



GABRIELLA FREITAS FERREIRA

O papel do estresse oxidativo e nitrosativo gerado pelos antifúngicos em *Cryptococcus gattii* e sua influência na heterorresistência ao Itraconazol

Belo Horizonte

Julho-2015



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

**O papel do estresse oxidativo e nitrosativo gerado pelos antifúngicos em
Cryptococcus gattii e sua influência na heterorresistência ao itraconazol**

GABRIELLA FREITAS FERREIRA

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Assis Santos
(Departamento de Microbiologia - UFMG)

Julho-2015

Agradecimentos

A Deus e a seu filho Jesus Cristo por sempre me protegerem e mostarem o caminho correto, permitindo a concretização dos meus sonhos;

Ao meu orientador Prof. Daniel, que muito mais do que um grande mestre se tornou um grande amigo. Suas orientações e ensinamentos foram essenciais para a confecção desse trabalho e para a minha realização profissional;

À banca examinadora que aceitaram gentilmente o convite.

Aos meus pais que são minha fortaleza, minha referência e meu porto seguro. Eles são os responsáveis pela minha resiliência frente às dificuldades encontradas durante a minha caminhada.

Ao meu irmão Henrique e às minhas amigas-irmãs Carol, Fernanda, Marli, Vans e Juju pelo incentivo, pelo carinho, pelas palavras de confiança, pela compreensão, pelo amor, pelo apoio nas horas mais difíceis.

À professora Cidinha e aos amigos do Laboratório de Micologia Guga, Rafa, Thaís, Noelly, Dani, Lorena, Alide, Valquíria e Érika, pelos momentos de descontração, pelo apoio e pela amizade.

À coordenação e à secretaria do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG.

Aos amigos, estagiários, funcionários e professores do Departamento de Microbiologia da UFMG pelo apoio, pelo suporte e por toda contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos, familiares e professores que contribuíram de forma direta ou indireta nesta caminhada.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Microgramas
μL	Microlitros
μm	Micrometros
ABC	<i>Atp Binding Cassette</i>
AIDS	Síndrome Da Imunodeficiência Adquirida
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FLC	Fluconazol
GalXM	Galactoxilomana
GXM	Glucuronoxilomanana
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ITC	Itraconazol
MCP-1	Proteína Quimioatraente para Monócitos
mg	Miligramas
MIP1- α	Proteína Inflamatória de Macrófagos 1-alfa
ml	Mililitros
NO	Óxido Nítrico
O^{2-}	Superóxido
PCR	Reação Da Cadeia Da Polimerase
PER	Peroxidase

SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superoxidodismutase
TBARS	Substâncias Reativas Derivadas do Ácido Tiobarbitúrico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UA	Unidades arbitrárias
UFC	Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

Embora os principais mecanismos de ação do fluconazol, itraconazol e anfotericina B estejam relacionados ao ergosterol, é possível que essas drogas tenham outros efeitos nas células fúngicas. Além dos mais, a heterorresistência é considerada um mecanismo de adaptação frente a um estresse induzido por concentrações crescentes de antifúngicos no ambiente. Sendo o itraconazol um dos azólicos usados no tratamento da criptococose, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência do estresse oxidativo e nitrosativo gerado pelos antifúngicos em células de *C. gattii* e sua influência no surgimento de clones heterorresistentes. Foram estudados distintos parâmetros para avaliar os estresses oxidativo e nitrosativo induzidos pelo fluconazol, itraconazol e anfotericina B em *C. gattii*. Já os efeitos da heterorresistência ao itraconazol foram estudados por meio de ensaios *in vitro* e em modelo murino. O itraconazol simultaneamente reduziu o conteúdo de ergosterol das células de *C. gattii* e induziu a produção de espécies reativas de oxigênio no início do tratamento, o que levou ao aumento da atividade das enzimas peroxidase e superoxidodismutase. O mesmo não aconteceu com o fluconazol. Já a anfotericina B promoveu grande estresse oxidativo e nitrosativo nas células de *C. gattii*, o que levou a uma elevada peroxidação lipídica e ineficiente ativação do sistema antioxidante celular. A heterorresistência ao itraconazol foi intrínseca para todas as linhagens testadas, alterou parâmetros farmacodinâmicos, diminuiu o diâmetro celular e o tamanho da cápsula e ativação do sistema antioxidante celular. Observou-se uma correlação positiva entre a razão superfície/volume e o nível de heterorresistência ao itraconazol. Além do mais, a heterorresistência levou a maior internalização das células criptocócicas pelos macrófagos, mas também a uma maior proliferação dentro dessa célula fagocítica, o que culminou com o aumento da virulência dos clones heterorresistentes e alta carga fúngica nos pulmões e cérebro dos camundongos. Diante desses resultados, concluiu-se que o estresse oxidativo possuiu um importante papel no mecanismo de ação do itraconazol e pode ser um dos mecanismos que levam a heterorresistência e o aumento da virulência das células de *C. gattii*.

Palavras-chaves: *C. gattii*, itraconazol, estresse oxidativo, heterorresistência.

ABSTRACT

Although the most accepted mechanisms of action of amphotericin B and azoles are related to ergosterol, it is possible that these drugs have other effects on the fungal cell. Moreover, heteroresistance is an adaptive mechanism developed by the microorganism to counteract the stress of increasing drug concentration in the environment. Since itraconazole is used in the therapy of cryptococcosis, the aim of this study was to evaluate the role of endogenous reactive oxygen species (ROS) and peroxynitrite produced by azoles and amphotericin B in the fungus *C. gattii* and its influence on emergence of heteroresistant clones to itraconazole. We studied distinct parameters to evaluate the effect of oxidative and nitrosative stresses induced by fluconazole, itraconazole and amphotericin B in *C. gattii* cells. The effects of the heteroresistance to itraconazole were studied by performing tests *in vitro* and in a murine model. Itraconazole reduces the level of ergosterol and led to ROS production in *C. gattii* cells in the early stages of the treatment, enhancing the antioxidant activity. The same did not happen with fluconazole. Amphotericin B caused lipid peroxidation in *C. gattii* cells through a greatly enhanced production of oxidative and nitrosative radicals with increased lipid peroxidation and inefficient activation of antioxidant cellular system. Heteroresistance to itraconazole was intrinsic in all strains tested and changed pharmacodynamics parameters, diminished cell and capsule sizes, reduced ergosterol content and enhanced the antioxidant system of heteroresistant clones. Indeed, heteroresistance to itraconazole led to the increased internalization of cryptococcal cells by macrophages, but also to a prominent proliferation inside these phagocytic cells, culminating in the higher virulence of heteroresistant clones. Based on these results, we conclude that oxidative bursts play an important role in the antifungal activity of itraconazole and may be one of the mechanisms that lead to heteroresistance and the increased virulence of *C. gattii*.

Keywords: *C. gattii*, itraconazoles, oxidative burst, heteroresistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biologia de <i>Cryptococcus gattii</i>	13
Figura 2. Heterogeneidade da população de <i>Cryptococcus sp.</i> extraída de pulmões de camundongos infectados.	15
Figura 3. Mapa do Brasil mostrando duas macrorregiões (Nordeste e Sudeste) e a distribuição dos tipos moleculares de <i>Cryptococcus</i> encontrados no Brasil.	18
Figura 4. Representação esquemática do papel do estresse oxidativo e nitrosativo causado pelo itraconazol (ITC) e anfotericina B (AMB) em células de <i>C. gattii</i>	33
Figura 5. Representação esquemática do sistema antioxidante e o mecanismo de ação do 3-AT, DETC e FETPPS	34
Figura 6. Resumo das alterações observadas nos clones heterorresistentes quando comparados com a linhagem original.	39
Figura 7. A virulência de linhagens clínicas de <i>C. neoformans</i> foi correlacionada com a interação fungo-macrófago.	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Revisão da literatura	10
1.1.1 <i>Cryptococcus gattii</i>	10
1.1.2 <i>Ecologia</i>	11
1.1.3 <i>Processo de disseminação e infecção</i>	11
1.1.4 <i>Formas clínicas</i>	15
1.1.5 <i>Epidemiologia</i>	16
1.1.6 <i>Fatores de virulência</i>	18
1.1.7 <i>Tratamento da Criptococose</i>	21
1.1.8 <i>Resistência e heterorresistência de <i>Cryptococcus spp.</i> aos antifúngicos</i>	22
1.2 Justificativa	26
1.3 Objetivos	28
1.3.1 Objetivo geral	28
1.3.2 Objetivos específicos.....	28
2 CAPÍTULOS	29
3. DISCUSSÃO	86
4 CONCLUSÕES	98
5 PERSPECTIVAS	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXOS	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 *Cryptococcus gattii*

O gênero *Cryptococcus* é composto por leveduras capsuladas, pertencentes à classe *Basidiomycetes*, que apresentam capacidade de infectar e causar doença em uma larga variedade de hospedeiros, incluindo os mamíferos. Dentro desse o gênero existem aproximadamente 70 espécies descritas, porém *C. neoformans* e *C. gattii* destacam-se como os agentes etiológicos mais comuns da criptococose humana (CHAYAKULKEERE; PERFECT, 2006; MCMULLAN et al., 2013).

