

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Livia Mara Vitorino da Silva

**INFLUÊNCIA DE ANTIBACTERIANOS NA MORFOFISIOLOGIA E  
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE *CRYPTOCOCCUS GATTII* E  
*CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS***

Belo Horizonte

2023

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Lívia Mara Vitorino da Silva

**INFLUÊNCIA DE ANTIBACTERIANOS NA MORFOFISIOLOGIA E  
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE *CRYPTOCOCCUS GATTII* E  
*CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia).

**Orientador:** Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

**Co-orientador:** Dr. Gustavo José Cota de Freitas

Belo Horizonte

2023

043

Silva, Livia Mara Vitorino da.

Influência de antibacterianos na morfofisiologia e susceptibilidade a antifúngicos de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* [manuscrito] / Livia Mara Vitorino da Silva. – 2023.

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos. Co-orientador: Dr. Gustavo José Cota de Freitas.

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

1. Microbiologia. 2. Antibacterianos. 3. Antifúngicos. 4. Criptococose. 5. Gentamicinas. I. Santos, Daniel de Assis. II. Freitas, Gustavo José Cota de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



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

### ATA DE DEFESA DE TESE

#### ATA DA DEFESA DE TESE DE LIVIA MARA VITORINO DA SILVA

Nº REGISTRO: 2019709265

Às 14:00 horas do dia **26 de junho de 2023**, reuniu-se presencialmente no Instituto de Ciências Biológicas - UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Elisabeth Neumann (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Douglas Boniek Silva Navarro (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG), Rachel Basques Caligiorne (Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte), Camila Rodrigues de Carvalho (CPqRR - FIOCRUZ), Prof. Dr. Daniel de Assis Santos (Orientador) e o Dr. Gustavo José Cota de Freitas (Coorientador), para julgar o trabalho final "**Influência de antibacterianos na morfofisiologia e susceptibilidade a antifúngicos de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans***" da aluna **Livia Mara Vitorino da Silva**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Daniel de Assis Santos, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à 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 e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 26 de junho de 2023

Membros da Banca:

Profa. Dra. Elisabeth Neumann

Dr. Douglas Boniek Silva Navarro

Profa. Dra. Rachel Basques Caligiorne

Dra. Camila Rodrigues de Carvalho

De acordo:

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

(Orientador)

Dr. Gustavo José Cota de Freitas  
(Coorientador)

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes  
(Subcoordenador do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Elisabeth Neumann, Professora do Magistério Superior**, em 27/06/2023, às 12:30, 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 **Caio Tavares Fagundes, Professor do Magistério Superior**, em 27/06/2023, às 13:09, 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 **Gustavo José Cota de Freitas, Técnico de Laboratório**, em 27/06/2023, às 13:23, 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 27/06/2023, às 13:40, 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 **Douglas Boniek Silva Navarro, Professor Magistério Superior-Substituto**, em 27/06/2023, às 15:47, 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 **Rachel Basques Caligorne, Usuário Externo**, em 03/07/2023, 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 **Camila Rodrigues de Carvalho, Usuária Externa**, em 04/07/2023, às 09:51, 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 **2419761** e o código CRC **BFE957B0**.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Daniel, por ter aceitado me orientar mesmo eu sendo de uma área distinta. Pelo companheirismo, respeito e principalmente pela paciência durante esses quatro anos. Por não ter permitido que houvesse desistência de minha parte diante das dificuldades encontradas, pelos momentos de descontração, pela acessibilidade mesmo estando em outro país. Sempre preocupou com o bem estar dos seus alunos, inclusive o meu. Um profissional que conquistou o seu espaço, sabendo ministra-lo com maestria e formando profissionais de excelência, espero me tornar assim ao final dessa jornada.

Ao Gustavo (Gu), pela amizade, pela atenção, puxões de orelhas, pelos momentos de alegrias, risadas, desabafos, encontros fora da UFMG. Desde o início do meu doutorado sempre me auxiliou na condução dos experimentos e, tornou se meu co-orientador, mostrando toda a sua competência e profissionalismo. Um jovem que conquistou o seu lugar na ciência com muito brilhantismo. O Laboratório de Micologia é um dos melhores do departamento de microbiologia é graças a pessoas como você, Gu! Saiba que este parágrafo é apenas uma concentração inibitória mínima da admiração que sinto por você. Torço muito pelas suas conquistas e tenho certeza que o seu desejo mais precioso será realizado em breve, falta muito pouco!

As minhas meninas do LEFM, babyzinha, vulgo Karenzinha e Gabizinha, que desde o início me acolheram, passamos por muitos momentos também e no final vocês brilharam, sempre acreditaram em mim, mesmo que em muitos momentos eu duvidei que conseguisse. Vocês são exemplos de mulheres nesse mundo cheio de supérfluos. Exemplo de inteligência, beleza, amizade, companheirismo, fortes e marcantes! Adoro muito vocês! E claro ao César, por sempre ser atencioso, amigo, engraçado, super inteligente e de um companheirismo sem igual, obrigada por tudo que fez por mim.

A Professora Nalu, Professora Cidinha e Professor Ary, pelo carinho, respeito, ensinamentos, parceria, risadas, café, compreensão, deixando o laboratório um ambiente ainda melhor para executar todas as atividades necessárias. Sempre estarão no meu coração.

Ao Douglas, pela amizade durante todo o meu doutorado, uma pessoa super compreensiva que sempre me ouviu quando eu precisei. Tenho muita admiração pelo seu trabalho e sei que você é magnífico! Torço muito pelo seu sucesso e sei que o melhor está por vir, afinal você é brilhante! Conte sempre comigo!

A Professora Beth, do LEFM, que sempre foi muito atenciosa comigo e acreditou no meu potencial. Obrigada pela oportunidade de está ao seu lado no treinamento didático e por confiar em mim para auxiliar os alunos. Pelo companheirismo e pelas experiências compartilhadas.

Ao pessoal do Laboratório de Micologia, que desde a minha entrada sempre me auxiliaram, especialmente a Elúzia que me ensinou com muita presteza e carinho, várias técnicas com os camundongos, sempre me ofereceu ajuda quando precisei me deixar em casa várias vezes. Sempre muito carinhosa e atenciosa, sinto saudades! Espero que tudo esteja bem! A Lud que sempre confiou em mim para ajuda la nos experimentos, torço muito que você tenha sucesso na sua carreira, principalmente agora no Pós doutorado. Ao Victor, por toda disponibilidade em me ajudar com os experimentos, espero que você seja muito feliz que a sua defesa de tese seja um sucesso!

A Queila, que também sempre me ajudou nos experimentos, uma mulher maravilhosa, doce, inteligente e que tem tudo para brilhar nessa jornada, também torço muito por você! Sei que será brilhante na sua trajetória acadêmica. A Bruna, a melhor IC que esse ICB já teve e foi para o lugar certo! Uma menina, super carinhosa, atenciosa, preocupada e sempre se dispôs a ajudar a todos no laboratório. Tenho certeza que será maravilhosa sua jornada no laboratório, conte sempre comigo!

Ao restante do grupo, como a Geise que sempre foi muito atenciosa e prestativa com todos. Uma mulher inteligentíssima, organizada e dedicadíssima. Tudo vai da certo para você! As demais meninas, Martha e Isabella, que estão sempre dispostas a colaborar e que já carregam uma bagagem de conhecimento e técnica com muita qualidade, sejam muito felizes! Aos meninos, Lucas e Thiago, por também sempre estarem dispostos a ajudar! A Vanessa, Carol e a Bia, pela educação e gentileza. Espero de coração que todos vocês sejam muito felizes!

A Dani, pelas conversas e incentivo de sempre seguir em frente por mais difícil que fosse. Uma pesquisadora maravilhosa que também leva o nome do laboratório com muita maestria para as palestras e aulas. Estarei sempre na torcida pelo seu sucesso! E a Sylvinha, que sempre me tratou muito bem, torço muito por você!

A mamãe, que nunca mediu esforços para me apoiar e acreditar em mim, mesmo que em vários momentos demonstrei desânimo, não têm palavras para descrever o amor que sinto por você! Essa conquista é sua também! Te amo demais! Bem como, os meus irmãos que também sempre me ajudaram em toda a minha jornada acadêmica. Amo vocês!

Dedico este trabalho também a minha Tia Ró (*in memoriam*) que sempre acompanhou o meu crescimento e tenho certeza que se estivesse aqui estaria muito feliz, sinto saudades ainda é muito difícil suportar a sua ausência. Sempre te amarei e obrigada por tudo!

Aos meus amigos, Gina, Mari, Julien, Idael, Rody, Júlia, Ana Cláudia, Xande e Gabriel que apesar da correria, sempre torceram por mim. Muito obrigada, por todos esses anos de amizade!

A banca avaliadora, Professora Beth, Douglas, Camila, Raquel, Dani e Silvinha por terem aceitado o convite de me avaliar e por contribuírem ainda mais para o meu crescimento profissional.

Por fim, ao CNPq pela concessão da bolsa, a UFMG por fornecer os equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Ao povo brasileiro, que confiou na ciência e que também foram responsáveis pelo financiamento dos meus estudos desde os meus tempos de iniciação científica até a conclusão do doutorado.

Muito obrigada!

*“Lamentar uma dor passada, no presente, é criar outra dor novamente”.*

**Willian Shakespeare**

## RESUMO

A criptococose é uma micose invasiva que envolve dois principais agentes etiológicos, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. A doença afeta primordialmente os pulmões, causando uma pneumonia, que pode evoluir para uma meningoencefalite. A anfotericina B e o Fluconazol são os antifúngicos indicados para o tratamento dessa infecção, porém, um agravante é que, por muitas vezes, pacientes com criptococose são também expostos a agentes antibacterianos, seja para tratamento empírico de pneumonias e meningites ou para tratamento de coinfeções bacterianas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de antibacterianos na morfofisiologia e susceptibilidade aos antifúngicos de *C. neoformans* e *C. gattii*. Para isso foram utilizados os antibacterianos: amoxicilina (AMO), amoxicilina + clavulanato (AMO + CLAV), ceftriaxona (CRO) e gentamicina (GEN). Inicialmente, foram observados que os antibacterianos não foram capazes de inibir o crescimento fúngico, exceto a gentamicina, que exibiu valores de CIM entre 32-256µg/ml. Em seguida, foram avaliados se a combinação de antibacterianos poderia resultar em alguma interação com antifúngicos clínicos e se a exposição a antibacterianos poderia interferir na susceptibilidade a antifúngicos. Observou-se que a combinação entre os fármacos resultou em uma interação indiferente e a exposição aos antibacterianos não foi capaz de selecionar subpopulações de *Cryptococcus* menos ou mais susceptíveis aos antifúngicos. Além disso, foi observado que a AMO e CRO apresentaram efeito fungistático em *Cryptococcus* e reduziram a síntese de melanina e cápsula polissacarídica na célula fúngica. A gentamicina, por sua vez, apresentou efeito fungicida associado ao aumento de espécies reativas de oxigênio, redução no conteúdo de ergosterol e síntese de melanina. Por fim, foram avaliados se os antibacterianos poderiam apresentar algum efeito no tratamento da criptococose em modelo de infecção. No entanto, apesar do efeito dinâmico dos antibacterianos em *Cryptococcus* spp., o tratamento com esses fármacos isolados ou combinados a anfotericina B não foi suficiente para inibir a progressão da doença nas doses testadas. Esse estudo trouxe resultados inéditos sobre os efeitos *in vitro* de antibacterianos na morfofisiologia e susceptibilidade aos antifúngicos de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*. Apesar dessas evidências, acreditamos que novos ensaios *in vitro* e *in vivo* ainda são necessários para a melhor compreensão do efeito de antibacterianos no contexto da criptococose.

**Palavras chave:** Antibacterianos, antifúngicos, criptococose, gentamicina, tratamento empírico.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is an invasive mycosis that involves two main etiologic agents, *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. The disease primarily affects the lungs, causing pneumonia, which can progress to meningoencephalitis. Amphotericin B and Fluconazole are the antifungals indicated for the treatment of this infection, however, an aggravating factor is that, many times, patients with cryptococcosis are also exposed to antibacterial agents, either for the empirical treatment of pneumonia and meningitis or for the treatment of coinfections bacterial. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of antibacterials on the morphophysiology and susceptibility to antifungals of *C. neoformans* and *C. gattii*. For this, the following antibacterials were used: amoxicillin (AMO), amoxicillin + clavulanate (AMO + CLAV), ceftriaxone (CRO) and gentamicin (GEN). Initially, it was observed that antibacterials were not able to inhibit fungal growth, except for gentamicin, which exhibited MIC values between 32-256 $\mu$ g/ml. Next, we evaluated whether the combination of antibacterials could result in any interaction with clinical antifungals and whether exposure to antibacterials could interfere with antifungal susceptibility. It was observed that the combination of drugs resulted in an indifferent interaction and exposure to antibacterials was not able to select subpopulations of *Cryptococcus* less or more susceptible to antifungals. In addition, it was observed that AMO and CRO had a fungistatic effect on *Cryptococcus* and reduced the synthesis of melanin and polysaccharide capsule in the fungal cell. Gentamicin, in turn, showed a fungicidal effect associated with an increase in reactive oxygen species, a reduction in ergosterol content and melanin synthesis. Finally, we evaluated whether antibacterials could have any effect on the treatment of cryptococcosis in an infection model. However, despite the dynamic effect of antibacterials on *Cryptococcus* spp., treatment with these drugs alone or combined with amphotericin B was not sufficient to inhibit disease progression at the doses tested. This study brought unprecedented results on the in vitro effects of antibacterials on the morphophysiology and susceptibility to antifungals of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. Despite this evidence, we believe that new in vitro and in vivo assays are still needed for a better understanding of the effect of antibacterials in the context of cryptococcosis.

**Keywords:** Antibacterials, antifungals, cryptococcosis, gentamicin, empirical treatment.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS:** *Acquired Immunodeficiency Syndrome*
- AMO:** Amoxicilina
- AMO+C:** Amoxicilina + Clavulanato
- CRO:** Ceftriaxona
- CLSI:** *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- GEN:** Gentamicina
- 5-FC:** 5-flucitosina
- AMB:** Anfotericina B
- FLC:** Fluconazol
- ASD:** Ágar Sabouraud Dextrose
- CIM:** Concentração Inibitória Mínima
- CIF:** Concentração Inibitória Fracionária
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- EDTA:** *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- GXM:** Glucoronoxilomanano
- GalGXM:** Galactoxilomanana
- HEPES:** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
- HIV:** Síndrome da Imunodeficiência Humana
- SNC:** Sistema Nervoso Central
- MM:** Meio mínimo
- MOPS:** Ácido 4-morfolinopropanosulfônico
- MTT:** Brometo tiazolil azul de tetrazólio
- LCR:** Líquido cefalorraquidiano
- PBP:** Proteína de ligação a penicilina
- PBS:** *Phosphate buffered saline*
- RPMI-1640:** *Roswell Park Memorial Institute*
- µg:** Microgramas
- µL:** Microlitro
- mL:** Mililitro
- UFC:** Unidade Formadora de Colônia
- UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema da placa de 96 poços em experimento de teste de combinação. As setas (vertical e horizontal) indicam o aumento da concentração individualmente e a seta em diagonal indica o aumento da concentração dos antifúngicos e antibacterianos testados em combinação..... 36
- Figura 2:** Interação entre antibacterianos e antifúngicos clínicos. Curva de interação entre Anfotericina/Amoxicilina (A), Fluconazol/Amoxicilina (B), Anfotericina/Amoxicilina + Clavulanato (C), Fluconazol/Amoxicilina + Clavulanato (D), Anfotericina/Ceftriaxona (E), Fluconazol/Ceftriaxona (F), Anfotericina/Gentamicina (G) e Fluconazol/Gentamicina (H)..... 46
- Figura 3:** Curva de crescimento de *Cryptococcus gattii* durante o tratamento com antibacterianos. Curva de crescimento de *C. gattii* após tratamento com amoxicilina (A), amoxicilina+clavulanato (B) e Ceftriaxona (C). Análise estatística: \*em relação ao controle  $p < 0,05$ ..... 49
- Figura 4:** Crescimento das linhagens L27/01 (controle), L27/01, Exp. C e 10p sob estresse na parede celular, membrana e osmótico após exposição a 512µg/mL de AMO, AMO+C e CRO. VC: Vermelho Congo (parede celular), DTT (retículo endoplasmático), NaCl e KCl(estresse osmótico)..... 50
- Figura 5:** Influência de antibacterianos na morfologia, melanização e síntese de ergosterol em *Cryptococcus gattii*. Efeito da AMO (A), AMO+C (B) e CFO (C) na espessura capsular de *C. gattii*. Visualização em tinta nanquim de colônias tratadas e não tratadas com antibacterianos (D). Fenótipo de melanização durante o tratamento com antibacterianos (E). Efeito da AMO (F), AMO+C (G) e CFO (H) no conteúdo de ergosterol de *C. gattii*..... 52
- Figura 6:** Curva de sobrevivência em modelo invertebrado de criptococose após infecção com as linhagens H99 e R265 e tratamento com AMO (A-B), AMO+C (C-D) e CFO (E-F). Análise estatística: \* Em relação ao controle não tratado..... 54
- Figura 7:** Teste de difusão de disco e perfil de crescimento de *Cryptococcus* durante o tratamento com gentamicina. Antibiograma para diferentes linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* (A) frente a gentamicina 120µg/mL. Curva de morte das linhagens tratadas com gentamicina em diferentes concentrações: (C) R265, (D) H99, (E) L27/01..... 56
- Figura 8:** Crescimento das linhagens H99, R265 e L27/01 sob estresse na parede celular e membrana após exposição a gentamicina. Perfil de crescimento das linhagens H99, R265 e L27/01 em vermelho congo (A), cloreto de potássio (B) e cloreto de sódio (C) após exposição a gentamicina..... 57
- Figura 9:** Avaliação de ergosterol e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio após tratamento com gentamicina. Conteúdo de ergosterol para linhagens R265, H99 e L27 após tratamento com gentamicina (A). Espécies reativas de oxigênio para as linhagens R265, H99 e L27 frente a gentamicina (B). Espécies reativas de nitrogênio para as linhagens R265, H99 e L27 frente a gentamicina (C). Análise estatística: \* Em relação ao controle não tratado..... 59
- Figura 10:** Síntese de cápsula polissacarídica e melanina após exposição a gentamicina. Corpo celular e espessura capsular das linhagens R265, H99 e L27 após 72 horas de exposição a gentamicina (A-F). Fenótipo de melanização e preparações em nanquim das linhagens R265, H99 e L27 após exposição a gentamicina (E). A barra representa um comprimento de 10µm. Análise estatística: \* Em relação ao controle não tratado..... 61

**Figura 11:** Perfil de toxicidade em macrófagos murinos e sobrevida em modelo invertebrado de criptococose após o tratamento com gentamicina isolada e combinada a antifúngicos clínicos. Viabilidade de macrófagos murinos frente a diferentes concentrações de anfotericina; Fluconazol; e gentamicina (A). Viabilidade de macrófagos murinos frente a diferentes concentrações de fluconazol (B) e anfotericina B (C) combinadas a gentamicina (B). Curva de sobrevida em modelo invertebrado de criptococose após infecção com as linhagens H99 (D) e R265 (E) e tratamento com gentamicina isolada e combinada a anfotericina B. Análise estatística: \* Em relação ao controle não tratado.....

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Proposta taxonomica para <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	21
<b>Tabela 2:</b> Linhagens de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> , utilizadas neste trabalho.....	33
<b>Tabela 3:</b> Solubilização dos antimicrobianos.....	28
<b>Tabela 4:</b> Diâmetro dos halos de inibição de crescimento de linhagens de <i>Cryptococcus gattii</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> frente aos antibacterianos.....	43
<b>Tabela 5:</b> Concentração inibitória mínima (CIM) para antifúngicos e antibacterianos frente a linhagens de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i> . Média da concentração inibitória fracionária (CIF) da interação entre anfotericina B/ antibacterianos e Fluconazol/antibacterianos.....	45
<b>Tabela 6:</b> Concentração inibitória mínima (CIM) para antifúngicos frente as linhagens L27/01 (Controle), L27/01 Exposta continuamente a antibacterianos (Ex. C) e após 10 passagens sem droga (10p).....	48

## SUMÁRIO

### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1.0 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 <i>Cryptococcus</i> spp e criptococose.....	18
1.1.2 Fatores de Virulência.....	19
1.1.3 Epidemiologia da criptococose.....	20
1.1.4 Tratamento da criptococose.....	22
1.1.5 Tratamento de infecções respiratórias bacterianas.....	24
1.1.6 Uso empírico de antibacterianos.....	27
1.1.7 Resistência aos antimicrobianos.....	28

<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
-----------------------------	-----------

### 3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral	
3.2 Objetivos específicos.....	32

### 4 METODOLOGIA

#### 4.1 Linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*

4.1.1 Fármacos.....	33
---------------------	----

#### 4.1.2 Abordagem *in vitro*

Antibiograma.....	34
-------------------	----

#### 4.1.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

4.1.4 Diluição dos antimicrobianos.....	34
---	----

#### 4.1.5 Preparo do inóculo

#### 4.1.6 Leitura e interpretação dos resultados

4.1.7 Avaliação da interação entre antifúngicos e antibacterianos.....	35
--	----

#### 4.1.8 Curva de morte

4.1.9 Exposição contínua aos antibacterianos.....	37
---	----

#### 4.2.0 Curva de crescimento na presença dos antibacterianos

#### 4.2.1 Ensaio de *spot* em diferentes estressores celulares

4.2.2 Análise Morfométrica.....	39
---------------------------------	----

#### 4.2.3 Fenótipo de Melanização

4.2.4 Quantificação do ergosterol.....	39
--	----

#### 4.2.5 Quantificação de espécie reativa de oxigênio

<b>4.2.5.1 Abordagem <i>ex vivo</i>.....</b>	<b>40</b>
--	-----------

4.2.5.2 Obtenção de macrófagos derivados de medulla óssea.....	41
--	----

#### 4.2.5.3 Ensaio de toxicidade

#### 4.2.6 Abordagem *in vivo*

4.2.7 Análise estatística.....	42
--------------------------------	----

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
5.1 Amoxicilina (AMO), Amoxicilina + clavulanato (AMO + CLAV), Ceftriaxona (CRO)	
5.1.2 A exposição contínua aos antibacterianos não altera a susceptibilidade de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	47
5.1.3 AMO e CRO alteram o perfil de crescimento de <i>Cryptococcus gattii</i> .....	48
5.1.4 AMO, AMO+C e CRO não alteram o conteúdo de ergosterol, mas interferem na síntese de cápsula polissacarídica e melanina de <i>Cryptococcus gattii</i> .....	51
5.1.5 O tratamento com AMO, AMO+C e CRO não aumenta a sobrevida em modelo invertebrado de criptococose.....	53
<b>5.2. Gentamicina</b>	
5.2.1 A gentamicina apresenta ação fungicida em <i>Cryptococcus</i> .....	55
5.2.2 A gentamicina reduz o conteúdo de ergosterol e induz oxidativo em <i>Cryptococcus</i> .....	58
5.2.3 A gentamicina reduz a espessura de cápsula polissacarídica e melanina em <i>Cryptococcus</i> ....	60
5.2.4 GEN apresenta baixa toxicidade em macrófagos murinos quando combinada a antifúngicos clínicos mas não aumenta a sobrevida em modelo invertebrado de criptococose.....	62
<b>6 SÍNTESE DOS RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>66</b>
<b>9 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>10 TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO.....</b>	<b>82</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1.0 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 *Cryptococcus* spp. e a criptococose

*Cryptococcus* é um fungo basidiomiceto que engloba mais de 80 espécies diferentes, das quais *C. neoformans* e *C. gattii* são as de maior relevância médica e veterinária. Essas espécies acometem indivíduos imunossuprimidos e imunocompetentes, sendo potencialmente fatais quando causam meningoencefalite (TEMFACK et al., 2019; MADA; ALAM., 2018).

