

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Curso de Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada**

Bruna Carolina Teixeira Almeida

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS E EXPRESSÃO DE  
GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA EM *CRYPTOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE  
PACIENTES ADMITIDOS NO HOSPITAL EDUARDO DE MENEZES, BELO  
HORIZONTE, BRASIL**

Belo Horizonte

2025

Bruna Carolina Teixeira Almeida

**PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS CLÍNICOS E EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA EM *CRYPTOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE PACIENTES ADMITIDOS NO HOSPITAL EDUARDO DE MENEZES, BELO HORIZONTE, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Profa. Nalu Teixeira de Aguiar Peres.

Coorientadora: Dra. Ludmila Gouveia Eufrásio.

Belo Horizonte

2025

043

Almeida, Bruna Carolina Teixeira.

Perfil de suscetibilidade a antifúngicos clínicos e expressão de genes associados à resistência em *Cryptococcus* spp. isolados de pacientes admitidos no Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, Brasil [manuscrito] / Bruna Carolina Teixeira Almeida. – 2025.

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

Orientadora: Profa. Nalu Teixeira de Aguiar Peres. Coorientadora: Dra. Ludmila Gouveia Eufrásio.

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

1. Microbiologia. 2. Criptococose. 3. *Cryptococcus gattii*. 4. Fluconazol. 5. Flucitosina. I. Peres, Nalu Teixeira de Aguiar. II. Eufrásio, Ludmila Gouveia. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ICB - CURSO MESTRADO PROFISSIONAL EM MICROBIOLOGIA APLICADA - SECRETARIA

### **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO/TESE**

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE BRUNA CAROLINA TEIXEIRA ALMEIDA,

matrícula 2024675950

Às 14:30 horas do dia 26 de novembro de 2025, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia da UFMG, de forma online na plataforma Teams, a Comissão Examinadora aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “**Perfil de suscetibilidade a antifúngicos clínicos e expressão de genes associados à resistência em *Cryptococcus* spp. isolados de pacientes admitidos no Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, Brasil**”, como requisito final para obtenção do GRAU MESTRE em MICROBIOLOGIA, área de concentração Microbiologia Aplicada. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Erna Geessien Kroon, coordenadora do Curso, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Nalu Teixeira de Aguiar Peres. ICB -UFMG – orientadora APROVADA

Dra. Luana Rossato, UFGD APROVADA

Prof. Daniel de Assis Santos, ICB-UFMG APROVADA

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão, da qual foi lavrada a presente ATA que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Profa. Nalu Teixeira de Aguiar Peres. ICB –UFMG

Dra. Luana Rossato, UFGD

Prof. Daniel de Assis Santos, ICB-UFMG

Profa. Erna Geessien Kroon  
Coordenadora

Belo Horizonte, 27 de novembro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 27/11/2025, às 17:01, 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 **Luana Rossato, Usuário Externo**, em 27/11/2025, às 17:48, 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 **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós- graduação**, em 27/11/2025, às 17:49, 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 **Daniel de Assis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 28/11/2025, às 11:43, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4776002** e o código CRC **7E726C00**.

## RESUMO

A criptococose é uma infecção causada por fungos do gênero *Cryptococcus*, capaz de provocar meningoencefalite, especialmente em pacientes imunocomprometidos, apresentando alta mortalidade. Apesar de sua relevância clínica, o tratamento ainda enfrenta desafios, como a oferta limitada de antifúngicos e o aumento da resistência à medicação. Assim, este estudo avaliou o perfil epidemiológico e de resistência de 154 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. de pacientes com neurocriptococose, identificando três isolados de *C. gattii* (MG-PC4, MG-5C27 e MG-5C28) resistentes ao fluconazol (FCZ) e à flucitosina (5-FC). Na análise do efeito combinado entre esses antifúngicos, foi observado sinergismo leve a moderado em concentrações mais baixas, enquanto doses mais elevadas indicaram possível antagonismo, dados relevantes diante da escassez de informações sobre a ação combinada e os mecanismos de resistência à 5-FC. Em termos de expressão gênica, MG-PC4 apresentou baixa expressão de *FCY2* na presença de 5-FC, indicando internalização da droga, junto da redução acentuada de *FUR1* e *FCY1*, comprometendo a ativação intracelular de 5-FC e contribuindo para o perfil de resistência, comportamento semelhante ao observado em MG-5C27 e MG-5C28. Em relação ao FCZ, MG-PC4 apresentou aumento na expressão de *AFRI* e *MDRI*, sugerindo ativação de bombas capazes de remover os antifúngicos do interior celular, enquanto MG-5C27 e MG-5C28 mantiveram níveis mais estáveis desses genes. Todos os isolados exibiram expressão elevada de *ERG11*, possivelmente como mecanismo compensatório para a manutenção da síntese de ergosterol e da integridade da membrana. Embora *AFRI* e *MDRI* tenham sido reduzidos pela flucitosina, MG-5C27 e MG-5C28 apresentaram expressão basal superior à cepa de referência ATCC, indicando que essas bombas podem contribuir para a resistência mesmo sem estímulo direto. O surgimento do perfil dessa resistência pode ter sido favorecido pelas condições clínicas dos pacientes, incluindo coinfeções e uso prolongado de múltiplos medicamentos. Esses achados sugerem um perfil de resistência multigênica, possivelmente associado a alterações cromossômicas, mecanismos adaptativos ao estresse antifúngico e fatores clínicos, reforçando a importância do monitoramento terapêutico e de novos estudos sobre a resistência em *C. gattii* e à flucitosina, ainda pouco documentada.

Palavras-chave: *Cryptococcus gattii*; fluconazol; flucitosina; expressão gênica; ergosterol; bombas de efluxo.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is an infection caused by fungi of the *Cryptococcus* genus, capable of causing meningoencephalitis, particularly in immunocompromised patients, and is associated with a high mortality rate. Despite its clinical relevance, treatment still faces challenges, such as limited availability of antifungals and increasing drug resistance. This study evaluated the epidemiological profile and antifungal susceptibility of 154 clinical isolates of *Cryptococcus* spp. from patients with neurocryptococcosis, identifying three *C. gattii* isolates (MG-PC4, MG-5C27, and MG-5C28) resistant to fluconazole (FCZ) and flucytosine (5-FC). In the analysis of combined antifungal effects, mild to moderate synergism was observed at lower concentrations, while higher doses suggested possible antagonism, which is relevant given the limited available data in the literature on combination effects and resistance to 5-FC. In terms of gene expression, MG-PC4 showed low expression of *FCY2* when exposed to 5-FC, indicating that the drug was internalized, but also exhibited a marked reduction in *FURI* and *FCY1*, compromising intracellular activation of 5-FC and contributing to the resistance profile, a pattern also observed in MG-5C27 and MG-5C28. Regarding FCZ, MG-PC4 exhibited increased expression of *AFRI* and *MDRI*, suggesting activation of efflux pumps capable of removing the antifungal agent from inside the cell, while MG-5C27 and MG-5C28 maintained more stable expression levels of these genes. All isolates showed elevated expression of *ERG11*, possibly as a compensatory mechanism to maintain ergosterol synthesis and membrane integrity. Although *AFRI* and *MDRI* were reduced by 5-FC, MG-5C27 and MG-5C28 displayed higher basal levels than the ATCC reference strain, suggesting that these pumps may contribute to resistance even without direct stimulation. The emergence of this resistance profile may have been favored by the clinical conditions of the patients, including coinfections and prolonged use of multiple medications. These findings suggest a multigenic resistance profile, possibly associated with chromosomal alterations, adaptive responses to antifungal stress, and clinical factors, highlighting the importance of therapeutic monitoring and further studies on resistance in *C. gattii* and to 5-FC, which remain poorly documented.

Keywords: *Cryptococcus gattii*; fluconazole; flucytosine; gene expression; ergosterol; efflux pumps.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Lista de patógenos fúngicos prioritários segundo a OMS. ....   | 14 |
| Figura 2: Esquema representando a infecção e a disseminação de <i>Cryptococcus</i> spp. e o estabelecimento da infecção pulmonar e neurológica. ....   | 15 |
| Figura 3: Resumo de mecanismos de ação de flucitosina, anfotericina B e fluconazol. ....   | 20 |
| Figura 4: Esquema de montagem das placas do teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima dos antifúngicos clínicos para os diferentes isolados clínicos de <i>Cryptococcus</i> spp.. .... | 25 |
| Figura 5: Esquema de montagem de placa de combinação de antifúngicos. ....   | 27 |
| Figura 6: Frequência de cada espécie de <i>Cryptococcus</i> spp. isolados de pacientes admitidos no HEM. ....  | 30 |
| Figura 7: Análise de comportamento global dos isolados clínicos com base nos valores de CIM. ....  | 38 |
| Figura 8: Perfil de expressão dos genes envolvidos na resistência ao FCZ e 5-FC, no isolado MG-PC4. ....   | 38 |
| Figura 9: Perfil de expressão dos genes envolvidos na resistência ao FCZ e 5-FC, nos isolados MG-5C27 e MG-5C28. ....  | 40 |
| Figura 10: Representação geral esquemática proposta das respostas gênicas observadas frente à 5-flucitosina e ao fluconazol em isolados resistentes de <i>Cryptococcus gattii</i> . ....   | 42 |
| Figura 11: Resumo da evolução clínica do paciente 1, com ênfase nos diagnósticos e tratamentos realizados. ....  | 44 |
| Figura 12: Resumo da evolução clínica do paciente 17, com ênfase nos diagnósticos e tratamentos realizados. ....   | 45 |
| Figura 13: Sinergismo da combinação de fluconazol com 5-flucitosina. ....  | 46 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Recomendação e esquema de tratamento antifúngico da criptococose.....                               | 18 |
| Tabela 2: Primers utilizados para a reação qPCR.....  | 29 |
| Tabela 3: Identificação dos isolados por espécie, número do paciente e CIM dos antifúngicos clínicos.....     | 31 |
| Tabela 4: Isolados clínicos de <i>C. gattii</i> selecionados de acordo com o perfil de susceptibilidade. .... | 36 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|           |  |
|-----------|--|
| OMS       | Organização Mundial da Saúde                                     |
| SNC       | Sistema Nervoso Central  |
| PLHIV     | Pessoas Vivendo com HIV  |
| BHE       | Barreira Hematoencefálica  |
| ASD       | <i>Ágar Sabouraud Dextrose</i>                                   |
| BHI       | <i>Brain Heart Infusion</i>                                      |
| SUS       | Sistema Único de Saúde   |
| AMB       | Anfotericina B   |
| FCZ       | Fluconazol   |
| 5-FC      | 5-Flucitosina  |
| ECV       | <i>Epidemiological Cutoff Calues</i>                             |
| CLSI      | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>               |
| CIM       | Concentração Inibitória Mínima                                   |
| UFMG      | Universidade Federal de Minas Gerais                             |
| FHEMIG    | Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais                    |
| MALDI-TOF | <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of-Fligh</i> |
| UFRN      | Universidade Federal do Rio Grande do Norte                      |
| MOPS      | 3-[N-morfolino] propano-ácido sulfônico                          |
| PCA       | Análise de Componentes Principais                                |
| WSS       | <i>Within-Cluster Sum of Squares</i>                             |
| TARV      | Terapia Antirretroviral  |
| LEMP      | Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva                        |
| µg/mL     | Micrograma por mililitro   |
| µl        | Microlitro   |
| PBS       | Tampão fosfato-salino  |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 13 |
| 1.1 Criptococose e <i>Cryptococcus</i> spp.....                                 | 13 |
| 1.2 Epidemiologia da criptococose.....  | 13 |
| 1.3 Patogênese da criptococose .....  | 15 |
| 1.4 Diagnóstico da criptococose.....  | 16 |
| 1.5 Tratamento da criptococose e problemática da resistência antifúngica .....  | 17 |
| 1.5.1 Suscetibilidade e resistência antifúngica em <i>Cryptococcus</i> spp..... | 19 |
| 1.5.1.1 Anfotericina B .....  | 19 |
| 1.5.1.2 Fluconazol.....   | 20 |
| 1.5.1.3 5-Flucitosina .....   | 21 |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....   | 22 |
| <b>3. OBJETIVO</b> .....  | 23 |
| <b>4. METODOLOGIA</b> .....   | 23 |
| 4.1 População de estudo e origem dos isolados clínicos.....                     | 23 |
| 4.2 Identificação dos isolados .....  | 24 |
| 4.3 Determinação da susceptibilidade .....                                      | 24 |
| 4.3.1 Análise de componentes principais .....                                   | 26 |
| 4.3.2 Investigação do sinergismo da combinação fluconazol e 5-flucitosina.....  | 26 |
| 4.4 Investigação de fatores associados à resistência .....                      | 27 |
| 4.4.1 Expressão de genes de interesse .....                                     | 28 |
| 4.4.1.1 Exposição aos antifúngicos.....   | 28 |
| 4.4.1.2 Extração de RNA .....   | 28 |
| 4.4.1.3 Quantificação de expressão de genes de interesse.....                   | 29 |
| 4.5 Investigação da progressão clínica e desfecho da doença.....                | 29 |
| 4.6 Análise estatística.....  | 30 |

|   |    |
|---|----|
| <b>5. RESULTADOS</b> .....  | 30 |
| 5.1 Identificação dos isolados clínicos.....                          | 30 |
| 5.2 Perfil de sensibilidade a antifúngicos clínicos .....             | 30 |
| 5.2.1 Comportamento dos isolados de acordo com os valores de CIM..... | 37 |
| 5.3 Expressão dos genes de interesse .....                            | 38 |
| 5.4 Evolução clínica dos pacientes.....                               | 43 |
| 5.5 Sinergismo da combinação fluconazol e 5-flucitosina.....          | 45 |
| <b>6. DISCUSSÃO</b> .....   | 47 |
| <b>7. CONCLUSÃO</b> .....   | 51 |
| <b>8. PERSPECTIVAS</b> .....  | 51 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Criptococose e *Cryptococcus* spp.

A criptococose é uma micose oportunista de distribuição cosmopolita, causada por fungos basidiomicetos do gênero *Cryptococcus* (Severo et al., 2009a). Esses patógenos, amplamente distribuídos no ambiente, são saprofíticos e mesófilos, não dependendo do hospedeiro humano para sobrevivência. Podem ser encontrados tanto no meio ambiente quanto em seres humanos e animais, onde podem causar quadros de micoses sistêmicas e oportunistas (Bahn et al., 2020; Casadevall et al., 2003). A ubiquidade desse gênero é evidenciada por relatos de sua presença em troncos de árvores e madeira em decomposição, em solos contaminados por excretas de aves, especialmente pombos, além de solas de sapatos, veículos, água e ar (Kidd et al., 2007).

Dentro desse contexto, destaca-se a classificação taxonômica do complexo *Cryptococcus*, ainda considerada polêmica. Tradicionalmente, o gênero é dividido em duas espécies de maior relevância clínica, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, diferenciadas por características fenotípicas e genotípicas (K. Kwon-Chung et al., 2002; K. J. Kwon-Chung et al., 2017). Embora a maioria das espécies não sobreviva em tecidos de animais endotérmicos, essas duas espécies são capazes de resistir tanto à temperatura quanto ao sistema imune do hospedeiro, caracterizando sua patogenicidade (Ramos, 2015).

### 1.2 Epidemiologia da criptococose

Desde 2022, esse fungo consta na lista de patógenos fúngicos prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo *C. neoformans* classificado no grupo “prioridade crítica” devido sua elevada ocorrência em indivíduos imunocomprometidos e seu tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), resultando na neurocriptococose, e *C. gattii* no grupo de “médio” risco (WHO, 2022) (Figura 1). Essa inclusão na lista é consequência de fatores como a resistência aos antifúngicos disponíveis, as elevadas taxas de mortalidade (41–61%), bem como das dificuldades diagnósticas e terapêuticas, incidência anual significativa e complicações associadas à infecção (WHO, 2022; Zhao et al., 2023).

*Cryptococcus neoformans* possui distribuição global e é responsável por aproximadamente 95% dos casos de neurocriptococose, enquanto *C. gattii* predomina em regiões tropicais e subtropicais, afetando mais frequentemente pacientes imunocompetentes

(Dao et al., 2024; Guia de Vigilância em Saúde, 2024; Kidd et al., 2020; Liu et al., 2024; Murray et al., 2020). Entretanto, esses dados podem ser subestimados devido à falta de identificação das espécies nos casos de criptococose em humanos (Almeida, em preparação).

Figura 1: Lista de patógenos fúngicos prioritários segundo a OMS.



















| Prioridade crítica   | Prioridade alta  | Prioridade média   |
|--|--|--|
|  <i>Cryptococcus neoformans</i> |  <i>Nakaseomyces glabrata</i> ( <i>Candida glabrata</i> ) |  <i>Scedosporium</i> spp.                             |
|  <i>Candida auris</i>           |  <i>Histoplasma</i> spp.                                  |  <i>Lomentospora prolificans</i>                      |
|  <i>Aspergillus fumigatus</i>   |  Eumycetoma causative agents                              |  <i>Coccidioides</i> spp.                             |
|  <i>Candida albicans</i>        |  Mucorales  |  <i>Pichia kudriavzevii</i> ( <i>Candida krusei</i> ) |
|  |  <i>Fusarium</i> spp.                                    |  <i>Cryptococcus gattii</i>                          |
|  |  <i>Candida tropicalis</i>                              |  <i>Talaromyces marneffeii</i>                      |
|  |  <i>Candida parapsilosis</i>                            |  <i>Pneumocystis jirovecii</i>                      |

Figura adaptada da tabela publicada em outubro de 2022 representando os agentes fúngicos prioritários para pesquisa e desenvolvimento devido a ameaça à saúde pública.

A neurocriptococose representa um grave problema de saúde pública, com incidência anual estimada em aproximadamente 194 mil casos e responsável por cerca de 147 mil óbitos. Sua letalidade é extremamente elevada, alcançando aproximadamente 60% mesmo quando tratada, chegando a 100% na ausência de tratamento (Denning, 2024). Nos últimos anos, a prevalência das infecções fúngicas tem aumentado globalmente, representando um risco crescente à saúde pública, sobretudo devido ao surgimento de linhagens resistentes aos antifúngicos (Melhem, Leite Júnior, et al., 2024).