Cryptococcus neoformans var. *gattii* foi reconhecido pela primeira vez em 1970, sendo diferenciado de *C. neoformans* var. *neoformans* por características fenotípicas, habitat natural, epidemiologia, manifestações clínicas, resposta às terapias antifúngicas, além de importantes diferenças na composição de nucleotídeos (FAN et al. 1994; SORRELL et al., 2001).

Inicialmente, as diferenças estruturais encontradas na cápsula eram a base para a separação das linhagens de *C. neoformans* em cinco sorotipos: A, B, C, D, AD. Esses cinco sorotipos pertenciam a duas variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) (CHAYAKULKEERE; PERFECT, 2006). Em 1999, foi sugerida uma inclusão da variedade *grubii* para amostras do sorotipo A, com base em características clínicas, moleculares e biológicas (FRANZOT et al., 1999). As divergências genéticas culminaram com a proposta da separação em duas espécies, *C. neoformans* e *C. gattii* (BOEKHOUT et al., 2001), conforme proposto originalmente por KWON-CHUNG (1976).

Posteriormente, *C. gattii* foi classificado em quatro tipos moleculares distintos, VGI, VGII, VGIII e VGIV, por meio da reação da cadeia de polimerase (PCR). VGI e VGII são os tipos moleculares mais prevalentes (JOBINS et al., 2010). fase teleomorfa do fungo foi classificada por Kwon-Chung como *Filobasidiella neoformans*, correspondente ao anamorfo *C. neoformans* e *Filobasidiella bacillispora*

correspondente à *C. gattii* (KWON-CHUNG, 1976). No estado teleomórfico, são evidentes as diferenças fenotípicas entre as espécies. Em *F. neoformans*, os basidiosporos são esféricos, elípticos ou cilíndricos com paredes rugosas; em *F. bacillispora*, são baciliformes e com parede lisa.

1.1.2 Ecologia

Em relação à ecologia das espécies, o sorotipo A (*C. neoformans* var. *grubii*) é mais amplamente distribuído no mundo, enquanto o sorotipo D (*C. neoformans* var. *neoformans*) está presente predominantemente em zonas temperadas (MARTINEZ et al., 2001). Já os sorotipos B e C (*C. gattii*) eram considerados restritos aos países de clima tropical e subtropical até quando ocorreu uma epidemia na região de clima temperado de Vancouver, Canadá (HOANG et al., 2004).

Relatos da literatura suportam a afirmativa de que *C. gattii* é bem estabelecido como um fungo pertencente da microbiota de árvores nativas de várias partes do mundo. Desde a descoberta da sua presença nos eucaliptos, *C. gattii* já foi recuperado em mais de 50 diferentes espécies de angiospermas e gimnospermas, incluindo cactos, pinheiros, legumes, frutas e árvores litorâneas (MCMULLAN et al., 2013).

Ainda, células de *C. gattii* podem ser recuperadas das amendoeiras até 100 dias após a inoculação do fungo na planta, apesar de não causarem fitopatologia (HUERFANO et al., 2001). Já XU et al (2007) revelaram que *C. gattii* pode interagir com as folhas de eucalipto para completar o seu ciclo sexuado. Dessa forma, acredita-se que as plantas não são susceptíveis a doenças causadas por *C. gattii*, mas funcionam como um reservatório ambiental.

1.1.3 Processo de disseminação e infecção

O processo de disseminação da criptococcose não é totalmente entendido. Na Austrália, a estação da florescência dos eucaliptos foi correlacionada à dispersão dos esporos de *C. gattii* (ELLIS; PFEIFFER, 1990), apesar de KIDD et al (2007a) não ter encontrado o mesmo resultado para as árvores nativas da Inglaterra. Já outros autores postularam que atividades ocupacionais e recreativas do homem no meio ambiente possuem importante papel na dispersão de *C. gattii* (KIDD et al., 2007b).

Sabe-se que *Cryptococcus* utiliza estratégias para se proteger de estresses ambientais (ex: aumento da temperatura, estresse oxidativo) e predadores naturais (ex: amebas) que são essenciais para que esse fungo, primariamente geofílico, possa infectar o homem (STEENBERGEN et al., 2001). Por exemplo, REN et al (2006) verificaram que as células de *C. gattii* crescem com alto teor de melanina em madeiras de diversas origens, o que poderia contribuir para a sua virulência em mamíferos. Já SPRINGER et al (2010) verificaram que células de *C. gattii* produzem fibrilas extracelulares quando infectam a superfície das folhas de *Arabidopsis thaliana*, que as tornaram mais virulentas em modelo murino. Outros autores postularam que a capacidade do fungo se multiplicar dentro dos macrófagos se deve a sua interação com amebas e nematódeos presentes no ambiente (HULL; HEITMAN, 2002; TUCKER; CASADEVALL, 2002).

A maioria dos estudos sobre a forma de infecção foi feita com a espécie *C. neoformans*. Nesses trabalhos, postula-se que a forma de contágio baseia-se na inalação de leveduras dessecadas ou basidiósporos, os quais pelo seu pequeno tamanho (em média três micrômetros) alcançam as vias aéreas inferiores e são fagocitados pelos macrófagos alveolares (KRONSTAD et al., 2011). Após a infecção pulmonar inicial, *C. neoformans* e *C. gattii* se disseminam por todo organismo (Figura 1), podendo atravessar a barreira hematocefálica por dois principais mecanismos: transcitose (onde o fungo atravessa diretamente os capilares endoteliais) e “cavalo de tróia” (os fungos atravessam a membrana hematoencefálica dentro dos macrófagos) (KRONSTAD et al., 2011).

Em hospedeiros hígidos infectados por *C. neoformans*, a infecção criptocócica é geralmente autolimitada, sugerindo que as células fagocíticas realizam efetivo *clearance* dos fungos ou o mantem em estado latente (ALANIO et al., 2015). O desfecho da criptococose depende da virulência da linhagem, do tamanho do inóculo inalado, do estado imunológico do indivíduo infectado e do padrão de citocinas geradas em resposta ao patógeno (CHAYAKULKEERE; PERFECT, 2006; VOELZ et al., 2009).

Quando os fungos penetram nos alvéolos são fagocitados pelos macrófagos, os quais funcionam como apresentadores profissionais de antígeno. Os macrófagos ativados produzem diversas citocinas e quimiocinas, de modo a desencadear a resposta imune adaptativa, como a interleucina (IL)-12, IL-18, proteína quimioatraente para monócitos 1 (MCP-1), e proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP1- α). O aumento da expressão de citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama

(IFN- γ) e IL-17 foi relacionado à diminuição da carga fúngica em modelos murinos. Todavia, a maior expressão das citocinas IL-4 e IL-13 reduziram a sobrevivência do hospedeiro infectado por *C. neoformans* (VOELZ et al., 2009; CHAYAKULKEERE; PERFECT, 2006). VOELZ et al. (2009) observaram que citocinas do tipo T *helper* 2 prejudicaram a expulsão de *Cryptococcus* após fagocitose, o que pode contribuir para a diminuição da sobrevivência do hospedeiro. Trabalhos recentes da literatura que estudaram as citocinas e quimiocinas presentes no fluido cerebrospinal de pacientes com meningite criptocócica corroboram a teoria de que uma resposta imune balanceada com predomínio de um perfil do tipo Th1 é essencial para o controle da infecção (JARVIS et al., 2015; MORA et al., 2015).