A infecção criptocócica inicia-se pela inalação de basidiosporos ou leveduras dessecadas disseminadas no meio ambiente. Após esse processo, o fungo se instala nos pulmões e frente ao escape a resposta imune do hospedeiro ocorre uma colonização, levando ao estabelecimento da infecção. Essa colonização inicial é frequentemente assintomática ou apresenta-se como sintomas gripais, como tosse e febre, podendo evoluir para sintomas mais severos como pneumonia e a síndrome aguda do estresse respiratório (MAZIARZ e PERFECT, 2016).

Uma vez que o fungo consegue escapar da neutralização no ambiente pulmonar, ele pode se disseminar via hematogênica para outros órgãos, incluindo o Sistema Nervoso Central (SNC), levando a meningoencefalite, forma mais grave da doença. A invasão de *Cryptococcus* spp., no SNC ocorre por meio de três mecanismos: o primeiro é denominado de transmigração transcelular, em que a levedura por si só, atinge a corrente sanguínea e atravessa as células endoteliais microvasculares cerebrais. O segundo mecanismo é conhecido como “cavalo de Tróia”, no qual o fungo atravessa a barreira hematoencefálica internalizado nos macrófagos. Por último, a invasão pode ocorrer por meio de transferência lateral, na qual fagócitos infectados transferem a levedura para o interior das células endoteliais da barreira hematoencefálica (LIU; PERLIN; XUE., 2012). Em geral, pacientes com meningite criptocócica apresentam sintomas predominantemente neurológicos, mais tipicamente cefaleia e estado mental alterado, bem como febre, náuseas e vômitos (CAO et al., 2018; LIN; HEITMAN., 2006; LI et al., 2016).

### 1.1.2 Fatores de Virulência

Durante a interação com o hospedeiro, *Cryptococcus* spp utiliza diferentes mecanismos de virulência importantes para a efetivação da infecção fúngica. Esses fatores incluem a cápsula polissacarídica, síntese de melanina, termotolerância e produção de diferentes enzimas (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL. 2015).

A cápsula polissacarídica é uma malha altamente hidratada e negativamente carregada de polissacarídeos que circundam a célula, composta predominantemente por glucuroxilomanana 90-95% (GMX) e 5% galactoxilomanana (GalGXM). Dentre outras funções, a cápsula está relacionada a atividades antifagocitárias, inibição da produção de anticorpos, depleção do complemento, inibição da migração de leucócitos e indução da apoptose em macrófagos e células T (SHUN & MODY, KRONSTAD et al, 2011).

A melanina é um corante natural sintetizado por membros de todos os reinos biológicos, incluindo uma variedade diversa de fungos, bactérias e helmintos que causam infecções em humanos. Sua síntese ocorre pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos, sendo a lacase a principal enzima envolvida nesse processo em *Cryptococcus*. Assim como a cápsula polissacarídica, células melanizadas são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro por meio de múltiplos mecanismos como, alterando os perfis de citocinas, reduzindo a fagocitose e diminuindo a toxicidade de peptídeos microbianos, espécies reativas de oxigênio e antifúngicos (CAMACHO et al., 2019).

A capacidade de *Cryptococcus* spp., de crescer a 37°C e sobreviver nessa temperatura é fundamental para o estabelecimento da infecção. Este mecanismo é regulado pela calcineurina, uma fosfatase específica de serina e treonina, ativada por  $Ca_2^+$  e calmodulina (LI; MODY., 2009; BIELSKA et al., 2018). Mutantes nulos que demonstram fenótipo sensível a 37°C são completamente avirulentos e não causam doenças em modelos de infecção em mamíferos (PERFECT., 2006).

No ambiente e durante a infecção *Cryptococcus* spp., pode secretar uma série de enzimas, como fosfolipase, proteinase, desoxirribonuclease (DNAases), urease superóxido dismutase e peroxidases. A atividade das proteinases é mostrada para degradar proteínas do hospedeiro, e com isso podem promover danos no tecido do hospedeiro, fornecendo proteção e nutrientes para o agente patogênico (MA & MAY,

2009) e ainda, propicia a disseminação pelo hospedeiro (KRONSTAD, et al, 2011). As fosfolipases são enzimas capazes de hidrolisar glicerofosfolípidos, sua atividade resulta na desestabilização de membranas, na lise celular e liberação de compostos lipídicos (MA & MAY, 2009). A urease, por sua vez, está envolvida na hidrólise da ureia em amônia e carbonato, o que contribui para desestabilização da barreira hematoencefálica e invasão do SNC (MA & MAY, 2009, KRONSTAD et al, 2011). Por último, as enzimas superóxido dismutase e peroxidases apresentam ação antioxidante importante para a neutralização de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio resultantes do metabolismo das células do sistema imune e da ação de antifúngicos (FERREIRA et al, 2013).

### 1.1.3 Epidemiologia da criptococose

A incidência da criptococose aumentou consideravelmente com a epidemia da AIDS no início dos anos 80 e estendeu - se até o início da década de 90. Estima-se que houve mais de 957.900 mortes por criptococose no pico da epidemia por HIV. Como o advento da terapia antirretroviral e profilaxia destinada a infecções fúngicas, a frequência da infecção criptococócica diminuiu na Europa e Estados Unidos a partir dos anos 90 até o ano 2014. Segundo estimativas recentes a criptococose é responsável por 19% da mortalidade global associada a AIDS. Anualmente, estima-se que ocorrem 179.000 casos de antigenia positiva para *Cryptococcus* (CrAg<sup>+</sup>) em pacientes HIV<sup>+</sup> globalmente. Desses, 152.000 para meningite criptococócica. Atualmente, no Brasil, a prevalência estimada de AgCr<sup>+</sup> varia de 2-4% em indivíduos HIV<sup>+</sup> (RAJASINGHAM; GOVENDER; JORDAN; LOYSE et al., 2022). Além disso, estudo recente no Estado de Minas Gerais encontrou uma mortalidade de 30% devido à criptococose em HIV<sup>+</sup> (LIMA et al., 2019).

Historicamente, o *Cryptococcus* spp., foi descrito pela primeira vez em 1895 e durante várias décadas, os agentes da criptococose foram agrupados em duas variedades que incluíam cinco sorotipos: *C. neoformans* var. *neoformans* para os sorotipos A, D e AD e *C. neoformans* var. *gattii* para os sorotipos B e C (KWON-CHUNG et al., 2014; BEARDSLEY et al., 2023). Com advento da taxonomia molecular, a nomenclatura dos fungos foi revolucionada com o emprego de várias técnicas, incluindo PCR- impressão digital, Polimorfismo de Fragmento de Restrição (RFLP), Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP) e Tipagem de Frequência Multilocus

(MLST) para identificação de diferentes linhagens de duas espécies: *C. gattii* (VGI-VGIV) e *C. neoformans* (VNI, VNII, VNB) atualmente separados em VNBI e II para todos os sorotipos A, VNII (híbrido dos sorotipos A e D e VNIV- sorotipo B (HONG; XEN; CHU., 2021; DESJARDINS et al., 2017). Já Hagen et al., 2015, adicionaram mais um genótipo de um isolado clínico no México, no qual foi proposto que *C. neoformans* e *C. gattii* fossem divididos em sete espécies, conforme descrito na tabela 1. Posteriormente, uma linhagem geneticamente diferente de *C. gattii* foi descoberta na Zâmbia, foi designada VGV e *C. decagattii* como VGVI (FARRER et al., 2019).

**Tabela 1:** Proposta taxonomica para *C. neoformans* e *C. gattii*.

Espécie	Genótipo	Nova nomenclatura
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNII VNII VNII	<i>C. neoformans</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VNIV	<i>C. deneoformans</i>
<i>C. neoformans</i> híbrido de intervariedade	VNII	<i>C. neoformans</i> X híbrido <i>C. deneoformans</i>
<i>C. gattii</i>	VGI VGIII VGII VGIV VGIV/VGIIIc	<i>C. gattii</i> <i>C. bacillisporus</i> <i>C. deuterogattii</i> <i>C. tetragattii</i> <i>C. decagattii</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> X <i>C. gattii</i> AFLP4/ híbrido VGI	–	<i>C. deneoformans</i> X híbrido <i>C. gattii</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> X <i>C. gattii</i> AFLP4/ híbrido VGI	–	<i>C. neoformans</i> X híbrido <i>C. gattii</i>
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> X <i>C. gattii</i> AFLP6/ híbrido VGII	–	<i>C. deneoformans</i> X híbrido <i>C. deuterogattii</i>

**Fonte:** Adaptado Hagen et al. (2015).

### 1.1.4 Tratamento da criptococose

O tratamento da criptococose está diretamente relacionado ao sítio da infecção e o estado imunológico do paciente. Para a neurocriptococose, quadro mais comum da doença, o tratamento é dividido em três fases: a fase de indução, que visa diminuir drasticamente a carga fúngica do líquido cefalorraquidiano. Nessa fase, a administração medicamentosa consiste no uso de anfotericina B (0,7-1,0mg/kg/dia) combinado a 5-FC (100mg/kg/dia) nas duas primeiras semanas. Após a terapia de indução, prossegue-se com a fase de consolidação, na qual é realizada a terapia com Fluconazol (400mg/dia) durante oito semanas. Neste estágio terapêutico, as concentrações dos antifúngicos podem ser aumentadas quando o tratamento considerado padrão ouro (anfotericina B + flucitosina) não estiver disponível. Por fim, realiza-se a fase de manutenção, que consiste na administração de fluconazol, 200mg/dia, durante 6 a 12 meses (SLOAN, PARRIS., 2014; BOYER-CHAMMER et al., 2019; SPADARI et al., 2020).

A anfotericina B é um macrolídeo polieno com ação fungicida que se liga ao ergosterol presente na membrana da célula fúngica, causando poros na membrana e o extravazamento do conteúdo intracelular levando a morte celular. Embora altamente eficaz, a anfotericina B apresenta efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos que limitam o seu uso. A primeira formulação foi incorporada em desoxicolato (DAmB), o que leva à rápida liberação do AmB e rapidez na ligação a lipoproteínas plasmáticas (SPADARI et al., 2020; GONZALEZ-LARA; SIFUENTES-OSORNIO; OSTROSKY-ZEICHMER., 2017; NETT; ANDES., 2015).

Além da formulação em desoxicolato, há duas formulações a base de lipídeos: anfotericina B lipossomal (L-AmB) e complexo lipídico de anfotericina B (ABLc) que apresentam menor toxicidade, todavia maior custo (NETT; ANDES, 2015; IYER et al., 2021). É válido ressaltar que apesar da resistência à AmB ser rara, quando ocorre, está relacionada a alterações qualitativas e quantitativas, na composição dos esteróis da membrana celular, como mutações nos genes *ERG3* e *ERG11*. Além disso, mais recentemente, mutações no *ERG6* foram associadas à resistência a AmB em leveduras (SHIVARATHRI et al., 2022).

Outro fármaco utilizado no tratamento da criptococose é a 5-FC, um análogo sintético de citosina, que após a administração, é absorvida pela citosina permease na célula fúngica e desaminada em 5-fluorouracilo pela citosina desaminase. A 5-FC é

subsequentemente convertida em trifosfato de 5-fluorouridina. Ao contrário do ácido uridílico, este composto é incorporado ao RNA fúngico, resultando na inibição da síntese de proteínas. Este antifúngico é hidrofílico com baixa ligação proteica de 3-4% e pode apresentar toxicidade hematológica exigindo uma vigilância farmacológica rigorosa durante o seu uso (HOUST; SPÍZEK; HAVLÍCEK., 2020; NIVOIX; LEDOUX; HERBRECHT., 2020; BELLMAN; SMUSZKIEWICZ., 2017). Porém, foi demonstrado que a resistência ao 5-FC pode resultar na perda ou mutação de qualquer uma das enzimas envolvidas na ativação da citosina permease, citosina desaminase ou uracil fosforibosiltransferase ou do aumento da produção de pirimidinas (DELMA et al., 2021).

Já o fluconazol, é um triazol que impede a produção de ergosterol por meio da inibição da ação da enzima C14-  $\alpha$  lanosterol desmetilase. Com isso a integridade da membrana celular é afetada devido ao acúmulo de precursores de esterol e pela redução de ergosterol. O fluconazol apresenta excelente atividade contra *Cryptococcus* spp., devido a sua alta biodisponibilidade, tolerância e baixa ocorrência de efeitos colaterais (NOCUA-BÁEZ et al., 2020). É a primeira linha para a terapia de consolidação em indivíduos com criptococose grave ou meningite criptococócica após a terapia de indução bem-sucedida com regime que possui AmB (NETT; ANDES., 2015). Estudos realizados em pacientes com criptococose, a profilaxia de 200mg/ dia demonstraram um aumento na concentração mínima inibitória (CIM) do fármaco dos pacientes avaliados. Entre os isolados de *Cryptococcus* para os quais as CIM's de fluconazol foram mais elevadas, seriam necessárias doses mais altas do fármaco para atingir as concentrações terapêuticas. No geral, 90% dos pacientes alcançariam um tratamento efetivo com 400mg/ml com uma CIM de 8 $\mu$ /ml, com 800mg/ml a 16 $\mu$ g/ml, 85% com 1200mg/ml a 32 $\mu$ g/ml e 70% com 1600mg/ dia a 64 $\mu$ g/ml (CHESDACHAI et al., 2019).

Entretanto, em *C. neoformans* a super expressão do gene *AFR1* da família ABC pode promover resistência ao fluconazol. Outros genes do *C. neoformans* e *C. gattii* como *Afr2p* e *MDR1* também são responsáveis pela resistência do fluconazol e outros azóis (BASSO et al., 2015; BASTOS et al., 2017; FONTES et al., 2017; SANTOS et al., 2014 SCORZONI et al., 2017). Outro mecanismo de resistência é através de mutações pontuais no gene *ERG11* que codifica a enzima 14- demetilase em leveduras, esta enzima é alvo para os azóis. Portanto, mutações pontuais neste gene alteram o sítio

de ligação ao azol, resultando na redução da afinidade ou mesmo na incapacidade de se ligar a enzima do medicamento (PFALLER., 2012).

### 1.1.5 Tratamento de infecções respiratórias bacterianas

Além dos patógenos fúngicos, as bactérias também ocasionam infecções respiratórias que podem evoluir para a meningite. Considerando esse aspecto, a ocorrência de coinfeção envolvendo bactérias e fungos não é algo comum. Diversas bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium abscessus* e *Streptococcus pneumoniae* (EMÍDIO et al., 2022; EMÍDIO et al., 2023; TONE et al., 2021; QIN et al., 2022) já foram reportadas associadas a infecções por *Cryptococcus*. Entretanto, esse cenário pode implicar na exposição do fungo aos agentes terapêuticos utilizados no tratamento de infecções bacterianas. Apesar disso, o conhecimento sobre o efeito de antibacterianos na morfofisiologia e susceptibilidade fúngica ainda permanece incipiente. Portanto, nesse tópico foi abordado os principais antibacterianos utilizados no tratamento de co infecção entre bactérias e *Cryptococcus*.

As bactérias de maior incidência em pacientes imunossuprimidos e até mesmo imunocompetentes são *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (ESHWARA; MUKHOPADHYAY; RELLO., 2020). A terapia com os  $\beta$ -lactâmicos geralmente é suficiente como monoterapia para pacientes com HIV bem como para hospedeiros sem comorbidades. Este grupo possui em sua estrutura química o anel  $\beta$ -lactâmico e classificados em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, e monobactâmicos. Os  $\beta$ -lactâmicos são agentes bactericidas capazes de inibir a síntese da parede celular da bactéria (STOCCO; LUCAFO; DECORTI., 2020; LIMA et al., 2020).

A amoxicilina é uma penicilina semissintética em uso desde a década de 70. É um antibacteriano que se liga a proteína de ligação à penicilina (PBP) 1A, uma enzima essencial para a síntese da parede celular bacteriana. O anel  $\beta$ -lactâmico da amoxicilina se abre para acilar o domínio C-terminal da transpeptidase de PBP 1A. Esta ligação irreversível inativa a PBP 1A, sem a qual, o peptidoglicano, um componente integral da parede celular da bactéria, não pode ser sintetizado. Como consequência, ocorre a lise e morte celular. Outro aspecto avaliado é o grupo hidroxila da amoxicilina, que resulta em

uma droga mais lipossolúvel e, portanto, tem uma biodisponibilidade e duração mais elevadas, com isso, aumenta a ação bactericida. (HUTTNER et al., 2019).

Não obstante, a resistência bacteriana aos  $\beta$ -lactâmicos tornou-se um problema clínico crescente que ameaça a utilidade terapêutica. Para evitar a resistência, foram acrescentados inibidores da beta lactamases, como ácido clavulânico, um inibidor de amplo espectro que se liga a estas enzimas. Devido aos perfis farmacodinâmicos e farmacocinéticos, a associação do ácido clavucânico com amoxicilina demonstraram ser eficientes no tratamento das infecções causadas por bactérias resistentes à amoxicilina (STOCCO; LUCAFO; DECORTI., 2020; LIMA et al., 2020).

Embora o ácido clavulânico e a amoxicilina tenham padrões de distribuição semelhantes e meia vida de aproximadamente uma hora, o inibidor de beta-lactamase difere em relação a outras propriedades farmacocinéticas. O metabolismo é principalmente hepático, com apenas 30-40% excretados na urina e até 30% são ligados às proteínas séricas. É importante ressaltar que o ácido clavulânico pode causar aumento dos efeitos colaterais no sistema gastrointestinal, particularmente a diarreia, em comparação com a amoxicilina isolada (HUTTNER et al., 2019).

As cefalosporinas também são  $\beta$ -lactâmicos com o anel diidrotiazina fundido ao núcleo  $\beta$ -lactâmico. A presença de um anel com seis membros contendo enxofre, menor tensão ao anel  $\beta$ -lactâmico. A ceftriaxona pertence às cefalosporinas de 3ª geração, em sua estrutura química, assim como os outros fármacos de 3ª geração, apresenta um amplo espectro microbiano, meia vida longa e boa penetração tecidual, incluindo no sistema nervoso central. Em contraste com os outros  $\beta$ -lactâmicos, a ceftriaxona é metabolizada no fígado (LIMA et al., 2020; KHAN et al., 2020; HAGIYA et al., 2017).

A terapia com ceftriaxona pode ser realizada contra bactérias do tipo *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*. Dada a gravidade da doença causada por esses patógenos, principalmente em casos de meningite, a concentração utilizada é superior a 4X a CIM do fármaco frente à bactéria alvo (GRÉGORIE et al., 2019). No entanto, concentração acima de 100 $\mu$ g/ml, administrado para infecção pulmonar, pode ocasionar os efeitos neurológicos adversos após oito dias de tratamento, além de insuficiência renal (LACROIX et al., 2021; HAGIYA et al., 2017).

Outra classe de antibacterianos bactericidas são os aminoglicosídeos, utilizados no tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram - negativas. Também são usados em combinação com outras classes de antimicrobianos para infecções causadas por bactérias Gram - positivas, como endocardite, e é uma opção de tratamento para a tuberculose. O mecanismo de ação decorre da ligação ao local de decodificação A na hélice 44 da pequena subunidade do ribossomo bacteriano. (BULMAN et al., 2020). Um dos aminoglicosídeos disponíveis para administração é a gentamicina, um fármaco produzido por fermentação a partir de *Micromonospora purpurea*, e que é fornecida como uma mistura composta principalmente por gentamicina C1, C1a e gentamicina C2 e C2a juntamente com pequenas quantidades de sisomicina, gentamicina A, B e B1, 2-desoxistreptamina, garamina e garosamina (RAJASEKARAN; CRICH., 2020).

A ação bactericida da gentamicina depende da concentração e não do tempo, ou seja, o efeito terapêutico é máximo se o quociente inibitório da concentração plasmática ( $C_{m\acute{a}x}$ ) dividido pela concentração inibitória mínima (CIM) for 8-10. Para atingir essa proporção é recomendado o uso de uma dose ótima de 7-9mg/kg, e assim, atingir uma  $C_{m\acute{a}x} >30\text{mg/L}$ . No entanto, concentrações acima de 100 $\mu\text{g/ml}$  são consideradas tóxicas (PERNOD. et al., 2020; BRENCIC; NIKOLAC., 2019).

Os glicopeptídeos, incluindo a vancomicina, têm como modo de ação a ligação ao dipéptido terminal D- alanina- D- alanina do lípideo II, não reticulado que é um intermediário no processo de síntese da camada de peptioglicano. Esta ligação obstrui a atividade da PBP de reticulação do lípideo II em peptídeo glicano maduro e, assim, levando ao estresse osmótico e lise da célula bacteriana (STOGIOS; SAVCHENKO., 2020).

Este agente é tradicionalmente utilizado para tratamento contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) e outras bactérias Gram - positivas beta lactamases resistentes. Vários efeitos adversos, como a nefrotoxicidade foram associados à vancomicina, a alta probabilidade no comprometimento renal está relacionada ao aumento nos níveis de creatina nas dosagens de  $>20\text{mg/l}$ . Com isso, a concentração máxima tolerada da vancomicina é de 20 a 40 $\mu\text{g/ml}$  e concentrações de 80 a 100 $\mu\text{g/ml}$  são consideradas tóxicas (ÁLVAREZ et al., 2016; BRENCIC; NIKOLAC., 2019).

### 1.1.6 Uso empírico de antibacterianos

Considerando a maior frequência das meningites bacterianas em comparação à criptococose, geralmente inicia-se com tratamento empírico com antibacterianos. Assim, o tratamento da criptococose é desafiador, pois depende de um diagnóstico laboratorial.

O diagnóstico da criptococose é desafiador, devido às suas características clínicas e exames radiológicos inespecíficos, pois em muitos casos a suspeita inicial é caracterizada como tuberculose, tumor ou pneumonia bacteriana. Além disso, o diagnóstico tardio da infecção pode ocasionar na evolução da doença resultando em maior risco de mortalidade (QU et al., 2020; LIYANG et al., 2018). O tratamento empírico, durante uma infecção bacteriana, pode selecionar clones resistentes (SCHIMIEDEL; ZIMMERLI., 2016; JUBEH.; BREIJYEH.; KARAMAN., 2020) e gerar efeitos ainda não conhecidos em células fúngicas. Além disso, este tratamento seria ineficaz caso o patógeno não seja uma bactéria.