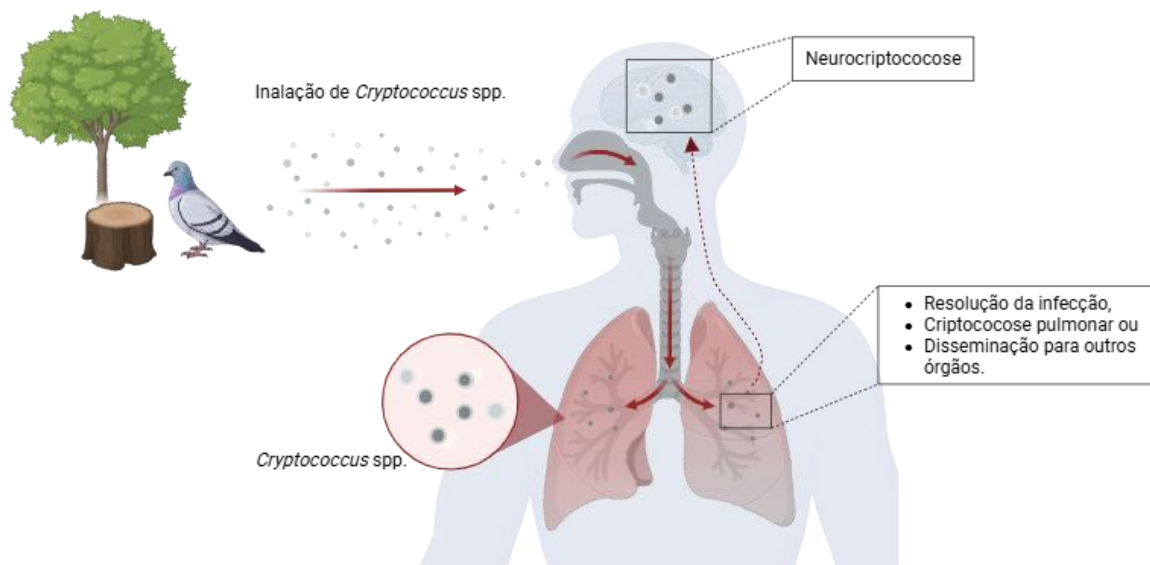
Entre os indivíduos mais vulneráveis a essa infecção estão aqueles com o sistema imunológico comprometido, seja por doenças imunológicas, câncer, transplantes de órgãos ou tratamentos quimioterápicos ou imunossupressores (Setianingrum et al., 2019). Nesses pacientes, a doença pode ser fatal, principalmente quando evolui para neurocriptococose,

caracterizada pela invasão do SNC pelo fungo. Estima-se que a neurocriptococose seja responsável por aproximadamente 112 mil mortes anuais em pessoas vivendo com HIV (PLHIV) (Liu et al., 2024; Rajasingham et al., 2022). A afinidade do fungo pelo SNC está provavelmente relacionada à alta disponibilidade de nutrientes e à menor ou ausente resposta inflamatória no tecido cerebral (Antônio Esmerino, 2016).

### 1.3 Patogênese da criptococose

A infecção por *Cryptococcus* spp. geralmente ocorre pela inalação do fungo na forma de leveduras dessecadas ou de basidiósporos infectantes, que estão presentes em ambientes contaminados (Figura 2) (Maziarz & Perfect, 2016). Uma vez inalado, ele alcança as vias aéreas superiores e entra em contato com os macrófagos alveolares, que liberam citocinas e recrutam células do sistema imune (K. J. Kwon-Chung et al., 2014; Severo et al., 2009). Durante essa resposta inicial, *Cryptococcus* spp. podem manipular os macrófagos para evadir a defesa do hospedeiro, os utilizando como abrigo e meio de transporte, multiplicando-se em seu interior ou permanecendo dormente, o que favorece tanto a persistência quanto a disseminação da infecção (Ristowi & Davisi, 2021; Subramani et al., 2020; C. Yang et al., 2022).

Figura 2: Esquema representando a infecção e a disseminação de *Cryptococcus* spp. e o estabelecimento da infecção pulmonar e neurológica.



Esses mecanismos estão relacionados a um conjunto de fatores de virulência que conferem ao fungo plasticidade morfológica e adaptativa. A cápsula polissacarídica dificulta a fagocitose, enquanto a variação no tamanho celular favorece a disseminação entre os diferentes sítios de infecção, como a transição da forma pulmonar para a neurológica (Freitas, 2022; Freitas et al., 2022). A melanina presente na parede celular é outro fator relevante, funcionando como um pigmento insolúvel que confere resistência a agentes oxidantes inibindo a fagocitose, e que consegue se adsorver a peptídeos com ação microbicida, aumentando a tolerância a terapias antifúngicas (Casadevall et al., 2000.; Jacobson & Tinnell, 1993; Nosanchuk & Casadevall, 2003; Rosas et al., 2002; Van Duin et al., 2002). De modo semelhante, a formação de biofilme também contribui para a resistência de *Cryptococcus* spp., criando uma matriz extracelular que atua como barreira física tanto no hospedeiro quanto em diferentes ambientes, protegendo o fungo de variações de pH, estresse osmótico e exposição a antifúngicos, como também favorece sua persistência em superfícies, inclusive equipamentos hospitalares (Benaducci et al., 2016; Mendes Giannini et al., 2025).

Tanto *C. neoformans* quanto *C. gattii* compartilham essa capacidade de adaptação, o que os permitem sobreviver e se manter no microambiente hostil do hospedeiro (Figura 2) e disseminar além do trato respiratório e SNC, atingindo outros órgãos e piorando o prognóstico (Bibiano Vasconcelos et al., 2023). As consequências dessa interação dependem diretamente do estado imunológico do hospedeiro. Em indivíduos imunocompetentes, o fungo tende a ser eliminado ainda nos estágios iniciais da infecção, enquanto em pacientes imunocomprometidos, pode persistir nos pulmões ou disseminar via hematogênica e linfática (Lima et al., 2023). No caso da neurocriptococose, o fungo atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) por diferentes mecanismos, como a endocitose pelas células endoteliais, a passagem entre junções intercelulares após danos na barreira ou o transporte associado a fagócitos, chamado mecanismo célula-associada ou “cavalo de Troia” (Pizani, 2015; Vu et al., 2014; Zaragoza, 2019).

Essas diferenças no curso da infecção explicam a variabilidade de manifestações clínicas (Lima et al., 2023.). Nas formas pulmonares, são comuns sintomas gripais como tosse e febre, que podem evoluir para pneumonia. Já na neurocriptococose, a cefaleia é o sintoma mais recorrente, geralmente acompanhada de náusea, vômitos, rigidez de nuca, alterações da consciência, memória, linguagem e cognição, além de paralisia facial, mudanças de personalidade e, em alguns casos, demência (Silveira et al., 2018).

#### 1.4 Diagnóstico da criptococose

A morfologia de *Cryptococcus* spp. é amplamente utilizada no diagnóstico clínico da criptococose devido às suas características únicas. O diagnóstico pode ser realizado a partir de diferentes tipos de amostras biológicas, como líquido cerebroorraquidiano (LCR), que é o mais utilizado, sangue, escarro ou fragmentos de biópsia do tecido infectado. Entre as metodologias disponíveis, a mais utilizada é a detecção de antígeno, geralmente associada à cultura e seguida da análise microscópica. Para o isolamento, utilizam-se meios de cultura como *Ágar Sabouraud Dextrose* (ASD) e *Brain Heart Infusion* (BHI), enquanto na microscopia as leveduras são observadas em colocação negativa com nanquim, sendo a presença da levedura encapsulada o traço morfológico mais evidente para diagnóstico presuntivo (Almeida et al., Artigo submetido; Canavari et al., 2023; Levino et al., 2024; Maziarz & Perfect, 2016b; Veronesi & Focaccia, 2015).

Entretanto, variações de temperatura, disponibilidade de nutrientes e fase do ciclo biológico podem levar esse gênero a se apresentar também nas formas de hifas e pseudohifas (Freitas, 2022; Ramos, 2015). Na prática, é comum que mais de uma amostra e múltiplas abordagens diagnósticas sejam empregadas de maneira complementar para garantir maior precisão, sendo o isolamento fúngico essencial para monitoramento da evolução clínica do paciente durante e após o tratamento (Almeida et al., Artigo submetido).

Além da complexidade morfológica, pacientes podem apresentar coinfeções com outros microrganismos, o que pode dificultar a investigação clínica, já que a identificação de um patógeno pode interromper a busca por outros, contribuindo para um prognóstico desfavorável (Nunes et al., 2016). A coinfeção mais descrita na literatura é entre *Cryptococcus* e HIV, responsável por 19% das mortes (Denning, 2024). Outras coinfeções relatadas incluem *Cryptococcus* spp. com *Mycobacterium tuberculosis* e *Histoplasma capsulatum*, devido às características oportunistas compartilhadas e sintomas semelhantes, como também mais recentemente, com SARS-CoV-2 (Regalla et al., 2022; Silva et al., 2025; Suresh et al., 2021). Essas coinfeções complicam as intervenções terapêuticas e evolução clínica do paciente, resultando frequentemente em internações mais longas, maior ônus econômico, aumento da morbidade e piores desfechos clínicos (Almeida et al., Artigo submetido).

### 1.5 Tratamento da criptococose e problemática da resistência antifúngica

Os antifúngicos recomendados pela OMS para o tratamento da criptococose incluem a anfotericina B (AMB), pertencente à classe dos polienos, disponível nas formulações lipossomal, complexo lipídico e desoxicolato. Também são utilizados o fluconazol (FCZ),

pertencente à classe dos azóis, e a flucitosina (5-FC), da classe das pirimidinas (Criptococose - Ministério Da Saúde; E. A. M. de Oliveira, 2022). A 5-FC apresenta disponibilidade limitada e histórico de indisponibilidade no Brasil, tendo sido reintroduzida apenas em 2021 após período prolongado fora do mercado em razão da descontinuidade de sua produção (Ministério da Saúde, 2021). Apesar da literatura ser restrita, o elevado custo do fármaco é considerado um dos principais fatores que motivaram sua interrupção e globalmente a droga permanece inacessível em diversos países (Kneale et al., 2016). Dessa forma, a escolha do regime terapêutico depende da disponibilidade desses medicamentos e das manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes, sendo todos disponibilizados gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Criptococose - Ministério Da Saúde; WHO, 2018; Ministério da Saúde, 2025).

Considerando essas recomendações, o tratamento da criptococose é estruturado em três fases, sendo a combinação de AMB e FCZ a terapia mais utilizada e indicada pela OMS. Na fase de indução, o objetivo é reduzir de forma rápida e significativa a carga fúngica, preparando o paciente para as etapas seguintes. Em seguida, a fase de consolidação tem como objetivo negativar a presença fúngica e normalizar os parâmetros clínicos e laboratoriais. Por fim, a fase de manutenção garante o monitoramento e continuidade do tratamento em monoterapia, prevenindo o surgimento de recidivas (Tabela 1) (Ministério da Saúde, 2024).

Tabela 1: Recomendação e esquema de tratamento antifúngico da criptococose.

| Estado imunológico | Indução   | Consolidação   | Manutenção                               |
|--------------------|---|--|--|
| Imunocompetente    | <b>Preferencial:</b> AMB lipossomal ou complexo lipídico + 5-FC<br><b>Alternativa:</b> AMB desoxicolato + 5-FC ou FCZ             | <b>Preferencial:</b> FCZ<br><b>Alternativa:</b> AMB desoxicolato | <b>Preferencial (se necessário):</b> FCZ |
| Imunocomprometido  | <b>Preferencial:</b> AMB lipossomal ou complexo lipídico+5-FC<br><b>Alternativa:</b> 5-FC + FCZ ou AMB desoxicolato + 5-FC ou FCZ | <b>Preferencial:</b> FCZ   | FCZ                                      |

Adaptado de (Ministério da Saúde, 2024; E. A. M. de Oliveira, 2022). AMB: anfotericina B; FCZ: fluconazol; 5-FC: 5-flucitosina.

### 1.5.1 Susceptibilidade e resistência antifúngica em *Cryptococcus* spp.

Apesar da disponibilidade de diferentes antifúngicos, a emergência de resistência aos medicamentos permanece como um dos principais desafios clínicos. Em *Cryptococcus* spp., essa resistência envolve múltiplos fatores interrelacionados, entre eles a plasticidade genética e a capacidade de adaptação fisiológica dessa levedura (Iyer et al., 2021). A virulência intrínseca da levedura também contribui para esse processo, pois permite que ela tolere diferentes tipos de estresse, tanto ambientais quanto aqueles impostos pelo hospedeiro e pelos antifúngicos. Essa virulência envolve, por exemplo, a modulação de estruturas como a cápsula, a parede celular e a melanina, que atuam como barreiras físicas e químicas protetoras (Casadevall, 2025; Melhem, Leite, et al., 2024; Perfect & Cox, 1999). Além dessas estruturas, o fungo ativa respostas celulares adaptativas, como o controle do estresse oxidativo e a expressão de genes compensatórios quando em frente aos medicamentos, favorecendo sua sobrevivência durante o tratamento e resultando em infecções mais persistentes (Boyce, 2023; Stone et al., 2019; Winski et al., 2022).

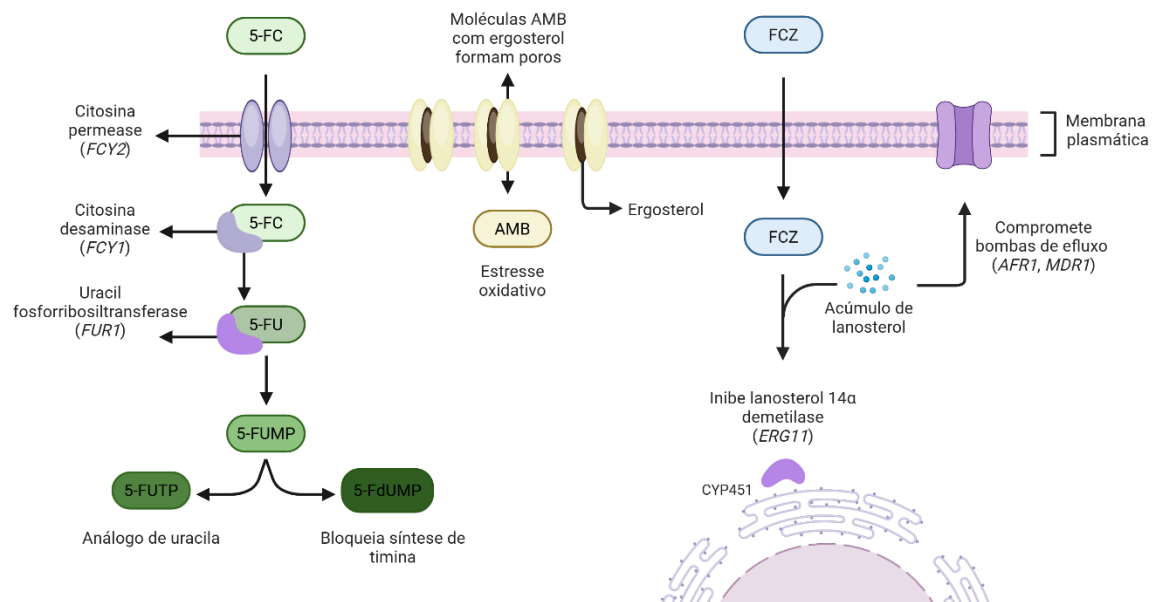
Nesse contexto, a resistência observada em *Cryptococcus* spp. pode ser investigada por meio de testes *in vitro* que avaliam a susceptibilidade do fungo a diferentes concentrações de antifúngicos. Para padronizar esses ensaios, utilizam-se os valores de corte epidemiológico (*Epidemiological Cutoff Values*, ECV), definidos por comitês internacionais como o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (Melhem, Leite, et al., 2024). Esses comitês estabelecem critérios para os testes de susceptibilidade e determinam os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), permitindo classificar as linhagens quanto à resistência aos fármacos avaliados (CLSI, 2017; EUCAST, 2024).

#### 1.5.1.1 Anfotericina B

A AMB é um antifúngico pertencente à classe dos polienos, cuja ação pode ser fungicida ou fungistática dependendo da dosagem aplicada (Cavassin et al., 2021). Ensaios realizados com *Cryptococcus* spp. mostram que as concentrações investigadas variam de 0.03 a 16 µg/mL, sendo consideradas possivelmente resistentes as linhagens que ultrapassam o valor de ECV de 0.5 µg/mL. A ação da AMB (Figura 3) está relacionada à sua ligação com o ergosterol presente na membrana celular fúngica, o que compromete sua integridade e leva à morte celular. Esse

processo ocorre devido do caráter anfipático da molécula, cuja região hidrofóbica se associa ao ergosterol, enquanto a porção hidrofílica forma poros que permitem o extravasamento de água, íons e outras moléculas, resultando em estresse oxidativo e lise celular (Abuhammour & Habte-Gabr, 2001; Gabrielska et al., 2006; Lee et al., 2023; Saritha et al., 2025). Por ser administrada por via endovenosa, a AMB exige monitoramento clínico cuidadoso devido à sua toxicidade renal, que pode evoluir para quadros graves, como lesão renal aguda (Falci & Pasqualotto, 2015). Casos de resistência são pouco comuns, mas quando ocorrem, geralmente estão associados à redução ou alteração do ergosterol na membrana plasmática, comprometendo a interação do fármaco com seu alvo e diminuindo sua eficácia antifúngica (Freitas, 2022).

Figura 3: Resumo de mecanismos de ação de flucitosina, anfotericina B e fluconazol.



Abreviações: Flucitosina (5-FC); Anfotericina B (AMB); Fluconazol (FCZ); 5-fluorouracil (5-FU); 5-fluorouridina (5-FUMP); 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (5-FdUMP); 5-fluorouridina-5'-trifosfato (5-FUTP).

### 1.5.1.2 Fluconazol

O FCZ é um antifúngico da classe dos triazóis, aprovado para uso clínico desde 1990, com efeito predominantemente fungistático. Em estudos realizados com *Cryptococcus* spp., as concentrações testadas variam de 0.125 a 64 µg/mL, sendo consideradas possivelmente resistentes as linhagens com crescimento inibido em 50% comparado ao controle, ultrapassando os valores de referência do ECV, estabelecidos em 8 µg/mL para *C. neoformans* e 16 µg/mL para *C. gattii* (CLSI, 2017). O principal mecanismo de ação do FCZ (Figura 3) envolve a inibição da biossíntese de ergosterol, componente essencial da membrana plasmática fúngica, por inibição da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase do citocromo CYP450. Essa inibição

compromete a integridade e a permeabilidade da membrana devido ao acúmulo de lanosterol, prejudicando o crescimento fúngico e aumentando a susceptibilidade do patógeno à resposta imunológica do hospedeiro (Emami et al., 2017; Petrou et al., 2021; Roemer & Krysan, 2014).

A partir desse efeito sobre a membrana, a resistência ao FCZ pode ocorrer por diferentes mecanismos genéticos e celulares. Alterações no gene *ERG11*, que codifica a lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase, podem reduzir a afinidade da enzima pelo antifúngico (Iyer et al., 2021; Lee et al., 2023). Além disso, eventos de aneuploidia podem levar à superexpressão desse gene, aumentando a produção da enzima e diminuindo a eficácia do FCZ (Cowen et al., 2015; Iyer et al., 2021). Mutações pontuais, inserções ou deleções na sequência proteica da enzima também contribuem para a resistência, podendo ocorrer de forma espontânea ou por pressão do ambiente em que o fungo se encontra (Bosco-Borgeat et al., 2016).

