

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Júlio Roger Evangelista dos Santos

**Avaliação do fenômeno de tolerância ao itraconazol em *Cryptococcus
neoformans***

Belo Horizonte

2022

Júlio Roger Evangelista dos Santos

Avaliação do fenômeno de tolerância ao itraconazol em *Cryptococcus neoformans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas: Ênfase em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

Belo Horizonte

2022

043

Santos, Júlio Roger Evangelista dos.

Avaliação do fenômeno de tolerância ao itraconazol em *Cryptococcus neoformans* [manuscrito] / Júlio Roger Evangelista dos Santos. – 2022.

61 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Daniel de Assis Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. *Cryptococcus neoformans*. 3. *Cryptococcus gattii*. 4. Itraconazol. 5. Tolerância a medicamentos. I. Santos, Daniel de Assis. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **JÚLIO ROGER EVANGELISTA DOS SANTOS**

Nº REGISTRO: **2020682642**

Às 14:00 horas do dia **23 de fevereiro de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Gabriella de Freitas Ferreira (Universidade Federal de Juiz de Fora), Simone Gonçalves dos Santos-Key (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), e o Prof. Dr. Daniel de Assis Santos – Orientador, para julgar o trabalho final “**Avaliação do fenômeno de tolerância ao itraconazol em *Cryptococcus neoformans***”, do aluno **Julio Roger Evangelista dos Santos**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Daniel de Assis Santos - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2022

Membros da banca:

Dra. Gabriella de Freitas Ferreira

Profa. Dra. Simone Gonçalves dos Santos-Key

De acordo:

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

(Orientador)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 24/02/2022, às 08:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 25/02/2022, às 13:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriella Freitas Ferreira, Usuário Externo**, em 03/03/2022, às 09:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Goncalves dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 13/04/2022, às 20:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1276740** e o código CRC **D4398548**.

Dedico este trabalho a todos os
pesquisadores que vem dando seu
melhor durante a pandemia,
contribuindo além da pesquisa,
mas também no enfrentamento a
COVID-19.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de alcançar essa meta, pela saúde e disposição que me permitiram a realização deste trabalho.

À minha mãe Simone e à meu pai Julimar, pela paciência, pela torcida, por cuidarem de mim, pelo incentivo, por toda a ajuda e por acreditarem em mim, nunca chegaria até aqui se não tivesse o amor e apoio de vocês.

À Marisa Casteluber e Mariana Reis, que desde minha graduação sempre me estimularam a buscar mais e acreditaram em mim, antes diria que são minhas ex professoras, mas sei que hoje posso dizer que são minhas amigas.

Ao meu orientador Daniel pela gentileza e confiança de me aceitar como orientando mesmo sem me conhecer e pelo auxílio em conduzir todo esse trabalho e a professora Nalu que sempre esteve disposta a ajudar os alunos do laboratório, seu suporte foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Micologia por todos os aprendizados, risadas e pela paciência em me ensinar, em especial Danielle, Geislane, Gustavo, Junya, Lívia, Ludmila, Paulo, Queila, Tamires e Victor. Agradeço também as ICs Bruna, Martha e Isabela por todo suporte e pelos ótimos momentos durante os experimentos.

A minhas colegas do LEFM Gabi e Karen, e do LABio Lara, Maísa e Samantha por todos os momentos compartilhados e por todo apoio, todas foram muito especiais durante esse período.

Ao Laboratório Mycoantar e ao professor Luiz Rosa por ceder o uso do laboratório para realização de alguns experimentos.

A minha amiga e eterna dupla de graduação Petúnia por todo o estímulo e por sempre me apoiar, nossas risadas serão eternas e você fez uma imensa falta durante o mestrado.

A Letícia Maria que embarcou comigo nesse desafio da pós graduação e sempre me auxiliou em ser um pesquisador melhor mesmo com todos os desafios que vivemos diariamente.

Aos membros da comissão examinadora, professores Gabriella Freitas, Simone Santos e Luiz Rosa, por aceitarem colaborar com a elaboração deste trabalho.

A todos aqueles que, embora não citados aqui, contribuíram de alguma forma para a minha formação e educação durante toda a minha vida, os meus sinceros agradecimentos.

“Um pássaro que repousa numa árvore nunca teme que o galho quebre, porque sua confiança não é no galho, mas nas suas próprias asas.”

(Elis Busanello)

RESUMO

Cryptococcus são leveduras encapsuladas que causam a criptococose. As principais espécies de importância clínica são *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. Os fármacos utilizados para seu tratamento no Brasil são anfotericina B e derivados azólicos como o itraconazol. O tratamento é longo e muitas vezes ineficaz por mecanismos de adaptação do fungo, como a tolerância. A tolerância é definida como a capacidade de sobrevivência do fungo na presença da droga, mesmo não havendo alteração da concentração inibitória mínima (CIM). Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a tolerância ao itraconazol em diferentes linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*. Inicialmente, foi avaliada a CIM de itraconazol para 53 linhagens de *C. neoformans*, sendo 17 linhagens selvagens e 36 linhagens com genes deletados, e 16 linhagens selvagens de *C. gattii* nas temperaturas de 30 °C e 35 °C. A CIM variou entre 0,03 e 2,00 µg/mL, apresentando um padrão de linhagens mais susceptíveis a 35 °C tanto para *C. neoformans* quanto para *C. gattii*. Posteriormente, selecionamos 17 linhagens com os maiores e menores valores de CIM, para análises de curva de crescimento nas concentrações de CIM, 2xCIM e 0,5CIM a fim de avaliar perfil de tolerância. Em seguida nós investigamos 10 dessas linhagens, que apresentaram crescimento na CIM para a análise de Unidades Formadoras de Colônias para verificar a viabilidade das células. Encontramos 4 linhagens capazes de crescer nas suas respectivas CIM, nas quais 2 foram capazes de crescer na CIM de 30 °C e 35 °C. A tolerância ao itraconazol causou uma mudança na morfologia dessas células, que apresentaram um aglomerado de células e o aspecto irregular se comparadas as linhagens não tratadas. As linhagens tolerantes ao itraconazol, que é um agente indutor de estresse oxidativo, não apresentaram um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e não houve alteração na produção de ergosterol que é um dos alvos desse fármaco. Estes resultados nos mostram que a resposta ao estresse oxidativo e a regulação do ergosterol podem ser alguns dos possíveis meios de adaptação que contribuíram para o fenômeno de tolerância.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, itraconazol, tolerância

ABSTRACT

Cryptococcus are encapsulated yeasts that cause cryptococcosis. The main species of clinical importance are *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. The drugs used for its treatment in Brazil are amphotericin B and azole derivatives such as itraconazole. Treatment is long and often ineffective due to fungal adaptation mechanisms, like tolerance. Tolerance is defined as the ability of the fungus to survive in the presence of the drug, even with no change in the minimum inhibitory concentration (MIC). In this context, this study aimed to evaluate the tolerance to itraconazole in different strains of *C. neoformans* and *C. gattii*. Initially, the MIC of itraconazole was evaluated for 53 strains of *C. neoformans*, being 17 wild-type strains and 36 strains with deleted genes, and 16 wild-type strains of *C. gattii* at temperatures of 30 °C and 35 °C. The MIC varied between 0.03 and 2.00 µg/mL, showing a pattern of more susceptible strains at 35 °C for both *C. neoformans* and *C. gattii*. Subsequently, we selected 17 lines with the highest and lowest MIC values for growth curve analysis at MIC, 2xMIC and 0.5MIC concentrations in order to assess tolerance profile. Next we investigated 10 of these strains, that showed growth in the MIC for the analysis of Colony Forming Units to verify the viability of the cells. We found 4 strains capable of growing at their respective MIC, in which 2 were able to grow at MIC of 30 °C and 35 °C. Tolerance to itraconazole caused a change in the morphology of these cells, which presented an agglomeration of cells and an irregular appearance when compared to untreated strains. The strains tolerant to itraconazole, which is an oxidative stress-inducing agent, did not show an increase in the production of reactive oxygen species and there was no change in the production of ergosterol, which is one of the targets of this drug. These results show us that the response to oxidative stress and the regulation of ergosterol may be some of the possible means of adaptation that contributed to the phenomenon of tolerance.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, itraconazole, tolerance

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AIDS do inglês, *acquired immunodeficiency syndrome*

AMB anfotericina B

ASD ágar Sabouraud-Dextrose

BHE barreira hematoencefálica

CIM concentração inibitória mínima

FLU fluconazol

GXM: Glucoronoxilomanano

GalXM: Galactoxilomanana

HIV do inglês, *human immunodeficiency vírus*

ITC itraconazol

mg miligrama (s)

ml mililitro (s)

NT não tratado

OMS Organização Mundial da Saúde

SNC sistema nervoso central

T tratado

UFC unidades formadoras de colônia

VRZ voriconazol

µg micrograma (s)

µl microlitro (s)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O modelo de disseminação de <i>Cryptococcus neoformans</i> até o SNC.....	11
Figura 2: Esquema da placa de microdiluição de 96 poços para determinação da concentração inibitória mínima.....	25
Figura 3: Curvas de crescimento de linhagens de <i>Cryptococcus neoformans</i> H99, 24067, K99 tratadas com itraconazol.....	33
Figura 4: Curvas de crescimento de linhagens mutantes de <i>Cryptococcus neoformans</i> K99 tratadas com itraconazol.....	34
Figura 5: Curvas de crescimento de linhagens mutantes de <i>Cryptococcus neoformans</i> K99 tratadas com itraconazol.....	35
Figura 6: Curvas de crescimento de linhagens mutantes de <i>Cryptococcus neoformans</i> K99 tratadas com itraconazol.....	36
Figura 7: Curvas de crescimento de linhagens de <i>Cryptococcus gattii</i> tratadas com itraconazol.....	37
Figura 8: Viabilidade das linhagens de <i>C. neoformans</i> durante tratamento com itraconazol.....	38
Figura 9: Viabilidade das linhagens de <i>C. gattii</i> durante tratamento com itraconazol.....	39
Figura 10: Crescimento das linhagens de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> após 72h de tratamento.....	40
Figura 11: Morfometria das linhagens tolerantes à ITC de <i>C. neoformans</i>	41
Figura 12: Tamanho do corpo celular das linhagens tolerantes à ITC de <i>C. neoformans</i> e da linhagem selvagem de K99.....	42
Figura 13: Tamanho da cápsula das linhagens tolerantes à ITC de <i>C. neoformans</i> e da linhagem selvagem de K99.....	43

Figura 14: Diâmetro celular das linhagens tolerantes à ITC de <i>C. neoformans</i> e da linhagem selvagem de K99.....	44
Figura 15: Relação superfície/volume das linhagens tolerantes à ITC de <i>C. neoformans</i> e da linhagem selvagem de K99.....	45
Figura 16: Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio das linhagens tolerantes à ITC de <i>C. neoformans</i> na presença e ausência de ITC.....	47
Figura 17: Quantificação de ergosterol após tratamento <i>overnight</i> com ITC.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> utilizadas.....	22
Tabela 2: Linhagens mutantes de <i>C. neoformans</i> (K99).....	23
Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico clínico itraconazol para as linhagens de <i>C. neoformans</i> , determinada pelo método de microdiluição em caldo.....	29
Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico clínico itraconazol para as linhagens de <i>C. gattii</i> , determinada pelo método de microdiluição em caldo.....	30
Tabela 5: Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico clínico itraconazol para as linhagens mutantes de K99, determinada pelo método de microdiluição em caldo.....	30
Tabela 6: Média da análise morfométrica das linhagens tolerantes à ITC de <i>Cryptococcus neoformans</i>	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 <i>Cryptococcus sp.</i>	8
1.2 <i>Criptococose – infecção e disseminação</i>	9
1.3 <i>Fatores de virulência</i>	11
1.4 <i>Criptococose - manifestações clínicas</i>	13
1.5 <i>Criptococose - tratamento</i>	13
1.6 <i>Resistência e tolerância de <i>Cryptococcus spp.</i> aos antifúngicos</i>	15
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 <i>Objetivo Geral</i>	21
3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	21
4. METODOLOGIA	22
4.1 <i>Linhagens de <i>Cryptococcus</i>, cultivo e manutenção</i>	22
4. <i>Determinação da CIM</i>	24
4.2.1 <i>Diluição da droga</i>	24
4.2.2 <i>Preparo do inóculo</i>	25
4.3 <i>Avaliação da tolerância ao ITC</i>	26
4.3.1 <i>Curva de crescimento</i>	26
4.3.2 <i>Determinação de Unidades Formadoras de Colônias</i>	26
4.4 <i>Análise morfológica</i>	27
4.5 <i>Mensuração de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio após desafio com itraconazol</i>	27
4.6 <i>Quantificação de Ergosterol</i>	28
5. RESULTADOS	29
5.1 <i>Avaliação da susceptibilidade de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> ao itraconazol</i>	29
5.2 <i>Influência do ITC na taxa de crescimento de <i>Cryptococcus</i> em diferentes temperaturas</i>	31
5.2.1 <i>Influência do ITC na curva de crescimento</i>	31
5.2.2 <i>Determinação da tolerância ao ITC</i>	37

<i>5.3 Influência do ITC na morfologia de Cryptococcus neoformans.....</i>	<i>40</i>
<i>5.4 Influência do ITC na produção de EROS e ERNs nas linhagens tolerantes.....</i>	<i>46</i>
<i>5.5 Influência do ITC na produção de Ergosterol das linhagens tolerantes.....</i>	<i>48</i>
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Cryptococcus* spp.

O gênero *Cryptococcus* agrupa aproximadamente 70 espécies, sendo *C. neoformans* e *C. gattii* os principais agentes etiológicos que acometem seres humanos e animais (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Outras espécies de *Cryptococcus* consideradas saprófitas, como *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. humicola* e *C. curvatus*, são também encontradas como patógenos em pacientes imunocomprometidos (PFALLER *et al.*, 2009). Esse gênero pertence ao filo Basidiomycota, classe Tremellomycetes, ordem Tremellales e família Tremellaceae (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; MORALES-LÓPEZ & GARCIA-EFFRON, 2021).

Quanto à morfologia, as células leveduriformes de *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam a forma globosa e são envoltas por uma cápsula que apresenta polissacarídeos como a glucuronoxilomanana (GXM) que compreende por volta de 90% da cápsula, a galactoxilomanana (GalXM) que compreende em torno de 8% da cápsula e também uma pequena parcela de manoproteínas (NIMRICHTER *et al.*, 2007; ZARAGOZA *et al.*, 2009; FREITAS & SANTOS, 2021). O componente capsular GXM apresenta diferenças estruturais que são responsáveis pela variabilidade antigênica e pela classificação do complexo em cinco sorotipos, sendo eles A, D e AD para *C. neoformans* e B e C para *C. gattii* (NIMRICHTER *et al.*, 2007; ZARAGOZA *et al.*, 2009; HAGEN *et al.*, 2015).

Durante seu ciclo de vida, esses fungos podem apresentar reprodução assexuada ou sexuada. A reprodução assexuada, também conhecida como anamórfica, ocorre por meio de brotamentos singulares ou múltiplos das leveduras que se apresentam na forma esférica ou globosa (LACAZ *et al.*, 2002). Já a reprodução sexuada ou fase telemórfica ocorre por meio de uma compatibilidade sexual, processo denominado *mating type*, no qual há fusão entre duas células haploides (MAT_a e MAT_α), que sofrem um dimorfismo para o crescimento de hifas que se desenvolvem em basídios e leva à formação de basidiósporos (LIN & HEITMAN, 2006).

1.2 Criptococose – infecção e disseminação

A criptococose é uma micose sistêmica que apresenta aproximadamente 223.100 casos anualmente, levando cerca de 181.000 pessoas a óbito no mundo (WILLIAMSON *et al.*, 2017 RAJASINGHAM *et al.*, 2017). A doença ocorre pela inalação de propágulos como basidiósporos presentes no ar ou de leveduras desidratadas presentes no ambiente, que são encontradas principalmente em locais com um solo rico em matéria orgânica ou em excrementos de aves, que são substratos ricos em nitrogênio, o que favorece o crescimento do fungo (LESTER *et al.*, 2011; KRONSTAD *et al.*, 2011). Os basidiósporos possuem aproximadamente de 1 a 2 μm e as leveduras de 1 a 3 μm , quando aspirados podem acarretar uma infecção aguda ou assintomática na qual o sistema imune pode promover a morte das células fúngicas ou inibir seu crescimento. Caso não ocorra uma resposta efetiva, o fungo pode permanecer de forma latente, e a doença se desenvolve caso haja alguma deficiência na resposta imune do hospedeiro (VELAGAPUDI *et al.*, 2009; MA & MAY, 2009).

O fungo é um patógeno intracelular facultativo, que após ser reconhecido por macrófagos alveolares, é internalizado formando assim o fagossomo, que irá sofrer um processo de maturação por meio de uma série de fusões com endossomos e lisossomos para formar o fagolisossomo, onde enzimas presentes podem eliminar as células fúngicas (ERWIG & GOW, 2016). Entretanto, as células de *C. neoformans* são capazes de sobreviver dentro dos fagócitos e manter sua capacidade reprodutiva. Acredita-se que esse fenômeno se deve a uma característica adaptativa para a proteção contra predação de amebas presentes no solo, que possuem propriedades similares aos macrófagos, realizando fagocitose e secretando enzimas para eliminar patógenos (SWANSON & HAMMER, 2000; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

Após a inalação e a sobreposição das barreiras naturais do hospedeiro, o primeiro sítio de infecção são os pulmões, havendo deposição dos propágulos nos alvéolos pulmonares, o que pode ocasionar sintomas como febre, tosse, dor no peito, perda de peso e até mesmo pneumonia em casos mais graves. O surgimento desses sintomas ocorre no período entre três semanas e três meses de infecção, entretanto, a infecção inicial também pode permanecer assintomática (MINISTÉRIO DA SAUDE; MAZIARZ & PERFECT, 2016). Posterior à infecção pulmonar pode ocorrer a

disseminação para outros órgãos por via hematogênica, principalmente para o sistema nervoso central (SNC) pelo qual essas células fúngicas apresentam tropismo (DEL POETA & CHATURVEDI, 2012). De acordo com Mednick e colaboradores (2005) esse neurotropismo pode ser referente à presença de catecolaminas, substância precursora para a sintetização de melanina. Já Liu e colaboradores (2014) sugeriram que isso se deve à presença de inositol no cérebro, o que permite que as células fúngicas aumentem a expressão de ácido hialurônico, encontrado na superfície da célula e promove a ligação da levedura aos receptores celulares CD44 do hospedeiro.