Relatos de diagnóstico incorreto já foram demonstrados em vários pacientes de diversos países, sinalizando a necessidade de uma abordagem mais cautelosa para o tratamento da infecção criptocócica. Um desses estudos ocorreu na China, em que 136 pacientes hospitalizados com problemas respiratórios foram incluídos. Destes, 47 foram diagnosticados erroneamente como tuberculose ou tumor, com base nas imagens da tomografia computadorizada (TC). Isso ocorre porque o *Cryptococcus* spp., pode levar a imagens semelhantes a outros tipos de patógenos (QU et al., 2020). Além disso, é comum iniciar o tratamento empírico, como ocorreu com uma mulher de 52 anos sem nenhuma doença pré-existente e negativa para o vírus do HIV. De acordo com o resultado da tomografia da paciente, foi considerado que ela poderia ter infecção pulmonar bacteriana e assim foi iniciado o tratamento empírico com moxifloxacina e ceftizoxima. Porém, após duas semanas de terapia foi averiguado que as lesões mostradas na tomografia computadorizada não apresentaram melhora. Depois disso, foi realizado um teste para tuberculose e testes para anticorpos autoimunes, mas os resultados foram todos negativos. Posteriormente, um exame revelou inflamação granulomatosa, e a coloração com ácido de Schiff, revelou criptococose pulmonar. A paciente então foi tratada com fluconazol, e seu estado foi monitorado com exames de tomografia computadorizada. Durante o tratamento de seis meses com fluconazol, outra tomografia foi realizada, mostrando melhora na lesão (LIYANG et al., 2018).

A ocorrência de criptococose também já foi relatada em pacientes transplantados. No Brasil, especificamente foram submetidos a transplante de órgãos, um paciente recebeu um transplante de fígado e o outro de rim e pâncreas. Em ambos os casos foi evidenciado infecção por *Cryptococcus neoformans*. Ademais, todos os pacientes avaliados, dez foram infectados por *C. gattii* e 72 por *C. neoformans*, destes, 23 pacientes veio a óbito devido a um diagnóstico tardio (PONZIO et al., 2019).

O tratamento empírico, em alguns casos pode não ser uma alternativa eficaz no tratamento de infecções pulmonares e até mesmo da meningite, aumentando a morbidade e mortalidade, inclusive de pacientes muito jovens com criptococose. Isso aconteceu no México com uma menina de 14 anos, que ao ser hospitalizada apresentava dor de cabeça, acompanhada de náuseas e convulsões. Os exames laboratoriais na admissão mostraram hemograma com resultados normais e tomografia computadorizada de crânio simples com contraste normal. Mesmo assim, o tratamento empírico foi iniciado com ceftriaxona e vancomicina. Posteriormente, foi colhido o LCR, onde foi detectado *C. neoformans* por meio da tinta nanquim e com isso, o tratamento foi iniciado com fluconazol, anfotericina B e dexametasona. Apesar da terapia, a paciente evoluiu com grave edema cerebral e deterioração neurológica, vindo a óbito em três dias (BECERRA-PEDRAZA et al., 2017).

### **1.1.7 Resistência aos antimicrobianos**

A resistência aos medicamentos antifúngicos tornou-se uma grande preocupação não só pelas implicações clínicas, mas também pelo seu impacto econômico (FERREIRA; SANTOS., 2017). Em geral, a resistência aos antifúngicos tem sido atribuída ao seu uso generalizado na medicina e na agricultura, promovendo a evolução de cepas resistentes (BERNAS; McALISTER., 2020). A resistência aos antifúngicos pode ser classificada a partir de duas perspectivas: a resistência primária e secundária. A resistência primária também conhecida como resistência intrínseca, é definida como uma resistência natural a droga, previamente à exposição (YANG & LO, 2001). Por outro lado, a resistência secundária se define pela aquisição de uma resistência após a exposição ao antifúngico (YANG & LO, 2001).

Em geral, o crescimento da resistência por fungos patogênicos varia de acordo com a classe de antifúngicos administrados (SAMARASINGHE et al., 2020). Este fenômeno está relacionado à diversidade genética, na qual a existência dos genes

presentes nos micro-organismos que expressam proteínas relacionadas a diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas pode ser intrínseca ou adquirida (TAVARES; SÁ., 2014). Nesse contexto, a resistência intrínseca é a característica dos patógenos em resistir à ação de um determinado fármaco com o efeito de uma particularidade estrutural ou funcional inerente a uma determinada espécie (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN., 2018). Portanto, neste tipo de resistência, os genes geradores dessa característica já estão contidos no código genético do micro-organismo patogênico (TAVARES; SÁ., 2014). A resistência adquirida ocorre por meio de mutações espontâneas ou de mutações induzidas por agentes mutagênicos. Ela pode ocorrer ainda, pela aquisição do material genético contendo genes de resistência oriundos de outros patógenos, ou seja, os genes de resistência não estão contidos no genoma do micro-organismo, contudo são incorporados a ele (BLAIR et al., 2015; TAVARES., 2014).

Outra forma de resistência é denominada de resistência cruzada, que ocorre quando patógenos possuem resistência a um determinado tipo de fármaco, mas também pode apresentar resistência a diferentes tipos de compostos ou não (CHERNY et al., 2020). Na agricultura, a resistência cruzada foi comprovada com a exposição dos agroquímicos aos azólicos clínicos, especificamente ao fluconazol. Linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* expostas sistematicamente aos agroquímicos, à resistência cruzada perdurou mesmo após vários cultivos em meios na ausência dos agroquímicos, e temporariamente em outras, retornando a sensibilidade original quando cessou o contato com os herbicidas fúngicos. A resistência cruzada ao fluconazol também foi observada em modelo murino *in vivo* para a criptococose, causando, a ineficiência no controle da infecção causada por linhagens adaptadas ao tebacunazol, piraclostrobina e benomil, em comparação com as sub populações não adaptadas aos fungicidas ambientais (BASTOS et al., 2017, BASTOS et al., 2021).

A heterorresistência implica que subpopulações de células têm uma concentração mínima inibitória (CIM) superior que a maioria da população. Em relatórios típicos de heterorresistência, *C. neoformans* e *C. gattii* apresentaram heterorresistência principalmente aos azóis, caracterizada por duplicações transitórias de cromossomos que carregam os genes relevantes para a resistência (BALABAN et al., 2019; SIONOV; CHANG; KWON-CHUNG, 2013; FERREIRA et al., 2015; FERREIRA; SANTOS., 2017).

Em alguns casos, tolerância e persistência são fenômenos semelhantes, pois a taxa de sobrevivência dos patógenos aumenta na presença de um antimicrobiano, porém sem aumento da CIM. Todavia, a persistência tem o atributo adicional de afetar apenas uma subpopulação de células, enquanto a tolerância é a capacidade total de uma população sobreviver a tratamentos mais longos, como por exemplo, obter uma taxa de morte mais baixa, mas sem apresentar alterações na CIM (BALABAN et al., 2019).

## 2 JUSTIFICATIVA

A criptococose é uma infecção sistêmica causada por leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus* spp. *C. neoformans* e *C. gattii* são as principais espécies responsáveis por acometer homens e animais. A doença se caracteriza principalmente pela infecção primária nos pulmões e subsequente no sistema nervoso central.

O tratamento da criptococose é realizado com os fármacos anfotericina B, 5-flucitosina (5-FC) e fluconazol, entretanto há casos de diagnóstico inicial incorreto, tratamento inadequado e resistência aos medicamentos causando elevadas taxas de mortalidade. Exposto isso, faz-se necessário intensificar pesquisas para abranger mecanismos de sobrevivência e virulência dos fungos ao serem submetidos a diferentes antimicrobianos e relatar as consequências que podem causar. Poucos estudos evidenciaram a atividade dos antibacterianos em infecções fúngicas, no entanto existe uma preocupação na comunidade científica sobre o uso incorreto destes medicamentos. Assim, no presente estudo, foram avaliados quatro antibacterianos de uso clínico (amoxicilina, amoxicilina + clavulanato, ceftriaxona e gentamicina) frente as linhagens de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, em ensaios de sensibilidade tratados individualmente e em combinação com os antifúngicos clínicos (anfotericina B e fluconazol), e na morfofisiologia. Além disso, observar se as linhagens *C. neoformans* e *C. gatti* ao serem expostas continuamente aos antibacterianos pode ocorrer resistência cruzada com os antifúngicos. Este trabalho é de grande importância para enfatizar a conscientização sobre o uso inadequado dos antibacterianos, uma vez que, essas drogas são também utilizadas no meio ambiente e também em infecções acometidas nos pulmões e no sistema nervoso central (SNC). É válido destacar que na realização de tratamentos ineficazes, essas linhagens tornam-se potencialmente mais virulentas devido a produção de melanina e alteração na espessura de cápsula. Outro impacto é a diminuição da sensibilidade aos antifúngicos clínicos. Pode-se concluir que é necessário melhorar a capacitação dos profissionais da área de saúde e do meio ambiente e investir em pesquisas para intensificar estratégias de tratamento efetivo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de antibacterianos na morfofisiologia e susceptibilidade a antifúngicos de *C. gattii* e *C. neoformans*.

#### 3.2 Objetivos específicos

##### **Ensaio *in vitro***

- Avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antibacterianos: amoxicilina, amoxicilina + clavulanato, ceftriaxona e gentamicina frente as linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*.
- Avaliar a concentração inibitória fracionária (CIF) dos antibacterianos combinados com os antifúngicos; anfotericina B e fluconazol.
- Avaliar diferentes parâmetros de *C. gattii* e *C. neoformans* após a exposição aos antibacterianos, como:
  - Concentração inibitória mínima
  - Curva de crescimento;
  - Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio;
  - Morfometria (diâmetro celular e espessura de cápsula);
  - Ergosterol;
  - Fenótipo de melanização;
  - Perfil de crescimento frente a estresse osmótico, estresse de membrana celular, parede celular e retículo endoplasmático.

##### **Ensaio *ex vivo***

- Avaliar a toxicidade da combinação entre gentamicina e antifúngicos frente a macrófagos murinos derivados de medula óssea.

##### **Ensaio *in vivo***

- Avaliar a influência dos antibacterianos isolados e combinados com anfotericina B na sobrevivência, em modelo de criptococose em *Tenebrio molitor*.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*

Neste trabalho foram utilizadas oito linhagens de *C. gattii* e sete de *C. neoformans* conforme descrito na Tabela 2. Todos os isolados utilizados pertencem ao Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e foram cultivados em meio Ágar Sabouraud Dextrose- ASD (Difco) a 37°C durante 48h, antes da realização dos testes (SANTOS et al., 2014).

**Tabela 2:** Linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*, utilizadas neste trabalho.

<b>Linhagens <i>C. gattii</i></b>	<b>Origem</b>
28/02	Clínico - Brasil
1913/ER	Clínico
ICB181	Ambiental - Brasil
ATCC 36608	Clínico - Brasil
135L/03	Clínico
L24/01	Clínico
L27/01	Clínico - Brasil
(ATCC® MYA- 4093™) R265	Clínico – Vancouver (Canadá)
<b>Linhagens <i>C. neoformans</i></b>	<b>Origem</b>
62066	Clínico - França
(ATCC® 208821™) H99	Clínico – Nova York
78	Clínico
24067	Clínico – Maryland (EUA)
RN01	Clínico - Brasil
ATCC 28957	Clínico – Lesão óssea humana
WP	Clínico

#### 4.1.1 Fármacos

Foram utilizados os antifúngicos fluconazol (Sigma-Aldrich®) e anfotericina B (Sigma-Aldrich®) e os antibacterianos amoxicilina (Fórmula Animal), ceftriaxona (Sigma-Aldrich®), gentamicina (Sigma-Aldrich®) e amoxicilina + clavulanato (Sigma-Aldrich®).

### 4.1.2 Abordagem *in vitro*

#### Antibiograma

O antibiograma foi realizado de acordo com a técnica de difusão de disco M02-A12 (CLSI, 2015). Foram utilizados os antibacterianos amoxicilina 30µg (Laborclin), gentamicina 120µg (Laborclin), vancomicina 30µg (Laborclin) e ceftriaxona 30µg (Laborclin).

As linhagens de *Cryptococcus* spp., foram repicadas em ASD e incubadas a 37°C durante 48h. Um repique das culturas foi adicionado em tubo de ensaio contendo 2mL de solução salina 0,85% esterilizada. A suspensão fúngica foi homogeneizada em vórtex, mensurada em espectrofotômetro a 530nm e transmitância ajustada para 75-77%, que corresponde a  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFC/mL (CLSI, 2017). Em seguida, com auxílio de *swab* estéril, uma alçada de cada inóculo foi estriada em meio ASD e os discos de antibacterianos foram dispensados com o auxílio de uma pinça estéril. As placas foram incubadas a 37°C por 72h seguida da leitura visual e medida do diâmetro dos halos de inibição.

Como controle, foram utilizadas as bactérias ATCC33591 *Pseudomonas aeruginosa* (bacilo Gram - negativo) e ATCC27853 *Staphylococcus aureus* (cocos Gram - positivo) cultivadas em ágar Muller - Hilton e incubadas a 37°C durante 24h.

### 4.1.3 Concentração inibitória mínima – CIM

#### 4.1.4 Diluição dos antimicrobianos

A solubilização dos antimicrobianos foi realizada de acordo com os protocolos M100-S22 (CLSI, 2012) e M27-A23 (CLSI, 2017) conforme apresentado na tabela a seguir:

**Tabela 3:** Solubilização dos antimicrobianos.

Fármacos	Solventes
Amoxicilina	½ Dimetilsufóxido (DMSO) ½ H <sub>2</sub> O destilada estéril
Amoxicilina + Clavulanato	Água destilada estéril
Gentamicina	Água destilada estéril
Ceftriaxona	Água destilada estéril
Fluconazol	DMSO
Anfotericina B	DMSO

Para o preparo das placas com os antimicrobianos, inicialmente foram realizadas diluições seriadas em meio sintético RPMI-1640 tamponado com MOPS (pH 7,0) que variaram de 512 - 1µg/mL para os antibacterianos, de 0,3-16µg/mL para anfotericina B e 0,12-64µg/mL para o fluconazol (CLSI; 2017). Em seguida, 100µL de cada diluição foram distribuídas em placas de microdiluição de 96 poços. Utilizou-se uma placa para cada fármaco e as concentrações foram distribuídas em ordem decrescente. Em cada placa foram definidos os seguintes controles: (1) controle de crescimento RPMI-1640+inóculo e (2) esterilidade contendo apenas o meio (CLSI; 2017).

#### **4.1.5 Preparo do inóculo**

O inóculo fúngico foi preparado a partir de culturas *C. gattii* e *C. neoformans* incubadas a 37°C, durante 48h em placas contendo ágar Sabouraud Dextrose (ASD).

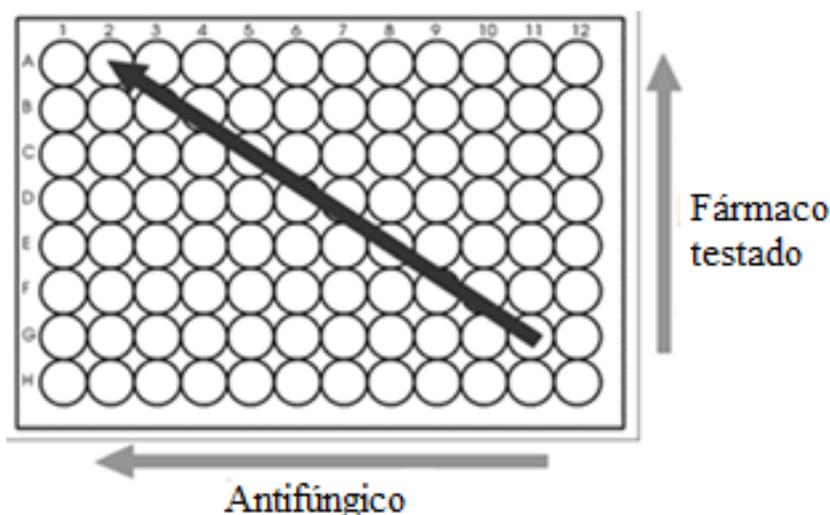
Uma alçada das culturas foi adicionada em tubos de ensaio com 2mL de solução salina 0,85% esterilizada para obtenção de uma suspensão. A solução foi homogeneizada em vórtex, mensurada em espectrofotômetro a 530nm e ajustada a transmitância para 75-77%, que corresponde à concentração de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Em seguida foi realizada uma diluição de 1:20 e 1:50 em RPMI-1640 de modo a alcançar a concentração de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  UFC/mL. Em seguida 100µL do inóculo foram dispensados nas placas de 96 poços contendo os antibacterianos e incubadas a 37°C durante 72h (CLSI, 2017).

#### **4.1.6 Leitura e interpretação dos resultados**

A leitura das concentrações mínimas inibitórias dos antibacterianos e antifúngicos foi executada após 72h de incubação. Foi realizada leitura visual e para a Anfotericina B e os antibacterianos a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento microbiana em relação ao controle de crescimento (CC). Para o fluconazol a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico. Os resultados foram expressos em µg/ml e o experimento realizado em duplicata.

#### 4.1.7 Avaliação da interação entre antifúngicos e antibacterianos

Os antibacterianos foram avaliados quanto a sua atividade em combinação com os antifúngicos fluconazol e anfotericina B. Alíquotas de 50µL de cada antibacteriano foram dispensadas nas placas de 96 poços na posição vertical, as concentrações variaram de 8µg/mL a 512µg/mL. Alíquotas de 50µL de cada diluição de anfotericina B (0,12µg/mL a 16µg/mL) e fluconazol (0,5µg/mL a 64µg/mL) foram dispensadas na posição horizontal, de acordo com a figura 1.



**Figura 1:** Esquema da placa de 96 poços em experimento de teste de combinação. As setas (vertical e horizontal) indicam o aumento da concentração individualmente e a seta em diagonal indica o aumento da concentração dos antifúngicos e antibacterianos testados em combinação.

Em seguida foram dispensados 100µl do inóculo fúngico preparado de acordo com o item 4.1.5. As placas foram incubadas a 37°C por 72h. A interação dos antibacterianos com os antifúngicos foi expressa como a soma do índice de concentração inibitória fracionária (CIF) de cada agente.

A CIF de cada agente foi calculada com o CIM desse agente em combinação, dividido pelo CIM do agente isolado. O índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) foi calculado pela soma dos CIF's:

$$\text{ICIF: } \text{CIF}_A + \text{CIF}_B = (C_A^{\text{COMB}} / \text{CIM}_A^{\text{INDIVIDUAL}}) + (C_B^{\text{COMB}} / \text{CIM}_B^{\text{INDIVIDUAL}})$$

Onde  $CIM_A^{INDIVIDUAL}$  e  $CIM_B^{INDIVIDUAL}$  são as CIM's dos fármacos A e B isoladamente e  $C_A^{COMB}$  e  $C_B^{COMB}$  são referentes as CIM's das combinações. Dessa forma a interação foi denominada como sinergismo se  $ICIF \leq 0,5$ , indiferente se  $0,5 < ICIF < 4$  e antagonismo se  $ICIF > 4,0$  (SANTOS et al, 2012; YU et al, 2008).

#### 4.1.8 Curva de Morte

Como a gentamicina foi capaz de inibir 100% do crescimento fúngico nos ensaios de susceptibilidade, foi realizada uma curva de viabilidade fúngica para determinar se seu efeito em *Cryptococcus* spp era resultado de uma ação fungicida ou fungistática. Para isso, inicialmente foi preparado um inóculo de  $1 \times 10^3$  mL, conforme descrito no item 4.1.5. Em seguida, o inóculo fúngico foi dispensado em placas de 96 poços contendo 32, 64 e 128  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina. Cada placa continha um controle de crescimento onde não havia presença do antibacteriano. As placas foram incubadas a 37°C por 72h e nos intervalos de 0, 24, 48 e 72h, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  foram removidas de cada poço, plaqueadas em meio ASD e incubadas a 37°C por 48h. Após o período de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram quantificadas para determinar a viabilidade fúngica após exposição a droga (PFALLER; SHEEHAN; REX, 2004).

#### 4.1.9 Exposição contínua aos antibacterianos

Após a realização dos testes de susceptibilidade, a linhagem L27/01 foi cultivada em meio ASD com concentrações fixas de antibacteriano para avaliar se a exposição contínua à antibacterianos poderia alterar diferentes parâmetros fisiológicos de *Cryptococcus* e interferir na susceptibilidade a antifúngicos.

Para isso, a linhagem foi cultivada em meio ASD sem droga e em seguida, em meio ASD contendo antibacterianos na concentração de 512  $\mu\text{g/mL}$  durante 48h. Após a realização de 10 repiques na presença dos antibacterianos, determinou-se a CIM em meio líquido (item 4.1.5) das colônias, denominadas como Expostas Continuamente (Exp. C) e das colônias selvagens, para os antifúngicos FLC e ANB. Além disso, para avaliar a estabilidade dos fenótipos observados após a exposição contínua aos antibacterianos, a linhagem Exp. C foi subcultivada em meio ASD sem droga por 48h durante 10 repiques (passagens) sendo denominada de 10p (BASTOS et al., 2017).

#### 4.2.0 Curva de crescimento na presença de antibacterianos

A curva de crescimento foi determinada em leitor de ELISA a 35°C, 600nm e intervalo de leituras a cada 1 hora. Inicialmente,  $5 \times 10^5$  cels/mL das linhagens L27/01 selvagem, Exp.C e 10p foram dispensadas em placa de 96 poços com RPMI na presença de AMO, AMO+C e CRO (512 µg/mL) e incubadas durante 72 horas. Para cada condição foram realizadas oito replicatas. O aumento da população microbiana é proporcional a absorbância detectada. O parâmetro Área Sob a Curva (ASC) foi utilizado para comparar os grupos.

#### 4.2.1 Ensaio de *spot* em diferentes estressores celulares

Após verificar a susceptibilidade de *C. gattii* e *C. neoformans* aos antibacterianos, as linhagens *C. gattii* L27/01, *C. gattii* R265 e *C. neoformans* H99 foram selecionadas devido ao histórico de hipervirulência e resistência cruzada, como já foram relatados em outros estudos (BASTOS et al., 2017; SANTOS et al., 2014). Para isso, foram analisadas possíveis alterações induzidas por esses antibacterianos na célula fúngica. É importante ressaltar que a L27/01 selvagem, Exp. C e 10p foram expostas a AMO, AMO + CLAV e CRO. Entretanto, como a gentamicina apresentou atividade inibitória frente a todas as linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*, as linhagens L27/01, R265 e H99 foram expostas ao antibacteriano. Para isso, linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* foram previamente cultivadas em meio ASD e após 72 horas de incubação a 37°C, foi preparado um inóculo de  $1 \times 10^4$  cels/mL. A partir deste inóculo, 10 µl foram dispensados em meio ASD suplementado com amoxicilina, amoxicilina + clavulanato e ceftriaxona (512µg/mL) e a gentamicina – 16µg/mL, 32µg/mL e 128µg/mL e incubados a 37°C durante 48h. Após a exposição aos fármacos, um novo inóculo foi preparado obtendo  $1 \times 10^8$  células/mL. Em seguida foram realizadas quatro diluições seriadas de 1:10 de cada inóculo e posteriormente 5µL de cada diluição foram dispensados em meio ASD suplementado com diferentes estressores celulares, sendo eles: Vermelho congo 0,5% (estresse de parede celular), Cloreto de Sódio 1,5M (estresse osmótico), Cloreto de potássio 1,5M (estresse osmótico), DTT 17,5mM (estresse no retículo endoplasmático). As placas foram incubadas à 37°C durante 72 horas e, posteriormente fotografadas (FREITAS et al., 2023).