Outro mecanismo de resistência relevante envolve a ativação de bombas de efluxo, que reduzem a concentração intracelular do FCZ (Oliveira, 2022). Essas bombas pertencem à família ABC *transporters* (ATP-binding cassette), destacando-se Afr1, amplamente descrita em *C. neoformans*, e Mdr1, observado em outros fungos, como *Candida albicans*, embora ainda pouco documentada em *Cryptococcus* spp. (M. Chang et al., 2018a; Lee et al., 2023; Torres et al., 2022). Dessa forma, a resistência ao FCZ resulta de uma combinação de alterações genéticas e adaptações celulares, permitindo que *Cryptococcus* spp. sobreviva mesmo na presença do antifúngico, representando um desafio terapêutico significativo.

#### 1.5.1.3 5-Flucitosina

A 5-FC é um antifúngico que apresenta atividade fungicida ou fungistática, dependendo da dose administrada. Para *Cryptococcus* spp., as concentrações testadas variam de 0.125 a 64  $\mu\text{g/mL}$ , sendo consideradas possivelmente resistentes as linhagens com crescimento inibido em apenas 50% em relação ao controle, acima dos valores de referência do ECV de 8  $\mu\text{g/mL}$  para *C. neoformans* e 4  $\mu\text{g/mL}$  para *C. gattii*, de forma semelhante ao FCZ (CLSI, 2017). A 5-FC é um análogo fluorado da citosina e é amplamente utilizada na fase de indução do tratamento da neurocriptococose, principalmente diante da emergência de isolados resistentes à AMB e ao FCZ (Molloy et al., 2018; Roemer & Krysan, 2014; WHO, 2018).

Após entrar na célula fúngica por meio da permease purina-citosina Fcy2, a 5-FC é convertida em 5-fluorouracil (5-FU) pela citosina desaminase Fcy1 e, posteriormente, transformada em monofosfato de 5-fluorouridina (5-FUMP) pela enzima Fur1 (Figura 3). 5-

FUMP, por sua vez, pode entrar em duas vias: ele pode ser transformado em 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (5-FdUMP), que inibe a síntese de timina ao ser incorporado na enzima timidilato sintetase; ou pode ser transformado em 5-FUTP, que é incorporado no RNA como análogo fluorado da uracila e compromete a síntese de proteínas e consequente estresse celular (Y. C. Chang et al., 2021). A eficácia da 5-FC pode ser comprometida por mutações que afetam a síntese ou a atividade das enzimas envolvidas em seu metabolismo, como Fcy1 e Fur1, já descritas *in vitro* em *Cryptococcus* spp. (Delma et al., 2024; E. A. Oliveira, 2022).

Relatos também indicam que o gene *AFRI*, relacionado à resistência ao fluconazol, pode contribuir para a redução da suscetibilidade à 5-FC, provavelmente por seu papel como bomba de efluxo que regula a concentração intracelular do fármaco (Y. C. Chang et al., 2021). Por fim, há evidências de multirresistência envolvendo 5-FC e FCZ em isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida lusitanae*, ressaltando a necessidade de monitoramento contínuo da resistência clínica (Cuenca-Estrella et al., 2001; Florent et al., 2009).

## 2. JUSTIFICATIVA

Dentre as doenças fúngicas que acometem a população brasileira, a criptococose se destaca pelo tropismo pelo sistema nervoso central, pelas altas taxas de morbidade e mortalidade e pelo impacto sobre populações vulneráveis. As espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, principais agentes etiológicos, são amplamente distribuídas no ambiente, especialmente em locais com acúmulo de fezes de aves. A inalação das leveduras ou basidiósporos pode levar à meningoencefalite criptocócica, um quadro de evolução grave, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Carosi et al., 2017; GOV, 2024).

Mesmo sendo uma infecção de grande importância clínica, o tratamento da criptococose ainda enfrenta muitos desafios. Além da oferta limitada de antifúngicos, é possível observar um aumento preocupante da resistência às principais drogas utilizadas, como o fluconazol e a flucitosina (Melhem, Leite Júnior, et al., 2024; Tan et al., 2025). Essa situação é agravada pela falta de investimentos e pela escassez de pesquisas voltadas às doenças fúngicas, o que mantém a criptococose entre as doenças fúngicas mais negligenciadas e com grandes lacunas de conhecimento (Tan et al., 2025).

No Brasil, o retorno do uso clínico da flucitosina torna ainda mais necessário o acompanhamento de sua eficácia e a investigação da possível emergência de resistência. Além disso, a heterorresistência ao FCZ, já relatada em literatura, mostra a importância da vigilância

do surgimento de resistência e a compreensão do comportamento dos isolados clínicos frente aos antifúngicos disponíveis, identificando possíveis alterações na expressão de genes relacionados à resposta antifúngica (Bongomin et al., 2018; Melhem, Leite Júnior, et al., 2024).

Nesse contexto, neste trabalho foram avaliados o perfil epidemiológico e de suscetibilidade a antifúngicos de isolados de *Cryptococcus* spp. de pacientes do Hospital Eduardo de Menezes, em Belo Horizonte, bem como a expressão de genes relacionados à resistência, a fim de relacionar a resistência ao contexto da infecção humana e desfecho clínico dos pacientes.

### **3. OBJETIVO**

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar isolados clínicos de *Cryptococcus* spp., obtidos do líquido de pacientes com neurocriptococose, quanto à identificação, susceptibilidade à antifúngicos e expressão de genes relacionados à resposta antifúngica.

#### **Objetivos específicos:**

1. Identificar os isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. de pacientes admitidos no Hospital Eduardo de Menezes (HEM) em Belo Horizonte a nível de espécie.
2. Avaliar e comparar a susceptibilidade dos isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos de uso clínico anfotericina B, fluconazol e flucitosina.
3. Avaliar o nível de expressão de genes de interesse associados à resposta antifúngica.
4. Comparar o perfil de susceptibilidade e de expressão gênica entre isolados, relacionando possíveis variações ao tempo de tratamento, intervenções medicamentosas e à evolução clínica dos pacientes.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1 População de estudo e origem dos isolados clínicos**

O Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) mantém diversas linhas de pesquisa envolvendo pacientes com neurocriptococose atendidos HEM, em Belo Horizonte (MG), pertencente à Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG). Neste estudo, foram utilizadas amostras de duas coleções clínicas: a primeira

composta por pacientes recrutados entre 2017 e 2022, e a segunda, iniciada em 2022, ainda em andamento.

Da primeira coleção, foram analisados 108 isolados clínicos, obtidos a partir de *pools* coloniais do líquido e sangue de 30 pacientes, e não tivemos acesso ao registro do tempo de tratamento. Na segunda coleção, foram incluídos 46 isolados clínicos de 10 pacientes, cujas amostras de líquido foram coletadas no momento do diagnóstico, antes do início do tratamento, e em dias subsequentes, conforme disponibilidade médica.

Todos os pacientes participantes desses projetos tiveram diagnóstico confirmado de neurocriptococose, podendo apresentar ou não coinfeção por outros patógenos. Todos os pacientes, ou seus responsáveis legais, assinaram um termo de consentimento esclarecido antes da inclusão no estudo. A primeira coleção teve seu projeto aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (CAAE FHEMIG: 00883118.0.3001.5124 e CAAE UFMG: 00883118.0.0000.5149), assim como a segunda (CAAE FHEMIG: 17377019.0.3001.5124 e CAAE UFMG: 17377019.0.0000.5149).

A terapia padrão adotada para os pacientes incluiu a combinação de anfotericina B com fluconazol ou flucitosina, quando disponível, durante a fase de indução. Nas fases de consolidação e manutenção, o tratamento consistiu exclusivamente em fluconazol.

Foram consultados os prontuários clínicos dos pacientes de ambas as coleções para coletar informações sobre esquema terapêutico, evolução clínica e possíveis efeitos adversos, quando disponíveis. Esses dados foram organizados para análises de correlação com os resultados microbiológicos e moleculares obtidos neste estudo.

Desse modo, nos experimentos deste trabalho foram utilizados os 154 isolados clínicos, e como controle as linhagens de *C. neoformans* H99 (ATCC 208821) e *C. gattii* (ATCC MYA-4093), reconhecidas como referência.

#### 4.2 Identificação dos isolados

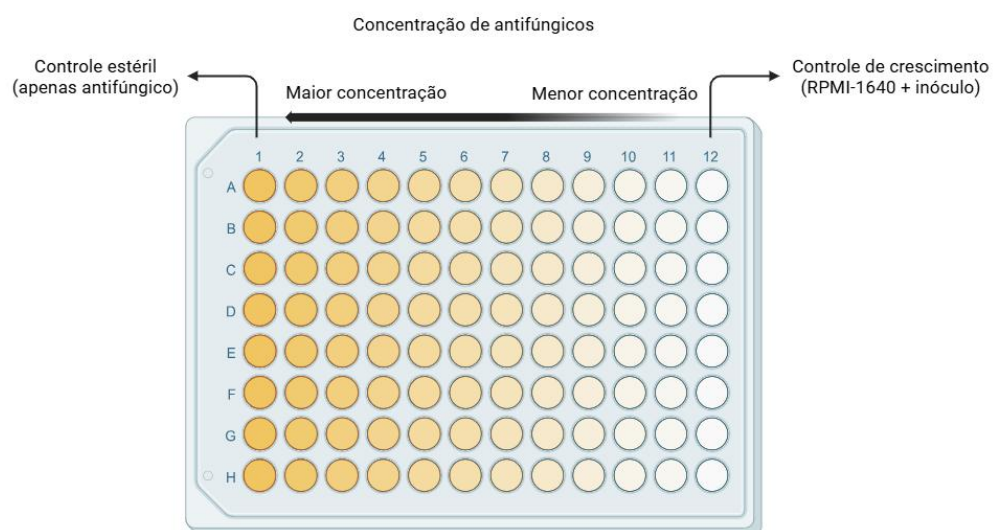
Para identificação a nível de espécie, foi realizada a técnica de espectrometria de massas *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF) conduzida pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Rafael W. Bastos, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Dos 154 isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. analisados, 150 foram identificados em nível de espécie.

#### 4.3 Determinação da susceptibilidade

Os isolados e as linhagens controles foram submetidos ao teste de determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) por microdiluição em caldo, conforme a metodologia descrita pelo CLSI, M27-A4 (CLSI, 2017). Para o teste, foram preparadas placas de 96 poços estéreis com diluições seriadas de antifúngicos clínicos em meio RPMI-1640 suplementado com 3-[N-morfolino] propano-ácido sulfônico (MOPS), com volume final de 100  $\mu$ L por poço. Nas placas, foram incluídos poços de controle de esterilidade sem inóculo e controle de crescimento sem antifúngico. Um esquema da montagem das placas está representado na Figura 4. As concentrações testadas variaram de 0,03 a 16  $\mu$ g/mL para anfotericina B e de 0,125 a 64  $\mu$ g/mL para fluconazol e 5-flucitosina.

O inóculo foi preparado a partir dos isolados que foram descongelados e repicados em meio ASD por 72 horas a 37 °C para ativação metabólica. Após o cultivo, uma alçada do fungo foi suspensa em solução salina 0,85% e a transmitância da suspensão foi medida em espectrofotômetro a 530 nm, ajustado para 75-77%, correspondendo a  $1-5 \times 10^6$  células/mL. Em seguida, a suspensão foi diluída para atingir uma concentração final entre  $1-5 \times 10^3$  células/mL, sendo então transferidos 100  $\mu$ L do inóculo final para as placas.

Figura 4: Esquema de montagem das placas do teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima dos antifúngicos clínicos para os diferentes isolados clínicos de *Cryptococcus* spp..



As placas foram incubadas a 30 e 37 °C por 72 horas. Após esse período, as CIMs foram determinadas por leitura visual, considerando que a turvação nos poços indicava crescimento

fúngico. O primeiro poço sem turvação foi considerado como apresentando inibição fúngica completa (100%) para AMB. Já no caso do FCZ e da 5-FC, a leitura foi realizada no ponto correspondente a 50% de inibição do crescimento, ou seja, metade do crescimento observado no controle positivo.

#### 4.3.1 Análise de componentes principais

Com os resultados de CIM organizados em tabelas, foi realizada uma análise complementar de PCA (*Principal Component Analysis* - Análise de Componentes Principais), de comportamento global junto de *biplot*, para uma melhor visualização do comportamento dos isolados como um todo. O comportamento global mostra um perfil multivariado, levando em consideração todas as variáveis ao mesmo tempo, portanto, utilizamos valores de ambas as temperaturas numa mesma análise.

Para identificar possíveis perfis de susceptibilidade, foi avaliado inicialmente a soma dos quadrados dentro dos *clusters* (*Within-Cluster Sum of Squares*, WSS) e o índice médio de silhueta. Com base nesses critérios, foi determinado um  $k = 2$  para o método *k-means*, uma vez que esse número de *clusters* apresentou simultaneamente um índice de silhueta elevado e uma queda significativa em WSS, indicando boa coesão interna e adequada separação entre os *clusters*. Foi utilizado, então, o *k-means* com as coordenadas de PC1 e PC2, de modo que permitiu explorar a separação dos isolados considerando a variabilidade explicada por esses dois componentes principais.

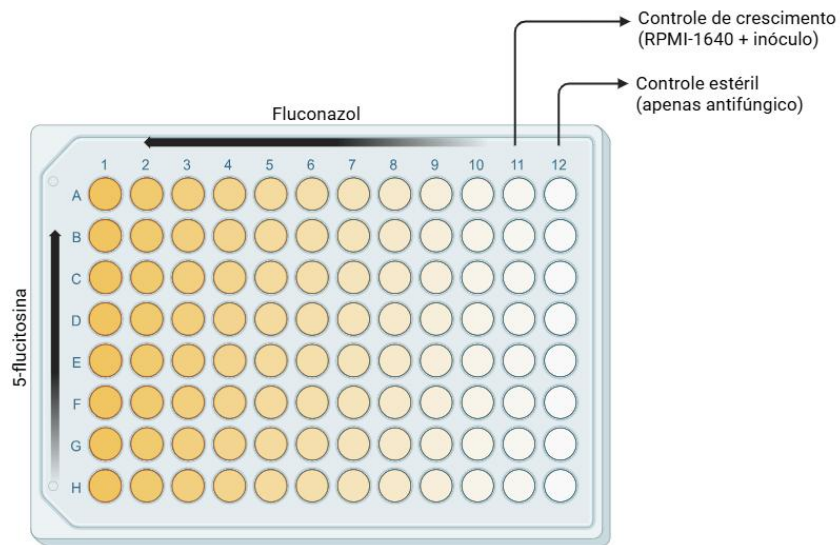
#### 4.3.2 Investigação do sinergismo da combinação fluconazol e 5-flucitosina

Em seguida, foi avaliado a susceptibilidade combinada dos isolados frente à associação de FCZ e 5-FC, com o objetivo de investigar o possível efeito sinérgico entre esses antifúngicos. Foram preparadas dez diluições seriadas de FCZ (0,25 a 64  $\mu\text{g/mL}$ ) e oito de 5-FC (1 a 64  $\mu\text{g/mL}$ ), distribuídas conforme ilustrado na Figura 5, sendo o FCZ disposto na orientação vertical e a 5-FC na horizontal. Dessa forma, foi possível obter diferentes combinações de concentrações dos dois antifúngicos. Foram incluídos controles de crescimento e de esterilidade em todas as placas. Em seguida, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de inóculo em cada poço, preparado em solução salina 0,85%. A suspensão contendo os fungos tiveram sua transmitância ajustada entre 75-77% à 530 nm em espectrofotômetro, correspondendo a uma densidade de  $1-5 \times 10^6$

células/mL, sendo posteriormente diluída para atingir uma concentração final de  $1-5 \times 10^3$  células/mL.

As placas foram incubadas nas temperaturas previamente associadas à resistência de cada isolado, sendo o isolado MG-PC4 incubado a 37 °C, juntamente com o controle R265, enquanto as MG-5C27 e MG-5C28 foram incubadas a 30 °C, também com o controle R265, por um período de 72 horas.

Figura 5: Esquema de montagem de placa de combinação de antifúngicos.



A direção das setas indica aumento da concentração dos antifúngicos.

Após esse período, as leituras da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 600nm. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o modelo de referência ZIP (*Zero Interaction Potency*), disponível na plataforma *SynergyFinder*, versão 3.0. Esse modelo avalia o efeito combinado das duas drogas, comparando as curvas de dose-resposta observadas para cada antifúngico isoladamente e em associação, permitindo determinar o grau de sinergismo ou antagonismo entre eles (Yadav et al., 2015).

#### 4.4 Investigação de fatores associados à resistência

Os isolados clínicos que apresentaram valores elevados de CIM tanto para FCZ e 5-FC foram selecionados para investigar fatores possivelmente envolvidos na resistência ou na

resposta a antifúngicos. Nesses isolados, foram conduzidos ensaios de expressão de genes associados à resistência.

#### 4.4.1 Expressão de genes de interesse

Primeiramente, os isolados selecionados foram expostos aos antifúngicos FCZ e 5-FC por 24 horas. Em seguida, a extração de RNA foi feita seguindo o protocolo padronizado pelo Laboratório de Micologia da UFMG, e os níveis de expressão de genes de interesse, previamente descritos na literatura como envolvidos em resistência antifúngica, foram quantificados.

##### 4.4.1.1 Exposição aos antifúngicos

Os isolados foram inicialmente cultivados em ASD sólido a 37 °C por 72 horas para reativação metabólica e, em seguida, inoculados em 4 mL de ASD líquido, distribuídos em três grupos e incubados a 37 °C (MG-PC4 e R265) e 30 °C (MG-5C27, MG-5C28 e R265) por 48 horas. Os grupos eram (i) não tratados (NT), (ii) exposto a FCZ e (iii) exposto a 5-FC. Após esse período, foi preparado um inóculo de cada um dos três grupos, medindo a transmitância das suspensões em espectrofotômetro a 530nm e ajustando para 75-77%, que corresponde a  $1-5 \times 10^6$  células/mL. Em seguida, 1 mL de cada inóculo foi centrifugado e ressuspensionado em 1 mL de ASD líquido, adicionando nos grupos FCZ e 5-FC concentrações de sub-CIM de cada amostra. Todos os grupos foram então incubados por 24 horas em suas respectivas temperaturas.

Após o tratamento, as amostras foram centrifugadas e lavadas 2X com tampão fosfato-salino (PBS), sendo finalmente ressuspensionadas em 1 mL de Trizol para extração de RNA.

##### 4.4.1.2 Extração de RNA

A extração de RNA total foi realizada pelo método TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante, com adaptações específicas estabelecidas pelo grupo do Laboratório de Micologia da UFMG para esse gênero de fungo. As adaptações incluíram o congelamento prévio da amostra com o reagente antes do início do protocolo e a realização de 10 ciclos de ruptura celular com *beads*, com intervalos de 1 minuto em gelo. As amostras extraídas foram armazenadas a -80 °C até o processamento.