Para alcançar o SNC as leveduras apresentam mecanismos que as permitem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) sendo eles: cavalo de troia, transcitose e paracitose (Figura 1). O mecanismo cavalo de troia consiste em células fúngicas internalizadas pelos macrófagos conseguem atravessar a BHE, fazendo com que não sejam expostas ao sistema imune (KRONSTAD *et al.*, 2011; DENHAM & BROWN, 2018). Já no mecanismo de transcitose, a célula fúngica é capaz de atravessar os capilares endoteliais e atinge o cérebro através do citoplasma (VU *et al.*, 2009). Por fim, a paracitose ocorre no momento em que a célula fúngica consegue atravessar a BHE através das junções celulares, onde utilizam a protease Mpr1 que permite a migração transendotelial (MAY *et al.*, 2016; NA POMBEJRA *et al.*, 2017). Uma vez que as leveduras sejam capazes de migrar para o SNC, o hospedeiro pode desenvolver pneumonia e meningoencefalite (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014).

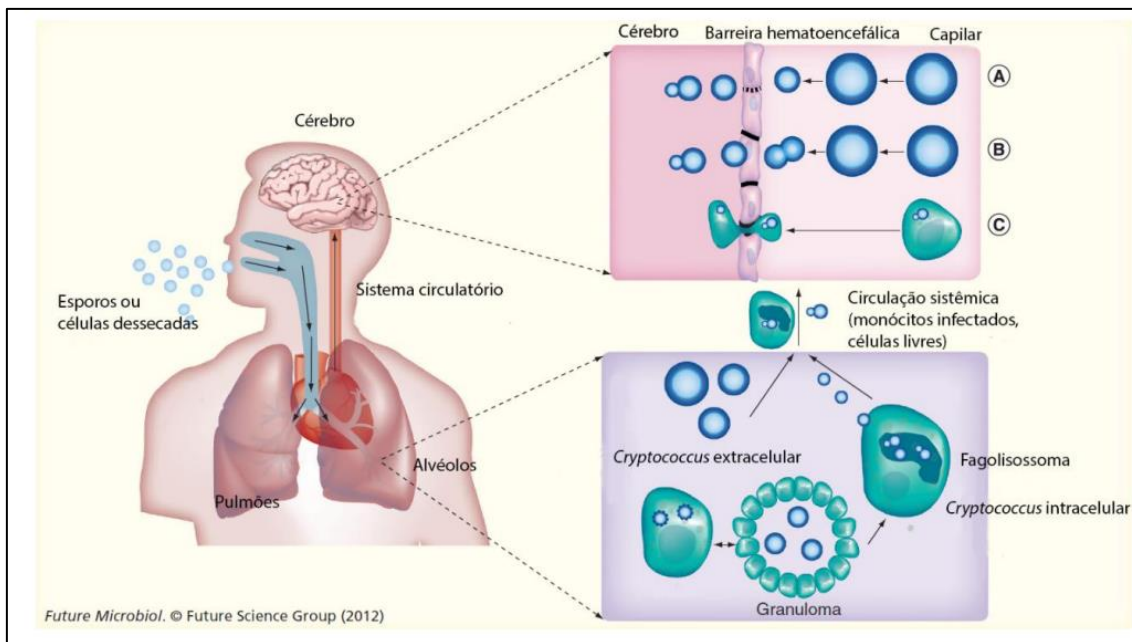


Figura 1: O modelo de disseminação de *Cryptococcus neoformans* até o SNC. As células podem permanecer nos pulmões ou migrar para o SNC após atravessar a BHE pelos mecanismos: (A) Paracitose; (B) Transcitose; (C) Cavalo de Troia. Fonte: Sabiiti; May, (2012)

1.3 Fatores de virulência

As células de *Cryptococcus* spp. possuem uma série de mecanismos que auxiliam a sua patogenicidade e garantem a sua sobrevivência no ambiente e frente ao sistema imunológico do hospedeiro. Tais mecanismos são denominados fatores de virulência, sendo eles a síntese da cápsula polissacarídica, a produção de melanina, a capacidade de crescer a 37 °C, também conhecida como termotolerância, e a secreção de enzimas como ureases, fosfolipases e proteases (BARONI, 2006; MAY *et al.*, 2016).

A cápsula polissacarídica está relacionada à sobrevivência e virulência do fungo, e também permite a classificação das espécies do gênero *Cryptococcus*. A cápsula é composta por dois polissacarídeos, sendo eles a GXM, que representa a maior parte da composição da cápsula e auxilia na classificação antigênica dos sorotipos, e a GalXM, podendo ainda haver em menor proporção manoproteínas (RODRIGUES *et al.*, 2011; KWON-CHUNG *et al.*, 2014). A cápsula possibilita a proteção contra desidratação no ambiente, contra a radiação solar e também predação através da fagocitose por amebas, fato que pode ter permitido a aquisição da resistência à fagocitose realizada por macrófagos do sistema imunológico de hospedeiros vertebrados (IDNURM *et al.*, 2005; ZARAGOZA *et al.*, 2009; PRATES *et al.*, 2013).

A dimensão da cápsula pode muitas vezes variar em diferentes linhagens, ou até mesmo em células de uma mesma linhagem, fatores que dependem da condição de crescimento (ZARAGOZA *et al.*, 2009). Uma vez que ocorra maior produção de cápsula, o que acarreta aumento do tamanho das células fúngicas formando células titânicas, isso faz com que as células sejam mais resistentes à fagocitose, e ocorra o aumento de sua virulência. Entretanto, existem células menores ou com menor produção de cápsula que são características por conseguirem atravessar a BHE de forma mais acessível devido a seu tamanho (BARONI, 2006; LONG *et al.*, 2012; HERNÁNDEZ-CHÁVEZ *et al.*, 2017; ROSSI & ZARAGOZA, 2017).

A produção de melanina é muito importante para a virulência de *C. neoformans* e *C. gattii* e é comum em diversas espécies de fungos patogênicos, uma vez que oferece proteção agindo como antioxidante, atua reduzindo a susceptibilidade de fármacos antifúngicos, dificulta o reconhecimento pelos macrófagos e consequentemente a fagocitose, além de ação das proteínas intracelulares, e oferece também proteção contra fatores ambientais como a radiação ultravioleta e altas temperaturas (WILLIAMSON, 1997; BARNETT, 2010; LESTER *et al.*, 2011). Sua produção está relacionada à presença da enzima lacase, codificada pelo gene LAC1 (BUCHANAN & MURPHY, 1998).

Dentre os fatores de virulência podemos destacar também a capacidade de crescimento fúngico tanto à temperatura ambiente quanto a 37 °C, o que faz com que as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* sejam capazes de causar doenças em mamíferos. Esse crescimento a 37 °C se deve, entre outros fatores, ao gene que codifica uma proteína fosfatase chamada calcineurina (ODOM *et al.*, 1997; ROSSI & ZARAGOZA, 2017).

As enzimas urease e a fosfolipase B são enzimas de degradação que auxiliam na sobrevivência à fagocitose pelos macrófagos e na migração de leveduras para o pulmão e para o SNC (KWON-CHUNG *et al.*, 2014). Já as enzimas proteases, auxiliam na virulência de *Cryptococcus* através da degradação de tecidos do hospedeiro ou de proteínas de grande importância para o sistema imune (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

1.4 Criptococose - manifestações clínicas

Após a inalação dos propágulos e início da infecção os principais órgãos comprometidos são os pulmões e o cérebro em infecções disseminadas (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006). Entretanto, outros órgãos podem ser acometidos, como por exemplo a pele, os olhos, a próstata ou os ossos (CHAYAKULKEERE & PERFECT, 2006).

Na criptococose pulmonar os órgãos do sistema respiratório são os primeiros atingidos, sendo que após a instalação nos pulmões há o desenvolvimento de uma infecção primária. Nessa fase, o hospedeiro apresenta sintomas como tosse, febre, perda de peso, dor no tórax ou insuficiência respiratória similares a uma pneumonia. Entretanto, a fase pulmonar pode ser assintomática, assim como pode não ocorrer disseminação para outros sistemas, fatores que dependem do grau de imunidade do hospedeiro e da virulência fúngica (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; QUEIROZ *et al.*, 2008; LI & MODY, 2010). Já na criptococose do SNC, devido ao tropismo de *C. neoformans* e *C. gattii* para o SNC, a sua disseminação pode causar meningite, encefalite ou meningoencefalite. Os pacientes podem apresentar manifestações como cefaleia, náusea, febre, confusão mental, convulsões, alterações na visão, déficit neurológico e coma (PERFECT & CASADEVALL, 2002; IDNURM *et al.*, 2005; DUARTE, *et al.*, 2017). A criptococose do SNC pode acarretar óbito de pacientes que não estejam realizando tratamento adequado e que estejam com o sistema imune comprometido, pois ocorre aumento da pressão intracraniana e consequentemente a redução de sangue circulante (CRISSEY; LANG; PARISH, 1995; VENTURA *et al.*, 2013).

1.5 Criptococose - tratamento

Os antifúngicos comumente utilizadas no tratamento da criptococose podem ser classificadas em três classes de fármacos, sendo elas os poliênicos, como por exemplo a Anfotericina B (AMB), os azóis, como por exemplo o fluconazol (FLU), o voriconazol (VRZ) e o itraconazol (ITC) e por fim o fluorado sintético 5-flucitosina (5FC) que

normalmente é utilizado em conjunto com a AMB (PERFECT *et al.*, 2010; SLOAN & PARRIS, 2014).

Atualmente, os poliênicos, como a AMB e os azóis, destacando-se o ITC, vem sendo os fármacos de primeira escolha nos tratamentos antifúngicos de micoses oportunistas, cutâneas e sistêmicas. Os poliênicos podem apresentar dois mecanismos de ação sendo o primeiro a ação na membrana celular dos fungos, onde os polienos ligam-se ao ergosterol, formando poros na membrana, o que ocasiona um aumento na permeabilidade da membrana permitindo o extravasamento de moléculas, levando à morte celular (BERGOLD & GEORGIADIS, 2004). O segundo mecanismo pode ocasionar o aumento da produção de radicais livres como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que também são importantes mediadores no efeito fungicida de poliênicos como a AMB, desencadeando um estresse oxidativo e nitrosativo, e esse aumento de radicais livres podem provocar danos nas células e dessa forma, causar morte celular (FERREIRA *et al.*, 2013; MESA-ARANGO *et al.*, 2014).

Os derivados azólicos atuam na inibição da esterol-14- α -desmetilase, impedindo a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e acarretando o acúmulo de 14- α -metilesteróis, isso faz com que haja formação da membrana com propriedades alteradas, não desempenhando as funções fundamentais para o desenvolvimento do fungo. Embora a classe dos azóis causem menos efeitos colaterais que a AMB, eles apresentam mecanismos menos potentes que a classe dos poliênicos (BERGOLD & GEORGIADIS, 2004). O ITC é o antifúngico de escolha alternativa usado no tratamento da criptococose pulmonar se o FLU não estiver disponível ou se houver contraindicação médica, apesar de o ITC apresentar baixa penetração para o SNC, estudos já demonstraram que o fármaco apresenta bons resultados na prevenção e no tratamento da criptococose pulmonar tanto em pacientes imunocompetentes quanto em indivíduos com AIDS, além disso também é descrito que assim como a AMB o ITC pode induzir estresse oxidativo (PERFECT *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.* 2013; FERREIRA *et al.* 2015). A utilização demasiada dos fármacos da classe dos azóis ocasionou o aparecimento de resistência em espécies capazes de sofrer modificações (BERGOLD & GEORGIADIS, 2004). Alguns mecanismos moleculares descritos na literatura estão relacionados com a aquisição de resistência aos fármacos azólicos, como por exemplo em linhagens de *C. albicans* ao fluconazol. Dentre esses mecanismos podemos citar a mutação no gene ERG3, que

codifica a enzima C-5 esterol desaturase (VALE-SILVA *et al.*, 2012); a ação do gene RTA2 mediado pela regulação da enzima fosfatase calcineurina, que atua na sinalização da célula fúngica, sendo que esse gene é capaz de bloquear a ação de azóis na membrana por meio da regulação da fosfatase calcineurina (JIA *et al.*, 2009); e a proteína HSP90 que está ligada a produção de biofilmes resistentes aos antifúngicos e ao aumento de expressão de proteínas de choque térmico (do inglês, *Hot Shock Proteins*) que possibilita uma troca entre leveduras-hifas de *Candida*, sendo uma etapa essencial para o início de formação do biofilme (BECHERELLI; TAO; RYDER, 2013).

A 5FC atua bloqueando o metabolismo da pirimidina e a síntese de DNA e RNA. O fármaco é transportado para o interior das células leveduriformes e é desaminado por compostos enzimáticos, logo após, ele se incorpora ao DNA bloqueando sua síntese ou ao RNA fúngico, bloqueando consequentemente a síntese protéica (CARMONA & LIMPER, 2017; FISHER *et al.*, 2018). A recomendação dada pela Organização Mundial da Saúde é que a 5FC seja associada a AMB para seu uso no tratamento de meningite criptocócica (OMS, 2011; Ministério da Saúde, 2021).

1.6 Resistência e tolerância de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos

O aumento frequente do isolamento de linhagens resistentes a fármacos utilizados para o tratamento de doenças fúngicas invasivas, e o aumento no número de pacientes imunocomprometidos são um problema de importância clínica em expansão mundial, causando a preocupação da comunidade científica (BROWN *et al.*, 2012; FISHER *et al.*, 2018). A resistência é a capacidade de um dado microrganismo crescer mesmo em concentrações elevadas de um antimicrobiano. Testes de susceptibilidade *in vitro* determinam os valores de concentração inibitória mínima (CIM), necessária para impedir o crescimento desses microrganismos (KANAFANI & PERFECT, 2008; BRAUNER, *et al.*, 2016).

Alguns fatores que têm contribuído para a resistência de microrganismos compreendem o uso desordenado de fármacos antimicrobianos, o descarte de medicamentos de forma incorreta no ambiente, a falta de saneamento básico e o uso de fungicidas no agronegócio (ZHANG *et al.*, 2017; SERAFIM & RUIZ, 2018). Um microrganismo resistente pode posteriormente transmitir a resistência para outras

gerações, fazendo com que seja necessário utilizar uma maior concentração dos fármacos antimicrobianos para que sejam eficientes em sua inibição (BRAUNER, *et al.*, 2016).

Dentre os mecanismos de resistência identificados em linhagens resistentes de *Cryptococcus* aos azóis podemos citar uma mutação no gene ERG11, que codifica a enzima 14- α -demetilase, resultando na resistência a FLU, e o aumento da expressão de bombas de efluxo que reduzem o acúmulo de fármacos dentro da célula como por exemplo MDR1, AFR1 e AFR2 (COWEN *et al.*, 2015; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017). Em estudos de Naicker e colaboradores (2020), que determinaram a CIM de FLU em 229 isolados de *C. neoformans*, foram encontrados valores de CIM duas vezes mais altos em 2017, comparado aos anos de 2007 e 2008. Esses dados sugerem que doses mais altas de FLU combinadas a AMB, podem ser necessárias para manter a eficácia do tratamento de meningite criptocócica em pacientes com HIV no sul da África.

Os fenômenos de resistência e tolerância a antifúngicos são comumente encontrados na literatura de forma similar. Entretanto, organismos tolerantes podem ser definidos como os que possuem a capacidade de crescer na presença de uma droga antifúngica, onde subpopulações de células tolerantes crescem lentamente mesmo na presença da droga. Estas linhagens podem continuar crescendo em altas concentrações, porém apresentando um crescimento mais lento que usual, o que pode se inferir como um mecanismo para alcançar o crescimento em uma situação de estresse, reduzindo seu metabolismo e processos celulares essenciais (BERMAN & KRYSAN, 2020).

Existem linhagens de *C. albicans* tolerantes ao FLU e estudos revelaram que ao utilizar esse fármaco associado a droga imunossupressora ciclosporina A, que possui a função de inibir a atividade da calcineurina em leveduras, a tolerância ao FLU é inibida, sugerindo que a calcineurina é essencial para a tolerância dessas linhagens de *C. albicans* ao fármaco. Nesse mesmo estudo também foi evidenciado que a calcineurina é essencial para a tolerância a outros agentes antifúngicos como voriconazol, itraconazol e terbinafina, indicando assim que a via da calcineurina desempenha um papel importante na sobrevivência de *C. albicans* na presença de inibidores externos do crescimento (SANGLARD *et al.*, 2003).

Yang e colaboradores (2017) relataram que a tolerância de *C. albicans* a caspofungina pode ser conferida por pelo menos três mecanismos: a) monossomia do cromossomo 5 (Ch5); b) monossomia combinada do braço esquerdo e trissomia do braço direito do cromossomo Ch5; e c) um mecanismo independente de aneuploidia. Em seu trabalho, a maioria das linhagens testadas em doses letais de caspofungina foram mortas, no entanto, algumas células foram capazes de sobreviver e formar colônias em placas contendo meio de cultura (extrato de levedura). Os mutantes tolerantes possuíam parede celular com elevado conteúdo de quitina, levando a acreditar que múltiplos genes são regulados a fim de aumentar a quantidade de quitina, como por exemplo, a regulação negativa de CHT2 (quitinase), PGA4 (1,3-beta-glucanosiltransferase) e CSU51 (Regulador da utilização de sorbose), localizados no Ch5. Nesse mesmo estudo, os autores obtiveram evidências de tolerância à caspofungina das linhagens mutantes relacionadas à via da calcineurina, que pode influenciar a resistência à caspofungina e corrobora com o estudo citado anteriormente que demonstra o papel dessa via na tolerância aos fármacos azólicos.

A espécie multirresistente *Candida auris* vem sendo amplamente estudada por pesquisadores devido ao seu rápido espalhamento pelo mundo na última década. Estudos recentes identificaram linhagens de *C. auris* tolerantes às três principais classes de antifúngicos, demonstrando que a tolerância a esses fármacos dependia da formação de biofilmes maduros (KEAN & RAMAGE, 2019). A proteína HSP90 que auxilia na formação de biofilmes de *Candida*, já citada anteriormente em casos de resistência a azólicos, também está relacionada a tolerância fúngica, de forma que o comprometimento de sua função, reduz a tolerância de espécies de *Candida* aos fármacos azólicos e sua inibição pode bloquear a evolução da resistência a essa mesma classe (COWEN & LINDQUIST, 2005; COWEN *et al.*, 2015).

Além de mecanismos moleculares, alguns fatores de estresse ambiental também podem causar alterações fenotípicas entre linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* influenciando na tolerância de antifúngicos. Bosch e colaboradores (2020) testaram o efeito de diferentes concentrações de nitrogênio na biossíntese de cápsula, melanina e ergosterol, bem como na susceptibilidade à AMB e FLU. Os autores observaram que concentrações mais baixas de nitrogênio aumentaram a biossíntese de ergosterol e cápsula, além disso apresentaram as maiores porcentagens de sobrevivência na presença

dos fármacos utilizados, sugerindo que a concentração de nitrogênio pode realmente influenciar na tolerância aos antifúngicos.