#### 4.2.2 Análise Morfométrica

As linhagens L27/01 selvagem, Ex. C e 10p foram cultivadas em meio ASD ou ASD + antibacteriano durante 72h a 37°C. Em seguida  $5 \times 10^5$  cels/mL foram preparados para cada linhagem e incubados em meio mínimo líquido na presença e ausência de antibacterianos. Após a incubação, uma alçada de cada cultivo foi suspensa em uma lâmina com tinta nankin, para visualização em microscópio óptico (Axioplan; Carl Zeiss) e captura de imagem. Os tamanhos das células e cápsulas de pelo menos 50 espécimes de cada cultivo foram mensurados com o auxílio do programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>; National Institutes of Health, NIH, Bethesda, MD) (ARAUJO et al., 2012). Além disso, a razão superfície/volume foi determinada usando a fórmula  $3/r$ , em que  $r$  = raio (FERREIRA; SANTOS; COSTA; HOLANDA et al., 2015).

#### 4.2.3 Fenótipo de melanização

A produção de melanina foi avaliada em meio mínimo líquido (15 mM glicose, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 29.4mM KHPO<sub>4</sub>, 13mM glicina, e 18g/L de ágar bacteriológico, pH 5.5) suplementado com 1mM de L-dopa e antibacterianos. Inicialmente as linhagens L27/01 selvagens, Ex. C e 10p foram cultivadas em meio ASD ou ASD + antibacteriano durante 72h a 37°C. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente e suspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% esterilizada. Após homogeneização em vórtex, a transmitância foi medida em espectrofotômetro a 530nm, sendo ajustada para 75% a 77%, o que corresponde a uma suspensão de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL. Em seguida 5µL dessa suspensão foram dispensados em MM com L-dopa na presença e ausência dos antibacterianos. As placas foram incubadas à 37°C durante dez dias e, posterior a esse tempo, foram fotografadas e comparadas com o controle sem antibacteriano (GARCÍA-RODAS et al., 2015).

#### 4.2.4 Quantificação do Ergosterol

A quantificação foi realizada conforme Santos et al, 2012, com modificações. Inicialmente as linhagens L27/01 selvagens, Ex. C e 10p foram cultivadas em meio ASD ou ASD + antibacteriano durante 72h a 37°C. Em seguida,  $1 \times 10^8$  cels/mL foram preparados para cada linhagem e incubados, *overnight* a 37°C, em meio mínimo RPMI na presença e ausência de antibacterianos. A linhagem selvagem tratada *overnight* a

37°C com fluconazol 8,0 µg/mL foi utilizada como controle. Após o período de tratamento, os tubos foram centrifugados a 1.200 r.p.m. por 5 minutos, a 4°C e em seguida, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com água destilada esterilizada. Para a extração dos lipídios, 3 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio 25% foram adicionados a cada massa celular, seguido por 1 minuto de agitação. Posteriormente, os tubos foram incubados em banho maria a 85°C por 1 hora e então resfriados à temperatura ambiente. Uma mistura de 3 mL de n-heptano (Sigma-Aldrich) e 1 mL de água destilada esterilizada foi adicionada, agitando-a em vórtex por 3 minutos. O sobrenadante, por sua vez, foi novamente removido para posterior leitura em espectrofotômetro a 282 nm. Uma curva de calibração com padrão de ergosterol (Sigma-Aldrich) foi produzida e utilizada para quantificação de ergosterol. Os resultados foram expressos em µg/mL baseado na curva de calibração com o padrão de ergosterol.

#### **4.2.5 Quantificação de Espécie Reativa de Oxigênio (ERO's)**

Como a gentamicina apresentou ação fungicida contra *Cryptococcus* spp. avaliou-se a capacidade dessa droga de induzir estresse oxidativo e nitrosativo na célula fúngica. A quantificação de ERO's (Espécies reativas de oxigênio) foi realizada por meio de ensaio fluorométrico com sondas específicas (FERREIRA et al., 2013).  $1 \times 10^4$  células/mL As linhagens H99, R265 e L27/01 foram tratadas com diferentes concentrações de gentamicina em meio RPMI sem vermelho de fenol, e incubados com diacetato de 2,7' -diclorofluoresceína 10 mM (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para quantificação de ROS, durante 3 horas. A linhagens sem tratamento foram utilizadas como controle. Após a incubação, a fluorescência foi mensurada em fluorômetro (Synergy 2 SL Luminescence Microplate Reader, Biotek) utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 500nm. Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência  $\pm$  SEM. Foram realizadas seis replicatas para cada condição.

##### **4.2.5.1 Abordagem *ex vivo***

Como a gentamicina apresentou ação fungicida contra *Cryptococcus* spp. avaliou-se o perfil de toxicidade dessa droga quando utilizada isoladamente ou em combinação a antifúngicos clínicos frente à macrófagos primários derivados de medula.

A toxicidade foi determinada com base na porcentagem de viabilidade em relação ao controle não tratado. O detalhamento desse ensaio está descrito a seguir.

#### **4.2.5.2 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMMs)**

As células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de camundongos C57BL/6 (CEUA protocolo 235/2017). Os animais foram anestesiados e eutanasiados e o fêmur e a tíbia foram cuidadosamente extraídos e adicionados a um tubo de polipropileno contendo PBS estéril e, posteriormente, deixados em etanol 70% por 1 minuto. Utilizando-se meio RPMI 1640 (HyClone, LGC Biotecnologia) e uma seringa com agulha 0,70 x 25 mm, as células foram removidas e transferidas a um tubo de polipropileno estéril. Para a diferenciação dos macrófagos derivados da medula óssea, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% SFB (Soro Fetal Bovino), 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e também com 30% de sobrenadante de cultura de células L-929. O sobrenadante de células L-929 contém quantidade significativa de Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos (M-CSF, do inglês Macrophage-Colony Stimulating Factor) que é um fator de crescimento essencial na diferenciação de células progenitoras a macrófagos. A suspensão de células foi colocada em placas de Petri e incubadas a 37°C/5% CO<sub>2</sub> por sete dias, sendo o meio renovado de dois em dois dias. Ao sétimo dia em cultura, o sobrenadante foi descartado e a cultura de células na placa lavada com 5 mL de PBS estéril para eliminar as células não aderentes. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de PBS/EDTA 10mM à cultura na placa, seguido de incubação no gelo por 10 minutos. As células aderidas à placa, já diferenciadas como macrófagos, foram ressuspensas e transferidas para tubo de polipropileno estéril. Os BMM's foram centrifugados a 200xg/5 min a 4°C e ressuspensos em 5 mL de meio RPMI 1640 contendo 10% SBF, 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2, 100 unidades/mL de penicilina G potássica e 5% de sobrenadante de cultura de células L929. As células viáveis foram contadas, usando Azul de Trypan, plaqueadas em placas de cultura de 24 e 96 poços, de acordo com os objetivos propostos, seguido de incubação em estufa a 37°C, atmosfera a 5% CO<sub>2</sub>. Após vinte e quatro horas, as células foram utilizadas para o ensaio de toxicidade.

### 4.2.5.3 Ensaio de toxicidade

Após a diferenciação das células derivadas de medula, os macrófagos foram tratados com gentamicina (8, 32 e 128 $\mu$ g/mL) isolada ou em combinação com os antifúngicos Anfotericina B (0,25 - 1 $\mu$ g/mL) e fluconazol (1 - 4 $\mu$ g/mL), durante 3 horas. Em seguida, o meio foi removido e os poços foram lavados com PBS 1X para a remoção completa da droga. Posteriormente, foi adicionado MTT 5mg/mL em cada poço para avaliação da viabilidade celular. Os dados foram expressos em porcentagem, considerando 100% de viabilidade para as células que não receberam tratamento, sendo o DMSO 50%, utilizado como controle positivo de toxicidade. A concentração capaz de reduzir mais de 50% da viabilidade celular foi considerada tóxica.

### 4.2.6 Abordagem *in vivo*

Para a análise de sobrevida em modelo *in vivo*, foram utilizadas larvas de *Tenebrio molitor*, com peso a partir de 100mg. Posteriormente, as larvas foram infectadas sob condições assépticas com 5 $\mu$ L de inóculo fúngico contendo 1x10<sup>4</sup>cels/mL de R265 (*C. gattii*) e H99 (*C. neoformans*). Para a infecção utilizou-se uma seringa de Hamilton (701 N, 26's gauge, 10 $\mu$ L). Após 24 horas de infecção as larvas foram tratadas com uma dose única de amoxicilina 32 $\mu$ g/mL, amoxicilina + clavulanato 32 $\mu$ g/mL, ceftriaxona 32 $\mu$ g/mL e gentamicina a 12,8 $\mu$ g/mL. As larvas foram incubadas à 37°C e monitoradas diariamente para determinação da curva de sobrevida (SOUZA et al., 2015).

### 4.2.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados por meio do Software *Prism 5* (*GraphPad Inc.*, San Diego, CA, USA). Os testes empregados foram: Área sob a curva, análise de variância (ANOVA), seguido de pós-teste de Tukey e área sobre a curva, considerando valores de  $p < 0,05$  estatisticamente significativos. Os testes realizados para cada experimento estão indicados nas tabelas e figuras. Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes. Já para a curva de sobrevida, os resultados foram analisados com *GraphPad Prism 5*, dispostos em uma curva de sobrevida usando o método Kaplan–Meier e a análise estatística foi realizada usando o teste de log-rank. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi avaliada a susceptibilidade de *C. gattii* e *C. neoformans* a diferentes antibacterianos pelos ensaios de difusão de disco e microdiluição em caldo. Na difusão de disco, todos os antibacterianos testados não foram capazes de levar a formação de halos de inibição, exceto para a gentamicina no qual foi observado halos com diâmetro entre 15-26mm para *C. gattii* e 14-29mm para *C. neoformans* (Tabela 4). Esses achados corroboraram com os resultados da microdiluição em caldo em que a contração máxima (512µg/mL) analisada dos antibacterianos (AMO, AMO+C, CRO) não foi capaz de inibir o crescimento fúngico (Tabela 4). Para a gentamicina foram encontrados valores de CIM que variaram entre 32 e 256 µg/ml para *C. gattii* e *C. neoformans* (Tabela 4).

**Tabela 4:** Diâmetro dos halos de inibição de crescimento de linhagens de *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* frente aos antibacterianos.

Linhagens	Diâmetro dos halos Antibacterianos (mm)				
	AMO (30µg)	GEN (120 µg)	OXA (1µg)	VAN (30µg)	CRO (30µg)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC27853	33	NT	NT	21	27
<i>P. aeruginosa</i> ATCC33591	NT	21	NT	NT	NT
<b><i>Cryptococcus gattii</i></b>					
1913/ER	0	20	0	0	0
R265	0	16	0	0	0
28/02	0	15	0	0	0
547	0	23	0	0	0
181	0	27	0	0	0
135L/03	0	19	0	0	0
L27/01	0	26	0	0	0
196L	0	19	0	0	0
L24/01	0	27	0	0	0
29/0893	0	21	0	0	0
32608	0	25	0	0	0
28/0893	0	22	0	0	0
<b><i>C. neoformans</i></b>					
WP	0	21	0	0	0
28957	0	16	0	0	0
96806	0	29	0	0	0
RN01	0	18	0	0	0
24067	0	25	0	0	0
78	0	14	0	0	0
28JF	0	16	0	0	0
62066	0	20	0	0	0
H99	0	19	0	0	0

AMO: Amoxicilina, GEN: Gentamicina, OXA: Oxacilina, VAN: Vancomicina, CRO: Ceftriaxona, NT: Não testado.

Algumas drogas podem não apresentar valores de CIM isoladamente, mas quando combinadas a antifúngicos podem resultar em interações sinérgicas ou antagônicas. A minociclina, por exemplo, um antibacteriano derivado de tetraciclina, apresenta sinergismo com FLC frente a linhagens de *C. neoformans*, apesar de não apresentar ação antifúngica isoladamente (SHI et al., 2010). Com isso, embora os antibacterianos avaliados nesse estudo não tenham inibido o crescimento de *Cryptococcus*, com exceção da gentamicina, foi avaliado se esses fármacos poderiam promover alguma interação com antifúngicos clínicos.

Os resultados da média da concentração inibitória fracionária (CIF) e CIM para as combinações entre AMB/antibacterianos e FLC/antibacterianos estão apresentados na Tabela 5 e Figura 2. Para a interação ANB/antibacterianos e FLC/antibacterianos os valores da média da CIF variaram entre 1,0 e 4,0, evidenciando indiferença na interação entre os fármacos, ou seja, os antibacterianos avaliados nesse estudo não foram capazes de interferir na ação dos antifúngicos clínicos (Tabela 5 e Figura 2).

Considerando os resultados obtidos, foi avaliado se a exposição contínua a antibacterianos poderia alterar diferentes parâmetros morfofisiológicos de *Cryptococcus* e interferir na susceptibilidade a antifúngicos. Para isso, realizou-se o perfil de crescimento, conteúdo de ergosterol, cápsula polissacarídica, melanina, e resistência a diferentes estressores celulares após exposição contínua aos antibacterianos. Nessa etapa foram analisadas as linhagens L27/01 selvagem (Controle), L27/01 Exposta Continuamente a antibacterianos (Exp. C) e L27/01 Exp. C após 10 passagens em meio sem antibacteriano (10p). Como a gentamicina apresentou valores de CIM, inicialmente foram apresentados os resultados obtidos para AMO, AMO+C e CRO e por último, de maneira a parte, serão apresentados os resultados para GEN.

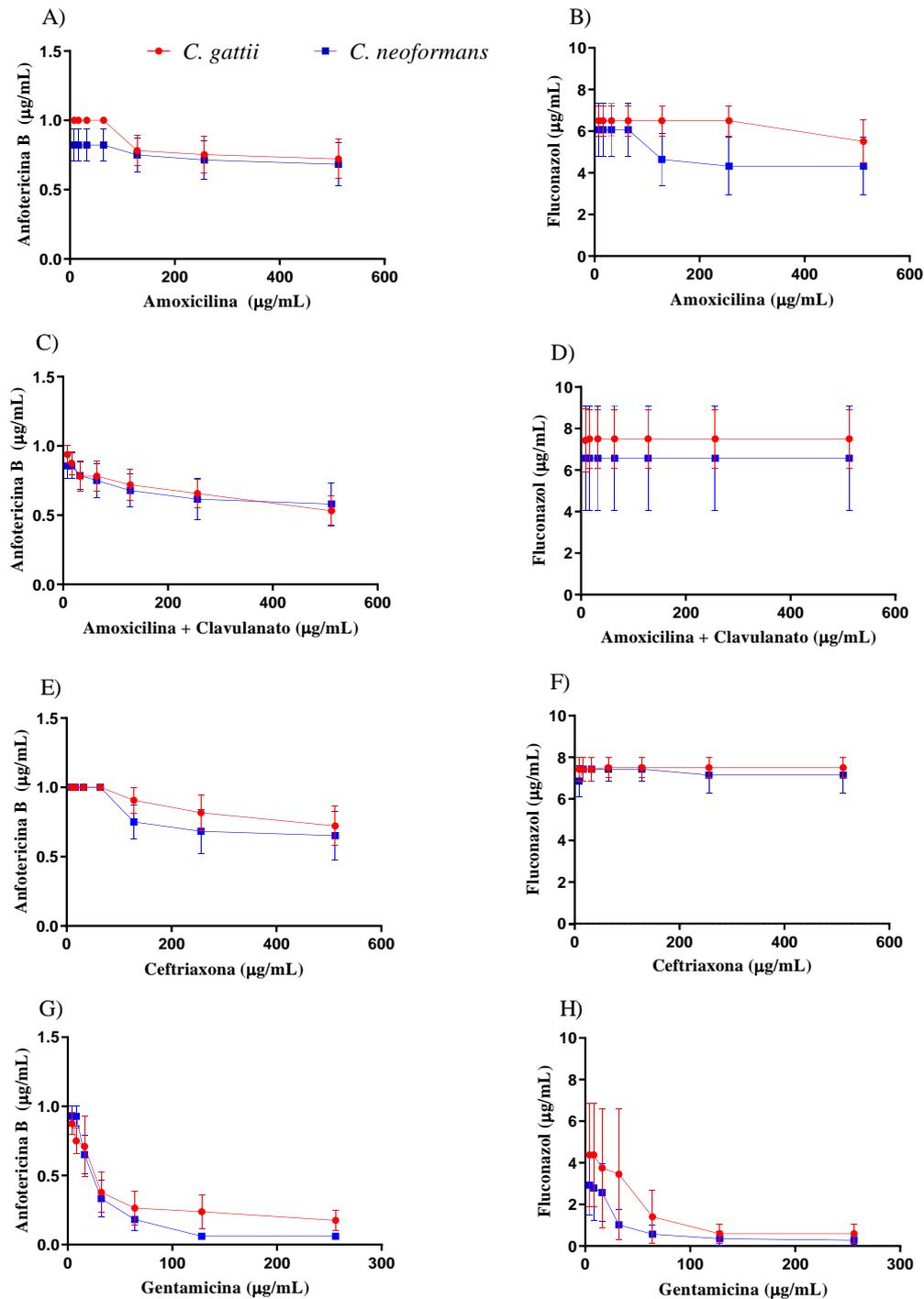
**Tabela 5:** Concentração inibitória mínima (CIM) para antifúngicos e antibacterianos frente a linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*. Média da concentração inibitória fracionária (CIF) da interação entre anfotericina B/ antibacterianos e Fluconazol/antibacterianos.

Linhagens	CIMµg/mL						Média da CIF da interação AMB/ antibacterianos				Média da CIF da interação FLC/ antibacterianos					
	AMB <sup>a</sup>	FLC <sup>b</sup>	AMO <sup>a</sup>	AMO+C <sup>a</sup>	CRO <sup>a</sup>	GEN <sup>a</sup>	AMO	AMO+C	CRO	GEN	AMO	AMO+C	CRO	GEN		
<i>C. gattii</i>	<b>2802</b>	1	4	>512	>512	>512	<b>128</b>	1,42	0,71	0,78	0,85	1,28	1,28	1,28	1,10	
	<b>1913/ER</b>	1	4	>512	>512	>512	<b>64</b>	1,28	0,64	1,28	1,31	2,28	2,28	3,42	1,81	
	<b>181</b>	0,5	4	>512	>512	>512	<b>64</b>	1,28	0,99	1,28	1,35	2,28	2,28	2,28	0,75	
	<b>36608</b>	1	4	>512	>512	>512	<b>32</b>	1,28	1,28	1,28	1,15	2,28	2,28	2,28	1,46	
	<b>135L/03</b>	2	4	>512	>512	>512	<b>256</b>	2,28	3,13	1,28	1,13	1,28	2,28	2,28	1,85	
	<b>L24/01</b>	2	8	>512	>512	>512	<b>128</b>	1,28	1,38	1,28	1,28	2,28	2,28	2,28	1,85	
	<b>L27/01</b>	1	8	>512	>512	>512	<b>128</b>	1,28	1,28	1,28	1,28	1,14	1,14	2,28	1,06	
	<b>R265</b>	1	16	>512	>512	>512	<b>128</b>	1,20	1,20	1,21	0,92	1,15	1,15	1,15	1,00	
	Var. CIM	0,5-2	4-16	-	-	-	<b>32-256</b>									
Média Geom	1,31	6,5	-	-	-	<b>116</b>										
<i>C. neoformans</i>	<b>62066</b>	1	8	>512	>512	>512	<b>32</b>	1,28	2,60	2,99	1,27	2,28	1,28	2,28	1,24	
	<b>H99</b>	1	4	>512	>512	>512	<b>128</b>	0,96	1,28	1,28	1,08	0,90	2,28	2,28	0,69	
	<b>78</b>	1	8	>512	>512	>512	<b>256</b>	1,20	1,20	1,20	0,92	1,28	3,56	1,21	1,08	
	<b>24067</b>	1	4	>512	>512	>512	<b>64</b>	1,06	2,56	2,56	1,28	2,28	2,28	2,28	1,08	
	<b>RN01</b>	2	2	>512	>512	>512	<b>32</b>	1,28	0,64	0,64	0,64	1,28	1,28	1,28	1,08	
	<b>28957</b>	2	0,25	>512	>512	>512	<b>128</b>	1,04	0,92	0,92	0,85	1,06	2,28	2,28	1,24	
	<b>WP</b>	1	8	>512	>512	>512	<b>64</b>	2,28	0,78	2,28	1,71	2,28	2,28	2,28	1,79	
	Var. CIM	1-2	0,25-8				<b>32-256</b>									
	Média Geom	1,28	4,89				<b>100,5</b>									

<sup>a</sup>CIM (100%): *endpoint* considerado 100% de inibição.

<sup>b</sup>CIM (50%): *endpoint* considerado 50% de inibição.

ANB: Anfotericina B; FLC: Fluconazol; AMO: Amoxicilina; AMO+C: Amoxicilina + Clavulanato; CRO: Ceftriaxona; GEN: Gentamicina



**Figura 2:** Interação entre antibacterianos e antifúngicos clínicos. Curva de interação entre Anfotericina/Amoxicilina (A), Fluconazol/Amoxicilina (B), Anfotericina/Amoxicilina+Clavulanato (C), Fluconazol/Amoxicilina+Clavulanato (D), Anfotericina/Ceftriaxona (E), Fluconazol/Ceftriaxona (F), Anfotericina/Gentamicina (G) e Fluconazol/Gentamicina (G) frente às linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*.

## 5.1 Amoxicilina (AMO), Amoxicilina + Clavulanato (AMO+C) e Ceftriaxona (CRO)

### 5.1.2 A exposição contínua aos antibacterianos não altera a susceptibilidade de *Cryptococcus gattii* aos antifúngicos.

A resistência cruzada é um tipo de resistência que ocorre quando os patógenos são menos susceptíveis a uma droga, também confere resistência a fármacos de mesma classe ou não. (SNELDERS et al., 2012). Nessa perspectiva, a hipótese inicial era de que a exposição a antibacterianos poderia selecionar populações de *Cryptococcus* menos sensíveis aos antifúngicos clínicos. Como *Cryptococcus* é um patógeno humano/ambiental, com isso, especulou-se que, no ambiente, esse fungo pode ser exposto a resíduos de antibacterianos provenientes da produção animal e vegetal. Entretanto, o estudo do impacto dessa exposição ambiental a antibacterianos sobre a susceptibilidade a antifúngicos, permanece incipiente. Essa vertente vem de encontro ao conceito de “One Health” onde considera-se que a saúde ambiental, animal e humana estão interligadas (One Health Joint Plan of Action, 2022). Além disso, devido ao uso empírico de antibacterianos no tratamento de pneumonias e meningites, é importante considerar que *Cryptococcus* também pode ser exposto a esses fármacos durante o manejo clínico da criptococose. Nesse contexto, nós avaliamos se a linhagem de *Cryptococcus gattii* L27/01 exposta continuamente a antibacterianos poderia apresentar alguma mudança no perfil de susceptibilidade a anfotericina B e fluconazol.