#### 4.4.1.3 Quantificação de expressão de genes de interesse

Para avaliar os níveis de expressão dos genes de interesse, foram realizadas reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Após a extração de RNA, foi sintetizado cDNA utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems). Em seguida, as reações de qPCR foram conduzidas no equipamento QuantStudio 1, utilizando *SYBR Green Universal Master Mix RT-PCR Reagents Kit* (Applied Biosystems), com 8 µL do mix de reação e 2 µL de cDNA por poço. Foram analisados os genes associados à resistência *FCY2*, *FCY1*, *FUR1*, *ERG11*, *AFR1* e *MDR1*, enquanto *ACT1* foi utilizado como controle endógeno (*housekeeping gene*) de *C. gattii*, para normalização dos dados. A expressão gênica relativa foi quantificada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , normalizando os valores em relação a beta-actina e ao controle experimental (Zhang et al., 2019). As sequências de primers estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2: Primers utilizados para a reação qPCR

| Gene         | Forward (5'→3')      | Reverse (5'→3')         |
|--------------|----------------------|-------------------------|
| <i>ACT1</i>  | CGGTATCGTCACAACTGG   | TAAGAAGAACGGGGTGCTC     |
| <i>FCY2</i>  | CTATATGCCTGCCGAAGCCA | TCATGCTCGTGATAGGCGTC    |
| <i>FCY1</i>  | CGTCATCCCCTCGTACTCG  | TAGCATGCCCAACCTCGTTT    |
| <i>FUR1</i>  | GTGATTGCTGTCGTTCCGTG | GAACCTCCCGTAGCAAGCAT    |
| <i>AFR1</i>  | GATGGACAGAGCGCGTACAA | GAAGGAGCAGAAGCCTGTCA    |
| <i>MDR1</i>  | GATGCGTCCAAGGCCAATTC | ATTCGCACATGACCAACGAC    |
| <i>ERG11</i> | CGAAACGGTGTCCCTCTCTC | GCAAGATGGAGAAGAGTCCAAGA |

#### 4.5 Investigação da progressão clínica e desfecho da doença.

Após os ensaios laboratoriais, foi avaliada a relação entre a resistência antifúngica dos isolados e os desfechos clínicos dos pacientes cujas informações estavam disponíveis. Os pacientes foram divididos em dois grupos conforme a presença ou ausência de isolados resistentes, e a progressão clínica foi comparada entre eles. A análise também permitiu

investigar a ocorrência de resistência adquirida ou variações na resistência em pacientes com amostras de líquor coletadas em diferentes momentos.

#### 4.6 Análise estatística

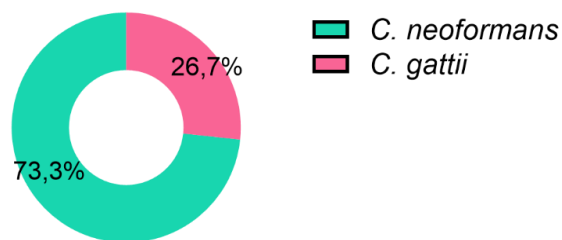
Os resultados obtidos foram analisados utilizando testes estatísticos para comparar as diferenças significativas entre os grupos estudados, com o apoio instrumental dos programas GraphPad Prism (v.9.5) e R (v.4.5.0). O nível de 95 % de significância será considerado para que os valores sejam significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Identificação dos isolados clínicos

Dos 154 isolados clínicos analisados, 150 (97,4 %) foram identificados pela técnica de MALDI-TOF. Entre esses, quatro não puderam ser identificados. Dentre os 150 isolados identificados, 110 (73,3 %) foram classificados como *C. neoformans* e 40 (26,7 %) como *C. gattii* (Figura 6).

Figura 6: Frequência de cada espécie de *Cryptococcus* spp. isolados de pacientes admitidos no HEM.



Esses isolados correspondem a amostras provenientes de 40 pacientes, dos quais 33 apresentaram isolamento apenas de *C. neoformans*, 4 (10 %) apenas *C. gattii* e 3 (7,5 %) apresentaram isolamento de ambas as espécies, demonstrando uma coinfeção.

### 5.2 Perfil de sensibilidade a antifúngicos clínicos

A Tabela 3 mostra os valores de CIM dos antifúngicos AMB, FCZ e 5-FC para todos os isolados avaliados neste estudo.

Entre os 110 isolados identificados como *C. neoformans*, os valores de CIM para AMB variaram de 0,125 a 1 µg/mL em ambas as temperaturas, sendo todos classificados como sensíveis. Para FCZ, a 30 °C, os isolados apresentaram CIMs entre 0,125 e 16 µg/mL, enquanto a 37 °C os valores variaram de 0,125 a 4 µg/mL, com apenas um isolado resistente com CIM >64 µg/mL (MG-PC2). Já para 5-FC, todos os isolados foram sensíveis em ambas as temperaturas, com CIMs variando de 0,125 a 8 µg/mL.

Nos 40 isolados de *C. gattii*, também não foram observados casos de resistência à AMB em nenhuma das temperaturas testadas, com valores de CIM também entre 0,125 a 1 µg/mL. Para FCZ, a 30 °C, as CIMs variaram de 1 a 32 µg/mL, sendo identificados três isolados resistentes (MG-PC4, MG-5C27 e MG-5C28), todos com valores >64 µg/mL. A 37 °C, as CIMs variaram de 0,125 a 8 µg/mL, com apenas um isolado também resistente com CIM de 64 µg/mL (MG-PC4). Em relação à 5-FC, as CIMs variaram de 1 a 8 µg/mL a 30 °C, com três isolados classificados como resistentes intermediários com CIM de 16 µg/mL (MG-5C27, MG-5C28 e MG-5C79). A 37 °C, os valores permaneceram entre 0,125 e 4 µg/mL, com apenas um isolado classificado como resistente intermediário com CIM de 16 µg/mL.

Em resumo, todos os isolados de *C. neoformans* (100 %) foram sensíveis à AMB e à 5-FC. Apenas um isolado (0,9 %) apresentou resistência ao FCZ, enquanto os demais (96,4 %) permaneceram sensíveis. Para *C. gattii*, também foi observada sensibilidade de todos para AMB. No caso do FCZ, três isolados (7,5 %) apresentaram resistência e os outros (92,5 %) foram sensíveis. Para a 5-FC, quatro isolados (10 %) foram classificados como resistentes intermediários, enquanto os outros (90 %) permaneceram sensíveis.

Os resultados detalhados são apresentados a seguir.

Tabela 3: Identificação dos isolados por espécie, número do paciente e CIM dos antifúngicos clínicos.

| Paciente | Isolado | Espécie              | CIM µg/mL      |       |            |       |             |       |
|----------|---------|----------------------|----------------|-------|------------|-------|-------------|-------|
|          |         |                      | Anfotericina B |       | Fluconazol |       | Flucitosina |       |
|          |         |                      | 30 °C          | 37 °C | 30 °C      | 37 °C | 30 °C       | 37 °C |
| 1        | MG-PC1  | <i>C. neoformans</i> | 1              | 0.125 | 8          | 2     | 8           | 1     |
|          | MG-PC2  | <i>C. neoformans</i> | 0.5            | 0.25  | 8          | >64   | 8           | 2     |
|          | MG-PC3  | <i>C. neoformans</i> | 0.5            | 0.5   | 4          | 1     | 8           | 4     |
|          | MG-PC4  | <i>C. gattii</i>     | 1              | 1     | >64        | >64   | 8           | 16    |

|    |         |                      |       |       |    |     |   |   |
|----|---------|----------------------|-------|-------|----|-----|---|---|
|    | MG-PC5  | <i>C. neoformans</i> | 1     | 1     | 4  | 1   | 2 | 2 |
|    | MG-PC6  | <i>C. neoformans</i> | 1     | 1     | 4  | 2   | 2 | 2 |
| 2  | MG-PC7  | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.25  | 2  | 1   | 4 | 1 |
|    | MG-PC8  | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.5   | 4  | 0.5 | 2 | 1 |
|    | MG-PC9  | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.5   | 4  | 1   | 2 | 1 |
|    | MG-PC10 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25  | 4  | 1   | 2 | 4 |
| 3  | MG-PC11 | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.25  | 2  | 2   | 2 | 1 |
|    | MG-PC12 | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.25  | 2  | 2   | 4 | 1 |
|    | MG-PC13 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.25  | 4  | 1   | 2 | 1 |
|    | MG-PC14 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.25  | 2  | 1   | 2 | 2 |
| 4  | MG-PC15 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.125 | 8  | 1   | 8 | 1 |
|    | MG-PC16 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25  | 16 | 1   | 2 | 1 |
|    | MG-PC17 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 4  | 0.5 | 2 | 1 |
|    | MG-PC18 | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.25  | 4  | 0.5 | 2 | 1 |
| 5  | MG-PC19 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.5   | 4  | 2   | 2 | 1 |
|    | MG-PC20 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.5   | 4  | 2   | 2 | 1 |
|    | MG-PC21 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.5   | 2  | 2   | 1 | 1 |
|    | MG-PC22 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 2  | 2   | 1 | 1 |
|    | MG-PC23 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 16 | 2   | 1 | 1 |
|    | MG-PC24 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 4  | 2   | 2 | 2 |
| 6  | MG-PC25 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 4  | 1   | 4 | 2 |
|    | MG-PC26 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 1     | 4  | 1   | 4 | 2 |
|    | MG-PC27 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25  | 4  | 1   | 4 | 2 |
|    | MG-PC28 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.25  | 4  | 1   | 4 | 2 |
| 7  | MG-PC29 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.25  | 4  | 1   | 4 | 1 |
|    | MG-PC30 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 4  | 1   | 4 | 1 |
|    | MG-PC31 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 4  | 1   | 4 | 1 |
|    | MG-PC32 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 4  | 1   | 4 | 1 |
|    | MG-PC33 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 4  | 1   | 2 | 1 |
|    | MG-PC34 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25  | 4  | 2   | 2 | 1 |
| 8  | MG-PC35 | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.25  | 1  | 1   | 1 | 1 |
|    | MG-PC36 | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.25  | 1  | 1   | 1 | 2 |
|    | MG-PC37 | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.25  | 1  | 1   | 2 | 1 |
|    | MG-PC38 | <i>C. neoformans</i> | 0.06  | 0.125 | 1  | 1   | 1 | 1 |
| 9  | MG-PC39 | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.25  | 2  | 1   | 1 | 2 |
|    | MG-PC40 | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.25  | 2  | 1   | 2 | 4 |
|    | MG-PC41 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25  | 2  | 1   | 2 | 2 |
|    | MG-PC42 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25  | 2  | 2   | 2 | 1 |
| 10 | MG-PC43 | NI                   | 0.25  | 0.5   | 4  | 0.5 | 4 | 1 |
|    | MG-PC44 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.25  | 2  | 0.5 | 1 | 1 |
|    | MG-PC45 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.25  | 2  | 0.5 | 2 | 2 |

|    |         |                      |       |       |       |       |    |       |
|----|---------|----------------------|-------|-------|-------|-------|----|-------|
|    | MG-PC46 | <i>C. neoformans</i> | 0.06  | 0.125 | 4     | 0.5   | 2  | 1     |
| 11 | MG-5C1  | <i>C. neoformans</i> | 1     | 1     | 4     | 2     | 8  | 4     |
|    | MG-5C2  | <i>C. neoformans</i> | 1     | 1     | 4     | 2     | 8  | 2     |
|    | MG-5C3  | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 1     | 8     | 1     | 8  | 2     |
|    | MG-5C4  | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 8     | 1     | 8  | 2     |
|    | MG-5C5  | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 8     | 1     | 8  | 2     |
|    | MG-5C6  | <i>C. neoformans</i> | 1     | 1     | 4     | 1     | 4  | 2     |
| 12 | MG-5C7  | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 4     | 2     | 4  | 2     |
|    | MG-5C8  | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 4     | 2     | 4  | 2     |
| 13 | MG-5C9  | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 2     | 2     | 2  | 1     |
|    | MG-5C10 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 2     | 2     | 2  | 1     |
| 14 | MG-5C11 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25  | 0.125 | 0.125 | 1  | 0.125 |
|    | MG-5C12 | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.5   | 8     | 0.5   | 8  | 1     |
| 15 | MG-5C13 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 2     | 0.5   | 2  | 1     |
|    | MG-5C14 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 4     | 2     | 2  | 2     |
| 16 | MG-5C15 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.125 | 0.5   | 0.125 | 2  | 0.125 |
|    | MG-5C16 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 1     | 0.25  | 1  | 0.5   |
|    | MG-5C17 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 2     | 1     | 2  | 1     |
|    | MG-5C18 | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.5   | 2     | 0.25  | 2  | 1     |
| 17 | MG-5C19 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 8     | 0.25  | 8  | 0.125 |
|    | MG-5C20 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 2     | 0.5   | 4  | 1     |
|    | MG-5C21 | <i>C. gattii</i>     | 0.125 | 0.25  | 4     | 2     | 8  | 2     |
|    | MG-5C22 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.25  | 4     | 2     | 4  | 1     |
|    | MG-5C23 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 8     | 0.25  | 8  | 1     |
|    | MG-5C24 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 8     | 0.125 | 8  | 1     |
|    | MG-5C25 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.25  | 8     | 1     | 4  | 2     |
|    | MG-5C26 | <i>C. gattii</i>     | 0.25  | 0.25  | 2     | 0.5   | 4  | 2     |
|    | MG-5C27 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | >64   | 2     | 16 | 0.5   |
|    | MG-5C28 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | >64   | 2     | 16 | 1     |
| 18 | MG-5C29 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.5   | 4     | 2     | 8  | 2     |
|    | MG-5C30 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 8     | 2     | 8  | 2     |
| 19 | MG-5C31 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.5   | 2     | 4     | 4  | 2     |
|    | MG-5C32 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 2     | 4     | 4  | 1     |
|    | MG-5C33 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 1     | 2     | 0.5   | 2  | 1     |
|    | MG-5C34 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.25  | 2     | 0.5   | 1  | 0.5   |
|    | MG-5C35 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.25  | 2     | 0.25  | 1  | 0.5   |
|    | MG-5C36 | <i>C. neoformans</i> | 0.25  | 0.25  | 2     | 0.5   | 2  | 0.5   |
| 20 | MG-5C37 | NI                   | 0.125 | 0.5   | 2     | 0.5   | 2  | 1     |
|    | MG-5C38 | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.25  | 2     | 0.5   | 2  | 0.5   |
|    | MG-5C39 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 4     | 4     | 8  | 2     |
|    | MG-5C40 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 4     | 2     | 8  | 2     |

|    |         |                      |       |       |     |       |           |       |
|----|---------|----------------------|-------|-------|-----|-------|-----------|-------|
| 21 | MG-5C41 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 2   | 1     | 4         | 1     |
|    | MG-5C42 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25  | 2   | 1     | 4         | 1     |
| 22 | MG-5C49 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 1   | 0.5   | 4         | 2     |
|    | MG-5C50 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 1   | 1     | 2         | 1     |
| 23 | MG-5C51 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 1     | 2   | 0.125 | 1         | 2     |
|    | MG-5C52 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 1     | 1   | 0.25  | 2         | 1     |
|    | MG-5C53 | NI                   | 0.5   | 0.5   | 2   | 0.25  | 2         | 2     |
|    | MG-5C54 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 1   | 1     | 1         | 1     |
| 24 | MG-5C55 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25  | 0.5 | 1     | 0.25      | 0.125 |
|    | MG-5C56 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 0.5 | 0.5   | 0.5       | 0.25  |
| 25 | MG-5C57 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.12  | 0.5 | 0.25  | 4         | 0.25  |
|    | MG-5C58 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 4   | 0.25  | 2         | 0.5   |
| 26 | MG-5C59 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 4   | 0.5   | 4         | 2     |
|    | MG-5C60 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 2   | 0.5   | 2         | 1     |
| 27 | MG-5C61 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 2   | 0.5   | 2         | 0.5   |
|    | MG-5C62 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 1     | 2   | 1     | 4         | 0.25  |
| 28 | MG-5C63 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25  | 4   | 0.5   | 2         | 1     |
|    | MG-5C64 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25  | 2   | 1     | 2         | 1     |
|    | MG-5C65 | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.25  | 4   | 0.5   | 2         | 0.5   |
|    | MG-5C66 | <i>C. gattii</i>     | 0.125 | 0.5   | 1   | 1     | 2         | 1     |
| 29 | MG-5C43 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.125 | 1   | 2     | 4         | 2     |
|    | MG-5C44 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 2   | 4     | 4         | 2     |
|    | MG-5C45 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 4   | 2     | 8         | 1     |
|    | MG-5C46 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 4   | 2     | 8         | 1     |
|    | MG-5C47 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 4   | 2     | 2         | 1     |
|    | MG-5C48 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 2   | 2     | 2         | 1     |
|    | MG-5C67 | <i>C. gattii</i>     | 1     | 0.5   | 8   | 2     | 2         | 1     |
|    | MG-5C68 | <i>C. gattii</i>     | 1     | 0.25  | 4   | 4     | 2         | 2     |
|    | MG-5C69 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 1     | 2   | 0.25  | 8         | 2     |
|    | MG-5C70 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 2   | 0.25  | 4         | 2     |
|    | MG-5C71 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 2   | 0.5   | 4         | 0.5   |
|    | MG-5C72 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 1   | 0.5   | 4         | 0.5   |
|    | MG-5C73 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 8   | 4     | 4         | 2     |
|    | MG-5C74 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 8   | 4     | 2         | 1     |
|    | MG-5C75 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5   | 4   | 2     | 8         | 1     |
|    | MG-5C76 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25  | 4   | 2     | 8         | 2     |
|    | MG-5C77 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 16  | 0.25  | 4         | 1     |
|    | MG-5C78 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5   | 16  | 0.5   | 4         | 1     |
|    | MG-5C79 | <i>C. gattii</i>     | 1     | 0.5   | 4   | 2     | <b>16</b> | 1     |
|    | MG-5C80 | <i>C. gattii</i>     | 1     | 0.5   | 4   | 2     | 8         | 1     |
|    | MG-5C81 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5   | 2   | 1     | 8         | 1     |

|      |          |                      |       |      |    |     |   |     |
|------|----------|----------------------|-------|------|----|-----|---|-----|
|      | MG-5C82  | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5  | 4  | 1   | 8 | 2   |
|      | MG-5C83  | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5  | 8  | 4   | 2 | 1   |
|      | MG-5C84  | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5  | 8  | 4   | 2 | 1   |
|      | MG-5C85  | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5  | 2  | 2   | 2 | 1   |
|      | MG-5C86  | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5  | 4  | 2   | 1 | 0.5 |
| 30   | MG-5C87  | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5  | 2  | 1   | 2 | 1   |
|      | MG-5C88  | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 1    | 2  | 1   | 2 | 2   |
| 31   | MG-5C89  | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5  | 2  | 2   | 2 | 2   |
|      | MG-5C90  | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5  | 2  | 2   | 2 | 2   |
| 32   | MG-5C91  | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5  | 1  | 0.5 | 2 | 0.5 |
|      | MG-5C92  | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5  | 2  | 1   | 2 | 2   |
| 33   | MG-5C93  | <i>C. neoformans</i> | 0.125 | 0.25 | 1  | 0.5 | 1 | 1   |
|      | MG-5C94  | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 1    | 1  | 1   | 2 | 1   |
| 34   | MG-5C95  | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5  | 16 | 2   | 8 | 4   |
|      | MG-5C96  | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5  | 8  | 0.5 | 8 | 2   |
| 35   | MG-5C97  | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25 | 8  | 1   | 8 | 4   |
|      | MG-5C98  | NI                   | 0.5   | 0.5  | 8  | 1   | 8 | 2   |
| 36   | MG-5C99  | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5  | 4  | 2   | 4 | 4   |
|      | MG-5C100 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5  | 4  | 2   | 4 | 2   |
| 37   | MG-5C101 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5  | 32 | 8   | 8 | 2   |
|      | MG-5C102 | <i>C. gattii</i>     | 0.5   | 0.5  | 32 | 4   | 8 | 2   |
| 38   | MG-5C103 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5  | 8  | 2   | 4 | 4   |
|      | MG-5C104 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.5  | 8  | 2   | 4 | 4   |
| 39   | MG-5C105 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.5  | 4  | 1   | 4 | 2   |
|      | MG-5C106 | <i>C. neoformans</i> | 1     | 0.25 | 4  | 1   | 4 | 2   |
| 40   | MG-5C107 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 0.25 | 8  | 2   | 8 | 8   |
|      | MG-5C108 | <i>C. neoformans</i> | 0.5   | 1    | 8  | 2   | 4 | 8   |
|      | CIM50    |                      | 0.5   | 0.5  | 4  | 1   | 4 | 1   |
|      | CIM90    |                      | 1     | 1    | 8  | 2   | 8 | 2   |
| ATCC | H99      | <i>C. neoformans</i> | 1     | 1    | 4  | 2   | 2 | 2   |
| ATCC | R265     | <i>C. gattii</i>     | 1     | 1    | 2  | 2   | 4 | 2   |

NI: isolado não identificado. CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> referente ao valor de CIM que inibe 50% e 90%, respectivamente, do crescimento dos isolados. Em negrito os valores de CIM considerados resistentes, em colorido os isolados selecionados para continuação de estudo.