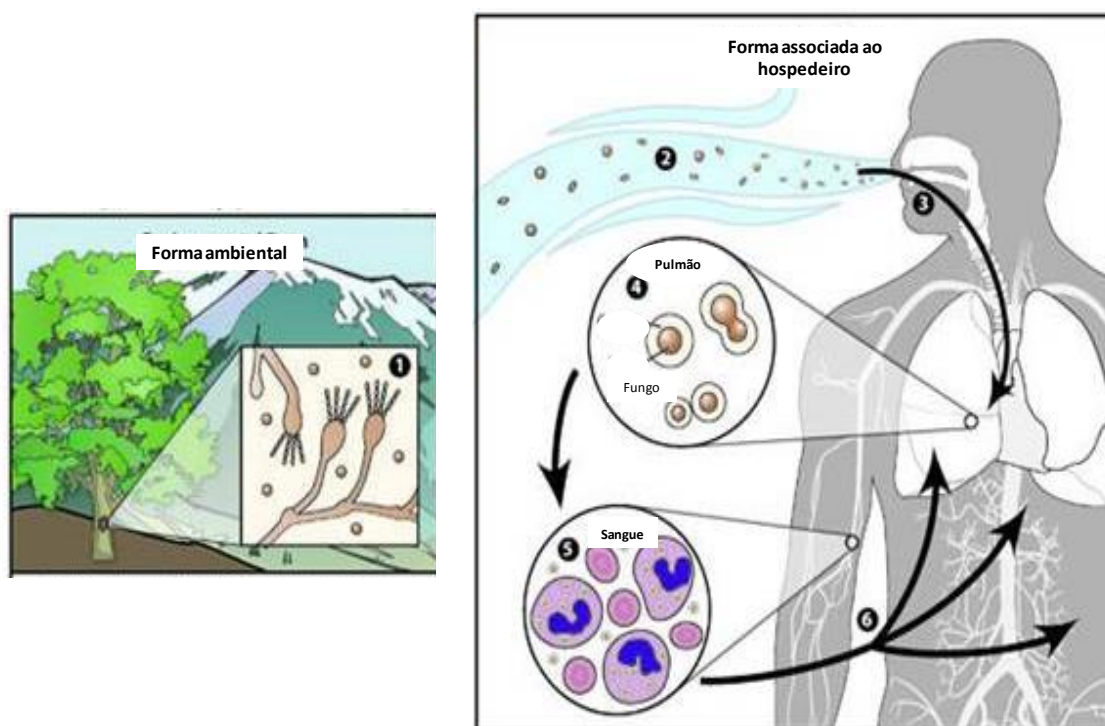


Figura 1. Biologia de *Cryptococcus gattii*. *C. gattii* vive no ambiente (1) geralmente em associação com certas árvores ou no solo. As leveduras desidratadas ou esporos (2) se dispersam no ar e podem ser inalados pelo hospedeiro (3). O tamanho pequeno da levedura e/ou esporos lhes permitem alojar-se no tecido pulmonar. Os macrófagos alveolares fagocitam *C. gattii*, o qual aumenta o seu tamanho para se proteger (4). As leveduras, em seguida, dividem-se e multiplicam-se por brotamento. Depois de infectar os pulmões, células de *C. gattii* podem chegar à corrente sanguínea (5), disseminando pelo organismo (6) (Fonte: CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION, 2014).

Em exposição ao ambiente pulmonar, *Cryptococcus* pode aumentar o seu tamanho e modificar a sua morfologia para a forma titânica. A presença de células titânicas durante a infecção representa um impedimento para uma resposta imune eficiente. As células titânicas dificultam a fagocitose, possuindo um importante papel no início da infecção ao promover a sobrevivência da população das células criptocócicas, mas ao decorrer da doença, as células titânicas impedem a disseminação dos fungos para o sistema nervoso central (OKAGAKI; NIELSEN, 2012; ZARAGOZA; NIELSEN, 2013). Durante a criptococose crônica, onde a carga fúngica nos pulmões é mínima, a proporção de células titânicas chega a 70-90% (ZARAGOZA et al., 2010).

É importante ressaltar que mudanças morfológicas acontecem também durante o processo de disseminação devido a diferentes microambientes, aos quais as células fúngicas encontram-se no organismo (FELDMESSER et al., 2001). Essas alterações de forma são críticas para a patogênese da criptococose. SHI et al, (2010) verificaram em seu trabalho que o tamanho da partícula é essencial para o processo de captura da célula fúngica pelos capilares cerebrais, e ainda que *C. neoformans* adota um formato ovóide no processo de transmigração.

Cryptococcus neoformans também pode se apresentar no formato de pequenas células, chamadas micro-células. O seu papel na patogenia da infecção ainda não está bem descrito, mas acredita-se que essas células possuem facilidades em se disseminar pelo organismo e atravessar as barreiras biológicas, como endotélio e barreira hematoencefálica, o que contribuiria para a instalação da meningite criptocócica (ZARAGOZA 2011). Além do mais, células menores tem maior área superficial relativa ao volume celular do que células grandes, o que significa que elas tem alta razão superfície sobre volume (S/V). Células com alta S/V conseguem alcançar rápida troca de nutrientes por volume celular e, dessa forma, multiplicar-se mais rapidamente (MADIGAN et al., 2013). A figura 2 representa as diferentes formas que o *Cryptococcus* pode assumir durante uma infecção.

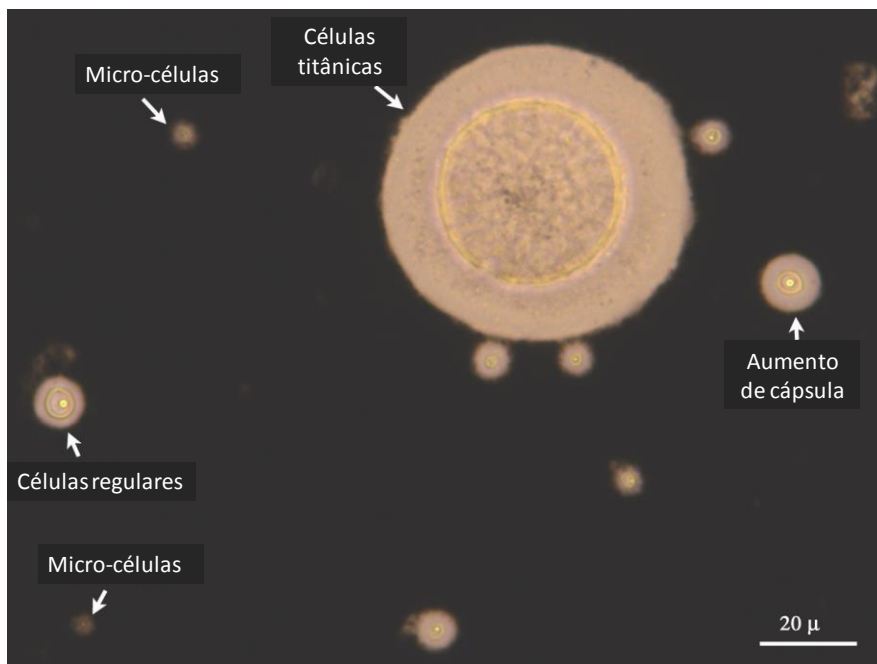


Figura 2. Heterogeneidade da população de *Cryptococcus sp.* extraída de pulmões de camundongos infectados. Durante a infecção, o fungo pode apresentar diferentes formas, mostrando a sua plasticidade morfológica (Fonte: ZARAGOZA, 2011).