Os resultados demonstraram que, embora alguns dos antibacterianos (AMO e CRO) tenham apresentado ação fungistática em *Cryptococcus*, a exposição contínua a AMO, AMO+C e CRO não foi suficiente para selecionar populações menos susceptíveis aos antifúngicos. Os valores de CIM dos antibacterianos frente à linhagem L27/01 Exp.C foram semelhantes aqueles obtidos para a linhagem L27/01 (Controle) (Tabela 6).

**Tabela 6:** Concentração inibitória mínima (CIM) para antifúngicos frente as linhagens L27/01 (Controle), L27/01 Exposta continuamente a antibacterianos (Exp. C) e após 10 passagens sem droga (10p).

Antibacterianos	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) ANB <sup>a</sup>			CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) FLC <sup>b</sup>		
	L27/01	Ex.C	10p	L27/01	Ex. C	10p
AMO	1	1	1	8	8	8
AMO + C	0,5	1	1	4	8	4
CRO	1	1	0,5	8	4	8

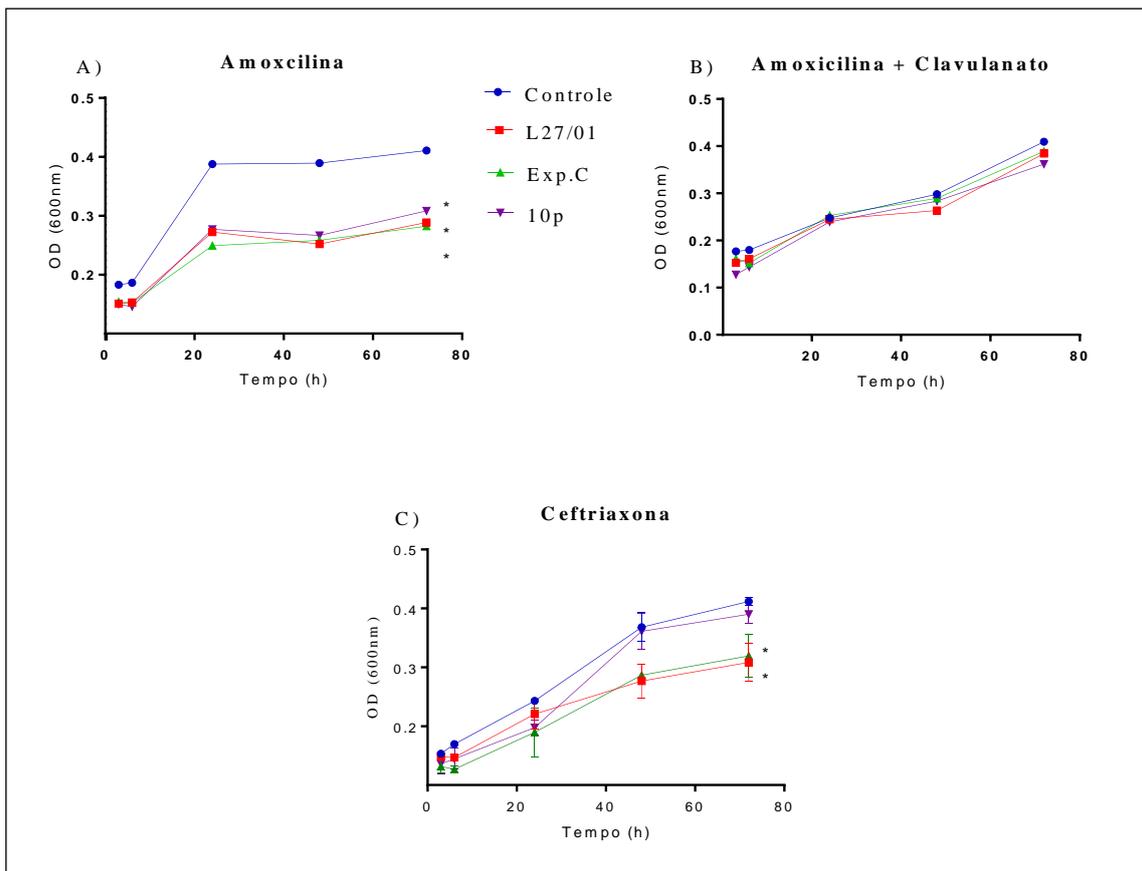
<sup>a</sup>CIM (100%): endpoint considerado 100% de inibição.

<sup>b</sup>CIM (50%): endpoint considerado 50% de inibição.

ANB: Anfotericina B; FLC: Fluconazol.

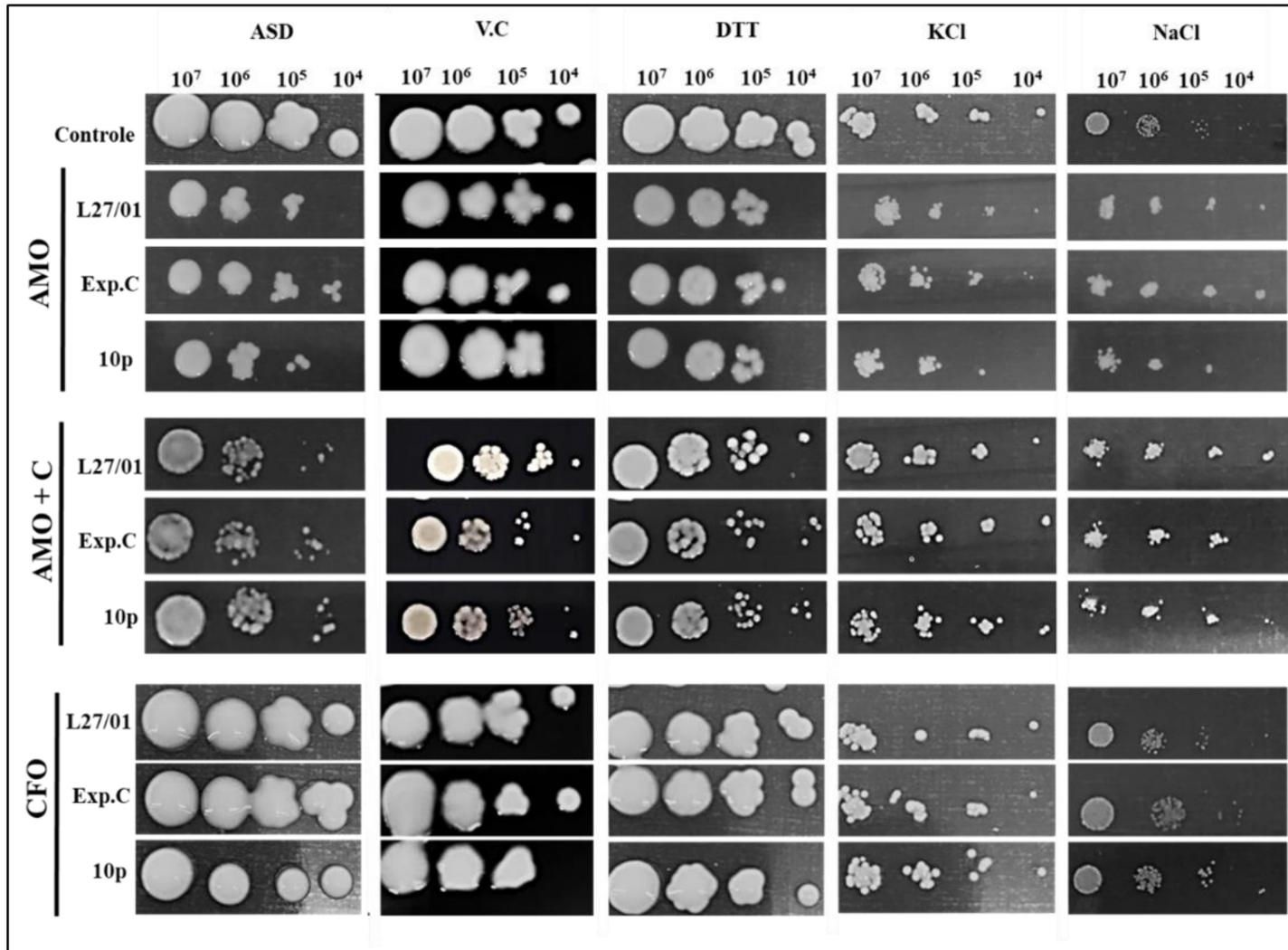
### 5.1.3 AMO e CRO alteram o perfil de crescimento de *Cryptococcus gattii*

Após analisar o efeito isolado e combinado aos antifúngicos frente a linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*, foi avaliado se a presença dos antibacterianos AMO, AMO+C e CRO poderiam interferir no perfil de crescimento de *Cryptococcus*. O tratamento com Amoxicilina ou Ceftriaxona reduziu significativamente o crescimento fúngico das linhagens L27/01, Exp. C e 10p em relação a linhagem controle sem tratamento (Figura 3). Para a Amoxicilina + C o tratamento foi indiferente (Figura 3). Esses achados sugerem que, apesar de não inibirem totalmente o crescimento fúngico, os antibacterianos Amoxicilina e Ceftriaxona podem apresentar ação fungistática em *Cryptococcus*.



**Figura 3:** Curva de crescimento de *Cryptococcus gattii* durante o tratamento com antibacterianos. Curva de crescimento de *C. gattii* após tratamento com amoxicilina (A), amoxicilina+clavulanato (B) e Ceftriaxona (C). Análise estatística: Área sob a curva e ANOVA seguido pelo teste de Tukey.\* Em relação ao controle. \*  $p < 0,05$ .

Por outro lado, o tratamento prévio com antibacterianos (Exp. C) não foi suficiente para promover diferenças no perfil de crescimento comparado a linhagem tratada somente durante o experimento (L27/01) (Figura 3). Isso sugere que, aparentemente, a exposição contínua a antibacterianos não foi capaz de promover mudanças fisiológicas em *Cryptococcus* suficientes para alterar a taxa replicativa. Esses achados corroboraram com os resultados observados no ensaio de crescimento em diferentes estressores celulares. A exposição contínua aos antibacterianos não selecionou populações menos ou mais susceptíveis a estressores de membrana e parede celular, levando a um fenótipo de crescimento semelhante ao controle sem tratamento (Figura 4).



**Figura 4:** Crescimento das linhagens L27/01 (controle), L27/01, Exp. C e 10p sob estresse na parede celular, membrana e osmótico após exposição a 512µg/mL de AMO, AMO+C e CRO. VC: Vermelho Congo (parede celular), DTT (retículo endoplasmático), NaCl e KCl(estresse osmótico).

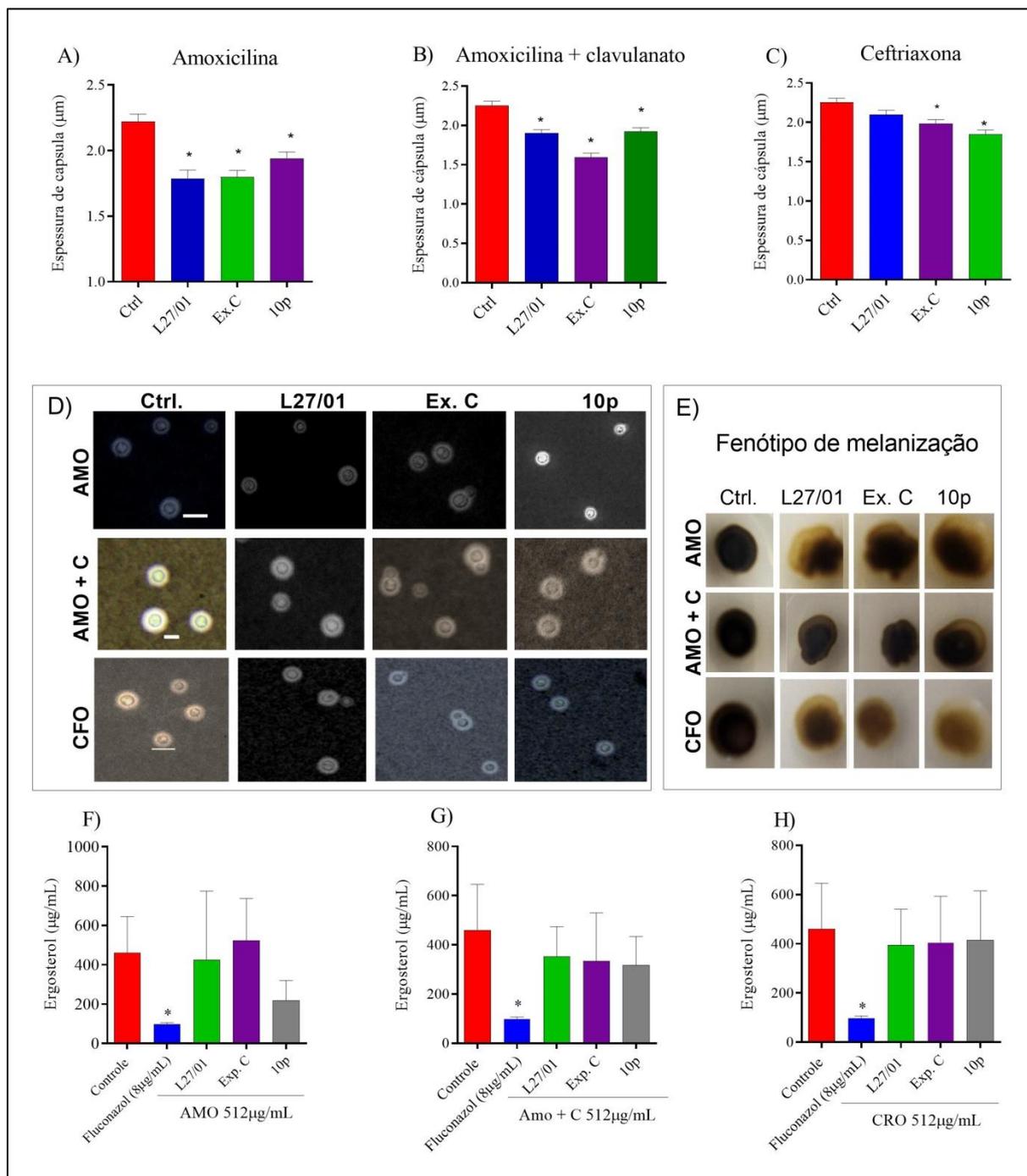
#### **5.1.4 AMO, AMO+C e CRO não alteram o conteúdo de ergosterol, mas interferem na síntese de cápsula polissacarídica e melanina de *Cryptococcus gattii*.**

O ergosterol é um componente de membrana fundamental para a manutenção da estabilidade e permeabilidade de membrana (THEIS; STAHL, 2004). Alterações no conteúdo do esterol podem alterar a taxa de crescimento fúngico e susceptibilidade aos antifúngicos clínicos (THEIS; STAHL, 2004). Como os antibacterianos AMO e CRO reduziram o crescimento fúngico, decidiu-se avaliar se essa redução poderia estar relacionada a alterações no conteúdo de ergosterol em *Cryptococcus*. Entretanto, o tratamento com AMO, AMO+C e CRO não alterou os níveis do esterol em *Cryptococcus*, sugerindo que outros alvos celulares estão envolvidos na ação dos antibacterianos na célula fúngica (Figura 5).

A cápsula polissacarídica e melanina são os fatores de virulência mais bem caracterizados para *Cryptococcus* (ARAÚJO et al., 2012). Durante a interação com o hospedeiro, esses fatores conferem ao fungo, propriedades antifagocíticas, resistência a estresse oxidativo e nitrosativos e evasão do reconhecimento imune (ARAÚJO et al., 2012). Neste estudo, observou-se que os antibacterianos AMO e CRO foram capazes de reduzir a síntese de cápsula polissacarídica e a intensidade do fenótipo de melanização *in vitro* (Figura 5). A AMO+C também reduziu a espessura da cápsula, mas não foi capaz de afetar a síntese de melanina (Figura 5).

A AMO e CRO pertencem à classe dos beta-lactâmicos e inibem a ação de carboxipeptidases, endopeptidases e transpeptidases na membrana citoplasmática bacteriana, envolvidas na síntese de parede celular (LIMA et al., 2020; KHAN et al., 2020; HAGIYA et al., 2017; HUTTNER et al., 2019). Em *Cryptococcus* cerca de 158 peptidases já foram descritas e caracterizadas, dentre elas existem algumas endopeptidases e carboxipeptidases (GONGORA; McALISTER, 2022). Essas enzimas estão envolvidas em diferentes processos celulares importantes para a célula fúngica como síntese de melanina, cápsula polissacarídica, termotolerância, degradação de proteínas do hospedeiro e resistência a antimicrobianos (GONGORA; McALISTER, 2022). Nesse contexto, sugere-se que a AMO e CRO também podem inibir peptidases

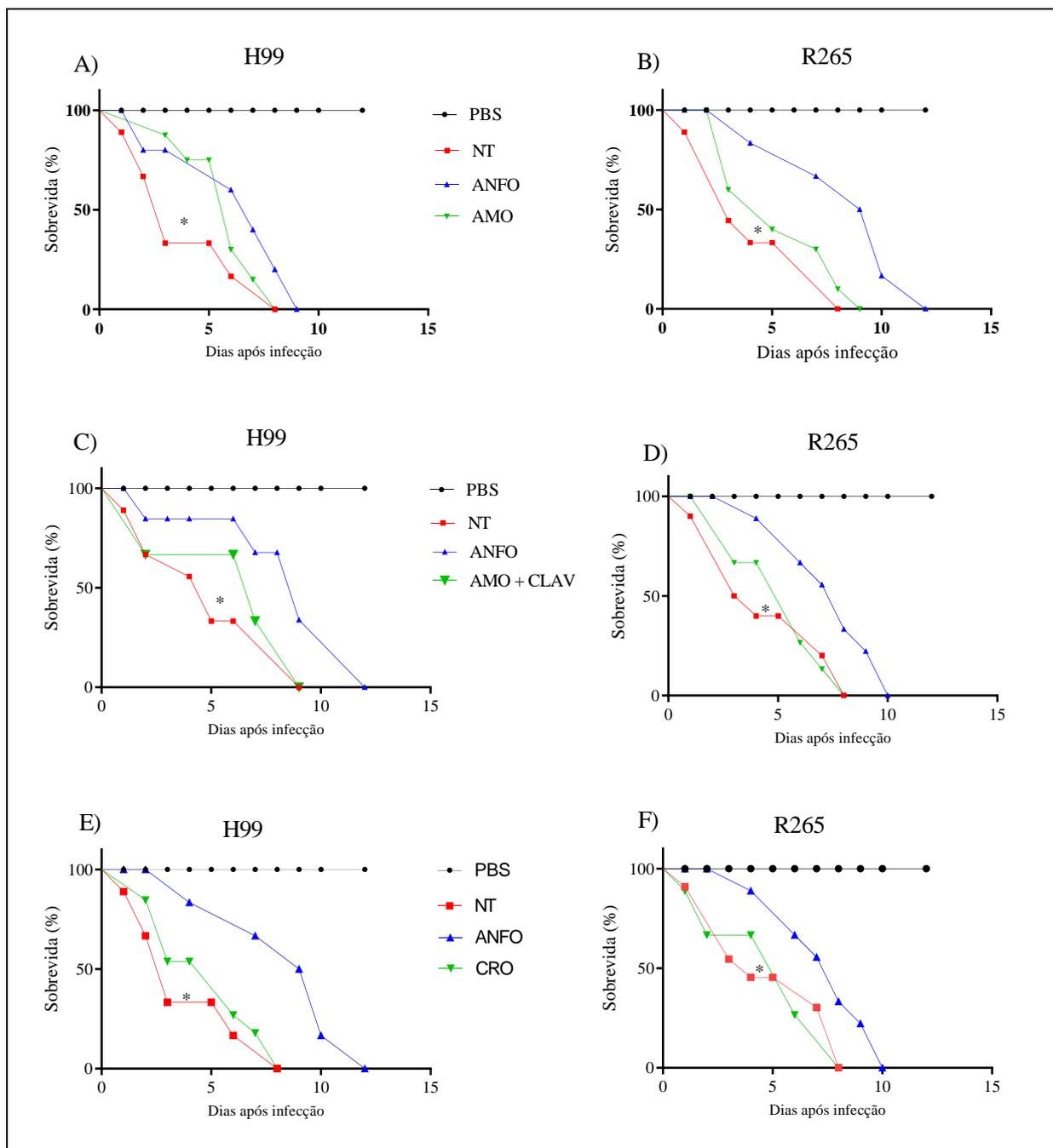
fúngica, o que explicaria a capacidade desses fármacos em reduzir o crescimento de *Cryptococcus* e interferir na síntese de melanina e cápsula polissacarídica.



**Figura 5:** Influência de antibacterianos na morfologia, melanização e síntese de ergosterol em *Cryptococcus gattii*. Efeito da AMO (A), AMO+C (B) e CRO (C) na espessura capsular de *C. gattii*. Visualização em tinta nanquim de colônias tratadas e não tratadas com antibacterianos. A barra representa um comprimento de 10µm.(D). Fenótipo de melanização durante o tratamento com antibacterianos (E). Efeito da AMO (F), AMO+C (G) e CFO (H) no conteúdo de ergosterol de *C. gattii*. Análise estatística: ANOVA seguido pelo teste de Tukey. \*Em relação o grupo não tratado (controle) com os grupos tratados. \*p<0,05.

### **5.1.5 O tratamento com AMO, AMO+C e CRO não aumenta a sobrevivência em modelo invertebrado de criptococose.**

Considerando a capacidade dos antibacterianos de inibir o crescimento fúngico e a síntese de fatores de virulência, avaliou-se o efeito desses fármacos na progressão da criptococose em modelo invertebrado de infecção. Nesse ensaio utilizou-se a anfotericina B como controle. Nossos achados demonstraram que os antibacterianos não foram eficazes para o tratamento da criptococose no modelo invertebrado (Figura 6). As larvas tratadas apresentaram um perfil de sobrevivência semelhante ao grupo não tratado. Acreditamos que a dose dos antibacterianos utilizada e as limitações do modelo de infecção podem ter contribuído para os resultados encontrados.



**Figura 6:** Curva de sobrevivência em modelo invertebrado de criptococose após infecção com as linhagens H99 e R265 e tratamento com AMO (A-B), AMO+C (C-D) e CRO (E-F). Análise estatística: teste de Log rank (Mantel-Cox) \* Em relação ao controle não tratado. \* $p < 0,05$ .