O isolado MG-PC2 apresentou CIM acima de 64 µg/mL para FCZ a 37°C, ultrapassando em mais de quatro vezes o ECV estabelecido para *C. neoformans* (8 µg/mL), sendo classificado como resistente. Já o isolado MG-PC4, obtido do mesmo paciente em um momento diferente do tratamento, apresentou resultado semelhante, com CIM superior a 64

$\mu\text{g/mL}$  para FCZ em ambas as temperaturas testadas, também excedendo em mais de quatro vezes o ECV, neste caso para *C. gattii* ( $16 \mu\text{g/mL}$ ). Para 5-FC, o isolado MG-PC4 apresentou CIM de  $16 \mu\text{g/mL}$  a  $37^\circ\text{C}$ , três vezes acima do ECV para *C. gattii* ( $4 \mu\text{g/mL}$ ), caracterizando este isolado com resistência intermediária ou dose-dependente.

Da mesma forma, os isolados MG-5C27 e MG-5C28, de outro paciente, apresentaram valores de CIM acima de  $64 \mu\text{g/mL}$  para FCZ e de  $16 \mu\text{g/mL}$  para 5-FC, ambos na temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , ultrapassando os ECVs estabelecidos para *C. gattii*. Esses resultados indicam resistência ao FCZ e resistência intermediária ou dose-dependente para 5-FC. O isolado MG-5C79, obtido de um terceiro paciente, também apresentou CIM de  $16 \mu\text{g/mL}$  para 5-FC a  $30^\circ\text{C}$ , valor também superior ao ECV para *C. gattii* e considerado de resistência intermediária ou dose-dependente.

Os outros 149 isolados clínicos apresentaram sensibilidade para os antifúngicos testados, em ambas as temperaturas. Dos 110 isolados clínicos identificados como *C. neoformans*, apenas um foi considerado resistente, no caso à FCZ, com um CIM de  $>64 \mu\text{g/mL}$  (MG-PC2), os outros 109 foram sensíveis a todos os antifúngicos. Dos 40 isolados de *C. gattii*, 4 foram considerados resistente, sendo

Interessantemente, não encontramos valores elevados de CIM para anfotericina para esses isolados.

Dentre os isolados considerados resistentes, selecionamos MG-PC4, MG-5C27, MG-5C28 e a linhagem referência R265 como controle, para dar sequência com as análises devido a esses isolados apresentarem resistência simultânea aos antifúngicos FCZ e 5-FC (Tabela 3). Vale destacar que todos os isolados com resistência simultânea pertencem à espécie *C. gattii*.

Tabela 4: Isolados clínicos de *C. gattii* selecionados de acordo com o perfil de susceptibilidade.

| Paciente | Isolado clínico | Espécie          | Perfil de CIM          |
|----------|-----------------|------------------|------------------------|
| 1        | MG-PC4          | <i>C. gattii</i> | Resistente: FCZ e 5-FC |
| 17       | MG-5C27         | <i>C. gattii</i> | Resistente: FCZ e 5-FC |
|          | MG-5C28         | <i>C. gattii</i> | Resistente: FCZ e 5-FC |
| ATCC     | R265            | <i>C. gattii</i> | Sensível               |

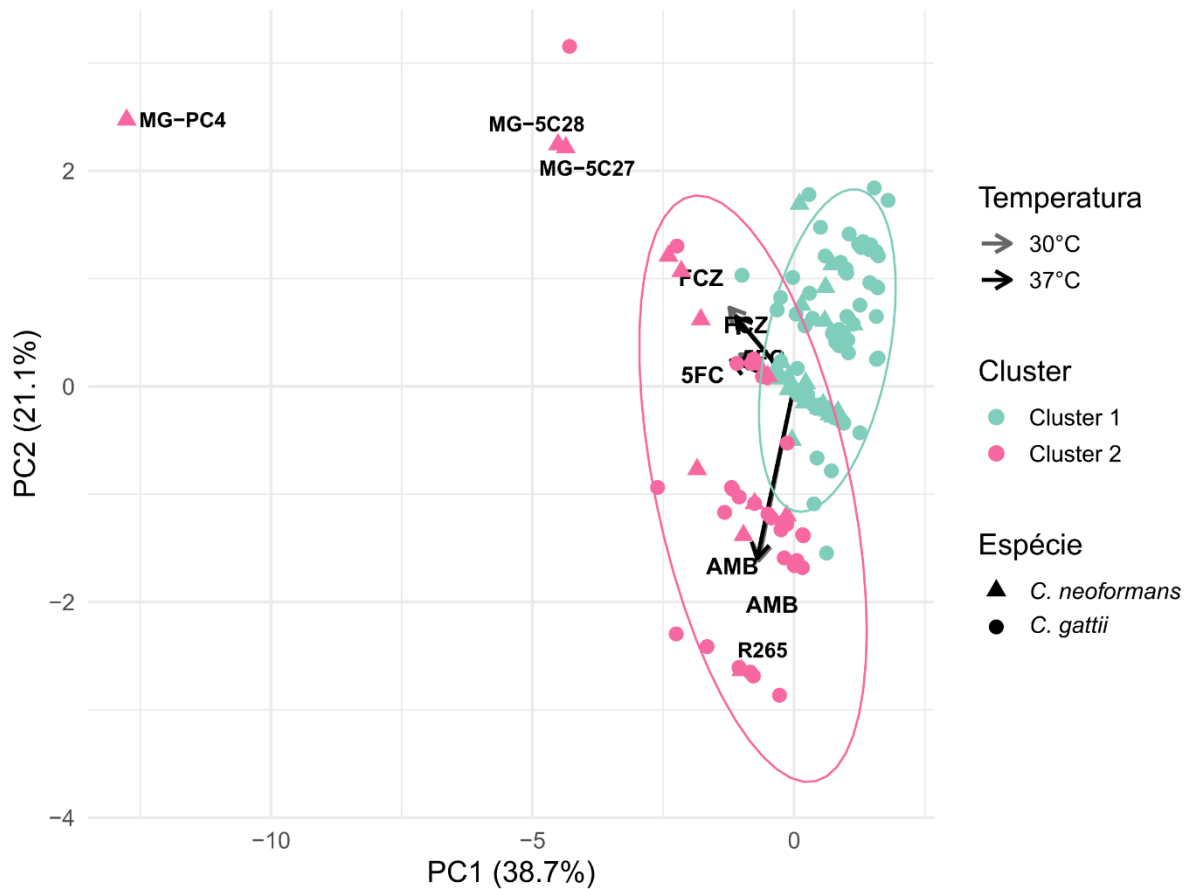
### 5.2.1 Comportamento dos isolados de acordo com os valores de CIM

Para uma análise mais direcionada, investigamos o comportamento dos valores de CIM por meio de uma PCA acompanhada do *biplot*, separados por temperatura (Figura 7). Os *clusters* 1 e 2 evidenciam uma variabilidade comum entre os isolados dentro de si, sem diferença clara entre as temperaturas. O componente PC1 explicou aproximadamente 39% da variância e o PC2, 21%, totalizando cerca de 60% da variabilidade dos dados.

Os vetores indicam a contribuição e a direção de cada antifúngico na formação dos componentes principais. Assim, para interpretar biologicamente a variabilidade observada, foram considerados os vetores correspondentes de cada antifúngico. O vetor da AMB foi o mais expressivo e em direção oposta aos de FCZ e 5-FC, indicando comportamento distinto dos valores de CIM e maior contribuição para o componente PC1. Já os vetores de FCZ e 5-FC apresentaram direções semelhantes, com pequena variação de ângulos, contribuindo principalmente para o componente PC2, embora com menor peso que a AMB em PC1.

Dessa forma, os pontos que representam isolados próximos entre si indicam comportamento semelhante, enquanto os mais distantes representam padrões distintos. Os *clusters* indicam a aproximação dos valores de CIM com 95% de confiança, e isolados fora deles representam padrões distintos em relação à maioria, como os isolados identificados na Figura 7. Por fim, os isolados localizados na direção dos vetores dos antifúngicos tendem a apresentar valores mais altos de CIM para aquela droga, enquanto os situados na direção oposta indicam valores mais baixos.

Figura 7: Análise de comportamento global dos isolados clínicos com base nos valores de CIM.

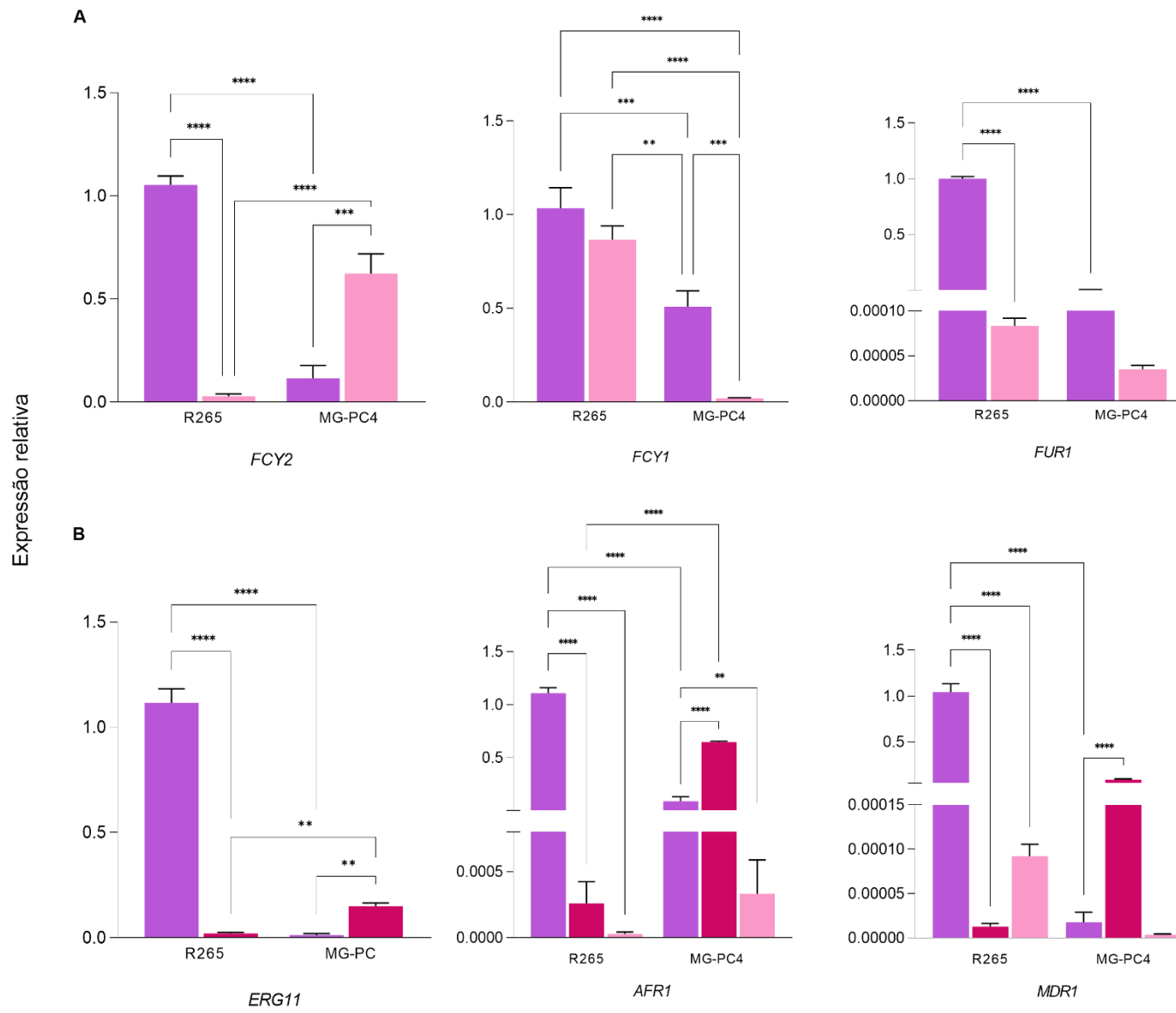


Os vetores indicam a contribuição dos antifúngicos para a formação dos componentes principais. AMB: anfotericina B; FCZ: fluconazol; 5-FC: 5-flucitosina.

### 5.3 Expressão dos genes de interesse

Uma vez que os isolados MG-PC4, MG-5C27 e MG-5C28 apresentaram valores de CIM mais elevados, nós avaliamos a expressão de genes associados aos mecanismos de resistência antifúngica. Assim, a expressão relativa dos genes *FUR1*, *FCY1*, *FCY2*, *AFR1*, *ERG11* e *MDR1* foi comparada à linhagem de referência R265 (Figuras 8 e 9).

Figura 8: Perfil de expressão dos genes envolvidos na resistência ao FCZ e 5-FC, no isolado MG-PC4.



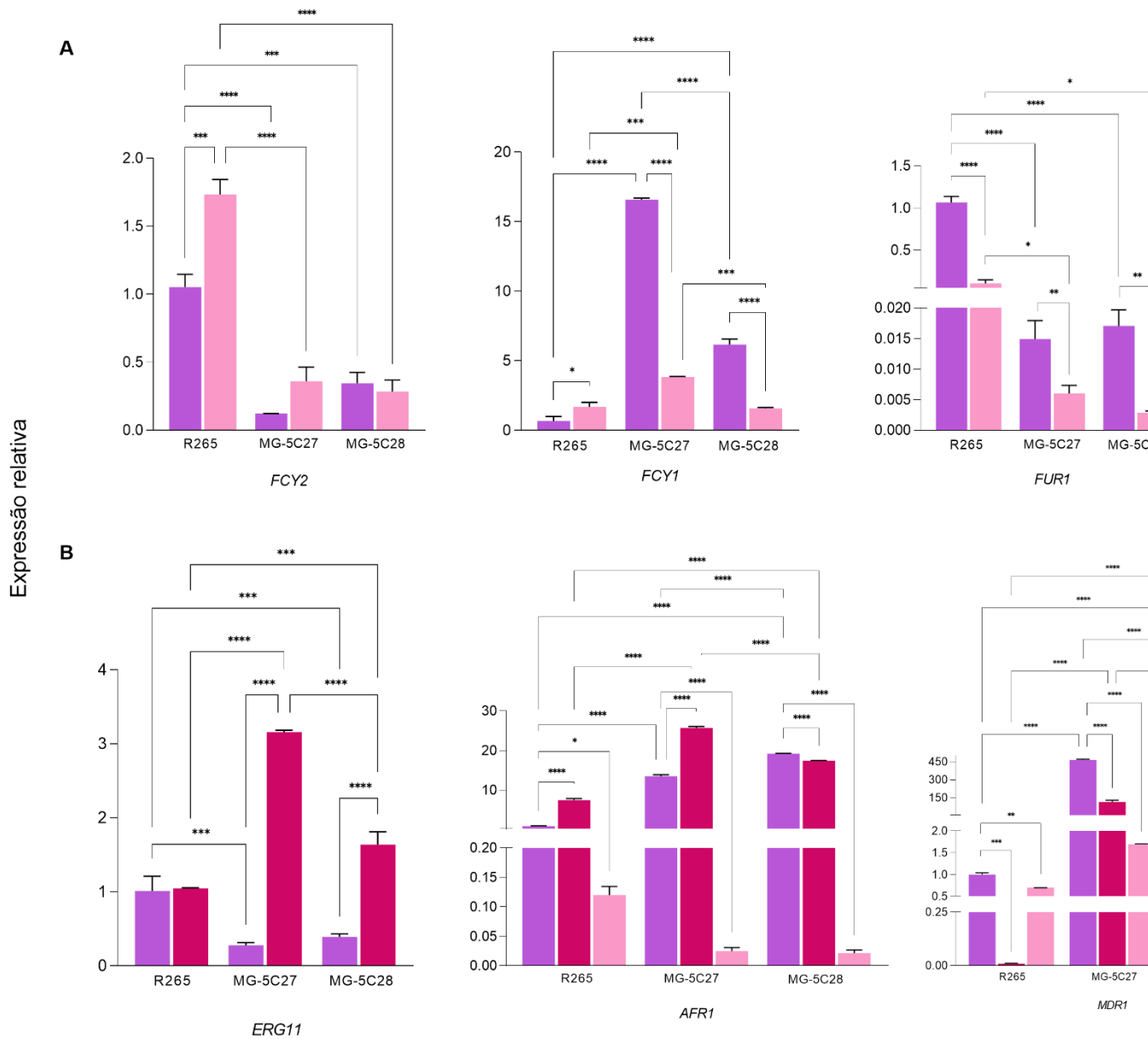
Os isolados resistentes e a linhagem sensível R265 foram cultivados na ausência ou presença de cada antifúngico por 24 horas a 37 °C. A expressão dos genes relacionados à resposta/resistência à 5-FC (A) e a 5-FC e FCZ (B) foi avaliada por qRT-PCR, conforme descrito por Zhang e colaboradores, 2019. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão indicadas por \*, quanto maior o número de \*, maior o nível de significância.