1.1.4 Formas clínicas

Os órgãos mais frequentemente atingidos pela criptococose são o pulmão e o cérebro, mas outros órgãos também podem ser infectados como pele, olhos, próstata, e ossos (CHAYAKULKEERE; PERFECT, 2006). Segue uma breve descrição das principais formas clínicas.

Criptococose pulmonar

A criptococose raramente desenvolve um processo infeccioso agudo. As formas crônicas são mais comuns e consistem em manifestações clínicas semelhantes à tuberculose ou ao câncer de pulmão, como perda de peso, febre prolongada, anorexia, fadiga, tosse, expectoração mucopurulenta e hemoptise, e mais raramente, dispneia e dores nas costas. Imagens de raios-X mostram infiltrados pontuais, unilaterais, densos e esféricos (criptococcomas). A pleurite pode acontecer em 10% dos casos (SINGH et al., 2008).

Os exames laboratoriais de rotina normalmente mostram aumento da taxa de sedimentação dos eritrócitos, anemia, leucocitose e hipergamaglobunemia. O diagnóstico diferencial da criptococose pulmonar pode ser feito pelo isolamento do fungo nas secreções brônquicas (mas não é o padrão ouro, visto a pouca sensibilidade) ou pelo teste de aglutinação utilizando anticorpos anti-antígenos capsulares (teste de alta sensibilidade, pois apresenta positividade mesmo na presença de uma baixa carga fúngica). Vale notar que quando a criptococose pulmonar é diagnosticada, é importante a realização de uma hemocultura e de uma punção lombar para verificar a possibilidade de disseminação, a qual acontece em 90% dos casos de pacientes que apresentam grave imunossupressão (NEGRONI, 2012).

Criptococose do Sistema Nervoso Central (SNC)

Cryptococcus neoformans e *C. gattii* possuem tropismo para o SNC, causando meningites aguda, subaguda ou crônica ou meningoencefalite. Os pacientes normalmente apresentam sinais e sintomas inespecíficos, como cefaléia, alteração na consciência, letargia, perda de memória e coma (PERFECT; CASADEVALL, 2002). Os exames físico-químico e citológico do líquido cefalorraquidiano apresentam nível de proteínas levemente elevado, leve pleocitose, e presença do fungo encapsulado em 80% dos casos (HARRIS et al., 2011).

Infecções causadas por *C. gattii* frequentemente induzem a formação de massas no parênquima cerebral e aumento da pressão intracraniana. A meningite é mais grave quando comparada a infecções que possuem *C. neoformans* como agente etiológico, levando a um quadro de hidrocefalia, neuropatia do nervo cranial e perda súbita de visão. A criptococose do SNC é sempre fatal sem tratamento medicamentoso. A evolução do paciente depende do estado imune do paciente e da gravidade do aumento da pressão intracraniana (VENTURA et al., 2013).

1.1.5 Epidemiologia

Criptococose é considerada uma infecção de distribuição mundial. A prevalência da infecção é diretamente relacionada ao estado imune do hospedeiro e ao grau de exposição à levedura. A maioria dos casos de infecção sintomática por *C. neoformans* ocorre em pacientes imunossuprimidos (LI; MODY, 2010).

Antes da epidemia da AIDS, a incidência de criptococose nos Estados Unidos era menor que um caso por milhão de pessoas por ano. Nos anos 80, a criptococose emergiu como uma importante infecção oportunista entre pessoas com AIDS, ocorrendo em 5 a 10% dos pacientes (CASADEVALL; PERFECT, 1998; BICANIC; HARRISON, 2004). No entanto, a partir da metade da década de 90, com o aumento do uso de fluconazol como profilaxia e o advento da terapia antirretroviral potente, a incidência anual de criptococose diminuiu consideravelmente nos países desenvolvidos. Em Atlanta, Estados Unidos, a prevalência da doença diminuiu de 66 casos por 1000 pacientes com AIDS em 1993, para sete casos por 1000 pacientes no ano de 2000 (BICANIC; HARRISON 2004; MIRZA et al., 2003). No entanto, atualmente as infecções por *C. neoformans* e *C. gattii* ainda causam aproximadamente um milhão de casos de meningite criptococcócica por ano entre as pessoas com AIDS/HIV no mundo, resultando em uma estimativa de 625.000 mortes (COGLIATI, 2013).

Recentemente foi publicada uma revisão sobre centenas de estudos epidemiológicos moleculares sobre criptococose publicados no PubMed (COGLIATI, 2013). Dos 68.811 isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* relatados, 19.651 foram encontrados na Ásia, 19.647 na África, 10.548 na América Central e do Sul, 8.738 na Europa, 7.922 na América do Norte e 2.518 na Oceania. Os países onde os isolados foram os mais prevalentes foram África do Sul (15.631), China (9.736), Estados Unidos (6.198) e Brasil (5.709). A caracterização molecular foi realizada apenas em 12% dos isolados. Entre tipos moleculares de *C. neoformans* e *C. gattii*, o VNI é o mais prevalente no mundo, exceto na Austrália e na Papua Nova Guiné onde é o VGI. Na América Central e do Sul os isolados foram de origem médica (81%) e de fontes veterinárias/ambientais (19%), sendo 6.665 desses isolados reconhecidos como *C. neoformans* e 1.464 como *C. gattii*. Esse estudo verificou ainda que todas as espécies moleculares estão presentes no Brasil, com exceção da VGIV, sendo que a maioria dos isolados de *C. neoformans* pertence à VNI, já para *C. gattii* pertencem à VGII.

No Brasil, criptococose causada pelo *C. gattii* é endêmica, sendo mais prevalente nas regiões norte e nordeste do Brasil (TRILLES et al., 2008) (Figura 3). Em Belém do Pará, foram analisados genotipicamente 54 isolados oriundos de um hospital de referência durante os anos de 2003 e 2007, sendo que metade deles era da espécie *C. gattii* (VGII 44%, VGI 6%) (SANTOS et al., 2008).

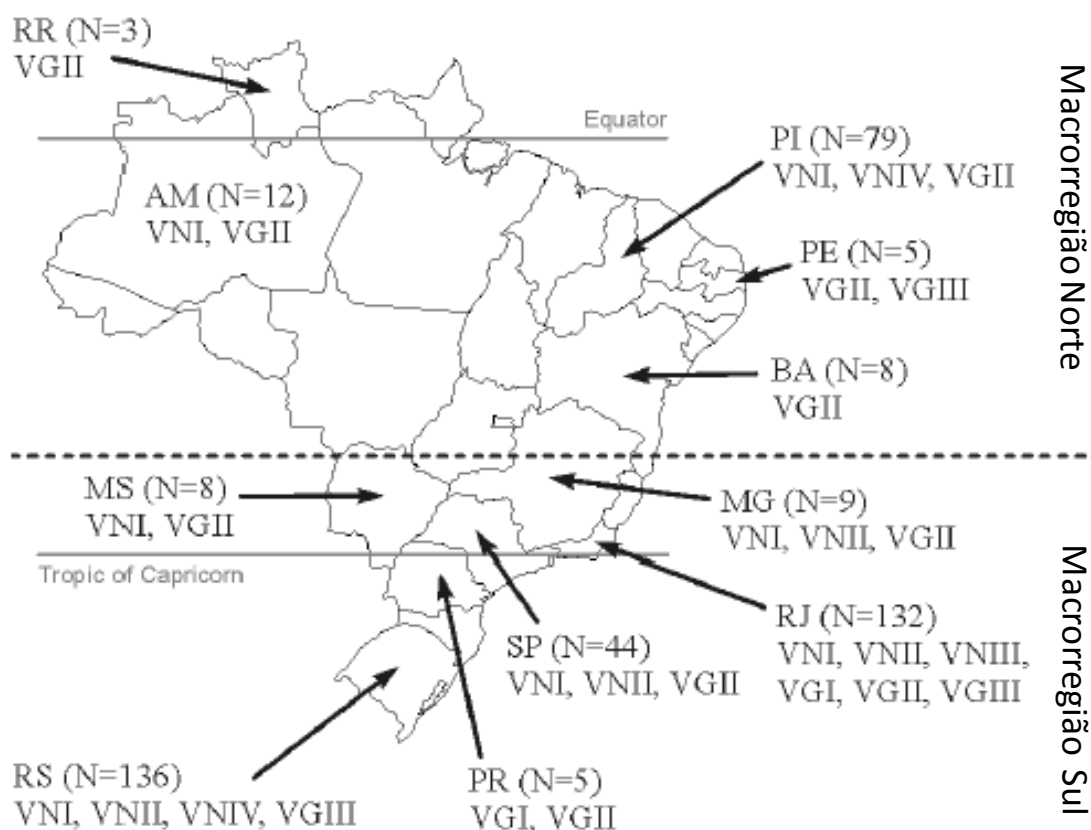


Figura 3. Mapa do Brasil mostrando duas macrorregiões (Nordeste e Sudeste) e a distribuição dos tipos moleculares de *Cryptococcus* encontrados no Brasil. AM: Amazonas; BA: Bahia; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; PE: Pernambuco; PI: Piauí; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RR: Roraima; RS: Rio Grande do Sul; SP: São Paulo (Fonte: TRILLES et al., 2008).