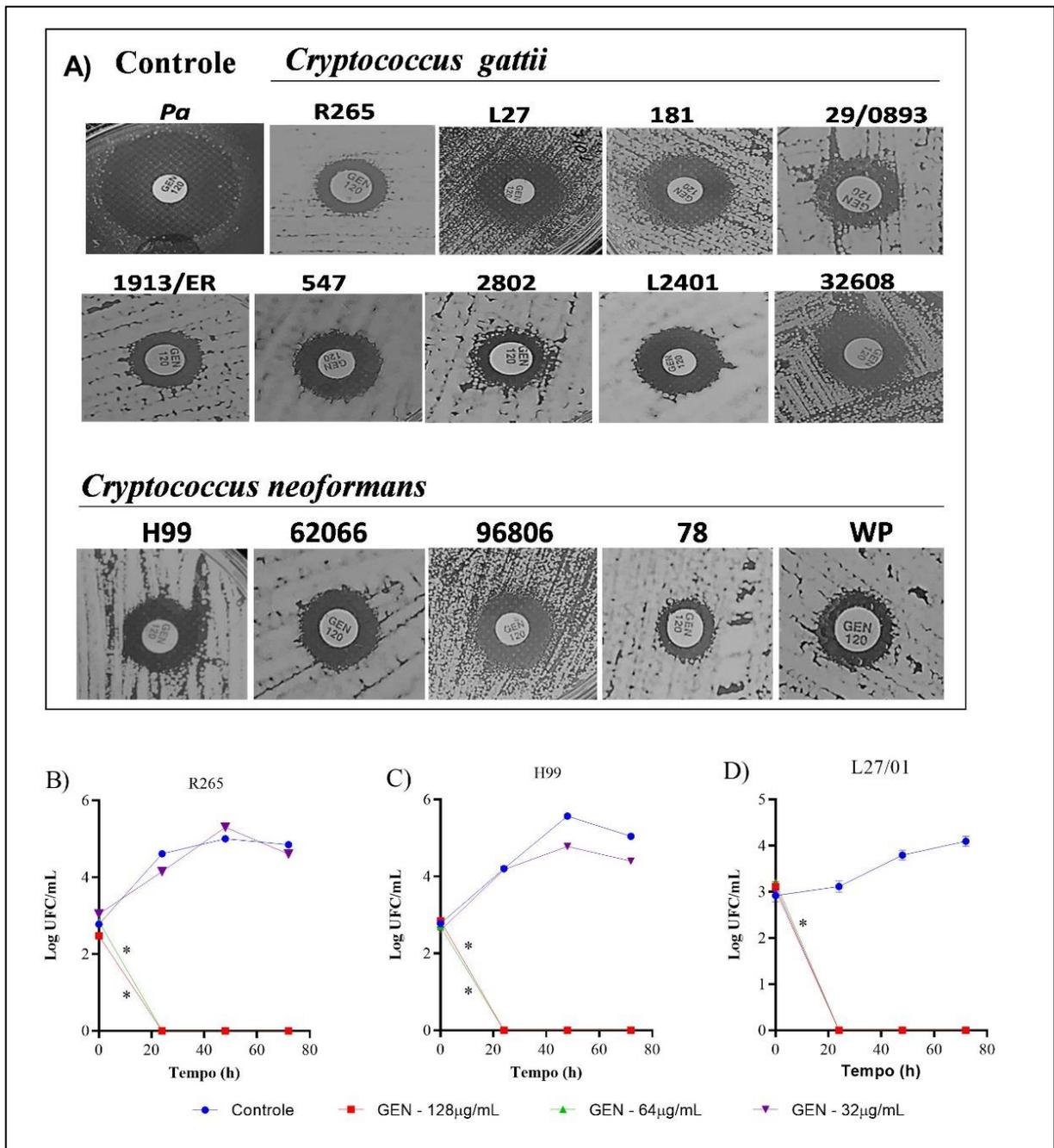
## 5.2 Gentamicina

### 5.2.1 A Gentamicina apresenta ação fungicida em *Cryptococcus*

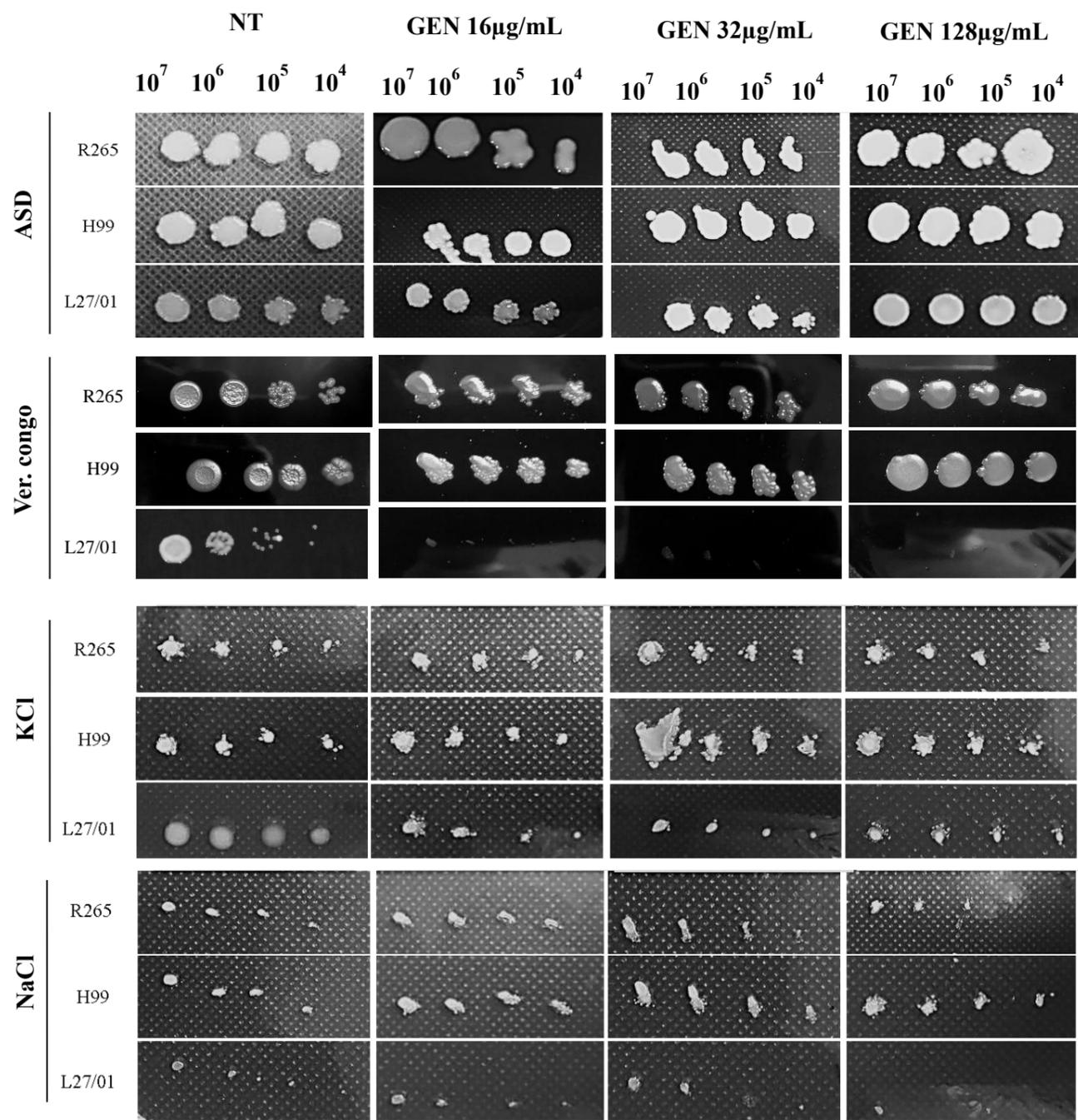
A gentamicina (GEN) é um aminoglicosídeo indicado para o tratamento de diversas infecções causadas por bactérias gram-negativas, como septicemias, meningite, infecções do trato urinário, entre outras (CHAVES; TADI, 2023). Estudos anteriores já demonstraram o efeito antimicrobiano da gentamicina frente a diferentes fungos, como *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Microsporium gypseum* e *Cryptococcus neoformans* (BANFALVI, 2020). Entretanto, apesar dessas evidências o conhecimento dos mecanismos envolvidos na ação da gentamicina em *Cryptococcus* ainda permanece incipiente. Nesse contexto, foi avaliado a influência da GEN na morfofisiologia e susceptibilidade à antifúngicos de *C. neoformans* e *C. gattii*.

Como demonstrado inicialmente, a GEN foi capaz de inibir o crescimento de diferentes linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* nos ensaios de difusão de disco e microdiluição em caldo e apresentou interação indiferente com antifúngicos clínicos. Considerando esses achados realizou-se uma curva de viabilidade fúngica para determinar se ação da GEN em *Cryptococcus* era resultante de um efeito fungicida ou fungistático. Após 24 horas, a GEN na concentração de 64µg/ml anulou a viabilidade das linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* testadas, evidenciando uma ação fungicida durante o tratamento (Figura 7).

Entretanto, apesar da ação fungicida em *Cryptococcus*, a pré-exposição a concentrações subinibitórias de GEN não foi capaz de alterar o perfil de crescimento fúngico durante o crescimento frente a estressores de membrana e parede celular (Figura 8). As linhagens pré-expostas à GEN apresentaram um perfil de crescimento semelhante ao controle (sem exposição à droga) quando cultivadas na presença de vermelho Congo, cloreto de sódio e cloreto de potássio. Isso sugere que a pré exposição à gentamicina não foi capaz de selecionar subpopulações celulares menos ou mais susceptíveis a estressores celulares.



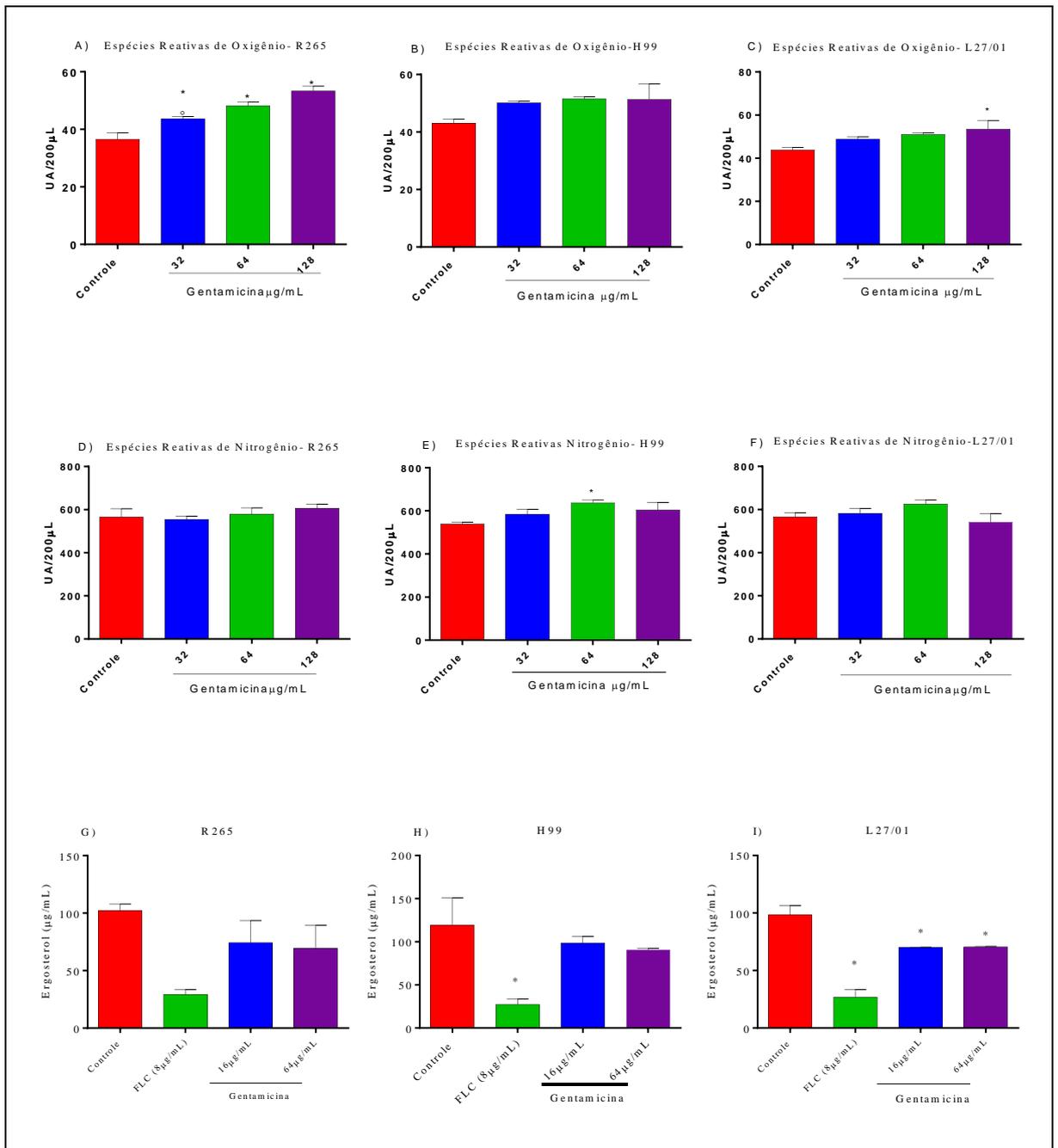
**Figura 7:** Teste de difusão de disco e perfil de crescimento de *Cryptococcus* durante o tratamento com gentamicina. Antibiograma para diferentes linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* (A) frente a gentamicina 120µg/mL. Curva de morte das linhagens tratadas com gentamicina em diferentes concentrações: (C) R265, (D) H99, (E) L27/01. Análise estatística: Área sob a curva e ANOVA seguida pelo teste de Tukey, \*p < 0,05 em relação ao grupo não tratado (controle).



**Figura 8:** Crescimento das linhagens H99, R265 e L27/01 sob estresse na parede celular e membrana após exposição à gentamicina. Perfil de crescimento das linhagens H99, R265 e L27/01 em vermelho congo (A), cloreto de potássio (B) e cloreto de sódio (C) após exposição a gentamicina.

### 5.2.2 Gentamicina reduz o conteúdo de ergosterol e induz estresse oxidativo em *Cryptococcus*

A anfotericina B é um antifúngico polieno, com ação fungicida, que se liga ao ergosterol e causa poros na membrana, levando ao extravasamento do conteúdo intracelular e morte fúngica (BANFALVI, 2020). Além disso, possui como efeitos secundários da sua ação, a capacidade de induzir estresse oxidativo e nitrosativo (NETT; ANDES, 2016). Como a gentamicina também apresentou ação fungicida em *Cryptococcus* decidiu-se avaliar se esse efeito poderia estar relacionado a indução de danos na membrana e aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Curiosamente, o tratamento fúngico com gentamicina resultou na redução significativa do conteúdo de ergosterol e no aumento de espécies reativas de oxigênio, o que pode explicar em parte, o seu efeito fungicida (Figura 9). Em bactérias, como a gentamicina interfere na síntese proteica, através da ligação irreversível ao ribossomo 30S, alguns estudos sugerem que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio esteja relacionado a depleção de proteínas envolvidas nas reações de oxirredução (FERREIRA et al., 2013). Por outro lado, embora seus ribossomos sejam diferentes, em eucariotos a gentamicina pode promover erros na síntese proteica, causar estresse no retículo endoplasmático (RE) e promover dano mitocondrial (IGWEBUIKE et al., 2020). Nesse contexto, supomos que a GEN ao afetar a síntese proteica em *Cryptococcus*, leve a um efeito dinâmico na célula fúngica, interferindo na síntese de componentes de membrana, como o ergosterol. Além disso, especulamos que a indução de ROS mediada pela GEN, observada nos resultados, pode estar relacionada a depleção direta de proteínas antioxidantes ou a danos na atividade mitocondrial.

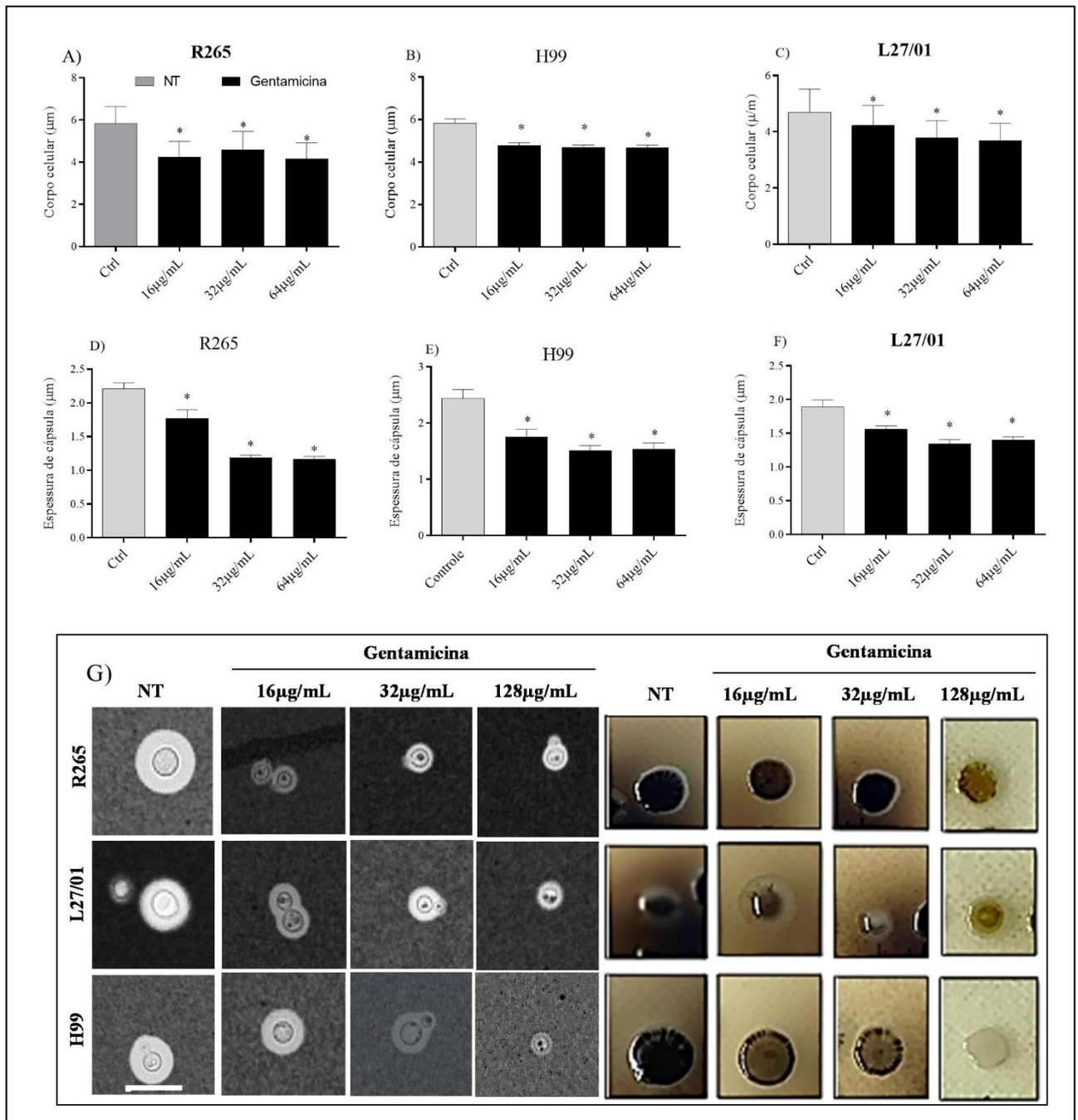


**Figura 9:** Avaliação de ergosterol e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio após tratamento com gentamicina. Conteúdo de ergosterol para linhagens R265, H99 e L27 após tratamento com gentamicina (A). Espécies reativas de oxigênio para as linhagens R265, H99 e L27 frente a gentamicina (B). Espécies reativas de nitrogênio para as linhagens R265, H99 e L27 frente a gentamicina (C). Análise estatística: ANOVA seguido pelo teste de Tukey \* Em relação ao controle não tratado com o grupo tratado com gentamicina. \* $p < 0,05$ .

### **5.2.3 A gentamicina reduz a síntese de cápsula polissacarídica e melanina em *Cryptococcus***

Considerando o efeito fungicida da gentamicina e a capacidade desse antibacteriano de reduzir o conteúdo de ergosterol e induzir estresse oxidativo em *Cryptococcus*, decidiu-se avaliar se esse antibacteriano seria capaz de alterar fatores de virulência importantes para o fungo, como a capsula polissacarídica e síntese de melanina. Interessantemente, o tratamento com a gentamicina foi capaz de reduzir, dose-dependente, o tamanho do corpo celular, a síntese de cápsula polissacarídica e melanina em *Cryptococcus* (Figura 10).

É possível que a redução na síntese de fatores de virulência induzida pela gentamicina esteja relacionada a alterações na síntese proteica fúngica. Entretanto, como trata-se de um estudo preliminar, novas pesquisas ainda são necessárias para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na ação da GEN em *Cryptococcus*.

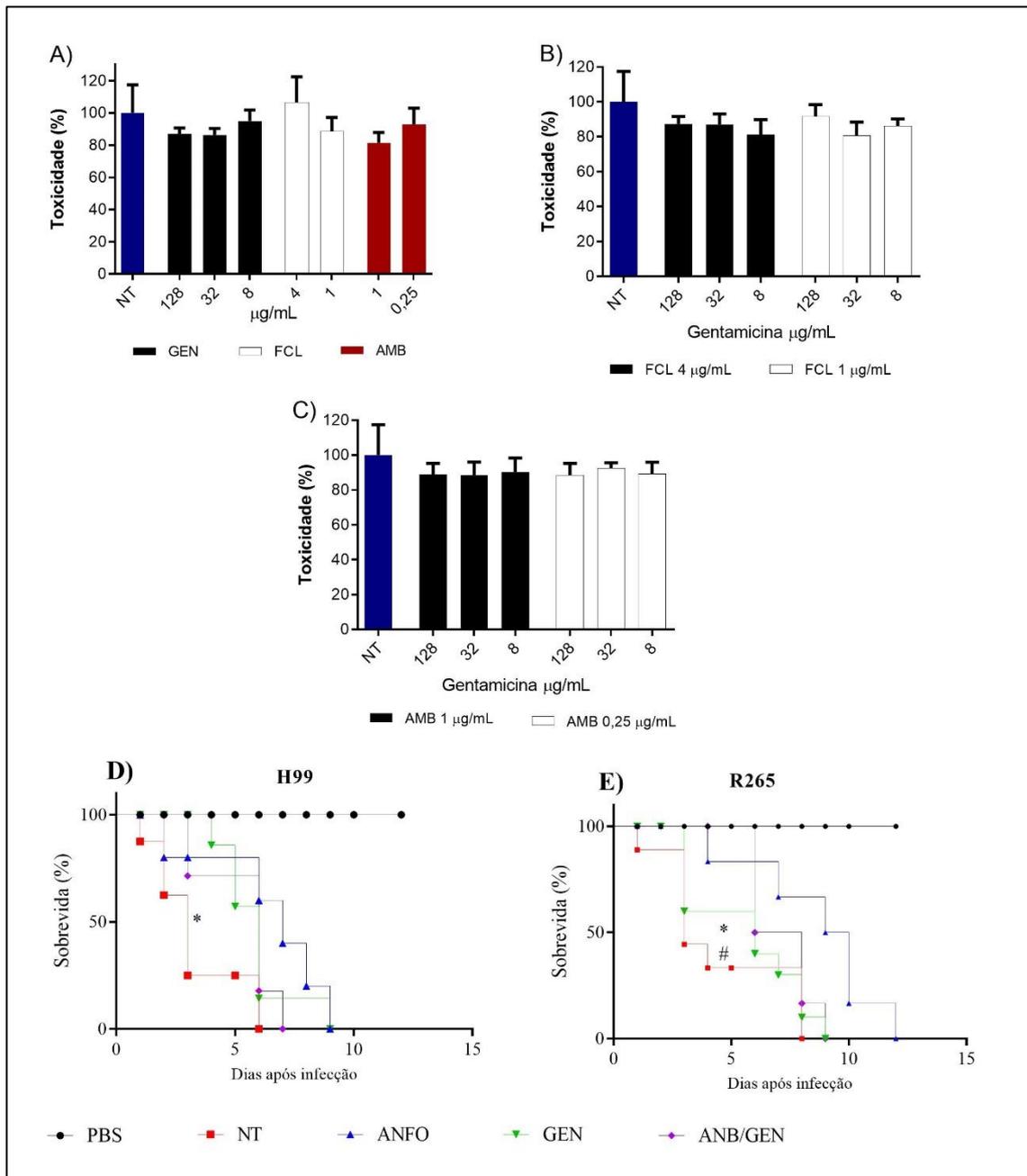


**Figura 10:** Síntese de cápsula polissacarídica e melanina após exposição a gentamicina. Corpo celular e espessura capsular das linhagens R265, H99 e L27 após 72 horas de exposição a gentamicina (A-F). Fenótipo de melanização e preparações em nanquim das linhagens R265, H99 e L27 após exposição a gentamicina (E). A barra representa um comprimento de 10µm. Análise estatística: ANOVA seguido pelo teste de Tukey \* Em relação ao controle não tratado \* $p < 0,05$ .