Estudos de Levin-Reisman e colaboradores (2017) demonstraram que casos de microrganismos que apresentam tolerância, são procedidos de aquisição de resistência aos tratamentos antimicrobianos. Isso demonstra que o desenvolvimento de tolerância aumenta as chances de ocorrerem mutações que geram resistência, o que pode se espalhar em uma população de microrganismos, ou seja, a tolerância pode auxiliar em uma rápida evolução de microrganismos resistentes. Isso mostra a importância de entender os processos envolvidos no fenômeno de tolerância para assim reduzir o número de microrganismos tolerantes e também o surgimento de linhagens resistentes aos fármacos utilizados na clínica médica.

2. JUSTIFICATIVA

A infecção por *Cryptococcus* ocorre mundialmente, sendo as espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* os principais agentes etiológicos. Essas espécies possuem diversos mecanismos para causar a infecção em seus hospedeiros, apresentando fatores de virulência que acarretam o escape do sistema imunológico e também fenômenos de adaptação aos fármacos antifúngicos. A doença afeta principalmente indivíduos com imunodepressão celular, como por exemplo, infecção por HIV ou pacientes transplantados em terapia imunossupressora, sendo caracterizada como uma micose oportunista, podendo também infectar indivíduos imunocompetentes (SEPKOWITZ, 2002; ARMSTRONG-JAMES *et al.*, 2014; JUNIOR *et al.*, 2015). Estudos revelam que na América do Sul ocorrem anualmente mais de 5.000 indivíduos com meningite criptocócica e por volta de 2.400 mortes por ano. O Brasil e Colômbia são os países com maior número, apresentando entre 1.000 a 2.500 casos de criptococose (FIRACATIVE *et al.*, 2018). No Brasil, a doença está presente nas regiões Sul e Sudeste apresentando infecções em pacientes com HIV e com taxa de letalidade, por volta de 40%, principalmente causada pela espécie *C. neoformans*. Já nas regiões Norte e Nordeste existem casos de infecção por *C. gattii* com altas taxas de mortalidade e ocorrência de meningoencefalite em crianças e adultos. Dentre as micoses sistêmicas, as infecções por *Cryptococcus* são a segunda maior causa de morte no país (COUTINHO *et al.*, 2002; BRASIL, 2012).

Apesar de existirem fármacos para o tratamento da criptococose, há predominância de alguns problemas como o aumento de linhagens apresentando mecanismos de adaptação a essas drogas, fato cada vez mais emergente nos últimos anos. Ainda que muitos estudos sugiram o desenvolvimento de novos fármacos, é necessário investigar e entender os mecanismos envolvidos nos fenômenos de adaptação dos microrganismos aos fármacos convencionais, como por exemplo a tolerância.

Embora existam estudos de tolerância ao fluconazol em *Cryptococcus*, os mecanismos envolvidos ainda são pouco elucidados. O itraconazol não é indicado para neurocriptococose devido a sua baixa penetração no SNC, porém é um antifúngico muito utilizado no tratamento da criptococose pulmonar. No entanto, até nosso conhecimento não há estudos sobre a tolerância de *C. neoformans* e *C. gattii* a esse fármaco. Esse viés demonstra a necessidade de estudos que avaliem os mecanismos

envolvidos no fenômeno de tolerância ao itraconazol em linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de tolerância ao antifúngico itraconazol em diferentes linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do itraconazol em diferentes linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*;
- Verificar a tolerância das linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* ao itraconazol;
- Avaliar diferentes parâmetros das linhagens tolerantes de *C. neoformans* e *C. gattii* após exposição ao itraconazol:

-Alteração na morfometria das células, como tamanho da cápsula, diâmetro celular e corpo celular;

-Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio;

-Produção de ergosterol.

4. METODOLOGIA

4.1. Linhagens de *Cryptococcus*, cultivo e manutenção

Para esse estudo foram utilizadas linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*, pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Micologia, da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram utilizadas 16 linhagens de *C. neoformans* e 16 linhagens de *C. gattii* (Tabela 1). Todas as amostras foram mantidas em estoque no freezer -80 °C e foram repicadas em meio Agar Sabouraud-dextrose (ASD) e incubadas por 48h-72h a 35° C para a realização dos experimentos.

Tabela 1: Linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* utilizadas

Linhagens de <i>C. neoformans</i>	Origem
WM 148 (ATCC® MYA-4564 TM)	Clínica – Austrália
WM 626 (ATCC® MYA-4565 TM)	Clínica – Austrália
WM 628 (ATCC® MYA-4566 TM)	Clínica – Austrália
WM 629 (ATCC® MYA-4567 TM)	Clínica – Austrália
H99 (ATCC® 208821 TM)	Clínica – Nova York
78	Clínica
5396	Clínica
WP	Clínica
96806	Clínica
24067	Clínica - Maryland (EUA)
RN01	Clínica - Brasil
62066	Clínica - França
C31	Clínica
ATCC 28957	Clínica - Lesão óssea humana
28/JF	Clínica
P3	Clínica - Brasil
Linhagens de <i>C. gattii</i>	Origem
WM 161 (ATCC® MYA-4562 TM)	Ambiental (Eucalipto) - San Diego (EUA)
WM 178 (ATCC® MYA-4561 TM)	Clínica – Austrália
WM 179 (ATCC® MYA-4560 TM)	Clínica – Austrália
WM 779 (ATCC® MYA-4563 TM)	Veterinária (Guepardo) – África do Sul
R265 (ATCC® MYA-4093 TM)	Clínica – Vancouver (Canadá)
L24/01	Clínica
29/0893	Clínica
547 OTTI	Ambiental
ICB 181	Ambiental - Brasil
135L/03	Clínica
L27/01	Clínica - Brasil
ATCC 32608	Clínica - Califórnia
28/0893	Clínica
1913/ER	Clínica
196L/03	Clínica
28/02	Clínica - Brasil

Além dessas linhagens, também foram utilizadas 37 linhagens de *C. neoformans* K99 sendo uma WT e 36 linhagens com genes deletados (Tabela 2). Essas linhagens foram cedidas gentilmente pela University of British Columbia e foram mantidas em estoque no freezer -80 °C e foram repicadas em meio Agar Sabouraud-dextrose (ASD) e incubadas por 48h-72h a 35° C para a realização dos experimentos.

Tabela 2: Linhagens mutantes de *C. neoformans* (K99).

Gene ID	Nome	Produto gênico deletado
CNAG_07361		hypothetical protein
CNAG_04804	SRE1	sterol regulatory element-binding protein (SREBP)
CNAG_06638		malate dehydrogenase (oxaloacetate- decarboxylating)
CNAG_03025		V-type H -transporting ATPase subunit D
CNAG_00149		NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 4
CNAG_02048	PUT5	Proline dehydrogenase
CNAG_00524		acetyl-CoA acyltransferase 2
CNAG_01575		ATP-binding cassette transporter
CNAG_06517		cytoplasmic protein
CNAG_03322	UXS1	UDP-glucuronate decarboxylase
CNAG_04632		uracil permease
CNAG_06241	CFO1	acidic laccase
CNAG_00699	LPI15	transmembrane receptor
CNAG_03433		endo alpha-1,4 polygalactosaminidase precursor
CNAG_06431		acyl-CoA oxidase
CNAG_04753		Gluconolactonase
CNAG_05721	MFE2	multifunctional beta-oxidation protein
CNAG_03204		hypothetical protein
CNAG_03638		heterokaryon incompatibility protein Het-C
CNAG_01519	EEP1	endonuclease/exonuclease/phosphatase
CNAG_00235	AMT1	AMT family ammonium transporter
CNAG_06109		hypothetical protein
CNAG_01858	HOB2	hypothetical protein
CNAG_00165		methylthioadenosine phosphorylase
CNAG_05264		alpha-amylase AmyA
CNAG_03007		hypothetical protein
CNAG_05095		pod-specific dehydrogenase SAC25
CNAG_02896	ERG130	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase
CNAG_02795		Phosphoribosylglycinamide formyltransferase
CNAG_03772	HXS1	high-affinity glucose transporter
CNAG_02226		hypothetical protein
CNAG_01360		pumilio domain-containing protein c
CNAG_04758	AMT2	AMT family ammonium transporter
CNAG_02896		hydroxymethylglutaryl-CoA synthase
CNAG_04868		cytoplasmic protein
CNAG_03553		hypothetical protein
K99	WT	-

4.2. Determinação da CIM

A susceptibilidade das amostras fúngicas ao antifúngico ITC foi determinada segundo a metodologia de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*. As concentrações de ITC necessárias para inibir o crescimento das linhagens auxiliaram na avaliação e seleção de linhagens tolerantes.

4.2.1 Diluição do antifúngico

Foram preparadas soluções estoque na concentração de 1000 µg/mL da droga, solubilizada em dimetilsufóxido (DMSO). A partir das soluções estoques dos antifúngicos, foram realizadas diluições seriadas em meio sintético RPMI 1640 tamponado (pH 7,0) com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS); a fim de obter 10 concentrações finais que variaram de 16 µg/mL a 0,0313 µg/mL para a droga utilizada. Aliquotas de 100 µl de cada diluição foram distribuídas nos poços da placa de microdiluição de 96 poços. O procedimento foi realizado em duplicata para cada linhagem e as concentrações foram distribuídas em ordem decrescente. Em cada placa havia os seguintes controles: (1) controle de crescimento, contendo RPMI 1640 e inóculo e (2) controle de esterilidade, contendo apenas o meio RPMI 1640. Após a microdiluição das drogas, as placas foram fechadas, embaladas em filme transparente e refrigeradas a – 20 °C até o momento do uso (CLSI, 2008).

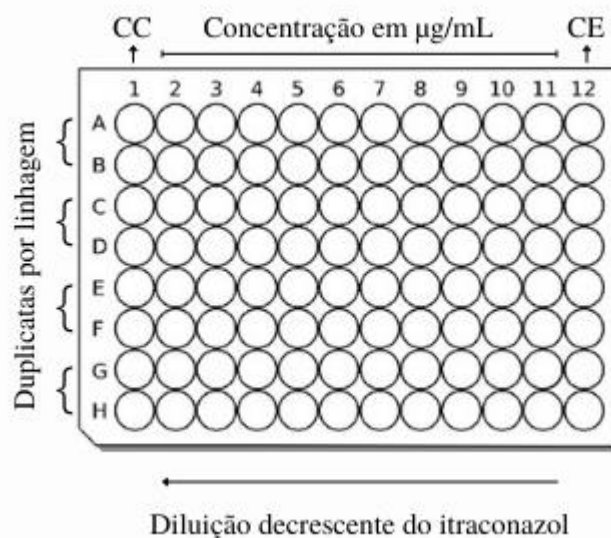


Figura 2: Esquema da placa de microdiluição de 96 poços para determinação da concentração inibitória mínima. CC: Controle de crescimento (RPMI + Inóculo), CE: Controle de esterilidade (RPMI). Os números de 2 a 11 indicam as concentrações, que variaram de 0,03 µg/mL a 16 µg/mL. Os colchetes indicam que os testes foram realizados em duplicata e em cada placa foram testadas quatro linhagens.

4.2.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado pelo método espectrofotométrico proposto por Pfaller e colaboradores (1988). Amostras de *C. gattii* e *C. neoformans* foram cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 35 °C por 48h. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente e suspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% esterilizada. Após homogeneização em vórtex, a transmitância foi medida em espectrofotômetro a 530 nm, sendo ajustada para 75% a 77%, o que corresponde a uma suspensão de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL. Posteriormente, para o preparo da suspensão de trabalho, foi realizada uma diluição de 1:50 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão padrão em meio líquido RPMI 1640, resultando na concentração de 1×10^3 células/mL. Então, alíquotas de 100 µL desse inóculo foram adicionados nas placas de 96 poços contendo o antifúngico. Cada amostra foi testada em duplicata. As placas foram incubadas a 30 °C e a 35 °C, por 72 horas, e posteriormente foi realizada a leitura visual conforme padronizado pelo CLSI. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada como a correspondente ao poço no qual houve redução de 50% do crescimento fúngico em relação ao controle de crescimento.

4.3 Avaliação da tolerância ao ITC

A seleção de linhagens tolerantes foi realizada de acordo com Bosch e colaboradores (2020) e Yang e colaboradores (2017) com modificações. As linhagens que apresentaram crescimento na CIM de ITC foram classificadas como tolerantes ao fármaco e utilizadas para os posteriores estudos.

4.3.1 Curva de crescimento

Foi realizado um ensaio para avaliar a curva de crescimento das linhagens de acordo com Meletiadis e colaboradores (2001), com modificações. Placas de 96 poços foram preparadas com RPMI 1640 suplementado com MOPS contendo a concentração de células fúngicas de $0,5 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. As placas foram incubadas a 30 °C e a 35 °C durante 72 horas, e levadas ao leitor de ELISA em um comprimento de onda de 600 nm realizando leituras pontuais nos intervalos de 0 horas, 3 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas, em triplicata.

4.3.2 Determinação de Unidades Formadoras de Colônias

Placas de 24 poços foram preparadas com RPMI 1640 suplementado com MOPS contendo a concentração de células fúngicas de 1×10^3 células/mL. As placas foram incubadas a 30 °C e a 35 °C durante 72 horas, alíquotas de 10 µL foram removidas de cada poço, plaqueadas em placas de Petri contendo ASD nos intervalos de 3 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas, em quadruplicata. Após 48 horas de incubação referente aos intervalos anteriores, foi realizada a contagem de colônias para determinar a UFC e construídas as curvas em função do número de UFC recuperadas ao longo do tempo.

4.4 Análise morfométrica

Para a análise morfométrica das linhagens, células de *C. neoformans* foram previamente cultivadas em RPMI acrescido de itraconazol por 72 horas a 30 °C e 35 °C. Após a incubação, uma alçada de cada cultivo foi suspensa em uma lâmina com tinta nanquim, para posterior visualização em microscópio óptico e captura de imagem. Os tamanhos das células e cápsulas de pelo menos 50 espécimes de cada cultivo foram mensurados com o auxílio do programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health, NIH, Bethesda, MD) (ARAUJO; *et al.*, 2012). Além disso, a razão superfície/volume foi determinada usando a fórmula $3/r$, em que r = raio (FERREIRA; *et al.*, 2015).

4.5 Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

A quantificação de EROs (Espécies reativas de oxigênio) e ERNs (espécies reativas de nitrogênio) foi realizada por meio de ensaio fluorométrico com sondas específicas (FERREIRA *et al.*, 2013). 1×10^4 células/mL de *C. neoformans* foram tratadas com o antifúngico itraconazol com sua respectiva CIM (controle positivo) em RPMI sem vermelho de fenol, e incubados com diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína 10 mM (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para quantificação de EROs e dihidrorhodamina 1,2,3 (Invitrogen) 20 mM para quantificação de peroxinitrito, durante 3 e 24 horas. Além dos grupos tratados com a droga, um grupo controle de crescimento contendo apenas meio RPMI-1640 e as sondas foi realizado. Em seguida, a fluorescência foi medida com um fluorômetro (Synergy 2 SL Luminescence Microplate Reader, Biotek) utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 500 nm. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência \pm SEM. Os testes foram realizados em quadruplicata.

4.6 Quantificação de Ergosterol

A quantificação foi realizada conforme Santos e colaboradores 2012, com modificações. Inicialmente, as amostras fúngicas foram cultivadas em meio ASD a 35 °C por 72 horas. Em seguida, 1×10^8 cels/mL de *C. neoformans* foram tratadas “overnight” com itraconazol conforme sua CIM. Além dos grupos tratados com a droga, um grupo controle de crescimento contendo apenas meio RPMI-1640 foi realizado. Após o período de tratamento, os tubos foram centrifugados a 4.000 r.p.m. por 10 minutos, a 4 °C e em seguida, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com água destilada esterilizada. Para a extração dos lipídios, 3 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio 25% foram adicionados a cada massa celular, seguido por 1 minuto de agitação. Posteriormente, os tubos foram incubados em banho maria a 85 °C por 1 hora e então resfriados à temperatura ambiente. Uma mistura de 3 mL de n-heptano (Sigma-Aldrich) e 1 mL de água destilada esterilizada foi adicionada, agitando-a em vórtex por 3 minutos. O sobrenadante, por sua vez, foi novamente removido para posterior leitura em espectrofotômetro a 282 nm. Uma curva de calibração com padrão de ergosterol (Sigma-Aldrich) foi produzida e utilizada para quantificação de ergosterol. Os resultados foram expressos em µg/mL baseado na curva de calibração com o padrão de ergosterol.

4.7 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism* version 8.00 para *Windows* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA). O teste empregado foi a análise de variância (ANOVA), pós teste de múltiplas comparações, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da susceptibilidade de *C. neoformans* e *C. gattii* ao itraconazol

Inicialmente foi determinado o perfil de susceptibilidade das linhagens frente ao antifúngico itraconazol. A escolha do antifúngico foi definida por ser o único fármaco para o tratamento da criptococose para o qual ainda não há estudos referentes ao fenômeno de tolerância. O experimento foi realizado com duas réplicas experimentais em duplicata. Para *C. neoformans* a 30 °C, a concentração inibitória mínima (CIM) variou entre 0,12 e 1 µg/mL e a 35 °C a CIM variou entre 0,03 e 1 µg/mL (Tabela 3). Enquanto para *C. gattii* a 30 °C, a CIM variou entre 0,06 e 1 µg/mL e a 35 °C a CIM variou entre 0,03 e 1 µg/mL (Tabela 4). Já para a linhagem K99 e suas respectivas linhagens mutantes, a 30 °C a CIM variou entre 0,25 e 2 µg/mL e a 35 °C a CIM variou entre 0,06 e 2 µg/mL (Tabela 5).

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico clínico itraconazol para as linhagens de *C. neoformans*, determinada pelo método de microdiluição em caldo.

<i>C. neoformans</i>	CIM 50% (mg/mL)	
	Temperaturas	
	30 °C	35 °C
WM 148 (ATCC® MYA-4564™)	0,50	0,06
WM 626 (ATCC® MYA-4565™)	0,12	0,06
WM 628 (ATCC® MYA-4566™)	1	0,03
WM 629 (ATCC® MYA-4567™)	0,50	0,03
H99 (ATCC® 208821™)	0,50	0,03
78	0,50	1
5396	0,50	0,12
WP	0,50	0,25
96806	0,50	0,25
24067	0,25	1
RN01	0,25	0,25
62066	0,50	0,50
C31	0,12	0,25
ATCC 28957	0,50	0,25
28/JF	0,12	0,50
P3	0,25	0,50
Média geométrica	0,35	0,32

CIM (50%): endpoint considerando 50 % da inibição de crescimento

Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico clínico itraconazol para as linhagens de *C. gattii*, determinada pelo método de microdiluição em caldo.