1.1.6 Fatores de virulência

A presença da cápsula polissacarídica foi o primeiro fator de virulência conhecido para *Cryptococcus* (KOZEI, 1995). A cápsula é considerada o principal fator de virulência desses fungos, sendo composta por uma rede contendo glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomana (GalXM). A GXM é o componente majoritário da cápsula do *Cryptococcus* (por volta de 90% de toda cápsula) (BOSE, 2003; NIMRICHTER et al., 2007). A cápsula polissacarídica é importante tanto na

patogênese como na sobrevivência do *Cryptococcus* no meio ambiente. Existem relatos na literatura demonstrando que a expressão da cápsula aumenta a resistência desse fungo contra a dessecação e o efeito de radiações solares (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005; ZARAGOZA et al., 2009).

Como descrito, o estabelecimento da criptococose depende da sobrevivência do fungo nos alvéolos pulmonares, fato que precede sua disseminação para outros tecidos. Nessa fase, a cápsula possui importante papel, pois além de proteger contra fagocitose, interage com as células do hospedeiro modulando suas atividades. A cápsula confere ao *Cryptococcus* uma superfície celular com carga negativa. Uma associação inversa entre o tamanho da cápsula e a fagocitose celular já foi documentada por vários pesquisadores (SMALL; MITCHELL, 1989; YASUOKA et al., 1994; SANTOS et al., 2014). CHIAPELLO et al. (2008) demonstraram que a GXM presente no sorotipo A modula a produção de óxido nítrico (NO) pelos fagócitos. Adicionalmente, outros autores observaram que GXM presente no sorotipo B é a mais efetiva em ativar os receptores *Toll* do tipo 2 e também em estimular a produção de NO pelos macrófago, quando comparado com os outros sorotipos (FONSECA et al., 2010). A cápsula ainda possui, exposta em sua superfície, a proteína antifagocitose 1, a qual pode ser secretada para o meio extracelular. Essa proteína inibe a fagocitose pela ligação aos receptores do sistema de complemento CR2 e CR3 (STANO et al., 2009).

Além da cápsula (que também funciona como um agente antioxidante) as células do gênero *Cryptococcus* possuem um potente sistema enzimático antioxidante que protege o fungo contra a fagocitose pelos leucócitos e também contra estresses ambientais. Esse sistema é composto principalmente pelas superóxidodismutases (SODs) e peroxidases (PERs) (NARASIPURA et al., 2003; GILES et al., 2005a).

A deleção do gene que expressa a enzima SOD1 (SOD citoplasmática) em *C. neoformans* resultou em um mutante mais susceptível à morte pelos neutrófilos e macrófagos, e conseqüentemente menos virulento. Já a deleção da SOD2 (SOD mitocondrial) diminui a capacidade dos mutantes em se multiplicar em elevadas temperaturas e também a sua virulência em modelos de infecção pulmonar e intravenosa (NARASIPURA et al., 2005; GILES et al., 2005b).

Algumas peroxidases possuem um papel crítico na proteção de *Cryptococcus* contra os estresses oxidativos e nitrosativos. Inesperadamente, as catalases não parecem ser importantes na detoxificação contra moléculas reativas do oxigênio exógenas, visto

que a deleção de toda a família das catalases não teve influência sobre a resistência contra o estresse oxidativo e na virulência desse fungo (GILES et al., 2006). Já as glutatona 1 e 2 peroxidases (MISSAL et al., 2005) e a citocromo C peroxidase (GILES et al., 2005) contribuem para a defesa antioxidante de *C. neoformans*, mas não interferem na sua virulência. No entanto, a atividade das thiol-peroxidases mostrou ser proporcional ao aumento da virulência de *C. neoformans*, fato que foi correlacionado com a sua capacidade de conferir a esse fungo resistência contra estresses oxidativo e nitrosativo (MISSAL et al., 2004).

A produção de melanina pela lacase é um importante fator de virulência em *C. neoformans* e *C. gattii* (STEENBERGEN ; CASADEVALL, 2003). A melanina protege o fungo dos intermediários do oxigênio que são produzidos pelo sistema de defesa do hospedeiro, enquanto, na natureza, protege contra a radiação ultravioleta. É interessante notar que a melanina produzida por *Paracoccidioides brasiliensis* também se liga aos antifúngicos capazes de gerar estresses oxidativo e nitrosativo, funcionando como um sistema sequestrador de radicais livres. O resultado dessa interação é a diminuição da suscetibilidade de *P. brasiliensis* a esses fármacos (BALTAZAR et al., 2015). A lacase, por sua vez, também interfere no estresse oxidativo gerado pelos macrófagos, uma vez que possui o papel de sequestrar moléculas de ferro durante a infecção (BROWN et al., 2007).

1.1.6.1 Regulação dos fatores de virulência

Vários fatores ambientais podem regular a virulência de *C. gattii* e de *C. neoformans*. Estímulos estressantes, como compostos intermediários do oxigênio, hipóxia, entre outros, podem induzir modificações fenotípicas nas células fúngicas (TOMAZETT et al., 2011).

A cápsula de *Cryptococcus* é uma estrutura muito dinâmica, que pode alterar seu tamanho e suas propriedades imunogênicas durante a interação com o hospedeiro. Dependendo das condições microambientais (pH, concentrações de dióxido de carbono e de ferro) o tamanho da cápsula é modificado (MONARI; VECCHIARELLI, 2012). Como exemplo, pode-se citar o aumento do tamanho da cápsula que acontece poucas horas após o início da infecção pulmonar em modelo murino (FELDMESSER et al., 2001).

Especificamente para *C. gattii*, muitas proteínas são hiperreguladas durante a fagocitose. O sistema antioxidante tireorredoxina, encontrado nessa espécie é importante para a sobrevivência intracelular e aumento da virulência em modelos murinos, sendo expresso apenas durante o stress oxidativo e nitrosativo. JOBBINS et al., (2010) mostraram que o sistema antioxidante tireorredoxina está presente em cepas do tipo VGII, o que pode explicar a maior virulência desse padrão molecular.

Em 1999, a população da ilha de Vancouver, no Canadá, enfrentou uma epidemia de criptococose, causada por linhagens hipervirulentas de *C. gattii* VGII. Essas linhagens tinham alta taxa de replicação dentro dos macrófagos quando comparadas a outras linhagens de *C. gattii*, mas não apresentavam maior expressão dos fatores de virulência clássicos para *C. gattii*, como o tamanho da cápsula, presença de melanina, produção de fosfolipase e produção de proteinases. Todavia, perceberam que após fagocitose, as mitocôndrias das cepas hipervirulentas tinham uma morfologia tubular. Dessa forma, os autores sugeriram que após o englobamento pelos macrófagos, essas cepas são capazes de promover a fusão das mitocôndrias, de modo a formar uma longa e tubular mitocôndria mais eficiente em reparar danos no DNA causados por espécies oxidativas e condições hipóxicas presentes dentro do fagossomo do macrófago (MA et al., 2009).

