular characterization of clinical and environmental isolates from the *Cryptococcus neoformans*/C. Gattii species complexes of Maceió, Alagoas, Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 55, p. 1369–1380, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01313-1>. Acesso em: 19 out. 2024.
27. FREITAS, Vivianny Aparecida Queiroz. **Ação da curcumina e morina em leveduras do complexo C. neoformans**. 2017. Tese (Doutorado em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstreams/2e98751a-dfc2-4d19-9c7a-c3b8f66ef1ce/download>. Acesso em: 27 set. 2024.
28. GARMPI, A.; DAMASKOS, C.; GARMPI, N.; KAMINIOTIS, V. V.; GEORGAKOPOULOU, V.; SPANDIDOS, D.; PAPALEXIS, P.; DIAMANTIS, E.; ΠΑΤΣΟΥΡΑΣ, A.; KYRIAKOS, G.; TARANTINOS, K.; SYLLAIOS, A.; MARINOS, G.; KOURAKLIS, G.; DIMITROULIS, D. Role of histone deacetylase inhibitors in diabetic cardiomyopathy in experimental models (Review). **Medicine International**, v. 2, 2022. DOI: 10.3892/mi.2022.51.
29. GUSHIKEN, A. C.; SAHARIA, K. K.; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 35, n. 2, p. 493-514, 2021. DOI: 10.1016/j.idc.2021.03.012. PMID: 34016288.
30. HAMED, M. F.; ARAÚJO, G. R. D. S.; MUNZEN, M. E.; REGUERAGOMEZ, M.; EPSTEIN, C.; LEE, H. H.; FRASES, S.; MARTINEZ, L. R. Phospholipase B Is Critical for *Cryptococcus neoformans* Survival in the Central Nervous System. **mBio**, v. 14, e02640-22, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mbio.02640-22>. Acesso em: 27 set. 2024.
31. HASSAN, Faiz-ul; REHMAN, Muhammad Saif-ur; KHAN, Muhammad Sajjad; ALI, Muhammad Amjad; JAVED, Aroosa; NAWAZ, Ayesha; YANG, Chengjian. Curcumin as an Alternative Epigenetic Modulator: Mechanism of Action and Potential Effects. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/genetics/articles/10.3389/fgene.2019.00514>. DOI: 10.3389/fgene.2019.00514. ISSN: 1664-8021. Acesso em: 19 out. 2024.

32. Hogg, S. J., Beavis, P. A., Dawson, M. A., & Johnstone, R. W. (2020). Targeting the epigenetic regulation of antitumour immunity. *Nature reviews. Drug discovery*, 19(11), 776–800. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0077-5>
33. HU, P.; LIU, L.; KE, W.; *et al.* A cyclin protein governs the infectious and sexual life cycles of *C. neoformans*. **Sci. China Life Sci.**, v. 64, p. 1336–1345, 2021. DOI: 10.1007/s11427-020-1697-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1697-3>. Acesso em: 27 set. 2024.
34. IRACANE, E.; VEGA-ESTÉVEZ, S.; BUSCAINO, A. On and Off: Epigenetic Regulation of *C. albicans* Morphological Switches. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 11, p. 1463, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10111463. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens10111463>. Acesso em: 27 set. 2024.
35. ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501–511, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000400011>. Acesso em: 27 set. 2024.
36. JANBON, Guilhem. *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 8, p. 765-771, 2004. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article/4/8/765/627504>. Acesso em: 27 set. 2024.
37. KAZANTZIS, K. T.; KOUTSONIKOLI, K.; MAVROIDI, B.; ZACHARIADIS, M.; ALEXIOU, P.; PELECANOU, M.; POLITOPOULOS, K.; ALEXANDRATOU, E.; SAGNO, M. Derivados de curcumina como fotossensibilizantes em terapia fotodinâmica: propriedades fotofísicas e estudos in vitro com células de câncer de próstata. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 19, p. 193-206, 2020. DOI: 10.1039/C9PP00375D.
38. KHAYATAN, D.; RAZAVI, S. M.; ARAB, Z. N. *et al.* Superóxido dismutase: um alvo-chave para os efeitos neuroprotetores da curcumina. *Mol Cell Biochem*, v. 479, p. 693–705, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11010-023-04757-5>. Acesso em: 19 out. 2024.