<i>C. gattii</i>	CIM 50% (mg/mL)	
	Temperaturas	
	30 °C	35 °C
WM 161 (ATCC® MYA-4562™)	0,25	0,12
WM 178 (ATCC® MYA-4561™)	1	0,25
WM 179 (ATCC® MYA-4560™)	0,25	0,25
WM 779 (ATCC® MYA-4563™)	1	0,03
R265 (ATCC® MYA-4093™)	0,50	0,12
L24/01	0,50	0,50
29/0893	0,12	0,50
547 OTTI	1	0,25
ICB 181	0,50	0,50
135L/03	0,25	0,12
L27/01	1	0,50
ATCC 32608	0,06	0,50
28/0893	0,25	0,50
1913/ER	0,50	0,25
196L/03	1	0,50
28/02	0,50	1
Média geométrica	0,41	0,28

CIM (50%): endpoint considerando 50 % da inibição de crescimento

Tabela 5: Concentração inibitória mínima (CIM) do antifúngico clínico itraconazol para as linhagens mutantes e selvagem K99, determinada pelo método de microdiluição em caldo.

Gene ID	Nome	CIM 50% (mg/mL)	
		Temperaturas	
		30 °C	35 °C
CNAG_07361		0,50	0,25
CNAG_04804	SRE1	1	0,50
CNAG_06638		1	0,25
CNAG_03025		1	0,12
CNAG_00149		1	0,25
CNAG_02048	PUT5	1	0,25
CNAG_00524		1	0,50
CNAG_01575		0,25	0,50
CNAG_06517		0,25	0,50
CNAG_03322	UXS1	2	0,50
CNAG_04632		0,25	0,50
CNAG_06241	CFO1	0,25	1
CNAG_00699	LPI15	1	2
CNAG_03433		2	1
CNAG_06431		1	0,50
CNAG_04753		0,50	0,06
CNAG_05721	MFE2	1	1
CNAG_03204		1	0,50
CNAG_03638		1	0,50
CNAG_01519	EEP1	0,50	0,12
CNAG_00235	AMT1	1	0,25
CNAG_06109		0,50	0,25
CNAG_01858	HOB2	0,50	0,50

CNAG_00165		0,25	0,06
CNAG_05264		1	0,25
CNAG_03007		0,50	0,25
CNAG_05095		0,50	0,12
CNAG_02896	ERG130	0,50	0,06
CNAG_02795		1	0,25
CNAG_03772	HXS1	0,50	0,25
CNAG_02226		0,50	0,25
CNAG_01360		0,50	0,25
CNAG_04758	AMT2	0,50	0,25
CNAG_02896		0,50	0,50
CNAG_04868		0,25	0,25
CNAG_03553		1	1
K99	WT	0,50	0,25
Média geométrica		0,63	0,31

CIM (50%): endpoint considerando 50 % da inibição de crescimento.

Em negrito os valores da CIM diferente da linhagem selvagem em cada temperatura.

Utilizando os pontos de corte para *Candida* spp, uma vez que não existem pontos de corte determinados para as espécies de *Cryptococcus*, foram encontradas 1 linhagem de *C. neoformans*, 5 linhagens de *C. gattii* e 17 linhagens mutantes de K99 resistentes a 30 °C. Na temperatura de 35 °C foram encontradas 2 linhagens de *C. neoformans*, 1 linhagem de *C. gattii* e 5 linhagens mutantes de K99 resistentes ao itraconazol (CLSI 2012). As únicas linhagens que apresentaram resistência nas duas temperaturas foram as linhagens mutantes de K99, sendo elas $\Delta LPII5$, CNAG_03433, $\Delta MFE2$ e CNAG_03553. Em razão da ausência de pontos de corte do itraconazol para *Cryptococcus* optamos por classificar as linhagens apenas como menos susceptível, susceptível e mais susceptível.

5.2 Influência do ITC na taxa de crescimento de *Cryptococcus* em diferentes temperaturas.

5.2.1 Influência do ITC na curva de crescimento

Após a determinação da CIM de todas as linhagens, foram selecionadas algumas linhagens que apresentaram as maiores ou menores CIM e mutantes com deleções de genes interessantes para o estudo, sendo para *C. neoformans* H99, 24067, K99, $\Delta EEP1$, $\Delta UXS1$, $\Delta CFO1$, $\Delta PUT5$, $\Delta MFE2$, $\Delta SRE1$, CNAG_03025, CNAG_01575, CNAG_04632, CNAG_03433, CNAG_00165 e CNAG_04868. Para *C. gattii* R265 e

28/02. As linhagens mutantes que apresentaram seus produtos do gene como proteína hipotética não foram selecionadas.

Considerando a termotolerância de *Cryptococcus* spp. visto que isso pode ser um fator determinante para seu crescimento, nós decidimos avaliar o perfil de crescimento em duas temperaturas e em três concentrações de ITC, sendo elas 2xCIM, CIM e 0,5xCIM. Foi utilizado o meio RPMI por ser um meio padronizado para a realização de ensaios de susceptibilidade a antifúngicos. As temperaturas escolhidas foram de 30 °C e 35 °C a fim de avaliar sua resposta mimetizando a temperatura ambiente e a temperatura de seu hospedeiro.

Para *C. neoformans* nós observamos que a maioria das linhagens apresentaram a 30 °C, um perfil de crescimento significativamente maior em relação as linhagens que foram cultivadas a 35 °C exceto para as linhagens $\Delta CFO1$ (Figura 5), CNAG_01575 e CNAG_00165 (Figura 4), cujo crescimento foi relativamente maior a 35 °C. As linhagens H99, 24067, $\Delta EEP1$, CNAG_01575, CNAG_04632 e CNAG_00165 apresentaram crescimento significativo após as 72h de tratamento com itraconazol a 30 °C. Já a 35 °C as linhagens H99, $\Delta CFO1$, CNAG_00165 apresentaram crescimento na presença de ITC em 72h de tratamento.

Em *C. gattii* nós vimos que para as 2 linhagens utilizadas também foi observado um maior crescimento nas linhagens cultivadas a 30 °C. Entretanto, apenas a linhagem 28/02 apresentou crescimento após as 72h de tratamento com itraconazol, sendo que o crescimento ocorreu apenas na temperatura de 30 °C. Quando cultivada a 35 °C podemos observar que a linhagem apresenta um crescimento entre 24h e 48h de tratamento, mas logo é reduzido até 72h (Figura 7).

Ao analisarmos o efeito geral do tratamento e da temperatura no crescimento de *C. gattii* e *C. neoformans*, é observado que mesmo havendo tratamento com o antifúngico, há maior crescimento das linhagens na temperatura de 30 °C.

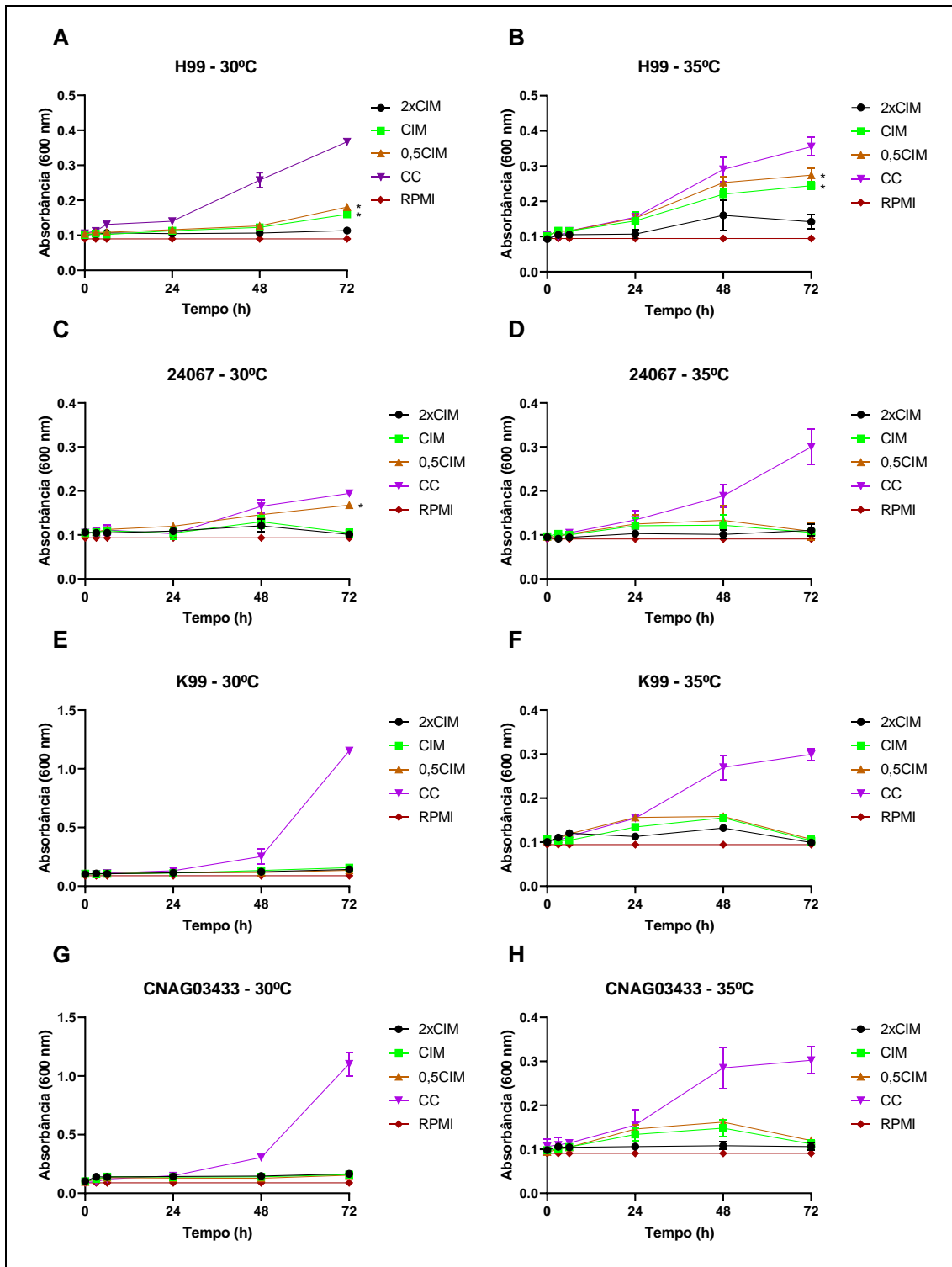


Figura 3: Curvas de crescimento de linhagens de *Cryptococcus neoformans* tratadas com itraconazol. Linhas pretas representam o valor de 2xCIM, linhas verdes o valor de CIM, linhas laranjas o valor de 0,5CIM e linhas roxas controle de crescimento sem droga. Dados apresentados em unidades de absorbância em relação ao tempo, com leituras em comprimento de ondas de 600 nm, obtidos em dois experimentos independentes em triplicatas. Análise estatística: ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Os asteriscos (*) representam $p < 0,05$ entre a taxa de crescimento das concentrações utilizadas no tempo de 72 horas.

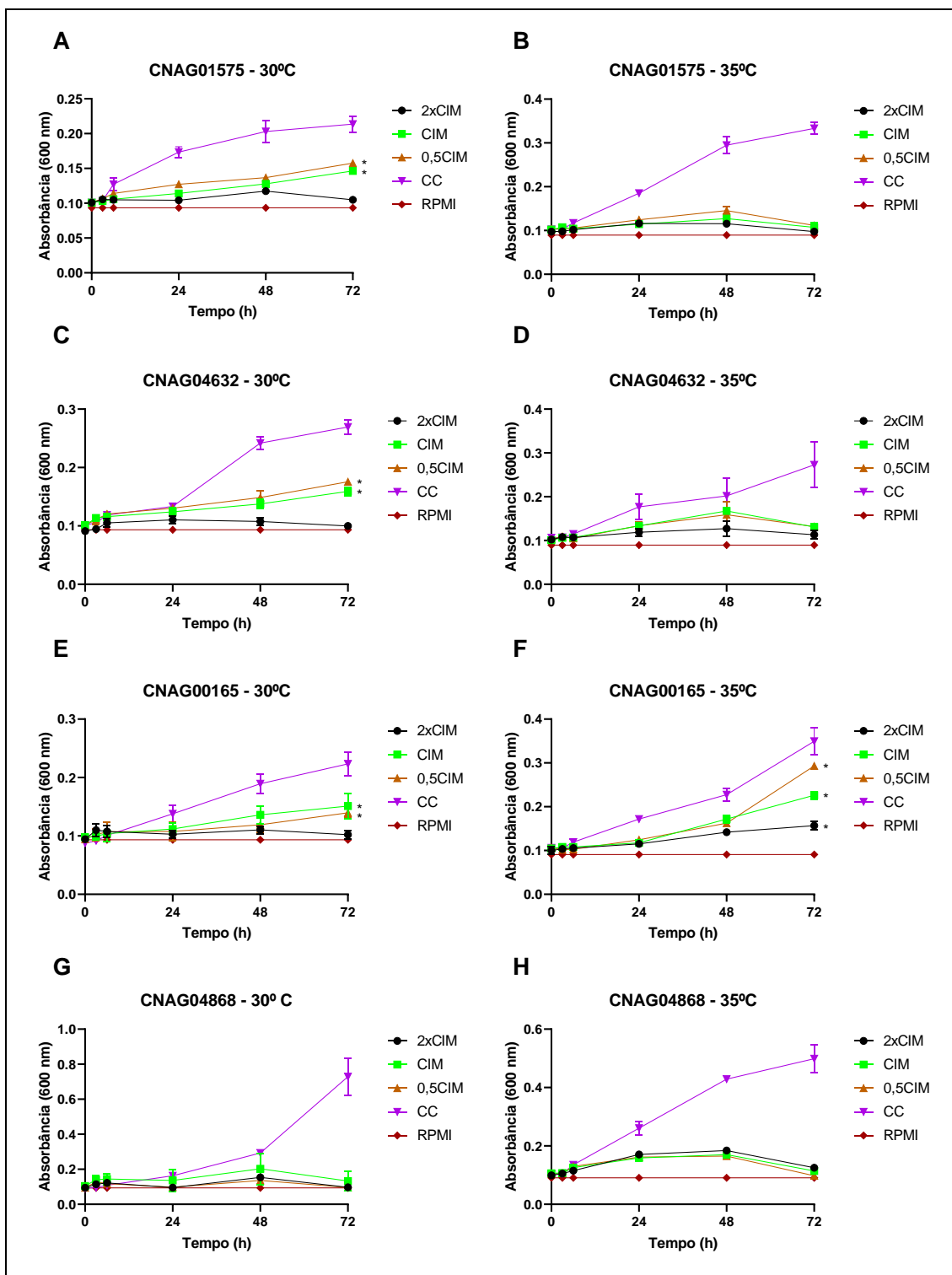


Figura 4: Curvas de crescimento de linhagens mutantes de *Cryptococcus neoformans* K99 tratadas com itraconazol. Linhas pretas representam o valor de 2xCIM, linhas verdes o valor de CIM, linhas laranjas o valor de 0,5CIM e linhas roxas controle de crescimento sem droga. Dados apresentados em unidades de absorbância em relação ao tempo, com leituras em comprimento de ondas de 600 nm, obtidos em dois experimentos independentes em triplicatas. Análise estatística: ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Os asteriscos (*) representam $p < 0,05$ entre a taxa de crescimento das concentrações utilizadas no tempo de 72 horas.

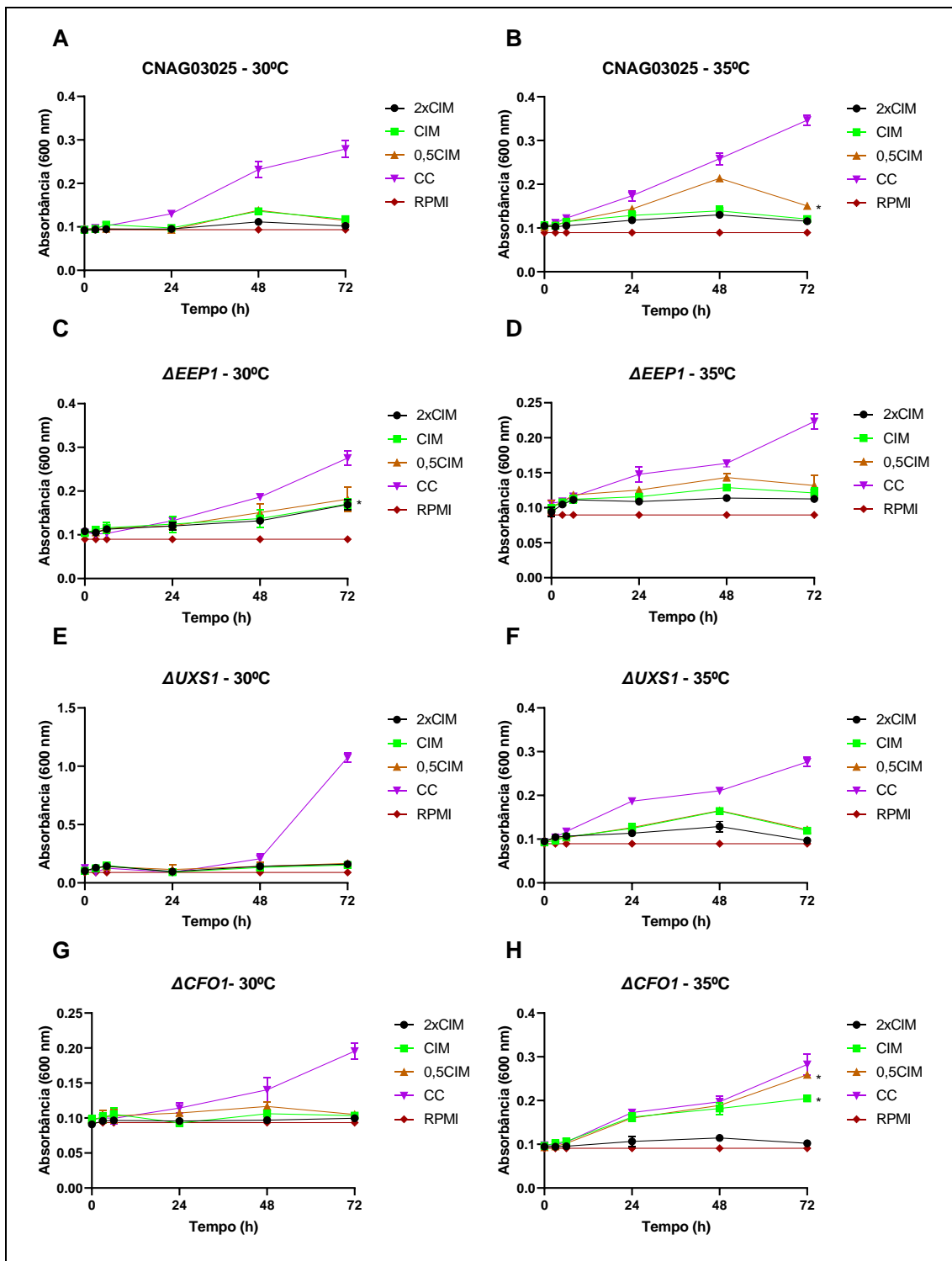


Figura 5: Curvas de crescimento de linhagens mutantes de *Cryptococcus neoformans* K99 tratadas com itraconazol. Linhas pretas representam o valor de 2xCIM, linhas verdes o valor de CIM, linhas laranjas o valor de 0,5CIM e linhas roxas controle de crescimento sem droga. Dados apresentados em unidades de absorbância em relação ao tempo, com leituras em comprimento de ondas de 600 nm, obtidos em dois experimentos independentes em triplicatas. Análise estatística: ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Os asteriscos (*) representam $p < 0,05$ entre a taxa de crescimento das concentrações utilizadas no tempo de 72 horas.