#### **5.2.4 GEN apresenta baixa toxicidade em macrófagos murinos quando combinada a antifúngicos clínicos, mas não aumenta a sobrevida em modelo invertebrado de criptococose**

De acordo com os resultados obtidos, decidiu-se avaliar o efeito da GEN isolada e combinada a antifúngicos clínicos quanto a toxicidade em macrófagos murinos e no tratamento da criptococose em modelo invertebrado de infecção.

Observou-se que o tratamento com a GEN isolada ou combinada a antifúngicos clínicos não foi capaz de induzir toxicidade elevada em macrófagos murinos e aumentar a sobrevida em modelo invertebrado de criptococose (Figura 11). Como a gentamicina apresentou ação fungicida *in vitro*, outros esquemas terapêuticos de GEN e modelos de infecção ainda são necessários para a melhor compreensão dos efeitos desse antibacteriano na terapia anticriptocócica.



**Figura 11:** Perfil de toxicidade em macrófagos murinos e sobrevivência em modelo invertebrado de criptococose após o tratamento com gentamicina isolada e combinada a antifúngicos clínicos. Viabilidade de macrófagos murinos frente a diferentes concentrações de anfotericina; Fluconazol; e gentamicina (A). Viabilidade de macrófagos murinos frente a diferentes concentrações de fluconazol (B) e anfotericina B (C) combinadas a gentamicina (B). Curva de sobrevivência em modelo invertebrado de criptococose após infecção com as linhagens H99 (D) e R265 (E) e tratamento com gentamicina isolada e combinada a anfotericina B. Análise estatística: ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Curva de sobrevivência: teste de Log rang (Mantel-Cox) \* Em relação ao controle não tratado e tratado com gentamicina #Em relação ao grupo controle não tratado e tratado com ANB/GEN. \* $p < 0,05$ .

## 6 SÍNTESE DOS RESULTADOS

- A AMO e CRO apresentam ação fungistática e inibem a síntese de cápsula polissacarídica e melanina em *Cryptococcus*. Apesar desses efeitos, a interação entre os antibacterianos e antifúngicos resultou em uma interação indiferente. Além disso, a exposição contínua aos antibacterianos não foi capaz de selecionar subpopulações de *Cryptococcus* menos ou mais susceptíveis aos antifúngicos clínicos. Apesar da ação fungistática, o tratamento com AMO ou CRO em modelo invertebrado de criptococose não foi capaz de inibir a progressão da doença.
  
- A gentamicina, por sua vez, apresenta efeito fungicida em *Cryptococcus*, associado a estresse oxidativo, redução do conteúdo de ergosterol, síntese de melanina e cápsula polissacarídica na célula fúngica. Apesar do efeito dinâmico, a GEN combinada a antifúngicos clínicos resultou em uma interação indiferente e o tratamento em modelo invertebrado de criptococose foi ineficaz.
  
- Esse estudo trouxe resultados inéditos sobre o efeito *in vitro* de antibacterianos na morfofisiologia e susceptibilidade aos antifúngicos de *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*. Entretanto, apesar dessas evidências, acredita-se que novos ensaios *in vitro* e *in vivo* ainda são necessários para a melhor compreensão do efeito de antibacterianos no contexto da criptococose.

## 7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados demonstraram que os antibacterianos utilizados não causaram resistência cruzada, mesmo após a exposição prévia aos antibacterianos. Além disso, a gentamicina pode vir a se tornar uma alternativa para o tratamento da criptococose. Entretanto, é necessário mais pesquisas para comprovar a eficácia deste fármaco.

## 8 PERPESCTIVAS

- Ensaio de fagocitose, para avaliar a taxa de proliferação e internalização após a exposição a gentamicina.
- Ensaio de barreira hematoencefálica para avaliar a possibilidade de inibir a infecção da criptococose no SNC.
- Avaliar a ação da gentamicina em modelo murino, com isso, será possível observar:
  - contagem de unidade formadora de colônia (CFU) em lavado brônquio alveolar, cérebro e pulmão.
  - possibilidade de observar concentrações sub inibitórias, inibitórias ou até mesmo dose dependente da gentamicina no tratamento da criptococose.
  - sobrevivência dos camundongos tratados com gentamicina dos grupos tratados em comparação com o não tratados.
  - co infecção (bactérias/*Cryptococcus* spp)

## 9 REFERÊNCIAS

- ABUSHAHEEN, M. et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease a Month**. v.66, p. 2-21, 2020.
- ALANIO, A. Dormancy in *Cryptococcus neoformans*: 60 years of accumulating evidence. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 130, n. 7, p. 3353-3360, 2020.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J.W.; CASADEVALL, A. Virulence- associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**. v. 14, n. 12. p. 1173-1185, 2015.
- ANDES, D.; STAMSTED, T.; CONKLIN, R. Pharmacodynamics of amphotericin B in neutropenic-mouse disseminates- candidiasis model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 3, p. 922-926, 2001.
- ANDES, D. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic comparison of amphotericin B (AMB) and two lipid-associated AMB preparations, liposomal AMB and AMB lipid complex, in murine candidiasis models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 2, p. 674-684, 2005.
- ÁLVAREZ, R. et al. Optimizing the clinical use of vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 60, n. 5, p. 2601-2609, 2016.
- ANTINORI, S. et al. Candidemia and invasive candidiasis in adults. A narrative review. **European Journal of Internal Medicine**. v. 34, p. 21-28, 2016.
- ARAUJO, G. et al. Capsules form pathogenic and non-patogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **Plos One**. v. 7, n. 1. e29561, 2012.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K.B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 3, p. 673-683, 2004.
- AZEVEDO, M.M. et al. The effect of antibacterial and non- antibacterial compounds alone or associated with antifungals upon fungi. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, p. 1-7, 2015.
- BANFALVI, G. Antifungal activity of gentamicin B1 against systemic plant mycoses. **Molecules**. v. 25, n. 10, p. 2-9, 2020.
- BALABAN, N. et al. Definitions and Guidelines for Research on Antibiotic Persistence. **Nature Reviews Microbiology**. v. 17, n. 7, p. 441-448, 2019.
- BASTOS, R.W. et al. Environmental triazole induces cross-resistance to clinical drugs and affects morphophysiology and virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 62, n.1, p. e01179-17, 2017.
- BASTOS, R. W.; ROSSATO, L.; GOLDMAN, G. H; SANTOS, D. A. Fungicide effects on human fungal pathogens: cross resistance to medical drugs and beyond. **Plos Pathogens**. v. 7, n. 12, 2021.

- BASSO, L.R. et al. Identification and properties of plasma membrane azole efflux pumps from the pathogenic fungi *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 70, p. 1396-1407, 2015.
- BEARDSLEY, J. et al. What's new in *Cryptococcus gattii*: from bench to bedside and beyond. **Journal of Fungi**. v. 9, n. 1, p. 41, 2023.
- BECERRA – PEDRAZA, L.C. et al. Immunocompetent patient with cerebral cryptococcosis: case report. **Gaceta Médica de México**. v. 153, p. 829-832, 2017.
- BELLMAN, R.; SMUSZKIEWICZ, P. Pharmacokinetics of Antifungal Drugs: practical implications for optimized treatment of patients. **Infection**. v. 45, n. 6, p. 737-779, 2017.
- BELOZERSKAYA. T.A.; GESSLER. N.N.; AVER'YANOV, A.A. Melanin pigments of fungi. **Fungal Metabolites**. v. 263-291, 2017. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_29).
- BERMAS, A.; GEDDES-McALISTER. Combatting the Evolution of Antifungal Resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**. v. 114, p. 721-734, 2020.
- BIELSKA. E.; MAY. R.C. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? **FEMS Yeast Research**. v. 16. n. 1. p. 1-12, 2016.
- BIELSKA, E. et al. Pathogen-derived extracellular vesicles mediate virulence in the fatal human pathogen *Cryptococcus gattii*. **Nature Communications**. v. 9, p. 1-9, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-03991-6.
- BICANIC, T. et al. Fungal burden, early fungicidal activity, and outcome in cryptococcal meningitis in antiretroviral-naïve or antiretroviral-experienced patients treated with amphotericin B or fluconazole. **Clinical Infectious Diseases**. v. 45, p. 76-80, 2007.
- BISHT, K.; BAISHYA, J.; WAKEMAN, C.A. *Pseudomonas aeruginosa* Polymicrobial Interactions During Lung Infection. **Current Opinion Microbiology**. v. 53, p. 1-8, 2020.
- BLAIR, J.M.A. et al. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature Reviews**. v. 13, n.1, p. 42-51, 2015.
- BONGOMIN, F et al. A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. **Mycoses**. v. 61, p. 290-297, 2018.
- BOYER- CHAMMARD, T. et al. Recent advances in Managing HIV- Associated Cryptococcal Meningitis [version 1 peer review: 2 approved] **F 1000 Research**. v. 8, 2019. <https://doi.org/10.12698/floorsearch.17673.1> Acesso em: 23/09/2021.
- BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**. v. 25, n. 6, p. 2-23, 2020.
- BRENCIC, T.; NIKOLAC, N. Gentamicin and vancomycin interference on results of clinical chemistry parameters on abbot architect c8000. **Archives of Pathology e Laboratory Medicine**. v. 143, n. 6, p. 738-747, 2019.

BROWN, G.D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**. v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004404.

BUCHAM, K.L.; MURPHY, J.W. What Makes *Cryptococcus neoformans* a Pathogen? **Emerging Infectious Diseases**. v. 4, n.1, p. 71-83, 1998.

BUTTS, A.; KRYSAN, D.J. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. **Plos Pathogens**. v. 8, n. 9, p. e1002870, 2012.

BULMAN, Z. et al. Unraveling the gentamicin drug product complexity reveals variation in microbiological activities and nephrotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 64, n.9 e00533-20, 2020.

BYRNES, E. J. et al. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 11, p. 895-92011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684347> >

CAMACHO et al. The structural unit of melanina in the cell wall of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Biological Chemistry**. v. 294, n. 27, p. 10471-10489, 2019.

CAO, W. et al. Comparison of clinical features and prognostic factors of cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* in patients with and without pulmonary nodules. **Mycopathologia**. v. 184, p. 73-80, 2018.

CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J.N.; NOSANCHUCK, J.D. Ready-made virulence and dual use virulence factors in pathogenic environmental fungi the *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Current Opinion in Microbiology**. v. 6, n. 4, p. 332-337, 2003.

CASADEVALL, A.; COELHO, C.; ALANIO, A. Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*- mediated host damage. **Frontiers in Immunology**. v. 9, p.1-8, 2018. Doi: 10.3389/fimmu.2018.00855.

CHANG, C. et al. HIV and co-infections. **Immunology Review**. v. 254, n. 1, p. 114-142, 2013.

CHARLIER, C. et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**. v. 77, n. 1, p. 120-127, 2009.

CHATURVEDI. et al. *Cryptococcus gattii* in AIDS Patients, Southern California. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 11, p. 1686-1692, 2005.

CHAVES, B.J, TADI, P. Gentamicin. 2021 Jul 9. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 32491482.

CHAVES, B.J; TADI, P. Gentamicin. Updated **StaPearls**. Treasure Island, 2023. //https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557550/. 2023.

- CHEN, G.L et al. Invasive fungal infection in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**. v. 31, p. 1087-1091, 2012.
- CHEN, S. C. A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii*. **Infections Clinical Microbiology. Reviews**. vol. 27 p. 980-1024, 2014.
- CHEN, Y. L.; LEHMAN, V. N.; LEWT, Y.; AVERTTE, A.; HEITMAN, J. Calcineurin governs thermotolerance and virulence of *Cryptococcus gattii*. **G3- Genes, Genomes, Genetics**. v. 3, n. 3, p. 527-535, 2013.
- CHERNY, S.S. et al. Revealing antibiotic cross-resistance patterns in hospitalized patients through Bayesian network modeling. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 76, n. 1, p. 239-248, 2020.
- CHESDACHAI, S. et al. Minimum Inhibitory Concentration Distribution of Fluconazole Against *Cryptococcus* Species and the Fluconazole Exposure Prediction Model. **Open Forum Infectious Diseases**. v. 6, n. 10, p. 1-8, 2019.
- CLANCY, C.J. et al. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates recovered from persons with AIDS demonstrate a wide range of virulence during murine meningoencephalitis that correlates with the expression of certain virulence factors. **Microbiology**. v. 152. p. 2247-2255, 2006.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- CLSI. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard. Third Edition. CLSI document M27 – A3. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2017.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M 100- S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and promising. **Cellular Microbiology**. v. 18, n.6, p. 792-799, 2016.
- DEISS, R. G.; BOLARIS, M.; WANG, A.; FILLER, S. G. *Cryptococcus gattii* meningitis complicated by *Listeria monocytogenes* infection. **Emerging Infectious Diseases**. v. 22, n. 9, p. 1669-1671, 2016.
- DELMA, S.S. et al. Molecular mechanisms of 5-fluorocytosine resistance in yeasts and filamentous fungi. **Journal Fungi**. v. 7, n. 11, p. 909, 2021.
- DESJARDINS, C. A. et al. Population genomics and the evolution of virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Genome Research**. v. 27, n. 7, p. 1207-1219, 2017.
- DZOYEM, J.P. et al. Prevalence of cryptococcosis among HIV- infected patients in Yaounde, Cameroon. **African Health Sciences**. v.12, n.2, p. 129-133, 2012.

ELAYYAN, S. et al. Antibacterial predrugs-from 1899 till 2015. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 4, n. 8, p. 1504-1529, 2015.

ELDESOUK, H.E. et al. Reversal of azole resistance in *Candida albicans* by sulfa antibacterial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 62, n. 3, p. 1-12, 2017.

EMÍDIO, E.C.P. et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection modulates the immune response and increases mice resistance to *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 12, p. 811474, 2022.

EMÍDIO, E.C.P. et al. *Staphylococcus aureus* triggers a protective inflammatory response against secondary *Cryptococcus gattii* in infection murine model. **Microbes and Infection**. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2023.105122>, 2023.

ESHWARA, V.K.; MUKHOPADHYAY, C.; RELLO, J. Community- Acquired Bacterial Pneumonia in Adults: An Update. **Indian Journal of Medical Research**. v. 15, n. 4, p. 287-302, 2020.

FAO, UNEP, WHO, WOA, 2022. One health joint plan action (2022-2026). Working together for the health of humans, animals, plants the environment.

FARRER, R. A. et al. A new lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) discovered in the central Zambezi miombo woodlands. **mBio**. v. 10, n. 6, p. e02306-19, 2019.

FERNANDES, K.E.; WEEKS, K.; CARTER, D.A. Lactoferrin is broadly active against yeasts and highly synergistic with amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 64, n. 5, p. e02284-19, 2020.

FERREIRA, G. et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 68, n. 8, p. 1801-1811, 2013.

FONTES, A.C.L. et al. A sub dose of fluconazole alters the virulence of *Cryptococcus gattii* during murine cryptococcosis and modulates type I interferon expression. **Medical Mycology**. v. 55, p. 203-212, 2017.

FREITAS, G.J.C. et al. Antimalarials and amphotericin B interact synergistically and are new options to treat cryptococcosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2023. [//https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106807](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106807).

FUCHS, B.B. et al. Inhibition of bacterial and fungal pathogens by the orphaned drug aurano-fin. **Future Medicinal Mycology**. v. 55, p. 203-212, 2017.

GANJAEI, K.G.; LAWTON, K.; GAUR, S. Cutaneous Leishmaniasis in an American adolescent returning from Israel. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**. v. 7, n. 3, p. 178-181, 2018.

GAZZONI, A.F. et al. Unusual morphologies of *Cryptococcus* spp. in tissue specimens: report of 10 cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 52, n. 3, p. 145-149, 2010.

GHANNOUM, M.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology**. v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GIARDINA, P. et al. Lacase: a never- ending. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 67, n. 3, p. 369-385, 2010.

GRÉGOIRE, M. et al. High-dose Ceftriaxone for Bacterial Meningitis and Optimization of Administration Scheme Based on Nomogram. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 63, n. 9, e00634-19, 2019.

GODINHO, R.M.C. et al. *Cryptococcus* and Cryptococcosis- chapter 6. **Current Progress in Medical Mycology**. p. 169-214, 2017.

GONGORA, D.G; McALISTER, J.G. Peptidases: promising antifungal targets of the human fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **Facets**. v. 7, n.1, p. 319-342, 2022.

GONZALEZ-LARA, M.F.; SIFUENTES-OSNORIO, J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Drugs in clinical development for fungal infections. **Drugs**. v. 77, n. 14, p. 1505-1518, 2017.

GROLL, A.H. et al. Comparative Efficacy and Distribution of Lipid Formulations of Amphotericin B in Experimental *Candida albicans* Infection of the Central Nervous System. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 182, p. 274-282, 2000.

GUPTA, A.; CAPOOR, M. R.; GUPTA, S.; SACHDEVA, H.C. Concomitant infection of influenza A H1N1 and disseminated cryptococcosis in an HIV seropositive patient. **Journal of Laboratory Physicians**. v. 7, n. 2, p. 134-136, 2015.

HAGEN, J. et al. Large-scale evolution of the immune mycology lateral flow and enzyme linked immuno assays for detection of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid. **Clinical Vaccine Immunology**. v. 20, p. 52-55, 2013.

HAGIYA, H. et al. Ceftriaxone- induced neurotoxicity in Patient after pancreas kidney transplantation. **Internal Medicine**. v. 56, n. 6, p. 3103-3107, 2017.

HAMILL, R. Amphotericin B Formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**. v. 73, n. 9, p. 919-934, 2013.

HEITMAN, J. et al. *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast. 2nd. Ed. Washington: ASM press. p. 620, 2011.

HOAG, K.A et al. IL-12 and IFN- Are Required for Initiating the Protective Th1 Response to Pulmonary Cryptococcosis in Resistant C.B-17 Mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v.17, p. 733-739,1997.

HOUST, J.; SPÍZEK, J.; HAVLÍČEK, V. Antifungal Drugs. **Metabolites**. v. 10, n. 3, p. 2-16, 2020.

- HUFFNAGLE, G.B. et al. Down – regulation of the afferent phase of Tcell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Immunology**. v. 15, n. 7, p. 3507-3516, 1995.
- HUTTNER, A. et al. Oral Amoxicilin and Amoxicilin-Clavulanic Acid: properties indications and usage. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 26, n. 7, p. 871-879, 2019.
- IGWEBUIKE, C. et al. Cross organelle stress response disruption promotes gentamicin-induced proteotoxicity. **Cell Death e Disease**.v. 11, n. 4, p. 217, 2020.
- INTRA, J. et al. Bacterial and fungal colonization of the respiratory tract in COVID-19 patients should not be neglected. **American Journal of Infection Control**. v. 48, n. 9, p. 1130-1131, 2020
- IYER, K. R. et al. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature Reviews Microbiology**. v. 19, p. 454-466, 2021.
- JEFFREY-SMITH, A. et al. *Candida auris*: a review of literature. **American Society for Microbiology**. v. 31, n. 1, p. 1-17, 2017.
- JAIN, N.; FRIES, B.C. Phenotypic Switching of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Mycopathologia**. v. 166, n. 4, p. 181-188, 2008.
- JOÃO, I.; BUJDÁKOVÁ, H.; JORDÃO, L. Opportunist Coinfections by Nontuberculous Mycobacteria and Fungi in Immunocompromised Patients. **Antibiotics**. v. 9, n. 11, p. 2-23, 2020
- JOHN, J.JR. The treatment of resistant staphylococcal infections. Version 1, peer review: 3 approved. F1000 Research, 2020. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17718.1>
- JONHSON, M. D.; PERFECT, J.R. Use of Antifungal Combination Therapy: Agents, Order, and Timing. **Current Fungal Infection Reports**. v. 4, n. 2, p. 87-95, 2010.
- JONES, T. H. et al. Novel antifungal activity for the lectin scytovirin: Inhibition of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Frontiers of Microbiology**. v. 8, p. 1-9, 2017.
- JUBEH, B.; BREIJYEH, Z.; KARAMAM, R. Resistance of Gram- positive bacteria to current antibacterial agents and over coming approaches. **Molecules**. v. 25, n. 12, p. 2-22, 2020.
- KAYE, C. et al. The Clinical Pharmacokinetics of New Pharmacokinetically Enhanced Amoxicilin Clavulanic Acid Formulation. **Clinical Therapeutics**. v. 23, n. 4, p. 578-584, 2011.
- KHONDDKER, A. et al. Membrane interactions of non-membrane targeting antibiotics: The case of aminoglycosides, macrolides and fluoroquinolones. **Biochimica et Biophysica Acta- Biomembranes**. v.1863, n. 1, p. 2-7, 2021.
- KIDD, S.E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 101, p. 17258-17263, 2004.

KWON-CHUNG, K.J. et al. Cryptococcosis: clinical and biological aspects. **Medical Mycology**. v. 38, p. 205-213, 2000.

KWON-CHUNG, K.J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

LACROIX, C. et al. Serious Neurological Adverses Events of Ceftriaxone. **Antibiotics**. v. 10, 2021. <https://doi.org/10.3390/antibiotics100505540>. Acesso: 10 de janeiro de 2022.

LANIDO-LABORIN, R.; CABRALES-VARGAS, M.N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Ibero Americana**. v. 26, n. 4, p. 223-227, 2009.

LEITE, D. P. et al. *Cryptococcus* spp. isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **Journal Occupational Medicine and Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 11, Jun 2012.

LIANG, Z. et al. Metastatic pulmonary calcification misdiagnosed as a fungal infection: A case report. **Molecular and Clinical Oncology**. v. 4, p. 409-412, 2015.