SPRINGER et al. (2010) observaram que a expressão de fibrilas extracelulares possui grande importância na virulência e na adaptação ecológica do *C. gattii*. Esses autores sugeriram que linhagens mutantes incapazes de produzir fibrilas se replicavam menos e provocavam lesões menores nas folhas da planta *Arabidopsis thaliana* quando comparadas com as cepas selvagens. Além do mais, mostraram em modelo murino que as cepas que expressavam fibrilas eram muito mais virulentas, pois possuíam maior resistência à fagocitose. E finalmente, os autores observaram que a expressão das fibrilas extracelulares *in vitro* por *C. gattii* era dependente de substratos derivados de plantas. Todos esses achados em conjunto indicam que as fibrilas são uma adaptação estrutural tanto nas relações célula-célula, célula-ambiente como célula-fagócitos.

1.1.7 Tratamento da Criptococose

A escolha da terapia medicamentosa é baseada na forma clínica da criptococose e no estado imunológico do hospedeiro (CHAYAKULKEERE ; PERFECT, 2006). A

Sociedade Americana de Doenças Infecciosas publicou, em 2010, um guia que fornece informações aos profissionais da saúde sobre o tratamento e profilaxia dessa micose. Os principais medicamentos recomendados por esse guia consistem na anfotericina B e nos azólicos (PERFECT et al., 2010).

A anfotericina B é um poliênico cuja ação primária consiste na alteração da permeabilidade celular da membrana fúngica. Seu efeito antifúngico é dependente das duplas pontes conjugadas do anel macrolídico. Essa parte hidrofóbica da molécula liga-se a esteróis, em especial, ao ergosterol, principal esteroide da membrana citoplasmática dos fungos. Este mecanismo de ação explica grande parte da toxicidade do poliênico, pois ocorre ligação também aos esteróis da membrana plasmática humana, como o colesterol. A ligação da droga ao lipídeo altera a permeabilidade seletiva da célula, originando poros permeáveis à saída de água e íons potássio, amônio e fosfato, além de açúcares e proteínas. Ocorre, a seguir, deterioração metabólica e morte celular (BATES et al., 2001; NOONEY et al., 2005).

Os azólicos são drogas fungistáticas e agem inibindo uma enzima da via biossintética do ergosterol, a lanosterol 14- α -demetilase. Sem a incorporação do ergosterol, que é o principal esteroide da membrana da célula fúngica, há comprometimento do crescimento e da divisão celular, além de interferir na fluidez e estabilidade da membrana (SANGLARD, 2002). O principal azólico usado no tratamento da criptococose é o fluconazol, mas o itraconazol, posaconazol e o voriconazol também podem ser utilizados (PERFECT et al., 2010).

A utilização do itraconazol tem-se mostrado uma ferramenta auxiliar no tratamento da criptococose pulmonar localizada, tanto em indivíduos imunodeprimidos ou imunocompetentes, sendo também administrado em combinação com anfotericina B nas formas disseminadas. Já na meningite criptocócica em pacientes com HIV, o itraconazol pode ser utilizado como dose de prevenção ou manutenção (CHAYAKULKEERE; PERFECT, 2006).

1.1.8 Resistência e heterorresistência de Cryptococcus spp. aos antifúngicos

Resistência antifúngica é um fenômeno verificado *in vitro*, no qual o agente etiológico consegue se desenvolver na presença de concentrações terapêuticas da

referida droga. Devido ao crescimento da população imunocomprometida e do uso cada vez mais frequente dos antifúngicos, há grande preocupação dos especialistas sobre o aumento da prevalência de cepas resistentes a esses fármacos, incluindo *Cryptococcus* spp. As maiores taxas de falha terapêutica na criptococose são verificadas frente às drogas imidazólicas, mas alguns estudos revelaram a não remissão dessa micose também com anfotericina B (CANUTO; RODERO, 2002; LOEFFLER; STEVENS, 2003).

BII et al. (2007) detectaram altas frequências de resistência a fluconazol entre 80 linhagens clínicas de *C. neoformans* isoladas a partir do fluido cerebrospinal de adultos hospitalizados com meningite criptocócica no Quênia: apenas 23,8% das linhagens foram sensíveis ao fluconazol e 61,3% foram sensíveis ao itraconazol. Vários mecanismos são propostos para explicar o aparecimento das linhagens resistentes aos triazólicos. Um dos mais frequentes consiste em alterações na enzima lanosterol 14 α -demetilase codificada pelo gene *ERG11*. Por exemplo, um estudo realizado com um paciente com AIDS e meningite criptocócica isolou linhagens antes e após o início do tratamento medicamentoso. Os pesquisadores verificaram que as linhagens isoladas após o tratamento mostraram uma substituição G484S em Erg11 e assumiram um perfil de resistência (RODERO et al., 2003).

Outro possível caminho para o desencadeamento do fenômeno da resistência ao fluconazol encontrado em linhagens de *C. neoformans* seria aumento da expressão do gene CnAFR1, que codifica as proteínas transportadoras *ATP Binding Cassette* (ABC), responsáveis pela redução do conteúdo de fluconazol dentro da célula fúngica (POSTERARO et al., 2003). Alguns autores correlacionaram resistência à virulência dos fungos patogênicos. SANGUINETTI et al., (2006) observaram que o gene AFR1, além de influenciar a resistência microbiana, está relacionado com o aumento da virulência de *C. neoformans*. Esses autores sugeriram que as proteínas transportadoras ABC realizam o efluxo dos intermediários do oxigênio, contribuindo para a sobrevivência do fungo dentro dos fagócitos. Como os macrófagos alveolares são a primeira defesa contra *Cryptococcus* inalados, a habilidade das cepas sobreviverem dentro da célula é um importante fator de virulência. Nessa mesma linha de raciocínio, ORSI et al., (2009) investigaram o papel do gene AFR1 na interação de *C. neoformans* e a micróglia. Esses autores perceberam que o gene AFR1 está associado à redução da acidificação do vacúolo fagocítico, alterando a homeostasia da micróglia.

Em 1999, observou-se pela primeira vez o fenômeno da heterorresistência aos azóis em linhagens de *C. neoformans* isoladas de indivíduos com e sem AIDS, após falha do tratamento medicamentoso (BRANDT et al., 1999). Heterorresistência consiste na habilidade de populações microbianas se tornarem resistentes aos antimicrobianos quando essas mesmas populações são sensíveis em testes tradicionais de susceptibilidade *in vitro*. O significado clínico desse fenômeno ainda não está claro, podendo ser um estágio precursor para a emergência de cepas resistentes (FALAGAS et al., 2007). SINIOV et al., (2009) definiu a heterorresistência em *C. neoformans* quando: a) uma subpopulação de células heterorresistentes tem crescimento inibido em determinada concentração do agente antimicrobiano, no entanto quando células individuais são expostas à droga, elas crescem de maneira variável (normal, lento ou não se multiplicam); b) A subpopulação resistente pode se adaptar em concentrações crescentes da droga; c) A subpopulação resistente produz uma cultura pura de células resistentes, enquanto esse fenômeno não acontece na subpopulação susceptível; d) A resistência encontrada na subpopulação é uma resposta reversível e adaptativa que acontece presença da droga.

Esses mesmos autores postularam que a heterorresistência ao fluconazol é um fenômeno universal para *C. neoformans*, visto que as 130 cepas testadas apresentaram heterorresistência. Estes autores também observaram que os níveis de heterorresistência estavam positivamente relacionados com a virulência das cepas e com a habilidade em tolerar outros xenobióticos presentes no solo e nas plantas. Dessa forma, foi sugerido que o mecanismo de heterorresistência aos azóis também está envolvido com a regulação da resposta fúngica a outros fatores estressantes do meio ambiente (SINIOV et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos com cepas de *C. gattii* (VARMA ; KWON-CHUNG, 2010).