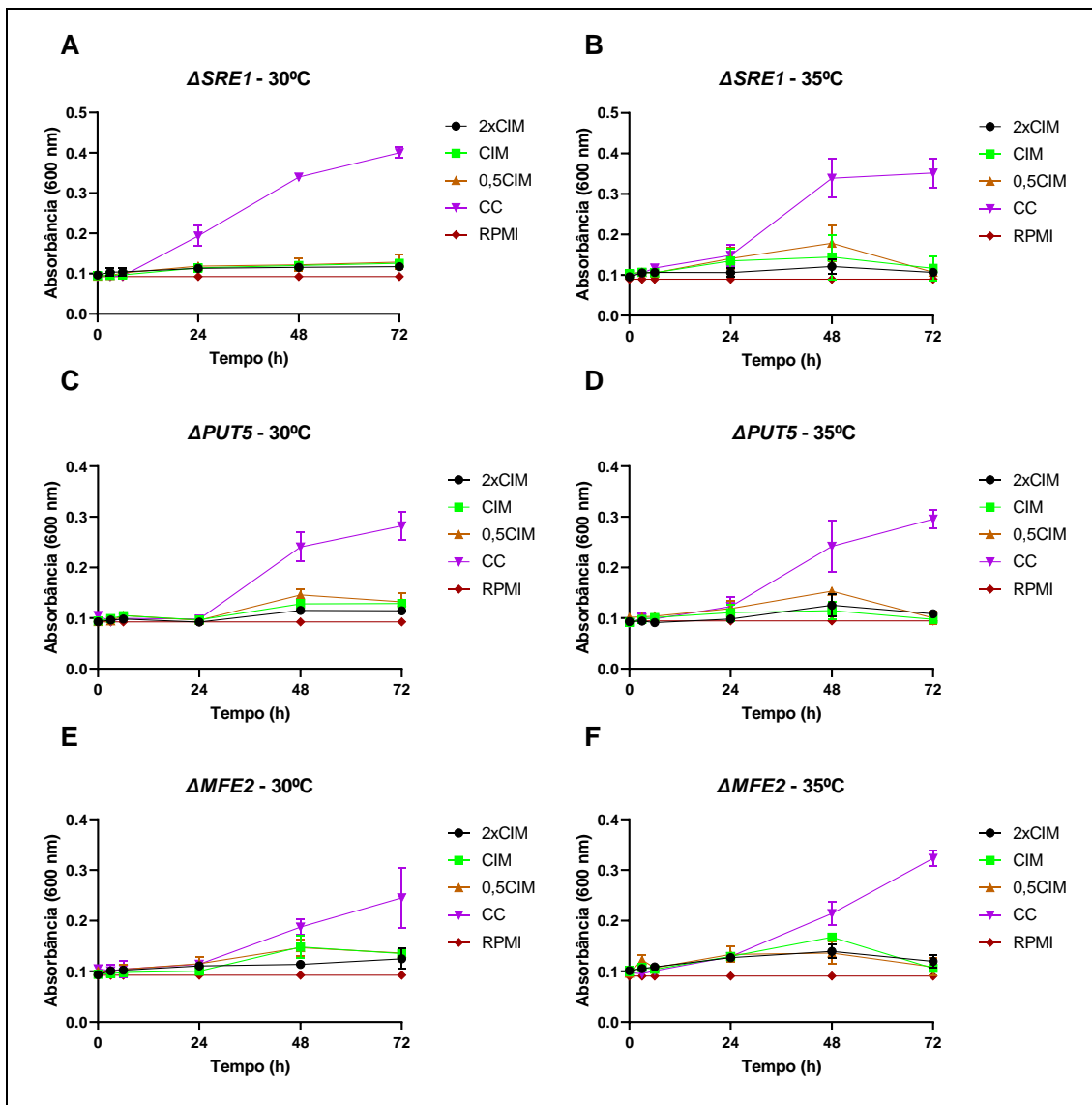


Figura 6: Curvas de crescimento de linhagens mutantes de *Cryptococcus neoformans* K99 tratadas com itraconazol. Linhas pretas representam o valor de 2xCIM, linhas verdes o valor de CIM, linhas laranjas o valor de 0,5CIM e linhas roxas controle de crescimento sem droga. Dados apresentados em unidades de absorbância em relação ao tempo, com leituras em comprimento de ondas de 600 nm, obtidos em dois experimentos independentes em triplicatas. Análise estatística: ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Os asteriscos (*) representam $p < 0,05$ entre a taxa de crescimento das concentrações utilizadas no tempo de 72 horas.

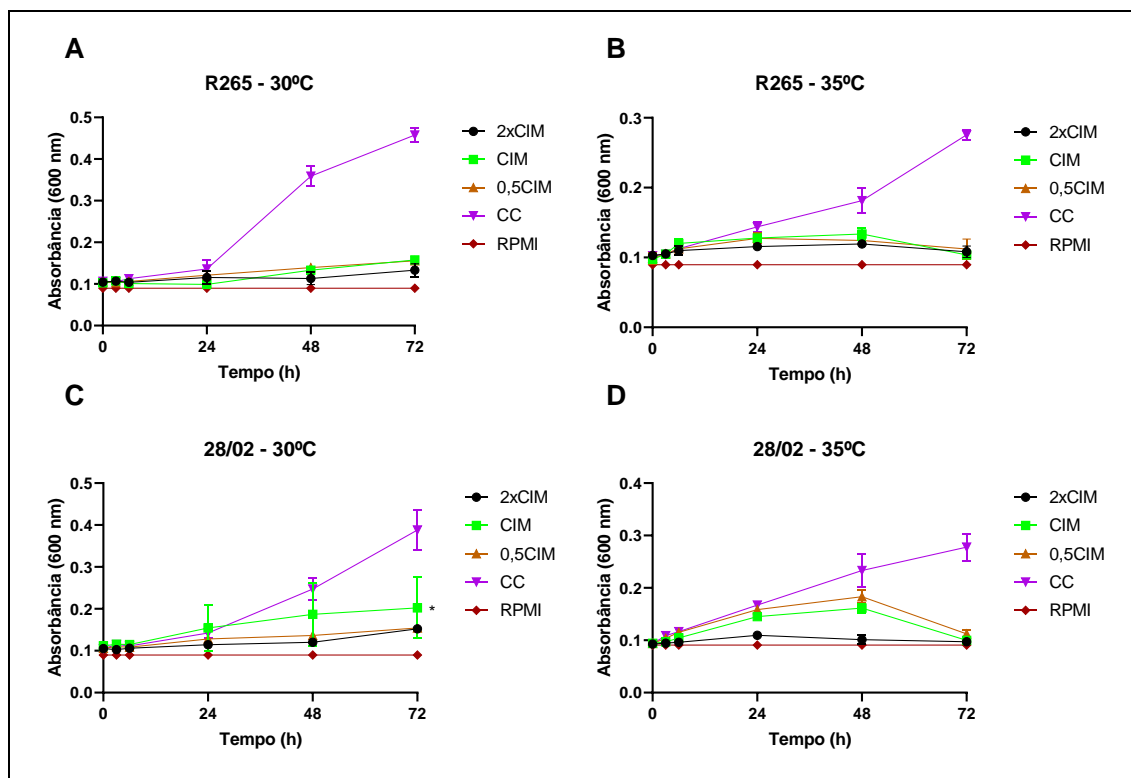


Figura 7: Curvas de crescimento de linhagens de *Cryptococcus gattii* tratadas com itraconazol. Linhas pretas representam o valor de 2xCIM, linhas verdes o valor de CIM, linhas laranjas o valor de 0,5CIM e linhas roxas controle de crescimento sem droga. Dados apresentados em unidades de absorbância em relação ao tempo, com leituras em comprimento de ondas de 600 nm, obtidos em dois experimentos independentes em triplicatas. Análise estatística: ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Os asteriscos (*) representam $p < 0,05$ entre a taxa de crescimento das concentrações utilizadas no tempo de 72 horas.

5.2.2 Determinação da tolerância ao ITC.

Os resultados obtidos pela análise da curva de crescimento demonstraram que houve crescimento para as linhagens de *C. neoformans* H99, 24067, $\Delta EEP1$, $\Delta CFO1$, CNAG_01575, CNAG_04632 e CNAG_00165 e de *C. gattii* 28/02. Seguimos então para a determinação de unidades formadoras de colônias para analisarmos a viabilidade das células tratadas com suas respectivas CIM de itraconazol. Após o plaqueamento podemos notar que houve crescimento a 30 °C para as linhagens H99, CNAG_01575, CNAG_04632 e CNAG_00165 e a 35 °C para H99 e CNAG_00165 de *C. neoformans* (Figura 8). Para *C. gattii* não houve crescimento considerável de nenhuma das 2 linhagens testadas (Figura 9).

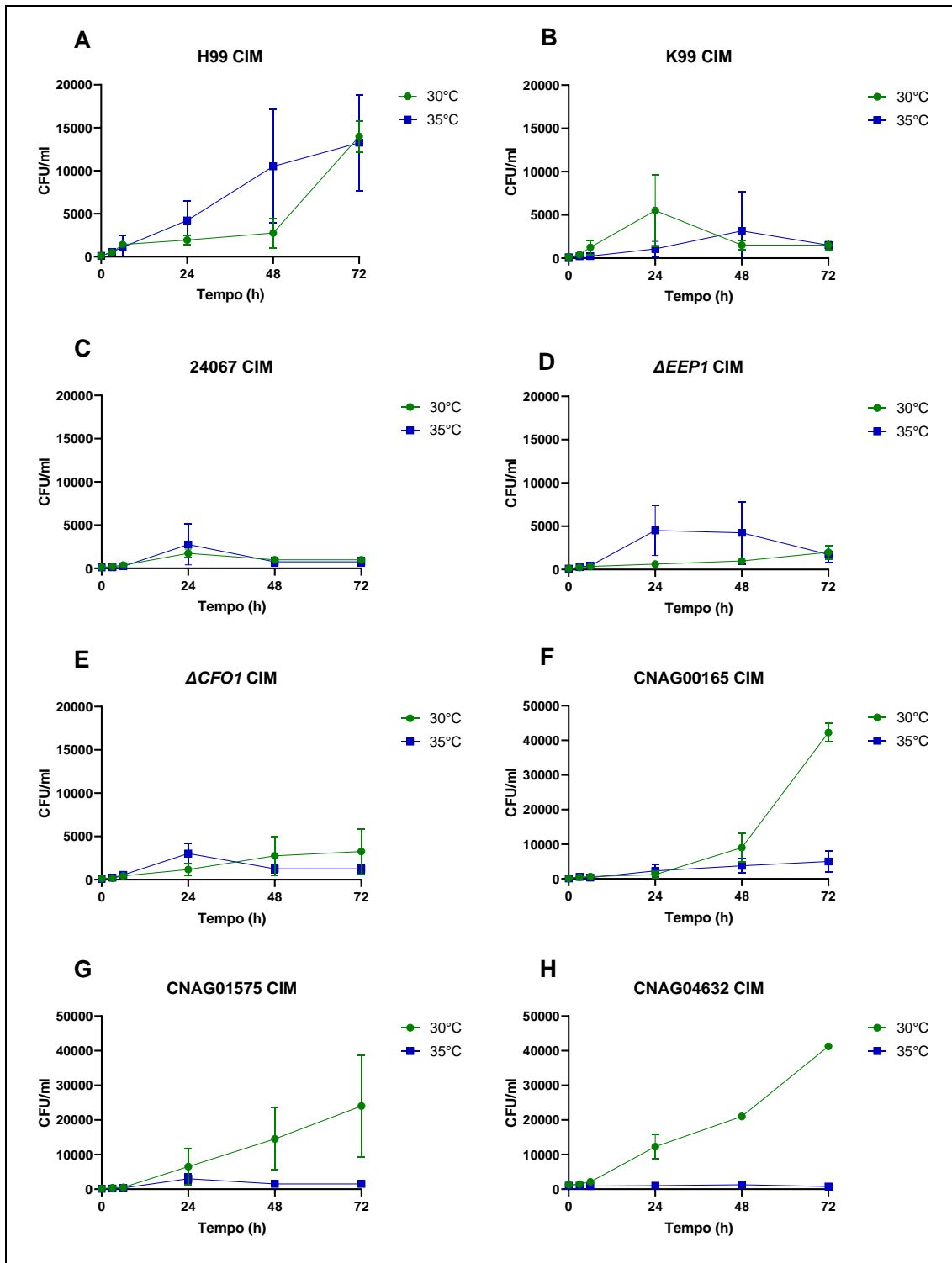


Figura 8: Viabilidade das linhagens de *C. neoformans* durante tratamento com itraconazol nas suas respectivas CIM.

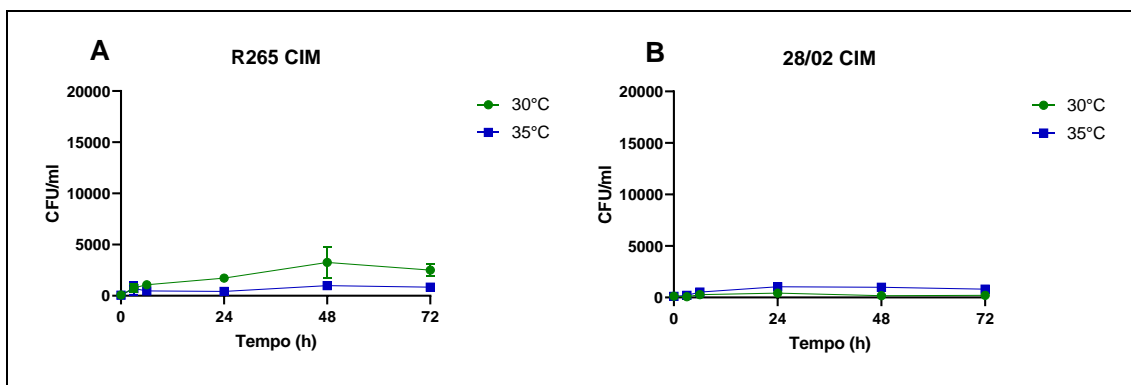


Figura 9: Viabilidade das linhagens de *C. gattii* durante tratamento com itraconazol nas suas respectivas CIM.

Após 72 horas de tratamento, podemos observar que mesmo na presença da CIM de itraconazol as linhagens, H99, CNAG_01575, CNAG_04632 e CNAG_00165 foram capazes de crescer na presença da droga na temperatura de 30 °C. Apenas as linhagens H99 e CNAG_00165 foram tolerantes nas duas temperaturas (Figura 10). Ainda que não apresentassem crescimento significativo, as outras linhagens utilizadas para determinação de UFC demonstraram recuperação de poucas células devido ao caráter fungistático do itraconazol. Para avaliarmos as alterações desse fenômeno na célula, essas linhagens foram selecionadas para os posteriores estudos e também foi utilizada a linhagem K99 para obtermos uma comparação entre as linhagens mutantes tolerantes e sua linhagem selvagem.

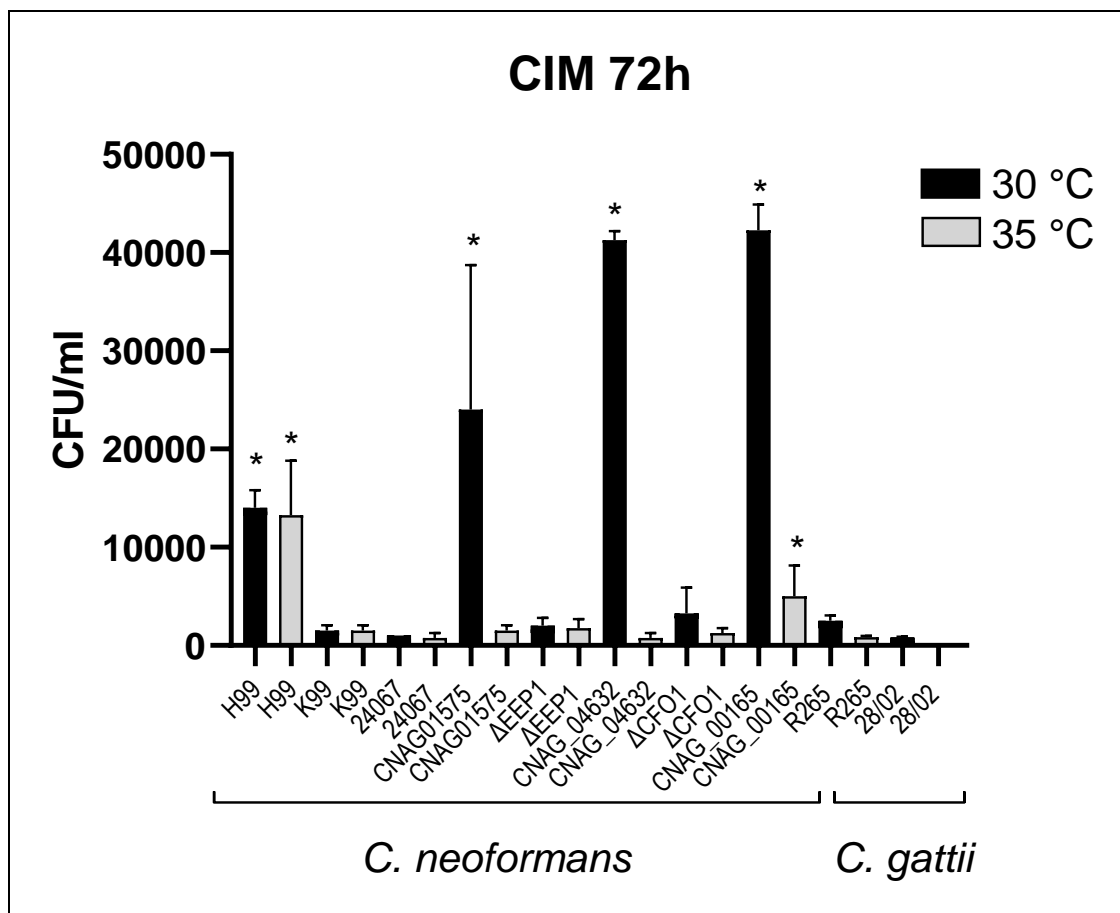


Figura 10: Crescimento das linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* após 72h de tratamento. Após 72h de tratamento apenas as linhagens H99, CNAG_01575, CNAG_04632 e CNAG_00165 apresentaram crescimento a 30 °C e H99 e CNAG_00165 a 35 °C. Análise estatística: ANOVA seguida de pós-teste Tukey. Os asteriscos (*) representam $p < 0,05$ na taxa de crescimento entre as linhagens tratadas com suas respectivas CIM no tempo de 72 horas.