LI, J. et al. Cryptococcal meningitis in tally presenting with eye symptoms in an immunocompetent patient: A case report. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 12, n. 2, p. 1119-1124, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3892/etm.2016.3440>>. Aceso em 06 fev 2019.

LI, L. et al. Pulmonary cryptococcosis coexisting with adenocarcinoma: a case report of the literature. **Journal of Medical Case Reports**. v. 12, p. 312-327, 2018.

LI, S.S; MODY, C.H. Cryptococcus. **Proceeding of the American Thoracic Society**. v. 7, p. 186-196, 2010.

LIMA, L.M. et al.  $\beta$ -Lactam antibiotics: An overview from Medical Chemistry Perspective. **European Journal of Medical Chemistry**. v. 208, p. 1-64, 2020.

LIN, X.; HEITMAN, J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annual Review of Microbiology**. v. 60, p. 69-105, 2006.

LIU, T.B.; PERLIN, D.S.; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence**. v. 3, n. 2, p. 173-181, 2012.

LIVER TOX: Clinical a Research Information on Drug-Induced Liver Injury. **Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases**, 2012. Oxacillin. Uptdated 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548078/>

MA, H. et al. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 106, n. 31, p. 1280-1285, 2009.

MADA, P.K.; ALAM, M.U. *Cryptococcus* (Cryptococcosis) 2018. Disponível em [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431060/?report=reader#\\_NBK431060\\_pubdet](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431060/?report=reader#_NBK431060_pubdet). Acesso em 6 fev 2019.

MAZIARZ, E.K.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 30, p. 179-206, 2016.

MAY, R.C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**. v. 14, n. 2, p. 106-117, 2016.

MELETIADIS, J. et al. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, monte carlo simulation analysis, and *in vitro-in vivo* correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 54, n. 2, p. 602-609, 2010.

McFADDEN, D.C.; CASADEVALL, D. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**. v. 39, p. 19-30, 2001.

McKENNEY, J. et al. Prevalence and correlates of cryptococcal antigen positivity among AIDS patients- United States, 1986-2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 63, n. 27, p. 585-587, 2014.

MITCHELL, T.M.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the Era of AIDS—100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 8, n. 4, p. 515-548, 1995.

MOOSBRUGGER, E.A.; ADAMS, B.B.; KRALOVIC, S.M. Cutaneous cryptococcosis in a patient on corticosteroid therapy for retinoid arthritis. **International Journal of Dermatology**. v. 47, p. 630-632, 2008.

MOR, V. et al. Identification of a New Class of Antifungals Targeting the Synthesis of Fungal Sphingolipids. **MBio**, v. 6, n. 3, p. e00647, 2015.

MOURAD, A.; PERFECT, J.R. Present and future therapy of *Cryptococcus* infections. **Journal of Fungi**. v. 4, n. 3, p. 2-10, 2018.

MOVAHED, E. et al. Triclosan demonstrates synergic effect with amphotericin B and fluconazole and induces apoptosis-like cell death in *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, p. 1-10, 2016.

MPOZA, E.; RHEIN, J.; ABASSI, M. Emerging fluconazole resistance: Implications for the management of cryptococcal meningitis. **Medical Mycology Case Reports**. 19, 'p. 30-32, 2018.

MUHAMMED, O.S.; NASIR, B.B. Drug use evaluation of ceftriaxone in Ras-Desta memorial General hospital, Ethiopia. **Drug Healthcare and Patient Safety**. v. 12, p. 161-168, 2020.

MÜLLER, U. et al. IL-13 Induces Disease-Promoting Type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Immunology**. v. 179, p. 5367-5377, 2007.

- NAKAMURA, S. et al. Macrolide Inhibit Capsule Formation of Highly Virulent *Cryptococcus gattii* and Promote Innate Immune Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 63, n. 6, p. 2-12, 2019.
- NEET, J.E.; ANDES, D.R. Antifungal agents: spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 30, n. 1, p. 51-83, 2016.
- NIVOIX, Y.; LEDOUX, M.P.; HERBRECHT, R. Antifungal Therapy: New and Evolving Therapies. **Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 41, n. 01, p. 158-174, 2020.
- NOCUA-BÁEZ, L. C. et al. Azoles de antes y ahora: una revisión. **Revista Chilena de Infectología**. v.37, n. 3, p. 219-230, 2020.
- NOSANCHUK, J.D.; STARK, R.E.; CASADEVALL, A. Fungal melanin: What do we know about structure? **Frontiers in Microbiology**. v. 6, p. 1-7, 2015.
- ODDS, F.C.; BROWN, A.J.; GOW, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiology**. v. 11, p. 272-279, 2003.
- OLIVEIRA, D.L. et al. Extracellular Vesicles from *Cryptococcus neoformans* Modulate Macrophage Functions. **Infection and Immunity**. v. 78, n. 4, p. 1601-1609, 2010.
- OLIVEIRA, L. et al. Report of filamentous forms in a mating type VNI clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from an HIV virus-infected patient. **Medical Mycology Case Reports**. v. 7, p. 4-7, 2015.
- OLIVER, B.G et al. Tetracycline alters drug susceptibility in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. **Microbiology**. v. 154, n. 3, p. 960-970, 2008.
- OZDEMIR, Z. et al. Determination of milk/plasma ratio and milk and plasma pharmacokinetics of amoxicillin after intramuscular in lactating cows. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 42, n.1, p. 45-51, 2018.
- PACIFICI, G.M.; MARCHINI, G. Clinical pharmacology of ceftriaxone in neonates and infants: effects and pharmacokinetics. **International Journal of Pediatrics**. v. 5, n. 9, p. 5751-5777, 2017.
- PAGANO, L.; FIANCHI, L.; LEONE, G. Fungal pneumonia due to molds in patients with hematological malignancies. **Journal Chemotherapy**. v. 18, n. 4, p. 339-352, 2006.
- PERAZELLA, M.A. Renal vulnerability to drug toxicity. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**. v. 4, n. 7, p. 1275-1283, 2009.
- PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*: A sugar – coated killer with designer genes. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 45, p. 395-404, 2005.
- PERFECT, J. The Antifungal Pipeline: A Reality Check. **Nature Reviews Drug**. v. 16, n. 9, p. 603-616, 2017.
- PEREA, S.; PATTERSON, T.F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clinical Infectious Diseases**. v. 35, n. 9, p. 1073-1080, 2012.

- PEREA, J. R. A. Anfotericina B liposomal: farmacología clínica, farmacocinética y farmacodinamia. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 38, n. 2, p. 52-55, 2021.
- PERFECT, J.R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: what do we know now. **Fungal Genetics and Biology**. v. 78, p. 49-54, 2015.
- PERFECT, J.R. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? **Current Medical Research**. v. 29, n.4, p. 3-11, 2013.
- PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**. v. 125, p. S3- S13, 2012.
- PERNOD, C. et al. Use of gentamicin for sepsis and septic shock in anaesthesia-intensive care unit: a clinical practice evolution. **Turkish Journal of Anaesthesiology and Reanimation**. v. 48, n. 5, p. 399-405, 2020.
- PISCITELLI, A. et al. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. **Current Genomics**. v. 12, p. 104-112, 2011.
- POSH, W. et al. *Aspergillus terreus*: Novel lessons learned on amphotericin B resistance. **Medical Mycology**. v. 56, n. 1, p. 73-82, 2018.
- PONZIO, V. et al. Genotypic diversity and clinical outcome of cryptococcosis in renal transplant recipients in Brazil. **Emerging Microbes e Infections**. v. 8, n. 1, p. 119-129, 2019.
- QUIN, Z. et al. Metagenomic next generation sequencing contributes to the diagnosis of mixed pulmonary infection: a case report. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 21, n. 52, 2022.
- QU, J. et al. Clinical Analysis Immunocompetent and Immunocompromised Patients with Pulmonary Cryptococcosis in Western China. **Scientific Reports Nature Research**. v. 10, p. 1-11, 2020.
- RAHAL, A. et al. Oxidative stress, pro-oxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed Research International**. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/51204/1761264>, 2014.
- RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infectious Diseases**. v. 17, n. 8, p. 873-881, 2022.
- RAJASEKARAN, P.; CRICH, D. Synthesis of gentamicin minor components: gentamicina B and gentamicin X2. **Org Lett**. v. 22, n. 10, p. 3850-3854, 2020.
- REICHERT-LIMA, F. et al. Evaluation of antifungal combination against *Cryptococcus* spp. **Mycoses**. v. 59, p. 585-593, 2016.
- RHEIN, J. et al. Efficacy of adjunctive sertraline for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: an open-label dose-ranging study. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 16, p. 809-818, 2016.

- RIBEIRO, N.Q. et al. Atorvastatin as a promising anticryptococcal agent. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2017.
- RODRIGUES, M.L. et al. Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence. **Eukaryotic Cell**. v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.
- RODERO, L. et al. In vitro susceptibility studies of *Cryptococcus neoformans* isolated from patients with no clinical response to amphotericin B therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 45, p. 239-242, 2000.
- ROE, C.C. et al. Dating the *Cryptococcus gattii* dispersal to North American Pacific North west. **American Society for Microbiology**. v. 3, n.1, p. 1-13, 2018.
- ROSEN, L.B. et al. Anti-GM-CSF Autoantibodies in patients with cryptococcal meningitis. **The Journal of Immunology**. v. 190, p. 3959-3966, 2013.
- ROSSATO, L. et al. In vitro interaction of antifungal and antibacterial drugs against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* before and after capsular induction. **Medical Mycology**. v. 53, p. 885-889, 2015.
- ROSSATO, L. et al. In vitro combination between antifungals and diphenyl diselenide against *Cryptococcus* species. **Mycoses**. 2019. doi: 10.1111/myc.12905.
- ROWE, H.; ROSCH, J. W. Polymicrobial interactions operative during pathogen transmission. **American Society for Microbiology**. v. 12, n. 3. e01027-21, 2021.
- RUGEMALILA, J. et al. Cryptococcal antigen prevalence in HIV- infected Tanzanians: a cross-sectional study and evolution of point-of- care lateral flow assay. **Tropical Medicine International Health**. v. 18, n. 9, p. 1075-1079, 2013.
- SAIJO, T. et al. Anti-Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. **mBio**. v. 5, n. 2, p. 1-14, 2014.
- SANGALLI-LEITE, F. et al. Synergistic effect of pedalatin and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* by in vitro and in vivo evolution. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 48, n.5, p. 504-511,2016.
- SANTOS, J.R. et al. Dynamic Interaction between Fluconazole and Amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 12, n. 5, p. 2553-2558, 2012.
- SANTOS, J. R. A. et al. Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus gattii* and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–14, 2014.
- SAMARASINGHE, H. et al. Hybridization Facilitates Adaptive Evolution in Two Major Fungal Pathogens. **Genes**. v. 11, n. 1, p. 1-21, 2020.

- SEGAL, E.; FRENKEL, M. Experimental in vivo models of candidiasis. **Journal of Fungi**. v. 4, p. 1-10, 2018.
- SETIANINGRUM, F.; RAUTEMA-RICHARDSON, R.; DENNING, D.W. Pulmonary Cryptococcosis: A Review of Pathobiology and Clinical Aspects. **Medical Mycology**. v. 57, n. 2, p. 133-150, 2019.
- SCORZONI, L. et al. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. **Frontiers of Microbiology**. v. 8, p. 1–23, 2017.
- SCHLOTTFELDT, F.S. et al. Prevenção da nefrotoxicidade da anfotericina B por meio do uso de fitomedicamentos. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. v. 49, p. 74-79, 2015.
- SCHMIEDEL, Y.; ZIMMERLI, S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococosis and pneumocystis pneumonia. **Swiss Medical Weekly**. v.146, p. 2-12, 2016.
- SHI, W. et al. The combination of minocycline and fluconazole causes synergistic growth inhibition against *Candida albicans*: an in vitro interaction of antifungal and antibacterial agents. **FEMS Yeast Res.**v.10, n.7, p. 885-893, 2010.
- SHIVARATHRI, R. et al. Comparative transcriptomics reveal possible mechanisms of amphotericin B resistance in *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 66, n. 6, p. e02276-21, 2022.
- SHUN LI, S.; MODY, C. H. *Cryptococcus*. **Proceeding of the American Thoracic Society**. v. 7, p. 186-196, 2010.
- SIONOV, E.; CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. Azole Heteroresistance in *Cryptococcus neoformans* Emergence of Resistant Clones with Chromosomal Disomy in the Mouse Brain During Fluconazole Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 10, p. 5127-5130, 2013.
- SLOAN, D. J.; PARRIS, V. Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. **Clinical Epidemiology**. v. 2014, n. 6, p. 169-182, 2014.
- SMITH K. D. Increased antifungal drug resistance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 59, n. 9, p. 7197-7204, 2015.
- SNELDERS, E. et al. Triazole fungicidas can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. **Plos One**. v. 7, n. 3. e31801, 2012.
- SPADARI, C. C. et al. New approaches for cryptococcosis treatment. **Microorganisms**. v. 8, n. 4, p. 1-15, 2020.
- SORRELL, T.C. et al. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: Evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. **Microbes Infection**. v. 18, n. 1, p. 57-67, 2016.

- STERGIOPOULOU, T. et al. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 63, p. 343-348, 2008.
- STOCCO, G.; LUCAFO, M.; DECORTI, G. Pharmacogenomics of Antibiotics. **International Journal of Molecular**. v. 21, n. 17, p. 2-19, 2020.
- STOGIOS, P. J.; SAVCHENKO, A. Molecular Mechanisms of Vancomycin Resistance. **Protein Science**. v. 29, p. 654-669, 2020.
- SURESH, C. S.; NINAN, M. M.; ZACHARIAH, A.; MICHAEL, J. S. Cryptococcosis with tuberculosis overlooked co infections. **Journal of Global Infectious Diseases**. v. 13, n. 3, p. 139-141, 2021.
- TAN, B.H. et al. Clinical challenges in managing patients with invasive fungal diseases in seven Asian countries: An Asia Fungal Working Group (AFWG) Survey. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 95, p. 471-480, 2020.
- TAVERNA, C, G. et al. Frequency and geographical distribution of genotypes and mating types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes in Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 52, n. 3, p. 183-188, 2020.
- TAVARES, I.V.; SÁ, A.B. Perfil de Prescrição de Antimicrobianos para as Infecções do Trato Urinário nos Cuidados de Saúde Primários. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**. v. 3, n. 2, p. 85-100, 2014.
- TEMFACK, E. et al. New insights in to *Cryptococcus* spp. biology and cryptococcal meningitis. **Current Neurology and Neuroscience Reports**. v. 19, n. 81, p. 2-10, 2019.
- TIMBROOK, T.T.; MCKAY, L.; SATTON, J. D.; SPIVAK, E. S. Disproportionality analysis of safety with nafcillin and oxacillin with the FDA adverse event reporting system (FAERS). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 64, n.3, p. 1-4, 2020.
- THEIS, T; STAHL, V. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 61, p. 437-455, 2004.
- THOMPSON, G.R.; CADENA, J.; PATTERSON, T.M. **Clinics in Chest Medicine**. v. 30, p. 203-215, 2009.
- TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; PRESTERL, E. Azole-resistant *Candida* spp. -emerging pathogens? **Mycoses**. v. 5, p. 24-32, 2012.
- TONE, K. et al. Pulmonary coinfection due to *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **Journal of Infectious Diseases**. v. 74, n.6, p. 600-6003, 2021.
- TRINDADE, M.T.; SALGADO, H.R.N. A critical review of analytical methods for determination of ceftriaxone sodium. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. v. 48, n. 2, p. 95-101, 2018.

- TSUCHIDA, H. et al, A case of cryptococcal meningitis with nephrotic syndrome and renal insufficiency under immunosuppressive therapy. **Nippon Jinzo Gakkai Shi.** v.49, p. 54-59, 2007.
- TUITE, N. L.; LACEY, K. Overview of invasive fungal infections. **Methods in Molecular Biology**, v. 968, p. 1-23, 2013.
- XUE, H. et al. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. **International Journal of Biological Sciences.** v. 14, p. 1232- 1244, 2018.
- WALKER, L.A.; GOW, N.A.; MUNRO, C.A. Fungal echinocandin resistance. **Fungal Genetics and Biology.** v. 47, n. 2, p. 117-126, 2010.
- WAMBAUGH, M.A. Synergistic and antagonist drug interactions in the treatment of systemic fungal infections. **eLife.** v. 9, p. e514160, 2020.
- WU, S.X. et al. Human pathogenic fungi in China-emerging trends from ongoing national survey for 1986,1996 and 2006. **Mycopathologia.** v. 171, p. 387-393, 2011.
- YU, J. et al. In vitro interaction of terbinafine with itraconazole and amphotericin B against fungi causing chromoblastomycosis in China. **Medical Mycology.** v. 46, p. 745-747, 2008.
- ZAMONER, W. et al. Serum concentration of vancomycin is a diagnostic predictor of nephrotoxic acute kidney injury in septic patients in clinical and surgical wards. **Infection and Drug Resistance.** v.13, p. 403-411, 2020.
- ZARAGOZA, O. Multiple disguises for the same party: the concepts of morphogenesis and phenotype variations in *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Microbiology.** v. 2, p. 1-9, 2011.
- ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: Cells with a giant impact. **Current Opinion in Microbiology.** v. 16, n. 4, p. 409-413, 2013.
- ZARAGOZA, O. Basics principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence.** v. 10, n. 1, p. 490-491, 2019.
- ZHAI, B. et al. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 56, n. 7, p. 3758-3766, 2012.
- ZHAO, Y. et al. Life cycle of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Microbiology.** v. 73, n. 1. 020518-120210, 2020.
- ZHOU, W. et al. Cryptococcal meningitis mimicking cerebral infarction: a case report. **Clinical Interventions in Aging.** v. 13, p. 1999-2002, 2018.

## 10 TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

- 1) **SILVA, LÍVIA MARA VITORINO DA**; ALMEIDA, ANNA CHRISTINA ; GONCALVES, S. F. ; SOUZA, G.A.A.D ; OLIVEIRA, A.R.E ; XAVIER, M.A.S ; SANGLARD, DEMERSON ARRUDA ; CARVALHO. C.M.C ; PIRES JUNIOR, O. S. ; SOUZA, C. N. ; COSTA, K . GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCUS SPECIES FROM BOVINEMILK FOUND ON PROPERTIES AND MUNICIPALITIES OF NORTHERN MINAS GERAIS. **INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENT RESEARCH**, v. 12, p. 009-015, 2022.
- 2) MARCELO, NATALIA ARANTES ; ANDRADE, VIVIANE AGUIAR ; SOUZA, CINTYA NEVES ; MOURÃO, RODRIGO PEREIRA ; MOURTHE, MÁRIO HENRIQUE FRANÇA ; **SILVA, LÍVIA MARA VITORINO** ; XAVIER, ALESSANDRA REJANE ERICSSON DE OLIVEIRA ; XAVIER, MAURO APARECIDO DE SOUSA ; FARACO, ANDRÉ AUGUSTO GOMES ; ALMEIDA, ANNA CHRISTINA . Efficacy of novel antiseptic product containing essential oil of *Lippia origanoides* to reduce intramammary infections in cows. **Veterinary World JCR**, v. 13, p. 2452-2458, 2020.
- 3) MANZUR, A.G.M ; Martins, V.S.J ; COSTA, F.M ; G.A.M, E. ; CARELI, R.T ; **SILVA, L. M. V.** ; COELHO, S.G ; ALMEIDA, A. C. ; DUARTE, E. R. . Extract of *Mangifera indica* L. leaves may reduce biofilms of *Staphylococcus* spp. in stainless steel and teatcup rubbers. **FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY INTERNATIONAL JCR**, v. 1, p. 108201321985852, 2019.
- 4) SOUZA, GEZIELLA ÁUREA APARECIDA DAMASCENO ; ALMEIDA, ANNA CHRISTINA DE ; XAVIER, MAURO APARECIDO DE SOUSA ; **SILVA, LÍVIA MARA VITORINO DA** ; SOUSA, CINTYA NEVES ; SANGLARD, DEMERSON ARRUDA ; XAVIER, ALESSANDRA REJANE ERICSSON DE OLIVEIRA . Characterization and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains resistant to beta-lactams isolated from the milk of cows diagnosed with subclinical mastitis. **Veterinary World JCR**, v. 12, p. 1931-1939, 2019.
- 5) DIAS, R.R ; COE, H.H.G ; LEPSCH, I.F ; RICARDO, S.D.F ; **SILVA, L. M. V.** ; ALVARENGA, A.C ; RASBOLD, G. G. . Morphological variation of phytoliths according to leaf senescence and position in the organs of *Brachiaria decumbens*. **FLORA JCR**, v. 260, p. 1, 2019.
- 6) PERES-EMIDIO, ELUZIA C. ; FREITAS, GUSTAVO J. C. ; COSTA, MARLIETE C. ; GOUVEIA-EUFRASIO, LUDMILA ; **SILVA, LÍVIA M. V.** ; SANTOS, ANDERSON P. N. ; CARMO, PAULO H. F. ; BRITO, CAMILA B. ; ARIFA, RAQUEL D. N. ; BASTOS, RAFAEL W. ; RIBEIRO, NOELLY Q. ; OLIVEIRA, LORENA V. N. ; SILVA, MONIQUE F. ; PAIXÃO, TATIANE A. ; SALIBA, ALESSANDRA M. ; FAGUNDES, CAIO T. ; SOUZA, DANIELE

- G. ; Santos, Daniel A. . Pseudomonas aeruginosa Infection Modulates the Immune Response and Increases Mice Resistance to Cryptococcus gattii. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** JCR, v. 12, p. 811474, 2022.
- 7) GOUVEIA-EUFRASIO, LUDMILA RIBEIRO, NOELLY QUEIROZ SANTOS, JULIANA RIBEIRO ALVES DA COSTA, MARLIETE CARVALHO EMÍDIO, ELÚZIA CASTRO PERES DE FREITAS, GUSTAVO JOSÉ COTA DO CARMO, PAULO HENRIQUE FONSECA MIRANDA, BÁRBARA ALVES DE OLIVEIRA, JOÃO CARLOS MAIA DORNELAS DA SILVA, LÍVIA MARA VITORINO TEIXEIRA LEOCÁDIO, VICTOR AUGUSTO RANDI MAGALHÃES, VANESSA CAROLINE PENIDO, INDIARA PEREIRA, LEONARDO SOARES RABELO, LÍVIA FROTA DE ALMEIDA FARIA, FLÁVIO AUGUSTO TEIXEIRA DUTRA, MARIA RITA ASPAHAN, MAÍRA DE PAULA, LUDMILA DA SILVA, DIRCE INÊS TAVARES MELO, MÁRCIA GREGORY DE ANDRADE ZAMBELLI, VIRGINIA ANTUNES GOMES FARACO, ANDRÉ AUGUSTO DA COSTA CÉSAR, ISABELA ALVES, GLAUCIENE PRADO , *et al.* ; Randomized, phase 1/2, double-blind pioglitazone repositioning trial combined with antifungals for the treatment of cryptococcal meningitis - PIO study. **Contemporary Clinical Trials Communications** JCR, v. n, p. 100745, 2021.