39. KIM, M. Y.; YAN, B.; HUANG, S.; QIU, Y. Regulating the Regulators: The Role of Histone Deacetylase 1 (HDAC1) in Erythropoiesis. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, p. 8460, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21228460>. Acesso em: 27 set. 2024.
40. LAHMER, T.; BATRES BAIRES, G.; SCHMID, R. M.; WIESSNER, J. R.; ULRICH, J.; REICHERT, M.; HUBER, W.; SÖRGEL, F.; KINZIG, M.; RASCH, S.; MAYR, U. Penetração do isavuconazol no líquido da ascite de pacientes críticos. **Jornal de fungos (Basileia, Suíça)**, v. 7, n. 5, p. 376, 2021. DOI: 10.3390/jof7050376. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7050376>. Acesso em: 27 set. 2024.
41. LAI, Y.; WANG, L.; ZHENG, W.; WANG, S. Funções regulatórias de modificações de histonas em patógenos fúngicos filamentosos. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 6, p. 565, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof8060565>.
42. LEE, H. H.; CARMICHAEL, D. J.; RÍBEIRO, V.; PARISI, D. N.; MUNZEN, M. E.; *et al.* Glucuronoxylomannan intranasal challenge prior to *C. neoformans* pulmonary infection enhances cerebral cryptococcosis in rodents. **PLOS Pathogens**, v. 19, n. 4, e1010941, 2023. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010941. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010941>. Acesso em: 27 set. 2024.
43. Liu, S., Wang, Q., Liu, N. *et al.* The histone deacetylase HOS2 controls pathogenicity through regulation of melanin biosynthesis and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathol Res* 4, 21 (2022). <https://doi.org/10.1186/s42483-022-00126-0>

44. LÚCIO, Jordânia De Morais *et al.* **Cúrcuma longa L. e sua ação epigenética: uma revisão sistemática.** Anais II CONBRACIS... Campina Grande: Realize Editora, 2017.
45. MACHADO, A. E. da H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-4042200000200015>. Acesso em: 27 set. 2024.
46. MARANHÃO, F. C. A.; FONSECA, D. L. H.; SANTOS, G. S. A.; FONSECA, L. A. V.; SANTOS, E. J. L.; SILVA, D. M. W. Disseminated and cutaneous cryptococcosis by *C. neoformans* VNI in an immunocompetent patient. **Jornal Brasileiro De Patologia E Medicina Laboratorial**, v. 56, e1722020, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200017>. Acesso em: 27 set. 2024.
47. MARTINS, C. V. B.; SILVA, D. L. da; NERES, A. T. M.; MAGALHÃES, T. F. F.; WATANABE, G. A.; MODOLO, L. V.; SABINO, A. A.; FÁTIMA, Â. de; RESENDE, M. A. de. Curcumina como um promissor antifúngico de interesse clínico. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 337-339, fev. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkn488>. Acesso em: 27 set. 2024.
48. MASSARANI, Susana; LOBO, Isabela. **Vantagens do uso combinado da curcumina e do óleo essencial da Curcuma longa na modulação epigenética do câncer.** In: **Genômica Brasil**, 1ª edição, de 10/04/2021 a 11/04/2021. ISBN dos Anais: 978-65-89908-01-2.
49. MATHA, A. R.; XIE, X.; LIN, X. Ergosterol is critical for sporogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Fungi*, v. 10, n. 2, p. 106, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof10020106>. Acesso em: 11 out. 2024.
50. Ming, T., Tao, Q., Tang, S., Zhao, H., Yang, H., Liu, M., Ren, S., & Xu, H. (2022). Curcumin: An epigenetic regulator and its application in cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 156, 113956. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113956>
51. MORAIS, J. A. V.; RODRIGUES, M. C.; FERREIRA, F. F.; RANJAN, K.; AZEVEDO, R. B.; POÇAS-FONSECA, M. J.; MUEHLMANN, L. A. Photodynamic therapy inhibits cell growth and enhances the histone deacetylase-mediated viability impairment in *Cryptococcus* spp. in vitro. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 29, p. 101583, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101583>. Acesso em: 27 set. 2024.
52. MOREIRA, T. de A.; FERREIRA, M. S.; RIBAS, R. M.; BORGES, A. S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 255–258, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000300005>. Acesso em: 27 set. 2024.