5.3 Influência do ITC na morfologia de *Cryptococcus neoformans*

As células de *C. neoformans* tolerantes a ITC foram analisadas em relação a suas características morfológicas conforme descrito na tabela 6, também foi utilizada a linhagem selvagem K99 para comparação com seus mutantes tolerantes.

A tolerância ao ITC causou uma mudança na morfologia. As células tolerantes de *C. neoformans* cresceram formando um agregado de células e algumas linhagens como H99 apresentaram células com formato irregular ou disforme (Figura 11).

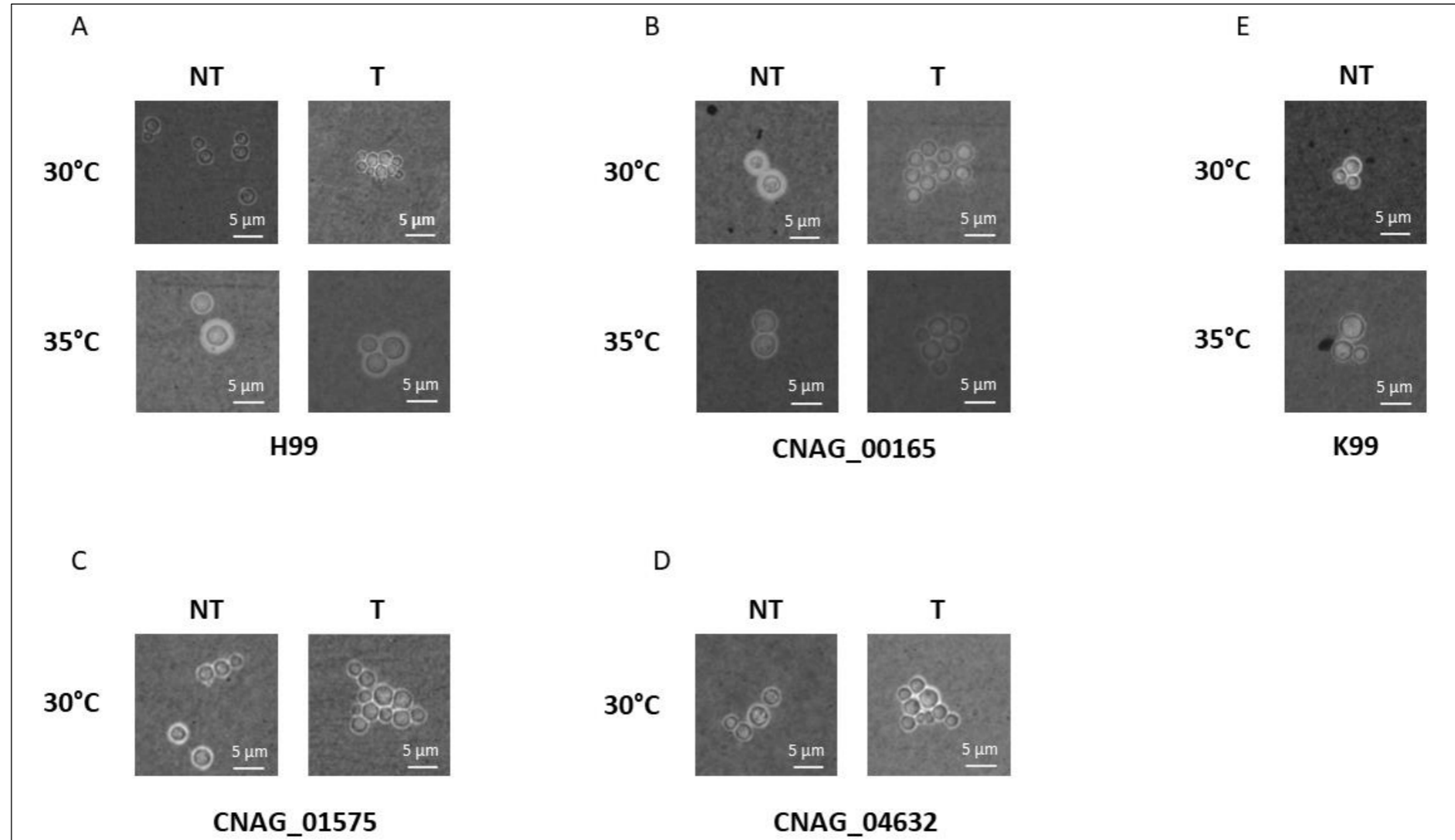


Figura 11: Morfometria das linhagens tolerantes à ITC de *C. neoformans*. Representação fotográfica das linhagens de *Cryptococcus neoformans neoformans* tratadas por 72 horas com ITC. Imagens obtidas pelo programa ImageJ 1.40 g. NT: não tratada. T: tratada.

Em relação ao tamanho do corpo celular, as linhagens tolerantes de H99 e CNAG_00165 a 35 °C apresentaram aumento significativo do corpo celular se comparado com as células NT. As linhagens H99 a 30 °C e CNAG_04632 a 35 °C não apresentaram diferença estatística entre NT e tratadas e as linhagens CNAG_01575 e CNAG_00165 a 30 °C apresentaram uma redução no tamanho do corpo celular se comparadas com as células NT (Figura 12).

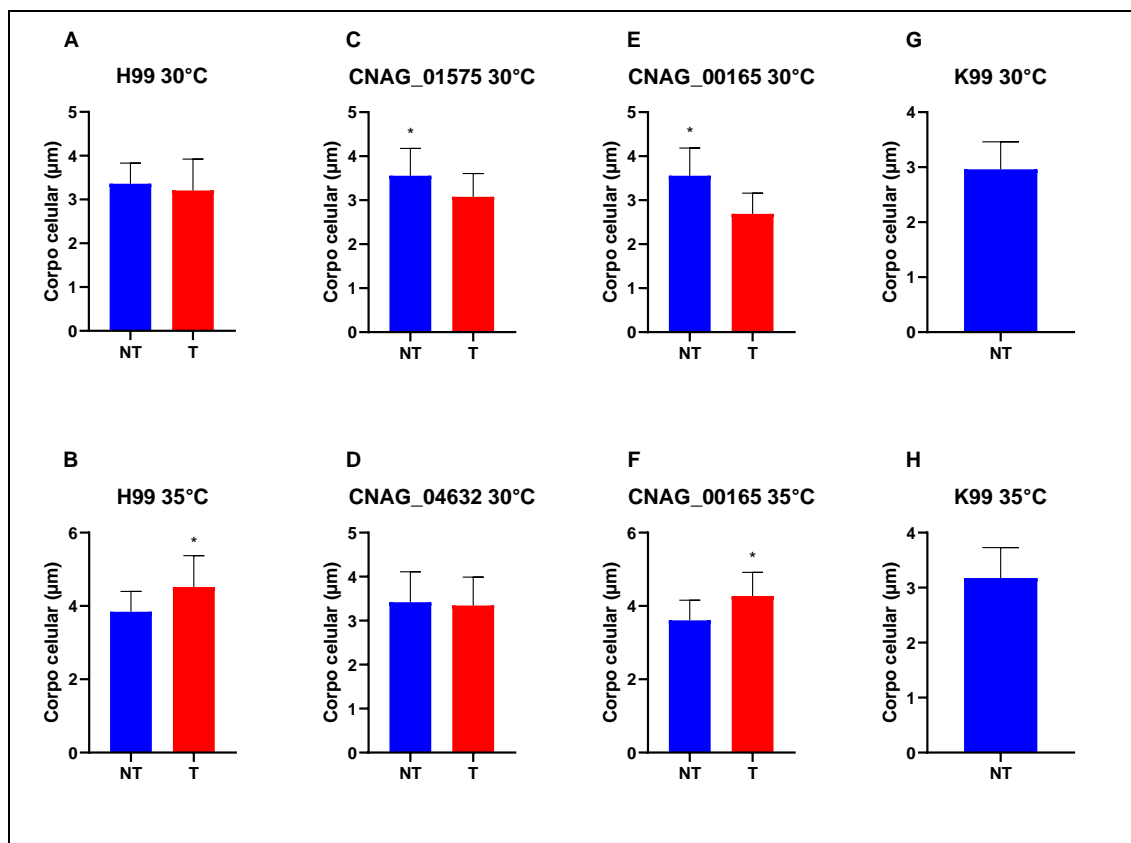


Figura 12: Tamanho do corpo celular das linhagens tolerantes à ITC de *C. neoformans* e da linhagem selvagem de K99. Os dados são expressos em µm. Os asteriscos (*) representam a diferença estatística ($p < 0,05$) entre as linhagens não tratadas (NT) e tratadas (T). NT indicadas em azul, T indicadas em vermelho.

As linhagens apresentaram uma pequena redução na espessura capsular exceto para as linhagens H99 e CNAG_01575 a 30 °C. Porém, a linhagem CNAG_00165 nas duas temperaturas foi a única que apresentou diferença estatística significativa entre T e NT (Figura 13).

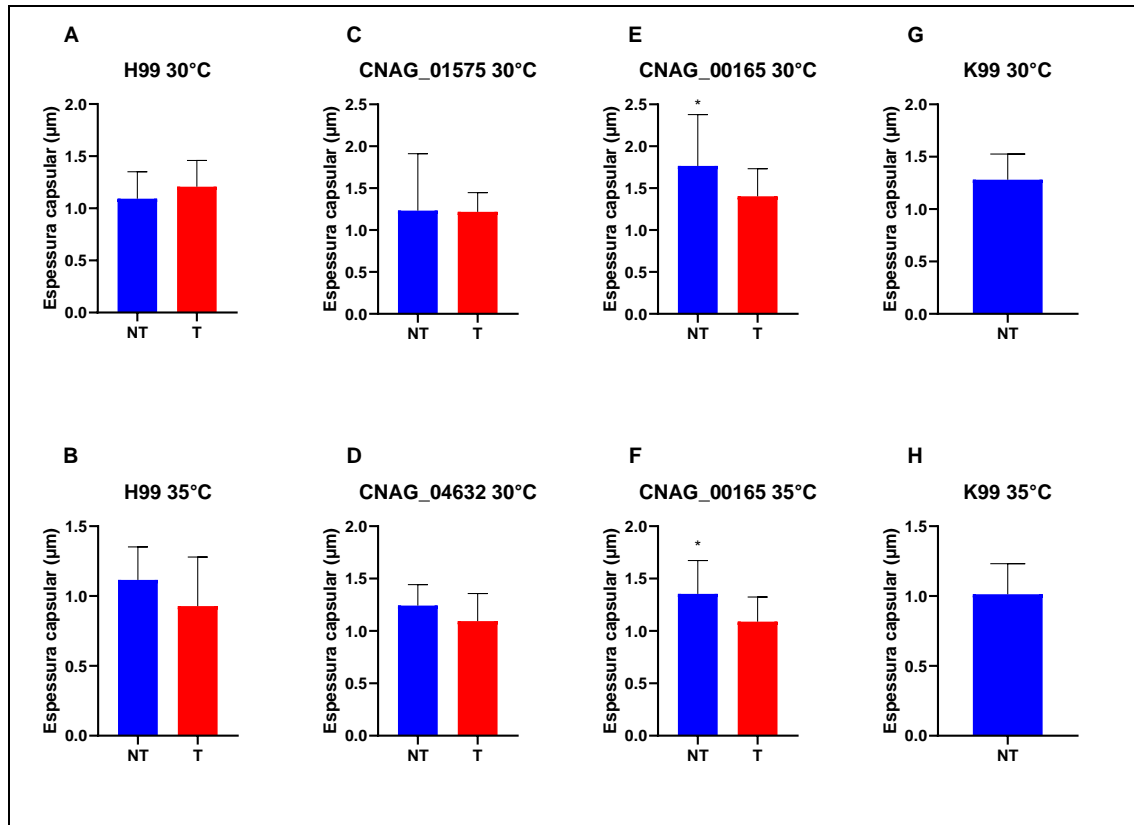


Figura 13: Tamanho da cápsula das linhagens tolerantes à ITC de *C. neoformans* e da linhagem selvagem de K99. Os dados são expressos em µm. Os asteriscos (*) representam a diferença estatística ($p < 0,05$) entre as linhagens não tratadas (NT) e tratadas (T). NT indicadas em azul, T indicadas em vermelho.

Em relação ao diâmetro celular apenas a linhagem CNAG_00165 a 30 °C apresentou diferença significativa entre NT e T, com redução do diâmetro celular das células tolerantes ao ITC (Figura 14).

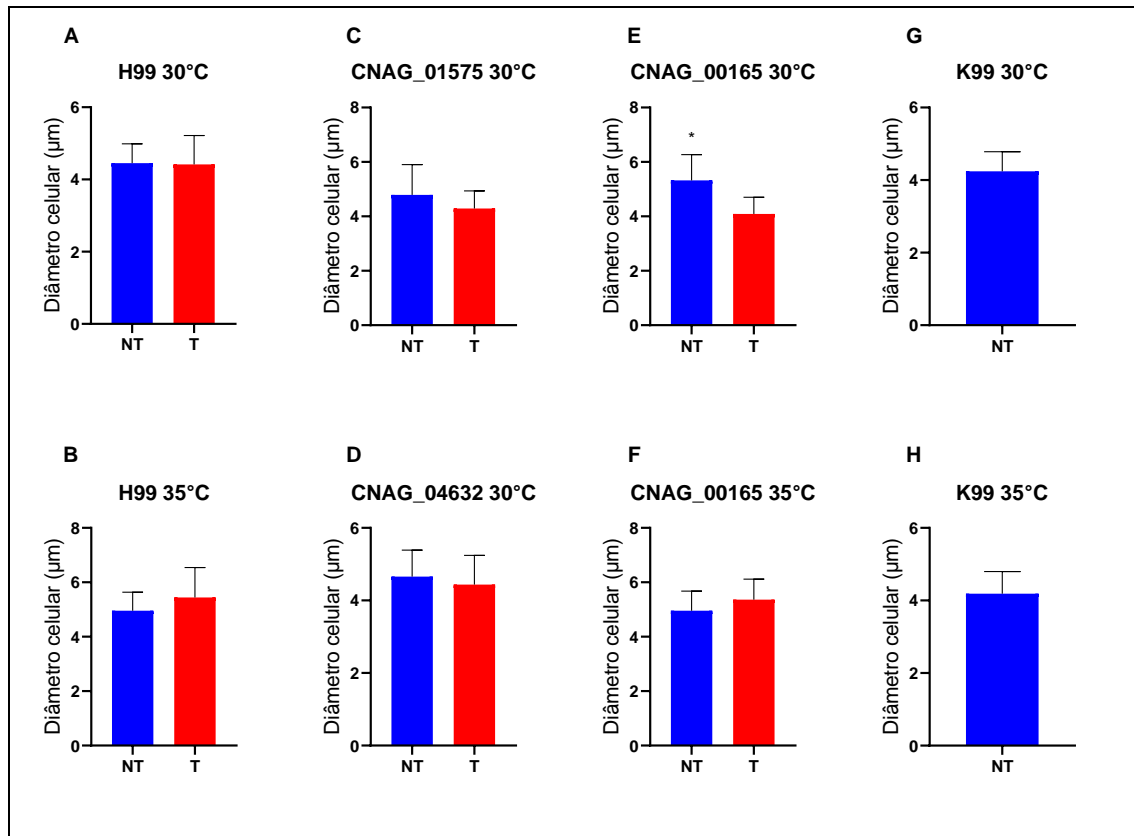


Figura 14: Diâmetro celular das linhagens tolerantes à ITC de *C. neoformans* e da linhagem selvagem de K99. Os dados são expressos em µm. Os asteriscos (*) representam a diferença estatística ($p < 0,05$) entre as linhagens não tratadas (NT) e tratadas (T). NT indicadas em azul, T indicadas em vermelho.

Na relação superfície/volume, sabemos que quanto maior a célula, menor a proporção entre sua área de superfície/volume, ou seja, células maiores possuem maior dificuldade para se adaptar a mudanças de condições ambientais se comparadas às células menores. Nesse estudo foi observado uma diferença estatística apenas para a linhagem CNAG_00165 se comparada entre as células NT e tratadas, sendo que a 30 °C apresentou uma maior relação S/V se comparada as células NT e a 35°C uma relação S/V menor se comparada as células NT (Figura 15).