É interessante notar que as células criptocócicas, frente a estresses antimicrobianos, alteram a sua morfologia e modificam a sua virulência. Autores demonstraram que células de *C. neoformans* que cresceram na presença de voriconazol tiveram significativa redução no tamanho da cápsula e do seu diâmetro (DUIN et al., 2004). NOSANCHUK et al. (1999) verificaram que as células que cresceram em concentrações subinibitórias de anfotericina B e de fluconazol tiveram alteração em sua carga celular, tamanho e composição da sua cápsula quando comparadas com aquelas que cresceram na ausência de antimicrobianos. Esses pesquisadores demonstraram,

ainda, que essas células que foram expostas a anfotericina B e fluconazol foram mais fagocitadas pelos macrófagos. Outros pesquisadores observaram que *C. neoformans*, na presença da terbinafina, apresentou importantes alterações morfológicas, tais como a indução de pseudohifas e hifas verdadeiras, e diminuição do tamanho da cápsula (GUERRA et al., 2012). Nosso grupo demonstrou em modelo murino que a resistência ao fluconazol induziu redução da cápsula polissacarídica do *C. gattii*, aumento da taxa de fagocitose, maior recrutamento de leucócitos para os pulmões, o que culminou na diminuição da virulência (SANTOS et al., 2014).

A literatura é escassa em relação a estudos sobre a heterorresistência ao itraconazol em *C. gattii*. No entanto, foi publicado um estudo que demonstra a presença da heterorresistência ao itraconazol em isolados *Aspergillus fumigatus*. É interessante ressaltar que nesse trabalho verificou-se que não houve mudanças no genótipo nos códons 54, 98, 138, 220, 432, e 448 no gene *cyp51A* (que junto com o gene *cyp51B* codifica a enzima lanosterol 14- α -demetilase) das linhagens heterorresistentes (ESCRIBANO et al., 2012).

O aumento da temperatura ambiental pode estar correlacionado com o aparecimento de linhagens resistentes e heterorresistentes de *C. neoformans* frente aos azólicos. Pesquisadores mostraram que a proteína fosfatase calcineurina é necessária para o crescimento do *C. neoformans* a 37°C (ODOM et al., 1997). Um estudo explorou o potencial sinérgico entre inibidores de calcineurina e azólicos. Os autores verificaram que a utilização conjunta do inibidor e o fluconazol diminuiu trinta vezes a concentração inibitória mínima (CIM) do inibidor e quatro vezes a CIM do fluconazol em linhagens de *C. neoformans* (DEL POETA et al., 2000).

Um dos mecanismos propostos para o aparecimento da heterorresistência de *C. neoformans* frente ao fluconazol consiste no fenômeno da dissomia. Linhagens de *C. neoformans* que cresceram na presença de fluconazol apresentaram dissomia no cromossomo 1 e que, quando aumentavam a exposição das células ao fluconazol de uma maneira dose dependente, ocorreram duplicações em outros cromossomos. Após a remoção do estresse antimicrobiano, as células retornavam ao perfil de susceptibilidade inicial, com perda da dissomia (SIONOV et al., 2010). Usando modelo murino, o mesmo grupo de pesquisadores verificou a emergência de clones heterorresistentes também *in vivo*, durante o tratamento com fluconazol de camundongos infectados com *C. neoformans* (SIONOV et al., 2013)

1.2 Justificativa

As infecções causadas por *C. gattii* ganharam bastante a atenção dos pesquisadores nos últimos anos devido à sua expansão em diferentes partes do mundo, que não faziam parte do seu nicho inicial, além da sua capacidade em infectar indivíduos imunocompetentes (GILES et al., 2009). A anfotericina B e os azólicos são os fármacos de primeira escolha utilizados na terapia da criptococose devido a sua segurança e eficácia (PERFECT et al., 2010).

Embora os mecanismos de ação mais aceitos para anfotericina B e para os azólicos estão relacionados com o ergosterol, vários artigos sugerem que esses antifúngicos podem causar outros efeitos nas células. LAMY-FREUND et al. (1985) verificaram que a anfotericina B induz a produção de espécies reativas de oxigênio por um processo de autooxidação. Já outros pesquisadores demonstraram que a anfotericina B provoca um alto estresse oxidativo em células de *C. neoformans* (SANGALLI-LEITE et al., 2011). Em relação aos azólicos, alguns estudos demonstraram que a atividade do miconazol, tanto em células planctônicas como em células de biofilme de *Candida albicans*, está relacionada com a produção de espécies reativas do oxigênio (KOBAYASHI et al., 2002; VANDENBOSCH et al., 2010). No entanto, não há, em nosso conhecimento, pesquisas que buscaram verificar qual o papel das espécies reativas de oxigênio e do nitrogênio no mecanismo de ação da anfotericina B, do fluzonazol e do itraconazol frente às células de *C. gattii*.

O tratamento farmacológico da criptococose normalmente se prolonga por mais de seis meses, sendo comum o relato da emergência de linhagens resistentes (PERFECT; COX, 1999). Dentro desse contexto, é importante ressaltar que a recorrência da meningite criptocócica pode ser resultado da persistência da linhagem original, apesar da terapia com os azólicos (SPITZER et al., 1993; CASADEVALL et al. 1993; WITT et al., 1996). Muitos estudos descreveram a emergência de clones heterorresistentes após o estresse com o fluconazol e o voriconazol (MONDON et al., 1999; SIONOV et al., 2009; VARMA et al., 2010, SIONOV et al., 2013).

Para *C. gattii*, a primeira vez que foi relatado o aparecimento da heterorresistência ao fluconazol foi em 2010. Esses autores observaram a

heterorresistência foi intrínseca para todas as linhagens estudadas e correlacionaram esse fenômeno com o aumento da virulência (VARMA; KWON-CHUNG, 2010).

Embora a heterorresistência possa ser reproduzida em laboratório, os mecanismos envolvidos e o seu significado clínico ainda são pouco conhecidos. O itraconazol é uma droga muito utilizada no tratamento da criptococose pulmonar, no entanto não há estudos sobre a heterorresistência de *C. gattii* a essa droga. Assim, nota-se a necessidade de estudos que avaliem os mecanismos envolvidos na heterorresistência ao itraconazol em cepas de *Cryptococcus gattii*.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do estresse oxidativo e nitrosativo gerado pelos azólicos em células de *C. gattii* e sua influência no surgimento de clones heterorresistentes ao itraconazol.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração mínima inibitória (CIM) e curva de morte fúngica de *C. gattii* frente ao fluconazol, itraconazol e anfotericina B.
- Avaliar os efeitos dos estresses oxidativos e nitrosativos gerados pelo fluconazol, itraconazol e anfotericina B em células de *C. gattii* utilizando como parâmetros: peroxidação lipídica, nível de ergosterol, produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, atividade das enzimas do sistema antioxidante, e interação *in vitro* dos antifúngicos com inibidores da SOD e da PER e com sequestrador de peroxinitrito.
- Selecionar linhagens de *C. gattii* heterorresistentes ao itraconazol.
- Analisar diferentes parâmetros dos clones heterorresistentes ao itraconazol em comparação com as linhagens originais: curva de morte, efeito pós-antibiótico, análise morfométrica, eletroforese em campo pulsante, detecção de ergosterol, peroxidação lipídica, potencial zeta, presença de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e expressão das enzimas neutralizadoras peroxidase e superoxidodismutase.
- Avaliar a interação das amostras originais e heterorresistentes ao itraconazol com macrófagos intraperitoneais de camundongos.
- Avaliar a progressão da criptococose em modelo murino de infecção intratraqueal e intravenosa utilizando linhagens originais e seus clones heterorresistentes.
- Verificar a carga fúngica e o infiltrado inflamatório de órgãos oriundos de camundongos infectados por linhagens originais e clones heterorresistentes.
- Realizar testes de análise morfométrica e de curva de sobrevivência em modelo murino de infecção intratraqueal com células derivadas do cultivo em meio sem droga dos clones heterorresistentes.