53. MUEHLMANN, L. A.; RODRIGUES, M. C.; PAULO, J.; *et al.* Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **J Nanobiotech**, v. 13, n. 36, p. 1–11, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12951-0150095-3>. Acesso em: 27 set. 2024.
54. MUSELIUS, B.; DURAND, S.-L.; GEDDES-MCALISTER, J. Proteomics of *C. neoformans*: From the Lab to the Clinic. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, p. 12390, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22212390>. Acesso em: 27 set. 2024.
55. NUNES, L. C. Efeito da terapia fotodinâmica mediada por cloreto de alumínio-ftalocianina associada ao uso de ~~droga~~**drogafármacofármacos** epigenéticas sobre o crescimento de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. 2023. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2023.

56. OLIVEIRA, A.; STARCK, É.; OLIVEIRA, G. G. Doenças causadas por fungos. In: CARDOSO, A. M.; MANFREDI, L. H.; MACIEL, S. F. V. O., eds. **Sinalização purinérgica: implicações fisiopatológicas** [online]. Chapecó: Editora UFFS, 2021, pp. 321-336. ISBN: 978-65-86545-47-0.
57. OLIVEIRA, K. T. de; SOUZA, J. M. de; GOBO, N. R. S.; ASSIS, F. F. de; BROCKSOM, T. J. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizantes do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2015. Data de publicação na Web: 27 de outubro de 2015.
58. OLIVEIRA, Rafael Furlan de; MARTINEZ, Diego Stéfani Teodoro; FAZZIO, Adalberto. A nanotecnologia na saúde: a nanotecnologia e os nanomateriais são elementos centrais para a inovação e solução de problemas na área da saúde. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 74, n. 4, dez. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/2317-6660.20220060>. Acesso em: 27 set. 2024.
59. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global guidance framework for the responsible use of the life sciences: mitigating biorisks and governing dual-use research**. Genebra: OMS, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>. Acesso em: 27 set. 2024.
60. PATRA, S.; RANEY, M.; PAREEK, A.; KAUR, R. Epigenetic Regulation of Antifungal Drug Resistance. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 8, p. 875, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof8080875>. Acesso em: 27 set. 2024.
61. PESSOA, Cláudia Cristina Brito; SILVA, Sílvia Helena Marques da; GOMES, Fabíola Silveira. Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem clínica em Belém, Estado do Pará, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 3, n. 2, p. 7, 2012. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v3n2/v3n2a08.pdf>. Acesso em: 27 set. 2024.
62. QUEIROZ, Rafael Santos. Aplicação da Terapia Fotodinâmica no Tratamento Endodôntico: Revisão de Literatura. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Cesumar (UNICESUMAR), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Maringá, 2020.
63. QUEMEL, Gleicy Kelly China; VALE, Valéria Silva do; SOUZA, Fabrício Diego Medeiros de; SILVA, Ana Carolina Rodrigues e; MACIEL, Marianna Paiva; SANTOS, Gabriel Cardoso de Queiroz. Revisão da literatura sobre o uso da *Curcuma longa* L. como terapêutica em processos inflamatórios. *International Journal of Development Research*, v. 11, n. 05, p. 46856-46863, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.37118/ijdr.21770.05.2021>. Acesso em: 08 out. 2024.
64. RANJAN, K. Combined strategies for cryptococcus sp. growth control: antifungal drugs, epigenetic modulators, photodynamic therapy and actinobacteria-derived metabolites. 2021. 139 f., il. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2021.
65. RATHORE, S. S.; SATHIYAMOORTHY, J.; LALITHA, C.; RAMAKRISHNAN, J. Uma revisão holística sobre *Cryptococcus neoformans*. **Microb Pathog.**, v. 166, p. 105521, maio 2022. DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105521. Epub 15 abr. 2022. PMID: 35436563.
66. REUTER, S.; GUPTA, S. C.; PARK, B. *et al.* Alterações epigenéticas induzidas por curcumina e outros compostos naturais. *Genes Nutr*, v. 6, p. 93–108, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0222-1>.
67. RISTOW, L. C.; JEZEWSKI, A. J.; CHADWICK, B. J.; *et al.* *C. neoformans* adapts to the host environment through TOR-mediated remodeling of phospholipid

- asymmetry. *Nat Commun*, v. 14, p. 6587, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42318-y>. Acesso em: 27 set. 2024.