No isolado clínico MG-PC4, todos os genes analisados apresentaram menor expressão em comparação à referência R265, na ausência de exposição aos antifúngicos (Figura 8). Após a exposição aos antifúngicos, a linhagem de referência também apresentou redução na expressão de todos os genes avaliados.

Na figura 8A, observamos que em resposta à 5-FC, o isolado MG-PC4 apresentou aumento na expressão do gene *FCY2* (5,4 vezes o controle) e redução na expressão de *FCY1* (24,4 vezes menor que o controle) e *FURI*, embora a diferença observada em *FURI* não tenha sido estatisticamente significativa. Da mesma forma, na Figura 8B, a exposição de MG-PC4 ao FCZ levou a um aumento significativo na expressão de *AFR1* (sete vezes o controle) e *MDR1* (5.000 vezes o controle), genes que codificam bombas de efluxo. Além disso, ainda sob exposição ao FCZ, a expressão de *ERG11* também aumentou (11,5 vezes o controle), sendo este gene essencial para a biossíntese de ergosterol, componente crítico da membrana de *Cryptococcus*. Em contraste, quando exposto à 5-FC, MG-PC4 apresentou redução na expressão de *AFR1* e *MDR1*.

A expressão desses genes nos isolados clínicos MG-5C27 e MG-5C28 está representada na Figura 10 abaixo.

Figura 9: Perfil de expressão dos genes envolvidos na resistência ao FCZ e 5-FC, nos isolados MG-5C27 e MG-5C28.



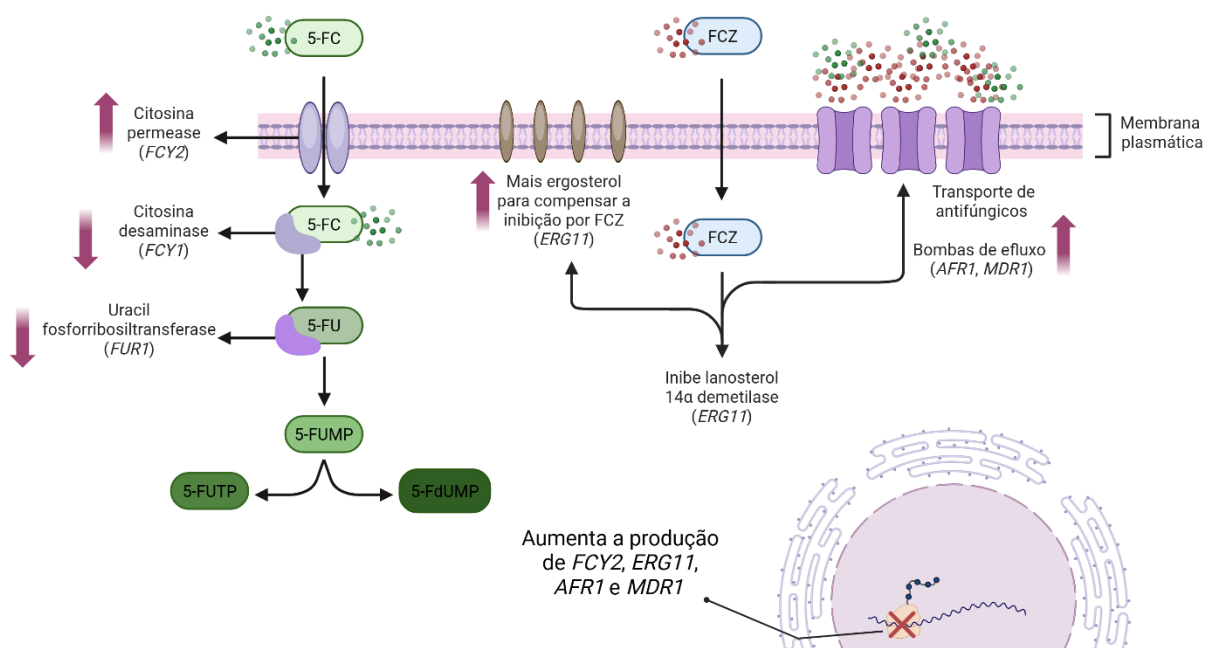
Os isolados resistentes e a linhagem sensível R265 foram cultivados na ausência ou presença de cada antifúngico por 24 horas a 30 °C. A expressão dos genes relacionados à resposta/resistência à 5-FC (A) e a 5-FC e FCZ (B) foi avaliada por qRT-PCR, conforme descrito por Zhang e colaboradores, 2019. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão indicadas por \*, quanto maior o número de \*, maior o nível de significância.

Na linhagem de referência R265, a exposição à 5-FC resultou em redução da expressão dos genes *FUR1*, *AFR1* e *MDR1*, com aumento da expressão de *FCY2* e *FCY1*. Sob exposição ao FCZ, R265 apresentou aumento na expressão de *AFR1*, redução de *MDR1* e manutenção dos níveis de *ERG11*.

Na Figura 9A, observamos que o isolado MG-5C27, quando exposto à 5-FC, apresentou aumento na expressão de *FCY2* e redução de *FCY1* (quatro vezes menor que o controle) e *FUR1* (2,5 vezes menor que o controle), seguindo um padrão semelhante ao observado para MG-PC4, embora a alteração em *FCY2* não tenha sido estatisticamente significativa. O isolado MG-5C28 apresentou redução na expressão de todos os genes analisados, sendo que *FCY2* também não mostrou diferença significativa.

Na Figura 9B, sob exposição ao FCZ, MG-5C27 apresentou aumento na expressão de *AFR1* (duas vezes o controle) e *ERG11* (11 vezes o controle), enquanto a expressão de *MDR1* diminuiu (quatro vezes menor que o controle). Já quando exposto à 5-FC, o isolado apresentou redução na expressão dos genes que codificam bombas de efluxo. O isolado MG-5C28 apresentou redução na expressão desses genes tanto sob exposição ao FCZ quanto à 5-FC. Ao FCZ houve leve diminuição na expressão de *AFR1* e *MDR1* (aproximadamente uma vez menor que o controle) e aumento na expressão de *ERG11* (quatro vezes o controle). Já sob exposição à 5-FC, *AFR1* e *MDR1* apresentaram redução de expressão.

Um modelo proposto que sintetiza e generaliza esses resultados é apresentado na Figura 10, ilustrando a possível compensação gênica nos isolados clínicos resistentes de *C. gattii*.  
 Figura 10: Representação geral esquemática proposta das respostas gênicas observadas frente à 5-flucitosina e ao fluconazol em isolados resistentes de *Cryptococcus gattii*.



Sentido das setas indicam mais ou menos expressão do gene em parênteses. Abreviações: Flucitosina (5-FC); Anfotericina B (AMB); Fluconazol (FCZ); 5-fluorouracil (5-FU); 5-fluorouridina (5-FUMP); 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (5-FdUMP); 5-fluorouridina-5'-trifosfato (5-FUTP).

#### 5.4 Evolução clínica dos pacientes

Buscando compreender as implicações clínicas e suas possíveis correlações com os resultados obtidos neste estudo, foi avaliada a intervenção medicamentosa e a presença de coinfeções nos pacientes 1 e 17, de onde se originaram os isolados considerados resistentes.

A Figura 11 apresenta o resumo da evolução clínica do Paciente 1, origem do isolado MG-PC4. Esse paciente apresentava histórico de hipertensão arterial e pré-diabetes, além de ter sido anteriormente hospitalizado por COVID-19 complicada por pneumonia bacteriana, cerca de dois meses antes do diagnóstico de neurocriptococose (março e abril de 2022). Durante essa internação inicial, recebeu tratamento com cinco antibióticos de amplo espectro, tanto terapêuticos quanto preventivos, como o tazocin, meropenem, clindamicina, bactrim e a penicilina cristalina. Nesse período, o paciente apresentou complicações respiratórias e foi investigado para possíveis infecções oportunistas, com suspeita inicial de neurocriptococose. No entanto, os testes realizados foram negativos para tuberculose, criptococose e sífilis, mas confirmaram infecção por HIV.

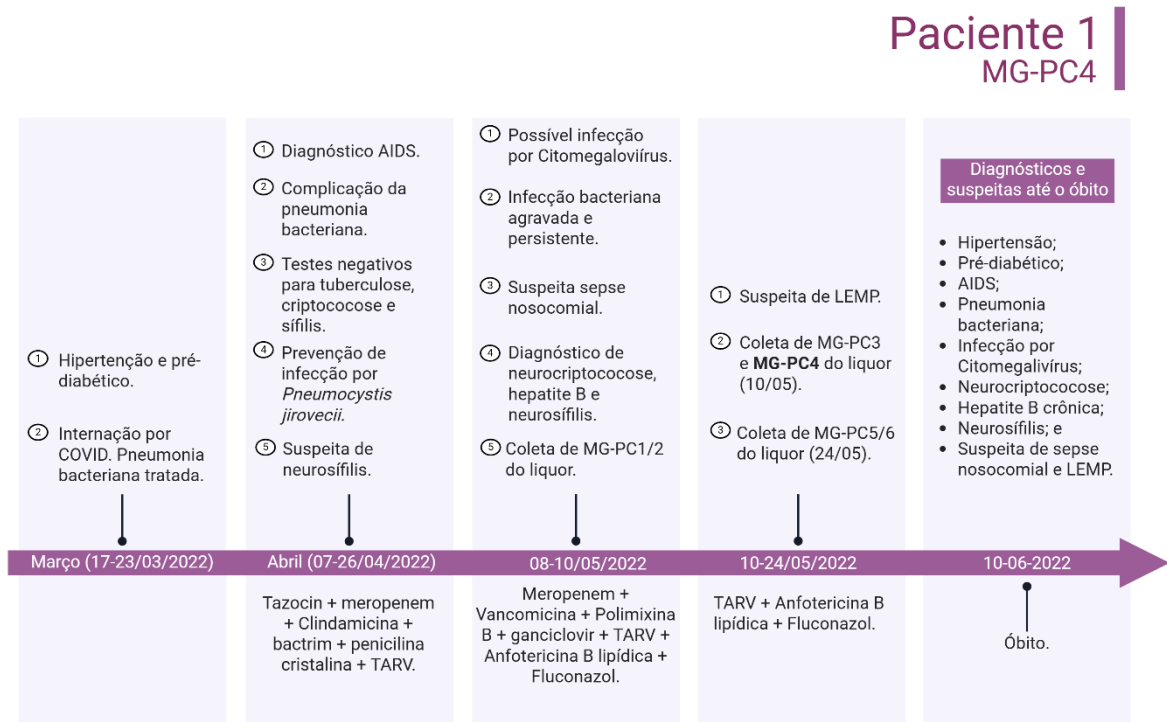
Após esse período de dois meses, o paciente permaneceu hospitalizado e manteve quadro de complicações respiratórias, agora com suspeita de infecção bacteriana resistente e infecção por citomegalovírus. Nessa nova investigação, ele obteve resultados positivos e foi diagnosticado com neurocriptococose, hepatite B e neurosífilis, além de suspeita clínica de sepse nosocomial.

Portanto, foi iniciada um tratamento combinado com múltiplos antibióticos, antifúngicos de indução e antirretrovirais, incluindo meropenem, vancomicina, polimixina B, ganciclovir, anfotericina B lipídica, fluconazol e TARV (Terapia Antirretroviral).

Ainda nesse terceiro mês de evolução, surgiu a suspeita de LEMP (Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva). Foi nesse contexto que ocorreu a coleta do isolado clínico MG-PC4, obtido a partir do líquido do paciente em maio, quando já apresentava quadro avançado de infecção e manifestações neurológicas.

Na sequência, o paciente concluiu o uso de antibióticos e permaneceu com o tratamento antifúngico, ainda na fase de indução, com anfotericina B associada com o fluconazol. Devido ao uso simultâneo e prolongado de múltiplos fármacos por mais de dois meses e à gravidade do quadro clínico, o paciente ficou internado sob observação até junho, quando evoluiu para óbito.

Figura 11: Resumo da evolução clínica do paciente 1, com ênfase nos diagnósticos e tratamentos realizados.



O isolado MG-PC4 está em negrito, indicando o ponto de coleta no tempo cronológico do caso. AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida; LEMP: Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva. TARV: Terapia Antirretroviral.

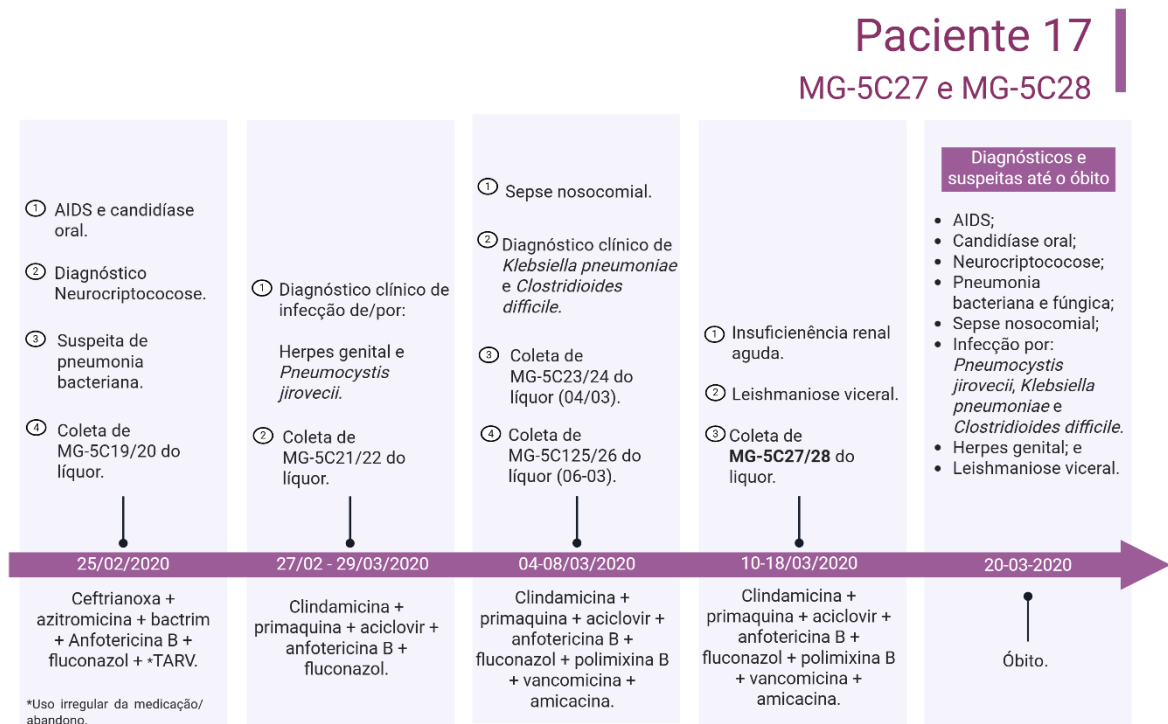
A Figura 12 apresenta o resumo da evolução clínica do Paciente 17, origem dos isolados MG-5C27 e MG-5C28. Esse paciente foi internado em fevereiro com diagnóstico de AIDS e candidíase oral, já apresentando quadro clínico sugestivo de neurocriptococose e suspeita de pneumonia bacteriana. Durante o período de internação, o paciente evoluiu com o diagnóstico de sepse nosocomial e herpes genital, além de desenvolver múltiplas infecções oportunistas, incluindo *Pneumocystis jirovecii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridioides difficile* e *Leishmania*.

O curso clínico teve um uso sucessivo e sobreposto de diversos esquemas terapêuticos. Inicialmente, o tratamento incluiu anfotericina B lipídica e fluconazol para a neurocriptococose, ainda na fase de indução, associados a ceftriaxona, azitromicina e bactrim. Nesse período, o uso da TARV foi interrompido.

Devido a persistência de infecções e da necessidade de ajustes terapêuticos, novos fármacos foram introduzidos, incluindo clindamicina, primaquina, aciclovir, polimixina B, vancomicina, amicacina, além da manutenção de anfotericina B e fluconazol.

Apesar das tentativas de controle das infecções, o paciente evoluiu para óbito ao final do segundo mês de internação. As frequentes trocas e sobreposições de tratamento indicam um quadro clínico de manutenção complexa, caracterizado por infecções recorrentes e uso prolongado de múltiplos esquemas antimicrobianos.

Figura 12: Resumo da evolução clínica do paciente 17, com ênfase nos diagnósticos e tratamentos realizados.