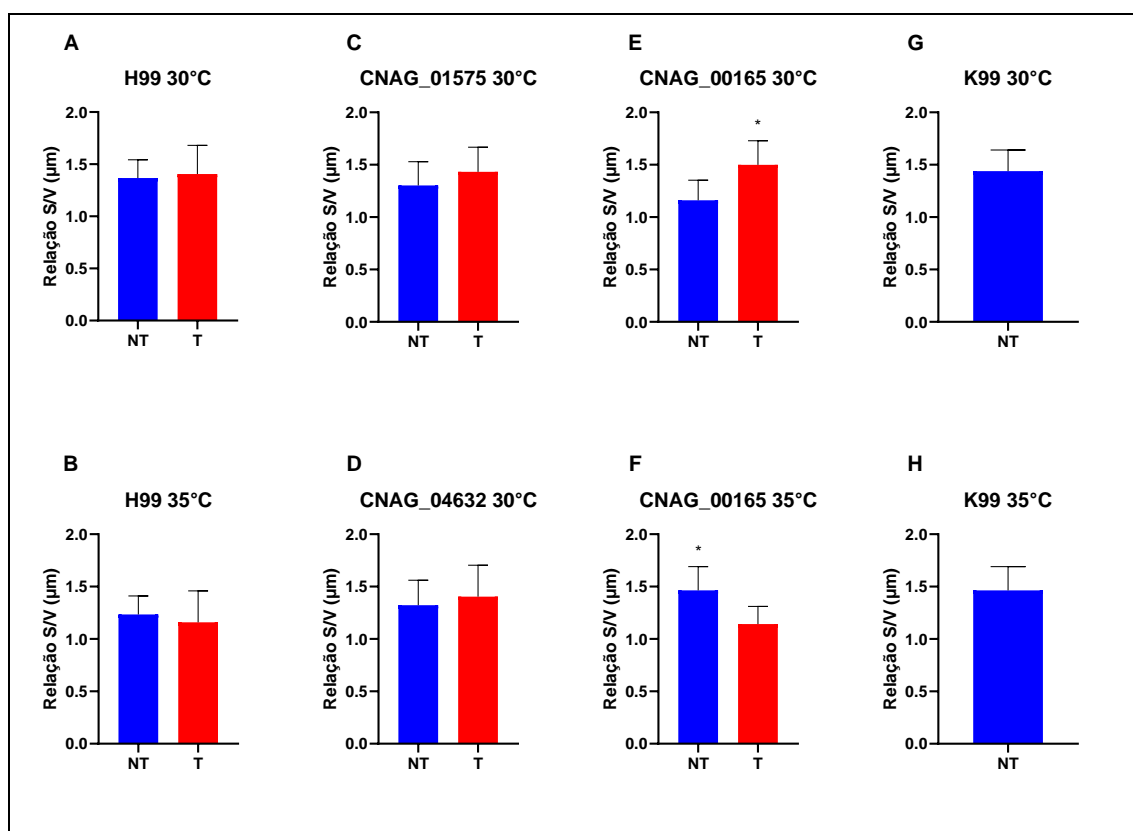


Figura 15: Relação superfície/volume das linhagens tolerantes à ITC de *C. neoformans* e da linhagem selvagem de K99. Os dados são expressos em μm . Os asteriscos (*) representam a diferença estatística ($p < 0,05$) entre as linhagens não tratadas (NT) e tratadas (T). NT indicadas em azul, T indicadas em vermelho.

Tabela 6 – Média da análise morfométrica das linhagens de *Cryptococcus neoformans* tolerantes ao ITC.

Linhagens	Espessura da cápsula (μm)	Diâmetro celular (μm)	Relação S/V (μm)	Espessura da cápsula (μm)	Diâmetro celular (μm)	Relação S/V (μm)
<i>C. neoformans</i>	NT			T		
ATCC H99 30°C	1,09 ± 0,25	3,35 ± 0,47	1,36 ± 0,17	1,20 ± 0,24	3,20 ± 0,71	1,43 ± 0,27
ATCC K99 30°C	1,28 ± 0,24	2,96 ± 0,50	1,43 ± 0,20	-	-	-
CNAG_01575 30°C	1,23 ± 0,68	3,55 ± 0,62	1,30 ± 0,22	1,21 ± 0,23	3,07 ± 0,52	1,43 ± 0,23
CNAG_04632 30°C	1,24 ± 0,19	3,41 ± 0,69	1,32 ± 0,23	1,09 ± 0,26*	3,34 ± 0,64	1,40 ± 0,29
CNAG_00165 30°C	1,76 ± 0,61*	3,55 ± 0,62*	1,16 ± 0,19	1,40 ± 0,32	2,68 ± 0,47	1,49 ± 0,22*
ATCC H99 35°C	1,11 ± 0,23	3,84 ± 0,55	1,23 ± 0,17	0,92 ± 0,35	4,51 ± 0,85	1,15 ± 0,29
ATCC K99 35°C	1,01 ± 0,21	3,17 ± 0,55	1,46 ± 0,22	-	-	-
CNAG_00165 35°C	1,35 ± 0,31*	3,60 ± 0,55	1,23 ± 0,19*	1,08 ± 0,23	4,27 ± 0,64	1,14 ± 0,16

ITC: Itraconazol; S/V: superfície/volume. Os dados são expressos em μm, apresentando a média ± erro padrão. Os asteriscos (*) representam a diferença estatística (p<0,05) entre as linhagens NT e T. (As linhagens em negrito se referem a linhagem selvagem K99 utilizada no estudo em comparação com seus mutantes com genes deletados)

5.4 Influência do ITC na produção de EROs e ERNs nas linhagens tolerantes

Após tratamento com a CIM de ITC, que é agente indutor de estresse oxidativo, as células tratadas das linhagens tolerantes de *C. neoformans* não apresentaram aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio após 3h em comparação às células que não receberam o mesmo tratamento. Entretanto, as células da linhagem K99 WT que receberam o mesmo tratamento, apresentaram aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em relação às células que não receberam este mesmo tratamento.

Nas leituras de 24h para espécies reativas de oxigênio, a 30 °C, a linhagem H99 e CNAG_01575 não tratadas apresentaram aumento de sua produção se comparadas com as linhagens tratadas. As linhagens CNAG_04632 e CNAG_00165 não apresentaram diferença estatística entre células não tratadas e tratadas e a linhagem K99 novamente apresentou aumento da produção nas células tratadas com itraconazol se comparada ao grupo não tratado. Já a 35 °C não houve diferença entre os grupos não

tratados e tratados de H99, houve aumento de produção se comparado ao grupo não tratado para a linhagem CNAG_00165 e para K99 WT.

Para espécies reativas de nitrogênio após a leitura de 24h, a 30 °C não houve diferença estatística entre os grupos tratados e não tratados para as linhagens H99 e CNAG_00165, já para as linhagens CNAG_01575, CNAG_04632 e K99 WT as células tratadas apresentaram aumento de espécies reativas de nitrogênio quando comparadas as não tratadas. A 35 °C houve diferença estatística apenas para a linhagem K99 WT.

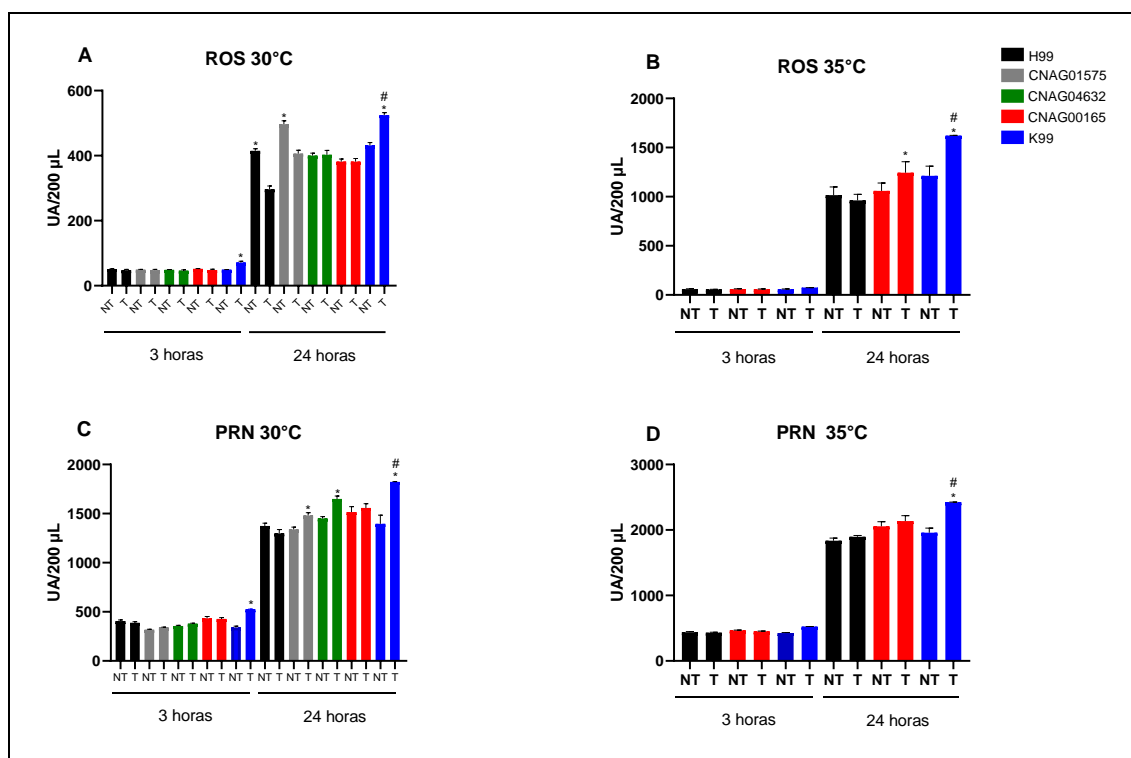


Figura 16: Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio das linhagens tolerantes à ITC de *C. neoformans* na presença e ausência de ITC. Produção de espécies reativas de oxigênio (A) e (B) e nitrogênio (C) e (D) por células tolerantes de *C. neoformans* tratadas e não tratadas com itraconazol em relação ao tempo. T representa as linhagens tratadas com itraconazol; NT representa as linhagens não tratadas com itraconazol. * $p < 0,05$ entre as linhagens tratadas e não tratadas nos tempos determinados. # $p < 0,05$ em relação as linhagens mutantes e selvagem. As linhagens foram tratadas com sua respectiva CIM para a leitura em 3h e 24h. Dados apresentados em unidades de absorbância em relação ao tempo, com leituras em comprimentos de onda a 485 nm, obtidos em quatro replicatas.

5.5 Influência do ITC na produção de Ergosterol das linhagens tolerantes

O ergosterol é o principal esterol das membranas celulares fúngicas, apresentando uma estrutura semelhante à do colesterol presente nos mamíferos ele é responsável pela estabilidade da forma e atividade da membrana. Neste estudo observamos que o tratamento com ITC propiciou uma pequena redução no conteúdo deste esterol para os 3 mutantes tolerantes a 30 °C, entretanto, não houve diferença estatística entre o grupo tratado e não tratado em nenhuma das temperaturas. A linhagem K99 apresentou uma redução significativa no conteúdo de ergosterol nos grupos tratados em comparação com os grupos não tratados nas temperaturas de 30 °C e 35 °C.

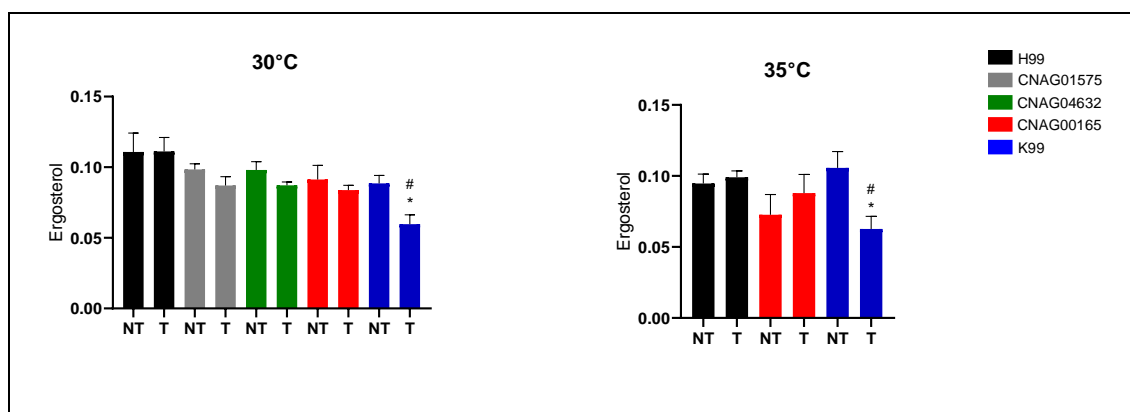


Figura 17: Quantificação de ergosterol após tratamento *overnight* com ITC. Análise estatística: ANOVA seguida de pós-teste Tukey, * $p < 0,05$ em relação ao controle não tratado. # $p < 0,05$ em relação as linhagens mutantes e selvagem

6. DISCUSSÃO

As espécies de importância médica de *Cryptococcus* spp. são responsáveis por aproximadamente 223.100 casos de criptococose anualmente, ocasionando cerca de 181.000 óbitos em todo o mundo, apresentando uma taxa de letalidade acima de 80% (WILLIAMSON *et al.*, 2017 RAJASINGHAM *et al.*, 2017). Além da emergência da infecção causada por esse fungo, estamos vivendo uma emergência de microrganismos que vêm apresentando mecanismos para adaptação dos tratamentos antifúngicos convencionais. O uso indiscriminado de antimicrobianos vem causando uma pressão seletiva sobre essas linhagens, fazendo com que elas desenvolvam maneiras de sobreviver aos tratamentos, como por exemplo os mecanismos de resistência e tolerância.

A metodologia de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), vem sendo amplamente utilizada para a determinação da susceptibilidade antifúngica de diversos fungos de importância médica, principalmente no atual cenário onde notamos microrganismos resistentes resultando em falhas nos tratamentos. Dessa forma, este trabalho foi realizado seguindo este parâmetro para determinação da CIM de ITC, de acordo com a CLSI M27-A3 que indica inibição de 50% do crescimento fúngico visível no teste de susceptibilidade antifúngica.

Observamos que a CIM para as linhagens de *C. neoformans* a 30°C, variou entre 0,12 e 1 µg/mL e a 35°C entre 0,03 e 1 µg/mL. Bastos e colaboradores (2018) ao analisar 4 linhagens de *C. neoformans* observaram que no teste de microdiluição em caldo com inóculo de 1×10^4 a 5×10^4 os valores de CIM de ITC variaram de 0,12 a 0,50 a 30°C e 0,12 a 0,25 a 35°C. Para *C. gattii* a 30°C, a CIM variou entre 0,12 e 1 µg/mL e a 35°C variou entre 0,03 e 1 µg/mL. Bastos e colaboradores (2018) também avaliaram 5 linhagens de *C. gattii* e com a CIM obtida de ITC os valores variaram de 0,25 a 0,50 a 30°C e a 35°C. Já para a linhagem K99 e suas respectivas linhagens mutantes, a 30°C a CIM variou entre 0,25 e 2 µg/mL e a 35°C a CIM variou entre 0,06 e 2 µg/mL.

Se analisarmos a diferença entre as temperaturas para as linhagens de *C. neoformans* podemos notar que a maioria das linhagens a 35 °C possuem sua CIM menor do que a 30 °C, totalizando em 9 linhagens (WM 148, WM 626, WM 628, WM 629 e H99), 2 possuem a mesma concentração de CIM (RN01 e 62066) e 5 a concentração de CIM maior a 35 °C (78, 24067, C31, 28/JF e P3). Em *C. gattii* foi observado o mesmo padrão, no qual novamente 9 linhagens apresentaram a CIM maior na temperatura de 30 °C (WM 161, WM 178, WM 779, R265, 547 OTTI, 135L/03, L27/01, 1913/ER e 196L/03), 3 linhagens com a mesma concentração nas duas temperaturas (WM 179, L24/01 e ICB 181) e 4 linhagens com a CIM maior na temperatura de 35 °C (29/0893, ATCC 32608, 28/0893 e 28/02). Para as linhagens de *C. neoformans* mutantes de K99, foram observadas 27 linhagens com a CIM maior em 30 °C, 5 linhagens com a mesma CIM nas duas temperaturas e 5 com a CIM maior a 35 °C. Esses valores nos mostram que na temperatura de 35 °C, que é a temperatura do hospedeiro de *Cryptococcus* spp., as linhagens apresentam-se mais susceptíveis ao ITC, não havendo diferença nesse padrão entre as duas espécies aqui estudadas.

Ao analisarmos as curvas de crescimento das linhagens estudadas podemos notar que há uma variação na taxa de crescimento para cada linhagem, o ciclo de crescimento de microrganismos apresenta quatro fases principais, sendo elas, a fase lag, a fase exponencial, a fase estacionária e a fase de morte. A fase lag é a qual ocorre intensa atividade metabólica e é de grande importância para a adaptação e crescimento acerca da condição utilizada para o crescimento dessas células (MADIGAN, 2016). Durante a fase lag as linhagens tolerantes podem ter se adaptado as condições mesmo na presença de ITC. Podemos notar que as linhagens tratadas apresentam um intervalo maior de tempo para apresentar crescimento se comparadas ao controle de crescimento sem ITC, principalmente na fase exponencial.

Para a verificação da viabilidade das células, uma vez que a absorbância na curva de crescimento pode conter células não viáveis seguimos para determinação de unidades formadoras de colônias. Neste trabalho, 4 linhagens quando submetidas em concentração de CIM de ITC apresentaram crescimento mesmo após 72 horas de exposição, a 30°C, sendo elas H99, CNAG_01575, CNAG_04632 e CNAG_00165, com a CIM de 0,50 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,25 µg/mL e 0,25 µg/mL respectivamente e 2 a 35°C, sendo elas H99 e CNAG_00165 com CIM de 0,03 µg/mL e 0,06 µg/mL

respectivamente. Os produtos dos genes deletados das linhagens mutantes são: uma proteína transportadora ABC (*ATP-binding cassette transporter*) Paul e colaboradores (2017) descobriram que uma proteína transportadora ABC chamada AbcG1 é necessária para a resistência ao VRZ em uma linhagem do tipo selvagem de *A. fumigatus*, ao testarem um mutante com a deleção de AbcG1 os autores observaram uma grande diminuição na resistência ao azol da linhagem mutante; a permease de uracila onde foi demonstrada em *S. cerevisiae* que sua modificação por fosforilação na membrana plasmática é um importante mecanismo para regular a endocitose do transportador (MARCHAL *et al.*, 2002); e a metiltioadenosina fosforilase onde sua biossíntese e metabolismo metiltioadenosina têm despertado interesse devido ao seu efeito regulador na biossíntese de poliaminas (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2006). Notamos também que na temperatura de 30°C, temperatura na qual o fungo se encontra no ambiente, tivemos mais linhagens tolerantes ao ITC se compararmos a temperatura de 35°C, o que se sugere que a temperatura pode ser um fator para a tolerância de algumas linhagens.

A cápsula polissacarídica é um importante fator de virulência das leveduras de *Cryptococcus* spp., conferindo proteção contra dessecação, raios solares UVA e UVB, espécies reativas, fagocitose por amebas no ambiente e por macrófagos no hospedeiro e também aos antifúngicos utilizados para tratamento dessas células (ZARAGOZA *et al.*, 2009; PRATES *et al.*, 2013). Ao analisarmos a média da análise morfométrica, houve redução da espessura capsular na maioria das linhagens tolerantes se comparadas as linhagens não tratadas, com exceção da linhagem H99 a 30°C que foi a única linhagem que apresentou aumento na espessura capsular se comparada a linhagem não tratada e a linhagem mutante CNAG_01575 que não houve diferença se comparada a não tratada.