68. RIVAS, M. P.; TEIXEIRA, A. C. B.; KREPISCHI, A. C. V. Epigenética: conceito, mecanismos e impacto em doenças humanas. *Genética na Escola*, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 14–25, 2019. DOI: 10.55838/1980-3540.ge.2019.311. Disponível em: <https://www.geneticanaescola.com.br/revista/article/view/311>. Acesso em: 27 out. 2024.
69. RUIZ, Mariana da Silva. **Avaliação do fenômeno de heteroresistência em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* / Evaluation of the heteroresistance phenomenon in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans***. 2009. [66] p. Tese (Mestrado) - São Paulo, s.n, 2009. Disponível em: LILACS, SES-SP, SESSP-CTDPROD, SES-SP, SESSP-ACVSES, SESSP-TESESESSP, SES-SP. ID: biblio-1073981.
70. SANTOS, Thiago Vieira Soares dos. **Terapia Fotodinâmica: uma revisão dos conceitos gerais e dos avanços de novos sistemas carreadores desenvolvidos com base na nanotecnologia**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/30674>. Acesso em: 27 set. 2024.
71. SAVOLDI PICOLI, M. H.; RUZZENE, H. Influência da luz led azul no crescimento de fungos e bactérias in vitro. *Revista Da UI_IPSantarém*, v. 11, n. 3, p. 22–23, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.25746/ruiips.v11.i3.32226>. Acesso em: 08 out. 2024.
72. SILVA, S. P. da; COSTA, C. B. L. da; SILVA, J. D. F. da; ALVES, R. R. de V.; SILVA, G. A. de S.; FREITAS, A. F. S. de; GUEDES, C. C. da S.; MARINHO, A. de O.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H. Resistance mechanisms of *Cryptococcus* spp. and plant compounds as tools to combat them. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 2, p. e57810212819, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12819. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12819>. Acesso em: 18 out. 2024.
73. SINGH, R.; RATHORE, A. S.; DILNASHIN, H.; *et al.* HAT and HDAC: Enzyme with Contradictory Action in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-024-04115-6>. Acesso em: 27 set. 2024.
74. SLOAN, Derek; DLAMINI, Siphon; DEDICOAT, Martin. Management of cryptococcal meningitis in resource-limited settings: A systematic review. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*, v. 99, p. 310-2, 2009.
75. SOFLAEI, Sara Saffar; MOMTAZI-BOROJENI, Amir Abbas; MAJEED, Muhammed; DEROSA, Giuseppe; MAFFIOLI, Pamela; SAHEBKAR, Amirhossein. Curcumin: A Natural Pan-HDAC Inhibitor in Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, v. 24, n. 2, 2018. DOI: 10.2174/1381612823666171114165051.
76. SOUSA, A. V. D.; CARVALHO, I. B. A.; CARVALHO, T. B. A.; PINTO, A. S. B. Uso da terapia fotodinâmica em infecções recorrentes: evidência atual. *Ciências da Saúde*, v. 27, n. 127, 2023.
77. Specian, V.; Orlandelli, R. C.; Felber, A. C.; Azevedo, J. L.; Pamphile, J. A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. *J. Health Sci.* [Internet]. 1º de julho de 2015 [citado 9º de outubro de 2024]; 16(4). Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsscogna.com.br/JHealthSci/article/view/393>.
78. SPECKBACHER, V.; FLATSCHACHER, D.; MARTINI-LÖSCH, N.; ULBRICH, L.; BALDIN, C.; BAUER, I.; RUZSANYI, V.; ZEILINGER, S. The histone deacetylase Hda1 affects oxidative and osmotic stress response as well as mycoparasitic activity and secondary metabolite biosynthesis in *Trichoderma atroviride*. *Microbiol. Spectr.*, v. 12, p. e03097-23, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/spectrum.03097-23>. Acesso em: 19 out. 2024.

79. STEMPINSKI, P. R.; GERBIG, G. R.; GREENGO, S. D.; CASADEVALL, A. Último, mas não levedura — As muitas formas de *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathogens*, v. 19, n. 1, p. e1011048, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011048>. Acesso em: 19 out. 2024.
80. SUDARSHAN SINGH RATHORE; JANANISHREE SATHIYAMOORTHY; CHEEPURUPALLI LALITHA; JAYAPRADHA RAMAKRISHNAN. A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. *Microbial Pathogenesis*, v. 166, p. 105521, 2022. ISSN 0882-4010.
81. SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G. P.; DECOTÉ-RICARDO, D.; LIMA, M. E. F. de. CURCUMINA, O PÓ DOURADO DO AÇAFRÃO-DA-TERRA: INTROSPECÇÕES SOBRE QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS. *Química Nova*, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150035>. Acesso em: 27 set. 2024.
82. TIAN, X.; HE, G. J.; HU, P.; CHEN, L.; TAO, C.; CUI, Y. L.; SHEN, L.; KE, W.; XU, H.; ZHAO, Y.; XU, Q.; BAI, F.; WU, B.; YANG, E.; LIN, X.; WANG, L. A reprodução sexual de *Cryptococcus neoformans* é controlada por um peptídeo de detecção de quorum. *Nat Microbiol.*, v. 3, n. 6, p. 698-707, jun. 2018. DOI: 10.1038/S41564-018-0160-4. Epub 21 maio 2018. PMID: 29784977.
83. TOPLIS, B.; BOSCH, C.; SCHWARTZ, I. S.; KENYON, C.; BOEKHOUT, T.; PERFECT, J. R.; BOTHA, A. O fator de virulência urease e seu papel inexplorado no metabolismo de *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.*, v. 20, n. 4, FOAA031, 1º jun. 2020. DOI: 10.1093/femsyr/foaa031. PMID: 32490521; PMCID: PMC7592176.
84. TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; FESTA NETO, C. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, v. 84, n. 5, p. 445–459, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000500002>. Acesso em: 27 set. 2024.
85. VU, K.; GELLI, A. Astemizole and an analogue promote fungicidal activity of fluconazole against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*. *Medical mycology*, v. 48, n. 2, p. 255–262, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13693780903081968>. Acesso em: 27 set. 2024.
86. WANG, Shu-Huei; LIN, Pei-Ya; CHIU, Ya-Chen; HUANG, Ju-Sui; KUO, Yi-Tsen; WU, Jen-Chine; CHEN, Chin-Chuan. A inibição de HDAC mediada por curcumina suprime a resposta a danos no DNA e contribui para o aumento da sensibilidade a danos no DNA. *PLOS ONE*, [s.l.], v. 10, n. 7, p. e0134110, 28 jul. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134110>.
87. WALTSON, Noah; KUPPUSWAMY, Sivaraman; LEDFORD, William Luke; SUKUMARI-RAMESH, Sangeetha. The role of HDAC3 in inflammation: mechanisms and therapeutic implications. *Frontiers in Immunology*, v. 15, 2024. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1419685>. Acesso em: 19 out. 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1419685. ISSN: 1664-3224.
88. YANG, D. H.; JUNG, K. W.; BANG, S.; LEE, J. W.; SONG, M. H.; FLOYD-AVERETTE, A.; FESTA, R. A.; IANIRI, G.; IDNURM, A.; THIELE, D. J.; HEITMAN, J.; BAHN, Y. S. Rewiring of Signaling Networks Modulating Thermotolerance in the Human Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*, v. 205, n. 1, p. 201–219, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1534/genetics.116.190595>. Acesso em: 27 set. 2024.
89. YEUNG, A. W. K.; HORBAŃCZUK, M.; TZVETKOV, N. T.; OLIVEIRA, A.; CARRADORI, S.; OLIVEIRA, F.; OLIVEIRA, J.; SUT, S.; DALL'ACQUA, S.; GAN, R.-Y.; *et al.* Curcumina: Análise em Escala Total da Literatura Científica. *Moléculas*,

- v. 24, p. 1393, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24071393>. Acesso em: 27 set. 2024.
90. ZACCHI, L. F.; SCHULZ, W. L.; DAVIS, D. A. *HOS2* and *HDA1* encode histone deacetylases with opposing roles in *Candida albicans* morphogenesis. **PLoS One**, v. 5, n. 8, e12171, 13 ago. 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0012171. PMID: 20730094; PMCID: PMC2921335.
 91. ZHANG J, JIANG C, FIGUEIRÓ LONGO JP, AZEVEDO RB, ZHANG H, MUEHLMANN LA. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2018;8(2):137-146. doi:10.1016/j.apsb.2017.09.003
 92. ZHAO, Y.; LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Sexo, morfogênese e virulência. **Infectar Genet Evol.**, v. 89, p. 104731, abr. 2021. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104731. EPub 23 jan. 2021. PMID: 33497839; PMCID: PMC8092418.