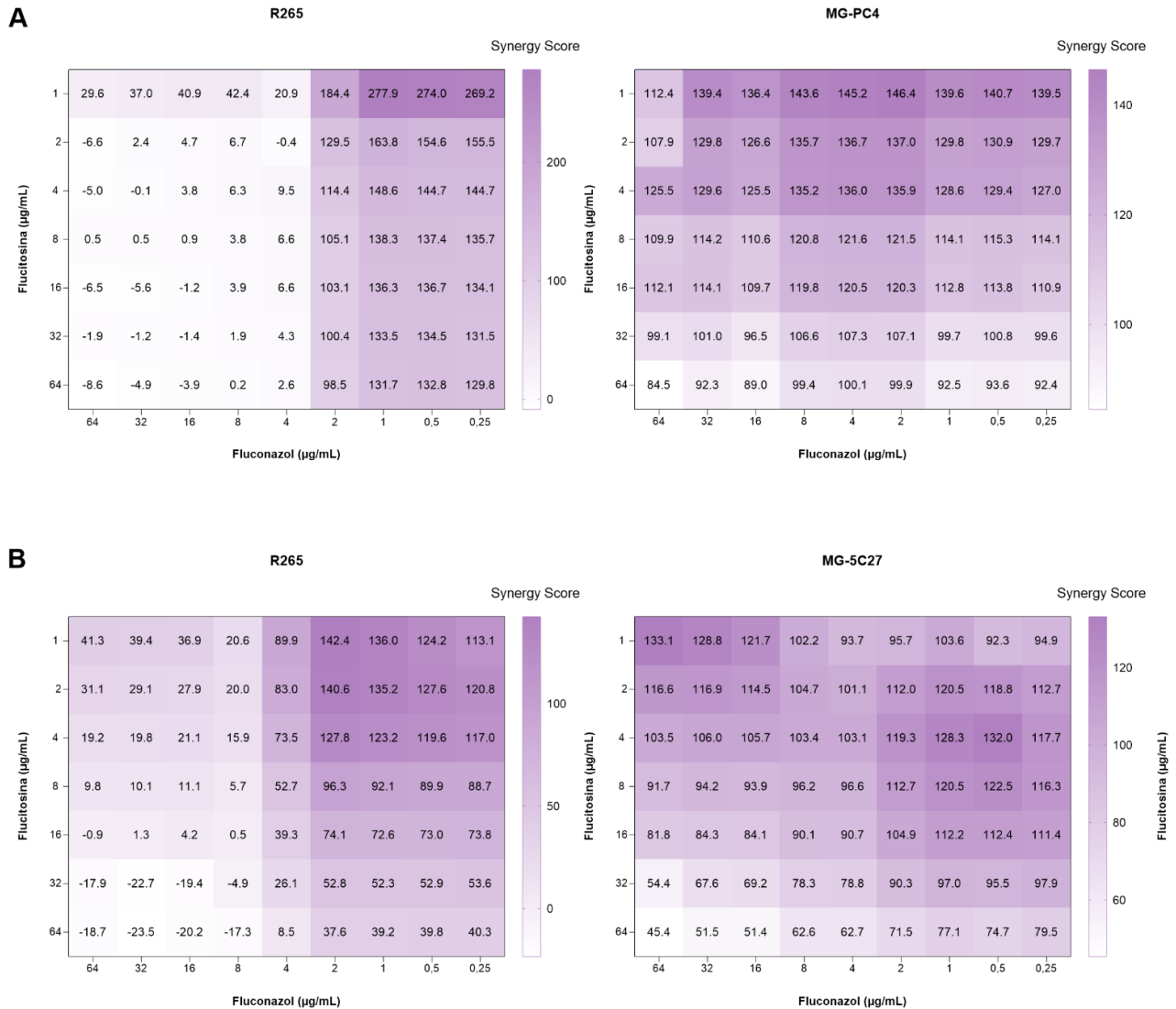


Os isolados MG-5C27/28 está em negrito, indicando o ponto de coleta no tempo cronológico do caso. AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida; TARV: Terapia Antirretroviral.

### 5.5 Sinergismo da combinação fluconazol e 5-flucitosina

A partir do comportamento dos vetores observado na Figura 7 e o observado clinicamente, partimos para a investigação dos isolados frente a combinação de diferentes concentrações de FCZ e 5-FC, para avaliar se há sinergismo entre esses antifúngicos (Figura 13), para os isolados resistentes.

Figura 13: Sinergismo da combinação de fluconazol com 5-flucitosina.



Coloração mais próxima do roxo indica sinergismo, mais distantes de roxo indicam antagonismo. A. Linhagem controle R265 e o isolado MG-PC4, a 37 °C. B. R265 e os isolados MG-5C27 e MG-5C28 a 30 °C. Gráficos foram gerados a partir dos valores de ZIP *score* de sinergismo gerados pela plataforma *SynergyFinder* 3.0.

De acordo com a Figura 13A, o isolado MG-PC4 apresenta uma leve interação sinérgica entre FCZ e 5-FC, evidenciada pela distribuição homogênea dos valores obtidos. Já o controle R265 (37°C) apresenta um sinergismo mais evidente nas concentrações mais baixas de fluconazol (0,25-2 µg/mL), enquanto as concentrações mais altas de ambos os antifúngicos indicam um possível efeito antagônico.

Na Figura 13B, o isolado MG-5C27 tem um comportamento semelhante, com um leve sinergismo distribuído de forma homogênea, embora com valores um pouco mais altos concentrados nas combinações entre baixas doses de FCZ (0,25-2 µg/mL) e intermediárias de

5-FC (2-8 µg/mL). Além disso, também é possível observar sinergismo quando 5-FC está em concentrações menores (1-2 µg/mL) associada a concentrações mais altas de FCZ (16-64 µg/mL). O controle R265 (30 °C) apresenta comportamento semelhante ao observado a 37 °C, ainda com perfil sinérgico embora os valores mais altos dos dois antifúngicos sugiram um leve antagonismo. Por fim, o isolado MG-5C28 demonstra um padrão oposto ao do controle, caracterizado por um sinergismo mais evidente nas combinações que envolvem baixas concentrações de 5-FC (1-8 µg/mL) associadas a altas de FCZ (8-64 µg/mL). O antagonismo, por outro lado, aparece quando ambos os antifúngicos estão em concentrações elevadas.

## 6. DISCUSSÃO

A criptococose ainda é considerada uma doença negligenciada. Mesmo com o aumento do interesse desde que foi incluída na lista de patógenos prioritários da OMS, os estudos abordando isolados fúngicos de pacientes, avaliando dados clínicos e experimentais, ainda são escassos (Duarte & Rodrigues, 2024). Essas pesquisas são fundamentais para ampliar a compreensão da doença em seus diferentes aspectos, abordando dados de epidemiologia, patogenia e virulência, além de aprofundar o entendimento sobre os mecanismos de resistência antifúngica e a interação entre o fungo e o hospedeiro, especialmente em isolados clínicos que evidenciam de forma mais direta essa relação. Portanto, os resultados obtidos neste estudo foram avaliados considerando os ensaios realizados em laboratório e buscando associar os achados à condição clínica dos pacientes de onde os isolados se originaram.

Na literatura, a espécie *C. neoformans* é relatada como o principal agente da criptococose, o que está de acordo com os achados neste estudo, em que a maior parte dos isolados clínicos correspondia a esta espécie (Baddley et al., 2021). Embora apenas três pacientes, entre os 40 avaliados, tenham apresentado infecção por *C. neoformans* e *C. gattii*, é importante considerar que as coletas foram realizadas em momentos distintos e podem não representar a mesma população. Portanto, é possível que outros pacientes também tenham sido infectados por ambas as espécies. A coinfeção é rara, mas já foi descrita, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, como pessoas vivendo com HIV (Alves et al., 2022; Rajasingham et al., 2022b).

Os pacientes com neurocriptococose incluídos neste estudo apresentavam infecção por HIV e diversas outras coinfeções bacterianas, fúngicas e parasitárias, refletindo a complexidade clínica típica de indivíduos imunocomprometidos. Para esta análise, foram selecionados isolados clínicos de *C. gattii* resistentes a FCZ e 5-FC, antifúngicos que

constituem a base do tratamento da criptococose, sendo então considerados com um perfil de resistência de relevância clínica e microbiológica significativa (Ministério da Saúde, 2024; WHO, 2018).

A análise por PCA revelou que os isolados MG-PC4, MG-5C27 e MG-5C28 se encontravam dentro de clusters, mas fora das elipses de 95% de confiança, indicando que apresentavam um perfil distinto em relação aos outros isolados. A literatura indica que fatores como temperatura ambiental, disponibilidade de nutrientes e pH podem influenciar a susceptibilidade de *Cryptococcus* spp., no entanto, a variável temperatura, representada no PCA, não explicou grande parte da variabilidade nos valores de CIM entre 30 °C e 37 °C. Já o comportamento antifúngico mostrou diferenças claras (Bastos et al., 2018; Carlson et al., 2021; Momin et al., 2021). A direção do vetor da AMB em relação aos vetores de FCZ e 5-FC sugere uma correlação negativa entre esses antifúngicos, o que indica que isolados com CIM alto para AMB tendem a apresentar CIM baixo para FCZ e 5-FC e vice-versa. Esse fato pode ser explicado pela ausência de isolados resistente à AMB e presença de resistência à FCZ e 5-FC. Os vetores de FCZ e 5-FC mostraram correlação positiva, indicando que os valores de CIM tendem a variar juntos.

Ao analisar o PCA com os valores de CIM como um todo, biologicamente PC1 pode refletir o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos, enquanto PC2 parece representar a intensidade geral de resistência, funcionando como um gradiente de aumento dos CIM independentemente do antifúngico específico. Esse padrão pode ser explicado a partir dos resultados de expressão gênica, como a seguir.

Os isolados MG-5C27 e MG-5C28 apresentaram expressão basal elevada dos genes *AFR1* e *MDR1*, que codificam bombas de efluxo capazes de reduzir o acúmulo intracelular de azólicos e pirimidinas. Desse modo, mesmo quando sua expressão diminui após a exposição direta aos antifúngicos, essas bombas ainda podem contribuir para o fenótipo de resistência, refletido nos elevados valores de CIM para FCZ e 5-FC. A análise combinada de FCZ e 5-FC revelou sinergismo em todos os isolados, sendo mais evidente em MG-5C28 e discreto em MG-PC4 e MG-5C27, possivelmente devido à resistência cruzada. Sugerimos que durante a exposição à 5-FC redução na expressão das bombas pode ter sido compensada pelo aumento de *AFR1* induzido pelo FCZ, indicando uma interação entre os dois antifúngicos e sugerindo que o FCZ pode favorecer a resistência intermediária à 5-FC, facilitando a remoção simultânea de ambas as drogas. No isolado MG-PC4, embora a expressão basal fosse menor, houve aumento de *AFR1* após exposição ao FCZ, reforçando o papel das bombas de efluxo no processo de adaptação ao antifúngico. A alta expressão desse gene já foi associada a valores elevados de

CIM de FCZ em *C. neoformans* e mais recentemente em *C. gattii* (M. Chang et al., 2018; Sanguinetti et al., 2006; M. L. Yang et al., 2016). Ao contrário de *AFRI*, a descrição sobre *MDRI*, especialmente em relação à 5-FC, é mais limitada, embora homólogos como *FLRI* tenham sido associados à resistência à 5-FC em *Candida glabrata* e à FCZ em *Saccharomyces cerevisiae* e *C. neoformans* (Melhem, Leite Júnior, et al., 2024; Pais et al., 2016). Apesar de evidências de superexpressão de *MDRI* em isolados de *C. gattii* resistentes ao FCZ, neste estudo a redução de sua expressão sob exposição à 5-FC sugere que esse gene pode não ser o principal determinante da resistência nos isolados analisados. *AFRI* provavelmente atua como a bomba de efluxo principal, enquanto *MDRI* exerce um papel aditivo na manutenção dos antifúngicos, possivelmente refletindo o comportamento observado nos isolados MG-5C27 e MG-5C28 (Basso et al., 2014; M. Chang et al., 2018; Pimenta, 2024).

O gene *ERG11* foi superexpresso nos três isolados quando expostos ao FCZ, o que provavelmente contribuiu para a resistência ao aumentar a produção da enzima da síntese de ergosterol e reduzir a eficácia do antifúngico. Estudos indicam que *ERG11* pode ter expressão naturalmente mais elevada em *C. gattii* do que em *C. neoformans*, embora os dados ainda sejam limitados (Bertout et al., 2023; Carvajal et al., 2023; Gast et al., 2013). O aumento do número de cópias desse gene sugere que os isolados compensam a presença do FCZ, produzindo enzimas suficientes para manter a integridade da membrana celular, mostrando que a resistência não depende apenas do antifúngico, mas também da capacidade do fungo de ajustar sua maquinaria celular frente ao estresse induzido pelo FCZ.

Em relação à 5-FC, o isolado MG-PC4 apresentou expressão basal menor de *FCY2*, *FCY1* e *FURI*, sendo que a exposição à droga aumentou *FCY2*, indicando internalização do antifúngico, enquanto a redução de *FCY1* e *FURI*, que codificam enzimas responsáveis pela ativação intracelular da 5-FC, pode estar associada à resistência observada, limitando a conversão da droga em metabólitos ativos e diminuindo sua eficácia. Os isolados MG-5C27 e MG-5C28 mostraram padrão semelhante, embora com expressão basal mais elevada, sugerindo mecanismos de resistência pré-existent, reforçando a complexidade multifatorial da resistência a este antifúngico.

De forma geral, a resistência à 5-FC pode ser explicada pelo perfil de expressão de *FCY1*, *FCY2* e *FURI*, enquanto a resistência ao FCZ está associada a *AFRI*, *MDRI* e *ERG11*. Esses resultados indicam que os isolados apresentam resistência multifatorial, possivelmente relacionada a alterações cromossômicas induzidas pelo estresse antifúngico, como dissomia ou aneuploidia, que podem modificar o número de cópias de cromossomos específicos, incluindo o cromossomo 1, onde se localizam *ERG11*, *AFRI* e *MDRI*, e o cromossomo 4, com genes

envolvidos na síntese de ergosterol e manutenção da membrana. Dessa forma, a expressão desses genes pode ser amplificada, o que se correlacionaria com o aumento observado nos valores de CIM. (Deng et al., 2023; Moreira et al., 2025; Ngamskulrungrroj et al., 2012; Sionov et al., 2013; Stone et al., 2019).

Todos esses comportamentos, combinados com os valores de CIM, podem estar relacionados à evolução clínica dos pacientes. Nos pacientes 1 e 17, a exposição prolongada a antibióticos pode ter alterado a resposta imunológica, já comprometida por coinfeções, aumentando a suscetibilidade a novas infecções e prolongando a internação (Jiang et al., 2025; Li et al., 2025). Embora não haja evidência direta de que o uso de antibióticos induza resistência à criptococose, essa combinação de fatores pode ter contribuído para a seleção de subpopulações tolerantes e até mesmo resistentes, dificultando a erradicação completa do fungo, reduzindo a eficácia do tratamento e elevando a mortalidade.

Além disso, a possibilidade de novas infecções ou da entrada de populações fúngicas resistentes em pacientes já debilitados pode estar associada à contaminação ambiental, como equipamentos médicos ou superfícies de uso frequente. Nesse contexto de Saúde Única, *Cryptococcus* spp. pode persistir nesses locais, formando biofilmes ou sendo exposto a doses subletais de desinfetantes devido ao uso inadequado, induzindo respostas de estresse e adaptação que favorecem a resistência. Esse fenômeno é consistente com a resistência observada dos isolados à temperatura de 30 °C, sugerindo que a combinação de fatores ambientais e os mecanismos de virulência do fungo podem gerar resistência temporária ou subpopulações heterorresistentes capazes de infectar o paciente durante sua evolução clínica (Ghodsí et al., 2025; Qian et al., 2024). Estudos adicionais focados em variações de temperatura seriam relevantes, especialmente considerando que o perfil da cepa ATCC R265 difere entre 30 °C e 37 °C nos genes analisados.

Os dados também indicam que modificações no microambiente hospedeiro, como exposição prolongada a antimicrobianos e complicações clínicas, também podem ter contribuído para a resistência observada nos isolados coletados em fases tardias da internação. No paciente 1, isolado MG-PC4, não houve aumento significativo do CIM até o óbito, enquanto no paciente 17, isolados MG-5C27/28, os valores elevados de CIM se mantiveram até o óbito. Esses achados sugerem a seleção de subpopulações mais tolerantes sob pressão antifúngica, um padrão consistente com o conceito de curso refratário, em que a erradicação completa do fungo falha mesmo na presença do tratamento adequado.

Os resultados deste estudo destacam a importância da vigilância da suscetibilidade antifúngica em casos de neurocriptococose, principalmente considerando respostas terapêuticas

limitadas em algumas situações. A correlação entre os dados *in vitro* e a evolução clínica dos pacientes destaca a relevância de estratégias que considerem a resistência adquirida, a complexidade multifatorial dos isolados e os múltiplos fatores que podem comprometer a eficácia do tratamento.

## 7. CONCLUSÃO

Esses dados contribuem para a compreensão dos mecanismos de resistência de *C. gattii* à exposição antifúngica e evidenciam a importância da integração entre informações laboratoriais e clínicas no manejo da doença. Os isolados MG-PC4, MG-5C27 e MG-5C28 apresentam um perfil de resistência complexo e multifatorial, reforçando a relevância dos isolados clínicos para desenvolver estratégias de tratamento mais eficazes e no avanço do conhecimento sobre resistência a antifúngicos no Brasil.

## 8. PERSPECTIVAS

Como perspectiva, este estudo aponta várias linhas de investigação futuras. A escassez de informações sobre a ação da 5-FC em *Cryptococcus* spp., especialmente em *C. gattii*, sugere a necessidade de uma exploração mais detalhada, incluindo alterações genômicas e a dinâmica da expressão gênica associada à resistência nessa espécie. Além disso, seria importante avaliar a resposta gênica em diferentes condições ambientais, como variações de temperatura, e em contextos de Saúde Única, considerando a exposição a outros compostos químicos e desinfetantes, principalmente em isolados clínicos que refletem a situação real do paciente. A análise mais aprofundada das interações medicamentosas e dos sinergismos observados também se mostra relevante, pois os resultados podem orientar combinações de antifúngicos otimizadas para o tratamento da criptococose, incluindo estudos *in vivo* que testem se a exposição ao FCZ favorece resistência intermediária à 5-FC, como sugerido pelos dados deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abuhammour, W., & Habte-Gabr, E. (2001). Systemic Antifungal Agents. *The Indian Journal of Pediatrics*, 68(7), 655-668.

Almeida, B e Peres, N. Artigo em preparação - Susceptibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus* spp..

Almeida, B., Santana, I., Silva, D., Bastos, R., Santos, D., Santos, J., Rossato, L., & Peres, N. Artigo submetido. Insights into the epidemiology and therapeutic strategies of tuberculosis and cryptococcosis co-infection worldwide: a systematic review and meta-analysis.

Alves, M. J., et al. (2022). Cryptococcosis in HIV/AIDS patients in northern Brazil: Clinical aspects, molecular types and isolation of agents from environmental samples associated with patients. *Tropical Medicine and International Health*, 27(4), 387–396.