As leveduras possuem de 1 a 3 µm, podendo apresentar aumento no tamanho dessas células durante a infecção, o diâmetro celular pode variar em diferentes linhagens ou até mesmo em células de uma mesma linhagem, o que depende da condição de cultivo dessas células (VELAGAPUDI *et al.*, 2009; MA & MAY, 2009). Neste trabalho foram encontradas células de 2 a 4 µm de diâmetro celular, observando a média da análise morfométrica, as células tolerantes que apresentaram maior diâmetro foram H99 e CNAG_00165 a 35°C, se comparadas as células não tratadas, conseqüentemente

reduzindo a relação superfície/volume dessas células. Para as outras linhagens houve redução do diâmetro celular quando comparadas as linhagens não tratadas, fazendo com que a relação superfície/volume dessas células seja maior. Ao comparar os três mutantes tolerantes com sua linhagem selvagem K99 a 30°C, as linhagens CNAG_01575 e CNAG_04635 apresentaram um aumento significativo no diâmetro celular e a linhagem CNAG_00165 apresentou uma redução no diâmetro celular se comparada a selvagem. A linhagem CNAG_00165, única linhagem mutante tolerante a 35°C, quando comparada a linhagem K99 houve também um aumento significativo do diâmetro celular. As células tolerantes capazes de crescer na CIM de ITC apresentaram um aglomerado de células e em algumas linhagens o aspecto irregular, é demonstrado na literatura por Martinez e Casadevall (2006b) a habilidade de *Cryptococcus* spp. de formar biofilmes menos susceptíveis a AMB e aos azólicos, no qual a melanização do biofilme confere menor susceptibilidade e a ligação de anticorpos à matriz extracelular poderiam estar formando uma capa protetora impedindo o acesso dos fármacos as células do biofilme.

É encontrado na literatura que o tratamento antifúngico com a classe dos poliênicos pode ocasionar o aumento da produção de radicais livres como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, isso tem sido importante para a resposta no efeito fungicida dessa classe de antifúngicos, principalmente no tratamento com a AMB, que pode desencadear um estresse oxidativo e nitrosativo, o aumento desses radicais livres pode causar danos nas células e dessa forma, causar morte celular (MESA-ARANGO *et al.*, 2014). O itraconazol também é um indutor de estresse oxidativo (FERREIRA *et al.* 2013). Quando analisada a capacidade das linhagens tolerantes produzirem EROs e ERNs frente a ITC, percebe-se que as linhagens tolerantes de *C. neoformans* não apresentaram aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio após 3h em comparação às células que não receberam o mesmo tratamento. Já as células da linhagem K99 WT que receberam o mesmo tratamento apresentaram uma diferença significativa entre tratadas e não tratadas. Nas leituras de 24h para EROs, a 30°C a linhagem H99 e CNAG_01575 não tratadas apresentaram diferença estatística se comparadas as linhagens tratadas, as linhagens CNAG_04632 e CNAG_00165 não apresentaram diferença estatística entre células não tratadas e tratadas e a linhagem K99 novamente apresentou aumento da produção nas células tratadas com itraconazol se

comparada ao grupo não tratado. Já a 35°C houve apenas aumento de produção se comparado ao grupo não tratado para a linhagem CNAG_00165 e para K99 WT. Na leitura de 24h para ERNs, a 30°C não houve diferença estatística entre os grupos tratados e não tratados para as linhagens H99 e CNAG_00165, já para as linhagens CNAG_01575, CNAG_04632 e K99 WT as células tratadas apresentaram aumento de espécies reativas de nitrogênio quando comparadas as não tratadas. A 35°C houve diferença estatística apenas para a linhagem K99 WT. Percebe-se que as linhagens tolerantes apresentaram menor ou igual produção de EROs quando comparadas às não tratadas, exceto para a linhagem CNAG_00165 a 35°C, isso pode ter ocorrido devido as células tolerantes adaptarem a esse agente oxidante. A produção de ERNs das linhagens tolerantes não apresentou diferença entre células tratadas e não tratadas apenas para as linhagens H99 e CNAG_00165, para as linhagens CNAG_01575, CNAG_04632 a 30°C e K99 nas duas temperaturas houve aumento se comparadas as células não tratadas, mas não foi prejudicial para o crescimento dessas linhagens, exceto para a K99 que não foi tolerante ao itraconazol e esse aumento de EROs e ERNs pode estar relacionado a sensibilidade dessa linhagem ao fármaco. Similar a esse trabalho Bhattacharya e colaboradores (2021) ao testarem a CIM de FLU em diferentes concentrações de glicose, observaram que em baixas concentrações de glicose há um aumento da tolerância ao FLU e conseqüentemente redução de EROs.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do trabalho demonstraram algumas alterações morfofisiológicas ocorridas nas células tolerantes das linhagens de *Cryptococcus neoformans*, onde apresentaram alterações em sua morfometria, não apresentaram um aumento de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio se comparada as linhagens não tratadas e também não há alteração na produção de ergosterol entre esse mesmo grupo, o que podem ser alguns dos possíveis meios de adaptação ao estresse.

PERSPECTIVAS

- Avaliar se a tolerância interfere na produção de fatores de virulência dessas linhagens;
- Avaliar a virulência das linhagens tolerantes em modelo murino;
- Avaliar o efeito da tolerância na fagocitose por macrófagos;
- Verificar se há formação de biofilmes nas linhagens tolerantes;
- Avaliar a expressão gênica para verificar quais genes estão sendo expressos durante esse processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG-JAMES et al. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, 2014.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 27, n. 11, p. 875-904, 2010.
- BARONI, F.A. et al. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 48, n. 2, p. 71-75, 2006.
- BASTOS, R. W. et al. Environmental Triazole Induces Cross-Resistance to Clinical Drugs and Affects Morphophysiology and Virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 62, n. 1, 2018
- BECHERELLI, M., TAO, J., & RYDER, N. S. Involvement of Heat Shock Proteins in *Candida albicans* Biofilm Formation. **Journal of Molecular Microbiology & Biotechnology**. Cambridge, Mass., USA, 2013.
- BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: Uma Revisão. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 159 -172, 2004.
- BERMAN, J., KRYSAN, D.J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nat Rev Microbiol** 18, 319–331,2020.
- BHATTACHARYA, S.; OLIVEIRA, N.K.; SAVITT, A.G.; et al. Low glucose-mediated fluconazole tolerance in *Cryptococcus neoformans*. *J Fungi (Basel)*. *J Fungi (Basileia)*. 2021;7(6):489. Publicado em 18 de junho de 2021. doi:10.3390/jof7060489
- BIVANCO, F. C.; MACHADO, C. APARECIDA S.; MARTINS, E. L. Criptococose cutânea. **Arq Med ABC**, v. 31, n. 2, p. 102-9, 2006.
- BOSCH, C. et al. Nitrogen concentration affects amphotericin B and fluconazole tolerance of pathogenic cryptococci. **FEMS Yeast Res**, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e Epidemiológica Da Criptococose. Unidade de vigilância das doenças de transmissão respiratória e imuno preveníveis. Rev. Brasília: **Ministério da saúde**, p. 03-18, 2012.
- BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews**, v. 14, p. 320-330, 2016.
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: Human fungal infections. **Sci. Transl. Med.** 4, 165rv13, 2012.
- BUCHANAN, K.; MURPHY, J. W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. 71-83, 1998.
- CARMONA, E.M; LIMPER, A.H. Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. **Clinical Chest Med.**, 2017.

CARNEIRO, H. C. S. et al. Hypervirulence and cross-resistance to a clinical antifungal are induced by an environmental fungicide in *Cryptococcus gattii*, **Science of the Total Environment**, 2020.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM, Press, p. 541, 1998.

CHATTOPADHYAY M.K., TABOR C.W., TABOR H. Methylthioadenosine and polyamine biosynthesis in a *Saccharomyces cerevisiae* *meu1*Δ mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;343:203–207.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infectious Diseases Clinical of North American**, v.20, p. 507–544, 2006.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, n. 1, p. 219-238, 2014.

COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, v. 2013, p. 23, 2013.

COSTA, M.C. et al. The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*. **Int. J. Med. Microbiol.** 306, 187 –195, 2016.

COUTINHO, Z.F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980- 1995). **Cad Saude Pub**, vol. 18: p. 1441-1454, 2002.

COWEN, L.E.; LINDQUIST, S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: Drug resistance in diverse fungi. *Science* 309: 2185–2189, 2005.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, 2015.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard (NCCLS document M27 – A3) Villanova, PA: **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 2008.

CRISSEY, J. T.; LANG, H.; PARISH, L. C. Manual of medical mycology. Cambridge, Spain. **Blackwell Science**, 1995.

DEL POETA, M; CHATURVEDI, V. *Cryptococcus* and cryptococcosis in the twenty-first century. **Mycopathologia**. 2012.

DENHAM, S. T.; BROWN, J. C. S. Mechanisms of Pulmonary Escape and Dissemination by *Cryptococcus neoformans*. **J Fungi** (Basel), v. 4, n. 1, Feb 2018.

DUARTE, S. B. L. et al. Magnetic resonance imaging findings in central nervous system cryptococcosis: comparison between immunocompetent and immunocompromised patients. **Radiol Bras**. v. 50, n. 6, p. 359-365, 2017.

ERWIG, L.; GOW, N. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nat Rev Microbiol**, 14, 163–176, 2016.

- FERREIRA, G. F. *et al.* The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 8, p. 1801-11, 2013.
- FERREIRA, G. F. *et al.* Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 59, n. 8, 2015.
- FIRACATIVE, C. *et al.* The status of cryptococcosis in Latin America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 7, e170554, 2018.
- FISHER, M. C. *et al.* Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 2018.
- FREITAS, G. J. C.; SANTOS, D. A. *Cryptococcus gattii* polysaccharide capsule: An insight on fungal-host interactions and vaccine studies. **European Journal Of Immunology**, v. 51, p. 2206-2209, 2021.
- GARCÍA-RODAS, R. *et al.* Role of Cln1 during melanization of *Cryptococcus neoformans*. **Front Microbiol**, v. 6, p. 798, 2015.
- HAGEN, F. *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genet. and Biol**, Orlando, v. 78, n. 1, p. 16-48, 2015.
- HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, M. J. *et al.* Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition. **J. Fungi**, 2017.
- IDNURM, A. *et al.* Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature** 3: p. 753-764, 2005
- JIA, X. M. *et al.* RTA2 is involved in calcineurin-mediated azole resistance and sphingoid long-chain base release in *Candida albicans*. **Cell Mol Life Sci**. 66(1):122-34, 2009.
- JUNIOR, C. S. A. P. *et al.* Criptococoma cerebral e pulmonar em paciente imunocompetente: relato de caso. Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: **Brazilian Neurosurgery**, [s.l.], v. 34, n. 04, p.335-337, 2015.
- KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120–128, 2008.
- KEAN, R.; RAMAGE, G. Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: the Global Threat of *Candida auris*. **MSphere**, 2019.
- KRONSTAD, J. W. *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 3, p. 193-203, 2011.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. The Yeasts, a Taxonomic Study. 5ed. USA. **Elsevier**, 2011.
- KWON-CHUNG, K.J.; FRASER, J.A.; DOERING, T.L. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2014.

- LACAZ, C.S. et al. Tratado de Micologia Médica 8ªed. São Paulo: **Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda**; 2002.
- LESTER, S. J. et al. Criptococcosis: updates and emergence of *Cryptococcus gattii*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40(1), p. 4-17, 2011.
- LEVIN-REISMAN, I. et al. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. **Science**, 355(6327), 2017.
- LI, S. S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proc Am Thorac Soc**. v. 7, n. 3, p. 186-96, 2010
- LIN, X. HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Ann. Rev. Microb.**, v. 60, n. 1, 2006.
- LIU, T. B. et al. *Cryptococcus* inositol utilization modulates the host protective immune response during brain infection. **Cell Commun Signal**, 2014.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. 25(4):402-408, 2001.
- LONG, M. et al. Lipid raft/caveolae signaling is required for *Cryptococcus neoformans* invasion into human brain microvascular endothelial cells. **J Biomed Sci**, v. 19, p. 19, 2012.
- MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv Appl Microbiol**, v. 67, p. 131-90, 2009.
- MADIGAN, M.T.; et al. Microbiologia de Brock. Tradução: Alice Freitas Versiani et al. 14. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2016.
- MARCHAL, C., DUPRE, S. & URBAN-GRIMAL, D. Caseína quinase I controla uma etapa tardia no tráfego endocítico de permease de uracila de levedura. *J. Cell Sci.* 115, 217-226 (2002).
- MARTINEZ, L.R., and CASADEVALL, A. (2006b). Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 50(3), 1021-1033. doi: 10.1128/AAC.50.3.1021-1033.2006.
- MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 2, p. 106-17, 02 2016.
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 179-206, Mar 2016.
- MCDERMOTT, W. Microbial persistence. Yale, **J Biol. Med.** 30:257–291, 1958.
- MEDNICK, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, 2005.
- MEIRELES, M. A. O. M. Uso de Antimicrobianos e Resistência Bacteriana: Aspectos Socioeconômicos e Comportamentais e seu Impacto Clínico e Ecológico. Monografia de Especialização em Microbiologia - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

MELETIADIS, J. *et al.* Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol. 39, No. 2 p. 478– 484. 2001.

MESA-ARANGO, A. C. *et al.* The Production of Reactive Oxygen Species Is a Universal Action Mechanism of Amphotericin B against Pathogenic Yeasts and Contributes to the Fungicidal Effect of This Drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** p. 58, (11). 6627–6638, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Criptococose: causas, sintomas, tratamento e prevenção. Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/criptococose>> Acesso em:15/06/2020

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Flucitosina para o tratamento de pacientes com meningite criptocócica e demais formas de neurocriptococose. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2021/Sociedade/ReSoc249_flucitosina_meningite.pdf> Acesso em:14/03/2022

MORALES-LÓPEZ, S, E.; GARCIA-EFFRON, G. Infections due to Rare *Cryptococcus* Species. A Literature Review. *J Fungi (Basel)*, 2021.

MOREIRA, L. S.; DORIA, A. C. O. C.; SANTOS, T. B.; FIGUEIRA, F. R.; SORGE, C. D. C.; SILVA, A. M.; KHOURI, S. Estudo da resistência aos antifúngicos de leveduras isoladas de candidúrias de um hospital de médio porte. **Revista Univap**. São José dos Campos, SP - Brasil, v. 23, n. 43, dez. 2017.

NA POMBEJRA, S. *et al.* The metalloprotease, Mpr1, engages AnnexinA2 to promote the transcytosis of fungal cells across the blood-brain barrier. **Front Cell Infect Microbiol**. 2017.

NAICKER, S.D. *et al.* Decreasing fluconazole susceptibility of clinical South African *Cryptococcus neoformans* isolates over a decade. *PLoS Negl Trop Dis*, 2020

NIMRICHTER, L. *et al.* Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. *Eukaryotic Cell*, v. 6(8), p. 1400–1410, 2007.

ODOM, A. *et al.* Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J*, v. 16, n. 10, p. 2576-89, 1997.

OLIVEIRA, L.V.N. *et al.* Influenza A Virus as a Predisposing Factor for Cryptococcosis. **Front Cell Infect Microbiol** 7, 419, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Rapid advice: diagnosis, prevention a management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children Geneva: WHO, Dec 2011. <http://www.who.int/hiv/pub/cryptococcal_disease2011/en/index.html> Acesso em:15/07/2020.

PERFECT, J.R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. *Infection Diseases of Clinics of North America*, v.16, p.837-874, 2002.

PERFECT, J. R. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 50:291–322, 2010.

- PFALLER, M. A. et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J Clin Microbiol*, v. 26, n. 8, p. 1437-41, Aug 1988.
- PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: 5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to FLUe e VORe determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J. Clin. Microbiol.*, v. 47, n.1, p. 117-123, 2009.
- PRATES, R. A. et al. Effect of virulence factors on the photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, v. 8, n. 1, p. e54387, 2013.
- QUEIROZ, J. P. A. et al. Criptococose: Uma revisão bibliográfica. v. 2, n.2, p. 32-38, 2008.
- RODRIGUES, M. L.; et al. Fungal polysaccharides: biological activity beyond the usual structural properties. *Frontiers in Microbiology*, v. 2, p. 1-4, 2011.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global Burden of Disease of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: An Updated Analysis. *Lancet Infect. Dis*, v. 3099, p. 1-9, 2017
- ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular evolution of antifungal drug resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**, 753-775, 2017
- ROSSI, S. A.; ZARAGOZA, O. Infections by *Cryptococcus* species. In: **Reference Module in Life Sciences**, 2017.
- SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiology*, v. 7, n. 11, p. 1297-313, 2012.
- SANGLARD, D. *et al.* Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. **Molecular Microbiology**, 48: 959-976, 2003.
- SLOAN, D. J.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: Epidemiology and therapeutic options. *Clin. Epidemiol.*, v. 6, p. 169-82, 2014.
- SEPKOWITZ, K. A. Opportunistic infections in patients with and patients without acquired immunodeficiency syndrome. **Clin Infect Dis**, 2002.
- SERAFIM, V. J.; RUIZ, L. G. P. Genes Bacterianos de Resistência no Meio Ambiente. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2018.
- STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN H. A.; CASADEVALL, A. Proceedings of the National Academy of Sciences, Dec 2001.
- STONE, N. R. H. et al. Dynamic ploidy changes drive fluconazole resistance in human cryptococcal meningitis. *J Clin Invest*, 2019.
- SWANSON, M.S.; HAMMER, B.K. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol.* 2000.
- VALE-SILVA, L.A. et al. Azole resistance by loss of function of the sterol $\Delta^{5,6}$ -desaturase gene (ERG3) in *Candida albicans* does not necessarily decrease virulence. **Antimicrob Agents Chemother.** 56(4):1960-1968, 2012.
- VELAGAPUDI, R. et al. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, v.77, n.10, p.4345-55, Jul. 2009.

VENTURA, A.P. et al. Cryptococcal infection in non-HIV immunosuppressed patients - Three case reports in a nephrology setting. *Medical Mycology Case Reports*, v. 4, p. 14-16, 2013.

VU, K. et al. Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. *MBio*, v. 5, n. 3, Jun 2014.

WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front Biosci*, v. 2, p. e99-107, 1997.

YANG, F. et al. Tolerance to caspofungin in *Candida albicans* is associated with at least three distinctive mechanisms that govern expression of FKS genes and cell wall remodeling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology*, v. 68, p. 133-216, 2009.

ZHANG, J. et al. Evolution of cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus* through selection pressure of environmental fungicides. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 284, n. 1863, p. 20170635, 2017.