- Antônio Esmerino, L. (2016). Diversidade microbiológica e suscetibilidade em cepas de *Escherichia coli* uropatogênica diagnosticadas em Ponta Grossa, Paraná. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 48(3), 48-54.
- Baddley, J. W., et al. (2021). MSG07: An international cohort study comparing epidemiology and outcomes of patients with *Cryptococcus neoformans* or *Cryptococcus gattii* infections. *Clinical Infectious Diseases*, 73(7), 1133–1141.
- Bahn, Y. S., Sun, S., Heitman, J., & Lin, X. (2020). Microbe profile: *Cryptococcus neoformans* species complex. *Microbiology (United Kingdom)*, 166(9), 797–799.
- Basso, L. R., Gast, C. E., Bruzual, I., & Wong, B. (2014). Identification and properties of plasma membrane azole efflux pumps from the pathogenic fungi *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(5), 1396–1407.
- Bastos, R. W., et al. (2018). Environmental triazole induces cross-resistance to clinical drugs and affects morphophysiology and virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1), 10-1128.
- Benaducci, T., et al. (2016). Virulence of *Cryptococcus* sp. biofilms in vitro and in vivo using *Galleria mellonella* as an alternative model. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 290.
- Bertout, S., et al. (2023). Fluconazole resistance and virulence in in vitro induced-fluconazole resistant strains and in clinical fluconazole resistant strain of *Cryptococcus deuterogattii*. *Pathogens*. 12(6), 758.
- Bibiano Vasconcelos, A., et al. (2023). Diagnóstico molecular de infecções fúngicas negligenciadas: criptococose e pitiose. Repositório UNESP.
- Bongomin, F., Oladele, R. O., Gago, S., Moore, C. B., & Richardson, M. D. (2018). A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. *Mycoses*. 61(5), 290-297.
- Bosco-Borgeat, M. E., Mazza, M., Taverna, C. G., Córdoba, S., Murisengo, O. A., Vivot, W., & Davel, G. (2016). Amino acid substitution in *Cryptococcus neoformans* lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase involved in fluconazole resistance in clinical isolates. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(2), 137–142.
- Boyce, K. J. (2023). The microevolution of antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Microorganisms*. 11(11), 2757.
- Canavari, I. C., Vargas, G. H., Tinucci-Costa, M., & Camplesi, A. C. (2023). Criptococose: revisão de literatura. *Scientific Electronic Archives*, 16(9).
- Carlson, T., Lupinacci, E., Moseley, K., & Chandrasekaran, S. (2021). Effects of environmental factors on sensitivity of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole and amphotericin B. *FEMS Microbiology Letters*, 368(7), 40.
- Carosi, A., Galvão De Souza Lima, A., Ishiwaki, S., De Rezende, D., & Maksymczuk, D. (2017). Neurocriptococose por *Cryptococcus gattii* resistente a fluconazol em imunocompetente fluconazole-resistant neurocriptococosis caused by *Cryptococcus*

- gattii* in immunocompetent individuals: case report. *Rev Soc Bras Clin Med.* 15(2), 124-126.
- Carvajal, S. K., Melendres, J., Escandón, P., & Firacative, C. (2023). Reduced susceptibility to azoles in *Cryptococcus gattii* correlates with the substitution R258L in a substrate recognition site of the lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase. *Microbiology Spectrum*, 11(4).
- Casadevall, A. (2025). Pathogenicity and virulence of *Cryptococcus neoformans* from an environmental perspective. *Virulence*, 16(1), 2547090.
- Casadevall, A., Rosas, A. L., & Nosanchuk, J. D. (2000). Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current opinion in microbiology*, 3(4), 354-358.
- Casadevall, A., Steenbergen, J. N., & Nosanchuk, J. D. (2003). “Ready made” virulence and “dual use” virulence factors in pathogenic environmental fungi - the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 332-337.
- Cavassin, F. B., Baú-Carneiro, J. L., Vilas-Boas, R. R., & Queiroz-Telles, F. (2021). Sixty years of amphotericin B: an overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. *Infectious Diseases and Therapy*. 10(1), 115–147.
- Chang, M., Sionov, E., Lamichhane, A. K., Kwon-Chung, K. J., & Changa, Y. C. (2018). Roles of three *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* efflux pump-coding genes in response to drug treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(4).
- Chang, Y. C., Lamichhane, A. K., Cai, H., Walter, P. J., Bennett, J. E., & Kwon-Chung, K. J. (2021). Moderate levels of 5-fluorocytosine cause the emergence of high frequency resistance in cryptococci. *Nature Communications*. 12(1), 3418.
- CLSI. (2017). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Method for Broth Dilution antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition, 2008.
- Cota, G. J., & Freitas, D. E. (2022). A biologia de *Cryptococcus* spp.: do remodelamento celular e transcricional ao tratamento. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rogers, P. D., & Perlin, D. S. (2015). Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(7).
- Criptococose - Ministério da Saúde*. Retrieved October 4, 2025, from <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/criptococose>
- Cuenca-Estrella, M., Díaz-Guerra, T. M., Mellado, E., & Rodríguez-Tudela, J. L. (2001). Flucytosine primary resistance in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(4), 276-279.
- Dao, A., et al. (2024). Cryptococcosis-a systematic review to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. *Medical Mycology*. 62(6), myae043.

- Delma, F. Z., et al. (2024). Genetic mutations in *Cryptococcus neoformans* pyrimidine salvage pathway enzymes contribute to reduced susceptibility against 5-fluorocytosine. *Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 24.
- Deng, H., Song, J., Huang, Y., Yang, C., Zang, X., Zhou, Y., Li, H., Dai, B., & Xue, X. (2023). Combating increased antifungal drug resistance in *Cryptococcus*, what should we do in the future? : Antifungal drug resistance in *Cryptococcus*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 55(4), 540.
- Denning, D. W. (2024). Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*. 24(7), e428-e438.
- Duarte, I., & Rodrigues, M. L. (2024). Funding for research on cryptococcal disease: an analysis based on the G-finder report. *IMA Fungus 2024 15:1*, 15(1), 1–6.
- Emami, S., Tavangar, P., & Keighobadi, M. (2017). An overview of azoles targeting sterol 14 $\alpha$ -demethylase for antileishmanial therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 135, 241-259.
- EUCAST. 2015. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents*.
- Falci, D. R., & Pasqualotto, A. C. (2015). Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. *Clinical & Biomedical Research*, 35(2), 65–82.
- Florent, M., Noël, T., Ruprich-Robert, G., Da Silva, B., Fitton-Ouhabi, V., Chastin, C., Papon, N., & Chapeland-Leclerc, F. (2009). Nonsense and missense mutations in FCY2 and FCY1 genes are responsible for flucytosine resistance and flucytosine-fluconazole cross-resistance in clinical isolates of *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 2982–2990.
- Freitas, G. J. C. de. (2022). A BIOLOGIA DE *CRYPTOCOCCUS* SPP.: Do remodelamento celular e transcricional ao tratamento. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Freitas, G. J. C., et al. (2022). The dynamics of *Cryptococcus neoformans* cell and transcriptional remodeling during infection. *Cells*, 11(23).
- Gabrielska, J., Gagoś, M., Gubernator, J., & Gruszecki, W. I. (2006). Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes: A 1H NMR study. *FEBS Letters*, 580(11), 2677–2685.
- Gast, C. E., Basso, L. R., Bruzual, I., & Wong, B. (2013). Azole resistance in *Cryptococcus gattii* from the Pacific Northwest: investigation of the role of ERG11. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5478–5485.
- Ghodsi, S., Nikaeen, M., Aboutalebian, S., Mohammadi, R., & Mirhendi, H. (2025). Prevalence of fungi and their antifungal and disinfectant resistance in hospital environments: insights into combating nosocomial mycoses. *Antimicrobial Resistance & Infection Control 2025 14:1*, 14(1), 1–12.

- GOV. (2024). *Criptococose*. <https://www.Gov.Br/Saude/Pt-Br/Assuntos/Saude-de-a-a-z/c/Criptococose>.
- Guia de Vigilância em Saúde* (6th ed., Vol. 3). (2024). [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_6edrev\\_v3.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_6edrev_v3.pdf)
- Iyer, K. R., Revie, N. M., Fu, C., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. *Nature Reviews Microbiology*, 19(7), 454-466.
- Jacobson", E. S., & Tinnell3, S. B. (1993). Antioxidant function of fungal melanin. *Journal of bacteriology*, 175(21), 7102-7104.
- Jiang, Y., Guo, J., Yao, X., Wang, Z., Wang, Y., Xia, R., Zhang, S., Yang, H., & Zou, Y. (2025). The impact of early-life and prolonged antibiotics exposure on 78 common diseases: Evidence from epidemiology. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 91(8), 2437–2446.
- Kidd, S. E., Chen, S. C. A., Meyer, W., & Halliday, C. L. (2020). A new age in molecular diagnostics for invasive fungal disease: are we ready? *Frontiers in Microbiology*, 10, 2903.
- Kidd, S. E., Chow, Y., Mak, S., Bach, P. J., Chen, H., Hingston, A. O., Kronstad, J. W., & Bartlett, K. H. (2007). Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1433–1443.
- Kneale, M., Bartholomew, J. S., Davies, E., & Denning, D. W. (2016). Global access to antifungal therapy and its variable cost. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12), 3599–3606.
- Kwon-Chung, K., Boekhout, T., Fell, Jack., & Diaz, M. (2002). Conservations in *Cryptococcus*. *International Association for Plant Taxonomy (IAPT)*.
- Kwon-Chung, Casadevall, A. et al. (2017). The Case for Adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *MSphere*, 2(1), 10-1128.
- Kwon-Chung, K. J., Fraser, J. A., Doering, T. Á. L., Wang, Z. A., Janbon, G., Idnurm, A., & Bahn, Y. S. (2014). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(7), a019760.
- Lee, Y., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2023). Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. *Antimicrobials and Resistance 2023 1:1*, 1(1), 1–9.
- Levino, A. A. do A., Silva, M. C. C. da, Alves, S. N., Araújo, N. K. de, Moraes, J. do N., Calderon, L. de A., & Corrêa, E. de A. (2024). *Cryptococcus neoformans*: um fungo patogênico oportunista. *OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA*, 22(6), e5314.

- Li, S., Liu, J., Zhang, X., Gu, Q., Wu, Y., Tao, X., Tian, T., Pan, G., & Chu, M. (2025). The potential impact of antibiotic exposure on the microbiome and human health. *Microorganisms* 2025, Vol. 13, Page 602, 13(3), 602.
- Lima, A., Silva, R. C., Silva, L. L., & Silva, L. C. da. *Vista do Criptococose\_ revisão de literatura*.
- Liu, M. Z., Dai, X. H., Zeng, M. T., & Chen, E. Q. (2024). Clinical treatment of cryptococcal meningitis: an evidence-based review on the emerging clinical data. *Journal of Neurology*. 271(6), 2960-2979.
- Maziarz, E. K., & Perfect, J. R. (2016). Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 30(1), 179–206.
- Melhem, M. S. C., et al. (2024). Antifungal resistance in cryptococcal infections. *Pathogens*. 13(2), 128.
- Mendes Giannini, S., et al. (2025). The hidden fortress: a comprehensive review of fungal biofilms with emphasis on *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Fungi* 2025. 11(3), 236.
- Ministério da Saúde. (2021, August 16). Ministério da Saúde incorpora medicamento para meningite criptocócica.
- Ministério da Saúde. (2024). Guia de vigilância em saúde (6th ed.). [www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)
- Molloy, S. F., Kanyama, et al. (2018). Antifungal combinations for treatment of cryptococcal meningitis in Africa. *New England Journal of Medicine*, 378(11), 1004–1017.
- Momin, M., Webb, G., Claudio, C., Renga, G., & Oikonomou, V. (2021). The environmental effects on virulence factors and the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(12), 6302.
- Moreira, I. de M. B., et al. (2025). Fluconazole resistance and heteroresistance in *Cryptococcus* spp.: Mechanisms and Implications. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 58, e00200-2025.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020). *Microbiologia Médica 8a EDIÇÃO*. Ngamskulrungraj, P., Chang, Y., Hansen, B., Bugge, C., Fischer, E., & Kwon-Chung, K. J. (2012). Characterization of the chromosome 4 genes that affect fluconazole-induced disomy formation in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE*, 7(3), e33022.
- Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2003). Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. *Microbiology*. 149(7), 1945-1951.
- Nunes, J. de O., Pillon, K. R. A. P., Bizerra, P. L., Paniago, A. M. M., Mendes, R. P., & Chang, M. R. (2016). The simultaneous occurrence of histoplasmosis and cryptococcal fungemia: a case report and review of the literature. *Mycopathologia*, 181(11–12), 891–897.
- Oliveira, E. A. M. de. (2022). Reposicionamento de fármacos para o tratamento de criptococose. <https://doi.org/10.34019/UFJF/DI/2022/00012>

- Pais, P., Pires, C., Costa, C., Okamoto, M., Chibana, H., & Teixeira, M. C. (2016). Membrane proteomics analysis of the *Candida glabrata* response to 5-flucytosine: Unveiling the role and regulation of the drug efflux transporters CgFlr1 and CgFlr2. *Frontiers in Microbiology*. 7, 2045.
- Perfect, J. R., & Cox, G. M. (1999). Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resistance Updates*, 2(4), 259-269.
- Petrou, A., Fesatidou, M., & Geronikaki, A. (2021). Thiazole ring—a biologically active scaffold. *Molecules*. 26(11), 3166.
- Pimenta, G. R. (2024). Investigação de genes que codificam as bombas de efluxo em biofilmes e células persisteres de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. UNESP.
- Pizani, A. T. (2015). Criptococose em pacientes HIV positivos: Revisão sistemática da literatura. UNIP.
- Qian, W., Lu, J., Gao, C., Liu, Q., Li, Y., Zeng, Q., Zhang, J., Wang, T., & Chen, S. (2024). Deciphering antifungal and antibiofilm mechanisms of isobavachalcone against *Cryptococcus neoformans* through RNA-seq and functional analyses. *Microbial Cell Factories*. 23(1), 107.
- Rajasingham, R., Govender, N. P., Jordan, A., Loyse, A., Shroufi, A., Denning, D. W., Meya, D. B., Chiller, T. M., & Boulware, D. R. (2022). The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 22(12), 1748–1755.
- Ramos, K. B. (2015). Variação fenotípica e genotípica de isolados do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/gattii*: revisão de literatura. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/174870>
- Regalla, D., VanNatta, M., Alam, M., & Malek, A. E. (2022). COVID-19-associated *Cryptococcus* infection (CACI): a review of literature and clinical pearls. *Infection*. 50(4), 1007–1012.
- Ristowi, L. C., & Davisi, J. M. (2021). The granuloma in cryptococcal disease. *PLOS Pathogens*. 17(3), e1009342.
- Roemer, T., & Krysan, D. J. (2014). Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 4(5), a019703.
- Rosas, Á. L., MacGill, R. S., Nosanchuk, J. D., Kozel, T. R., & Casadevall, A. (2002). Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9(1), 144–148.
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., La Sorda, M., Torelli, R., Fiori, B., Santangelo, R., Delogu, G., & Fadda, G. (2006). Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo

response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 74(2), 1352–1359.

- Saritha, C., Rajana, V. K., Choudhary, K., Vairagar, A., Mishra, A., Penumaka, S. M., Jain, S., Dande, A., Naresh, P., Kumar, N., Ramalingam, P., & Mandal, D. (2025). Highly selective ergosterol binding and impaired redox balance leads to improved antileishmanial efficacy for amphotericin b synthesized silver nanoparticles with reduced toxicity– In vitro and in vivo studies. *Free Radical Biology and Medicine*. 235, 405–425.
- Setianingrum, F., Rautemaa-Richardson, R., & Denning, D. W. (2019). Pulmonary cryptococcosis: A review of pathobiology and clinical aspects. *Medical Mycology*. 57(2), 133–150.
- Severo, C. B., Gazzoni, A. F., & Severo, L. C. (2009). Capítulo 3: criptococose pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 35(11), 1136–1144.
- Silva, D. L., Peres, N. T. A., & Santos, D. A. (2025). Key fungal coinfections: epidemiology, mechanisms of pathogenesis, and beyond. *MBio*. 16(5), e00562-25.
- Silveira, M. B., Moura, A. M. de, Sousa, I. C. de S., & Rezende, H. H. A. (2018). Diagnóstico laboratorial de criptococose em indivíduos imunodeprimidos. *Saúde & Ciência em Ação*. 4(1), 103-116.
- Sionov, E., Chang, Y. C., & Kwon-Chung, K. J. (2013). Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57(10), 5127–5130.
- Stone, N. R. H., et al. (2019). Dynamic ploidy changes drive fluconazole resistance in human cryptococcal meningitis. *The Journal of Clinical Investigation*. 129(3), 999-1014.
- Subramani, A., Griggs, P., Frantzen, N., Mendez, J., Tucker, J., Murriel, J., Sircy, L. M., Millican, G. E., McClelland, E. E., Seipelt-Thiemann, R. L., & Nelson, D. E. (2020). Intracellular *Cryptococcus neoformans* disrupts the transcriptome profile of M1- and M2-polarized host macrophages. *PLOS ONE*, 15(8), e0233818.
- Suresh, C., Ninan, M., Zachariah, A., & Michael, J. (2021). Cryptococcosis with tuberculosis: Overlooked coinfections. *Journal of Global Infectious Diseases*. 13(3), 139–141.
- Tan, C., Wu, A., & Li, C. (2025). Forty years of global research on WHO's four critical priority fungal pathogens: advances and prospects. *Journal of Infection and Public Health*. 18(11), 102947.
- Torres, I., Gallo, J. E., Gómez, O. M., Rúa-Giraldo, Á., McEwen, J. G., & García, A. M. (2022). Gene expression profiles of ERG11, MDR1 and AFR1 in *Cryptococcus neoformans* var. *grubbi* from HIV patients. *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*. 42(4), 697–706.

- Van Duin, D., Casadevall, A., & Nosanchuk, J. D. (2002). Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(11), 3394–3400.
- Veronesi, & Focaccia. (2015). Veronesi: tratado de infectologia (R. Focaccia, Ed.; 5th ed.).
- Vu, K., Tham, R., Uhrig, J. P., Thompson, G. R., Na Pombejra, S., Jamklang, M., Bautos, J. M., & Gelli, A. (2014). Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. *MBio*. *5*(3), 10-1128.
- WHO. (2018). The diagnosis, prevention and management of cryptococcal disease in HIV-infected adults, adolescents and children supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. World Health Organization. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/260399/9789241550277-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- WHO. (2022). WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. World Health Organization.
- Winski, C. J., Qian, Y., Mobashery, S., & Santiago-Tirado, F. H. (2022). An atypical ABC transporter is involved in antifungal resistance and host interactions in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mbio*. *13*(4), e01539-22.
- Yadav, B., Wennerberg, K., Aittokallio, T., & Tang, J. (2015). Searching for drug synergy in complex dose–response landscapes using an interaction potency model. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. *13*, 504–513.
- Yang, C., Huang, Y., Zhou, Y., Zang, X., Deng, H., Liu, Y., Shen, D., & Xue, X. (2022). *Cryptococcus* escapes host immunity: What do we know? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. *12*, 1041036.
- Yang, M. L., Uhrig, J., Vu, K., Singapuri, A., Dennis, M., Gelli, A., & Thompson, G. R. (2016). Fluconazole susceptibility in *Cryptococcus gattii* is dependent on the ABC transporter Pdr11. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(3), 1202–1207.
- Zaragoza, O. (2019). Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. *Virulence*. *10*(1), 490–501.
- Zhang, L., Fang, W. J., Zhang, K. M., Jiang, W. W., Chen, M., Liao, W. Q., & Pan, W. H. (2019). Long noncoding RNA expression profile from cryptococcal meningitis patients identifies DPY19L1p1 as a new disease marker. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. *25*(6), 772-782.
- Zhao, Y., Ye, L., Zhao, F., Zhang, L., Lu, Z., Chu, T., Wang, S., Liu, Z., Sun, Y., Chen, M., Liao, G., Ding, C., Xu, Y., Liao, W., & Wang, L. (2023). *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. *Infectious Diseases of Poverty*. *12*(02), 1-18.