2 CAPÍTULOS

2.1 CAPÍTULO I – “The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*”

Gabriella Freitas Ferreira, Ludmila de Matos Baltazar, Julliana Ribeiro Alves Santos, Andrea Souza Monteiro, Lucia Alves de Oliveira Fraga, Maria Aparecida Resende-Stoianoff e Daniel Assis Santos. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.68, p.1801-1811, 2013. doi:10.1093/jac/dkt114

Nesse trabalho foram avaliados distintos parâmetros para estudar os efeitos dos estresses oxidativos e nitrosativos causados pelos azólicos e pela anfotericina B nas células de *C. gattii*, tais como peroxidação lipídica, conteúdo de ergosterol, produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, atividade enzimática do sistema antioxidante e a interação in vitro das drogas antifúngicas com inibidores da peroxidase, da superoxidismutase e com sequestrador de peroxinitrito. Nossos dados mostraram que os estresses oxidativo e nitrosativo possuem um importante papel na ação antifúngica do itraconazol e da anfotericina B contra as células de *C. gattii*.

Os objetivos desse trabalho foram:

1. Avaliar a cinética da curva de tempo de morte dos isolados de *C. gattii* frente aos antifúngicos fluconazol, itraconazol, anfotericina B.
2. Quantificar a peroxidação lipídica e a produção de espécies reativas causadas pelos antifúngicos nas células de *C. gattii*.
3. Quantificar o conteúdo de ergosterol da membrana celular fúngica antes e após a exposição aos antifúngicos.
4. Determinar o papel das enzimas peroxidase e superoxidodismutase na resposta do *C. gattii* frente aos estresses causados pelos antifúngicos.

2.2 CAPÍTULO II – “Heteroresistance to itraconazole alters morphology and increases virulence of *Cryptococcus gattii*”

Gabriella Freitas Ferreira, Julliana Ribeiro Alves Santos, Marliete Carvalho da Costa, Rodrigo Assunção de Holanda, Ângelo Márcio Leite Denadai, Gustavo José Cota de Freitas, Áquila Rodrigues Costa Santos, Priscila Batista Tavares, Tatiane Alves Paixão, Daniel Assis Santos. **Manuscrito aceito pelo periódico Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. doi:10.1128/AAC.00466-15

Nesse trabalho avaliou-se o desenvolvimento da heterorresistência de *C. gattii* ao itraconazol e sua influência na virulência das linhagens em modelo murino. Verificou-se que os clones eram intrinsecamente heteroresistentes e apresentavam alteração no diâmetro celular e no tamanho da cápsula, maior negatividade da carga da superfície celular, redução da quantidade de ergosterol, alteração molecular cromossômica, além de um potente sistema antioxidante. Além disso, a heterorresistência ao itraconazol levou a uma maior fagocitose desses fungos pelos macrófagos, os quais conseguiram proliferar exacerbadamente dentro dos fagócitos. Esses resultados em conjunto podem explicar a diminuição do tempo de sobrevivência, a grande carga fúngica encontrada nos pulmões e cérebro, além do menor infiltrado inflamatório nos pulmões dos camundongos infectados pelas células heteroresistentes em comparação com os animais infectados com as linhagens originais. Nossos resultados indicam que a heterorresistência ao itraconazol é intrínseca e aumenta virulência de *C. gattii*

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Induzir a heterorresistência ao itraconazol em onze linhagens de *C. gattii*.
2. Caracterizar os isolados originais e heteroresistentes ao itraconazol por meio dos testes: curva de morte, efeito pós-antibiótico, análise morfométrica, eletroforese em campo pulsante, detecção de ergosterol, peroxidação lipídica, potencial zeta, presença de espécies reativas e expressão das enzimas neutralizadoras,
3. Avaliar o perfil fagocítico dos macrófagos frente aos isolados originais e heteroresistentes e a capacidade proliferativa destes isolados no interior dos macrófagos e investigar a virulência das células originais e clones heteroresistentes em modelo murino.

3. DISCUSSÃO

O projeto sobre o imunoproteoma de *C. gattii* identificou grande parte do sistema antioxidante desse fungo (JOBINS et al, 2010). No entanto, pouco se sabe sobre a influência das drogas antifúngicas no sistema antioxidante de *C. gattii*. O itraconazol, um triazólico oral de amplo espectro, tem atividade antimicótica para *C. gattii* tanto *in vitro* como em modelos murinos de meningite criptocócica (CAUWENBERGH, 1993). Em nosso trabalho, altos níveis de TBARS foram observados após uma hora de tratamento das células de *C. gattii* com itraconazol, mas não com fluconazol. Os ensaios mostraram que uma alta peroxidação lipídica aconteceu concomitantemente com a redução dos níveis de ergosterol após exposição ao itraconazol e, por isso, decidiu-se mensurar ERO e peroxinitrito produzido por células de *C. gattii*.

Os resultados demonstraram que o itraconazol aumentou a quantidade intracelular de ERO. Baseado nesses dados, hipotetizamos que esse fármaco não possui apenas um único alvo na célula: itraconazol também induz a produção de ERO, os quais levam à adição de elétrons nos lipídios das membranas (maioria ácidos poli-insaturados), resultando em danos celulares. Esse fenômeno aconteceria de uma maneira dinâmica em conjunto com a inibição da enzima 14 α -desmetilase (SHAPIRO et al., 2009), o que explicaria o fato do CIM do itraconazol ser menor do que o CIM para fluconazol para a maioria dos fungos (BADIEE; ALBORZI; 2011; ESPINEL-INGROFF et al., 2012). É importante ressaltar que o fluconazol não foi capaz de induzir radicais livres e nem peroxidação lipídica.

Não foi observada peroxidação lipídica nas células de *C. gattii* tratadas com itraconazol após 24 horas, mas foi verificado aumento da atividade das enzimas SOD e PER nesse mesmo tempo. O sinergismo entre o itraconazol e o 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT), um inibidor de catalase, foi também analisado. Os resultados sugerem que o estresse oxidativo em células de *C. gattii* expostas ao itraconazol ocorreu no início do tratamento e contribuiu para o seu efeito antifúngico. É provável que as células criptocócicas sobrevivam ao ERO por ativarem o seu sistema antioxidante. Essa hipótese ajudaria a explicar o fato do itraconazol ser uma droga fungistática (COWEN; STEINBACH, 2008).

A anfotericina B é uma droga antifúngica que apresenta potente atividade contra a maioria das leveduras e fungos filamentosos (GRUSZECKI et al., 2003). É uma molécula autooxidável, o que pode estar relacionado com o estresse oxidativo (MATOS et al., 2012). Interessantemente, a curva de morte fúngica na presença de anfoterica B, o nível de peroxidação lipídica, o grau de interação com inibidores da peroxidase e superoxidodismutase, além de interação com o sequestrador de peróxidonitrito, foram semelhantes a estes mesmos parâmetros quando o peróxido de hidrogênio foi testado. A partir dessas observações, pensou-se que a anfotericina B poderia induzir a produção de ERO e peroxinitrito nas células de *C. gattii*. Os resultados mostraram altos níveis de radicais livres após o tratamento das células fúngicas com esse fármaco, o qual perdurou por 24 horas. Nesse sentido, acredita-se que a anfotericina B também possui múltiplos efeitos na célula, como sugerido previamente (SOKOL-ANDERSON et al., 1998; SANGALLI-LEITE et al., 2011). Dessa forma, postulou-se que a anfotericina B possui dois mecanismos fungicidas nas células: indução de estresse oxidativo/ nitrosativo e aumento da permeabilidade celular.

Cryptococcus gattii aumenta a atividade do seu sistema antioxidante frente a estresses oxidativo e nitrosativo (MISSALL et al., 2004; BROWN et al., 2009). Os ensaios demonstraram um aumento da atividade da peroxidase após 24 horas de tratamento com anfotericina B, além de uma interação sinérgica entre a anfotericina B e os inibidores da peroxidase/superoxidodismutase. No entanto, acredita-se que essa ativação do sistema antioxidante não é suficiente para neutralizar todas as espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, o que não permite a célula uma eficiente adaptação a esse estresse. Essa afirmativa poderia explicar a menor taxa de resistência de isolados de *C. gattii* a anfotericina B quando comparado aos azólicos (MATOS et al., 2012).

Uma associação esquemática com todos os dados obtidos dos experimentos que buscaram entender o papel dos estresses oxidativos e nitrosativos no mecanismo de ação dos azólicos e da anfotericina B está apresentada na Figura 4.

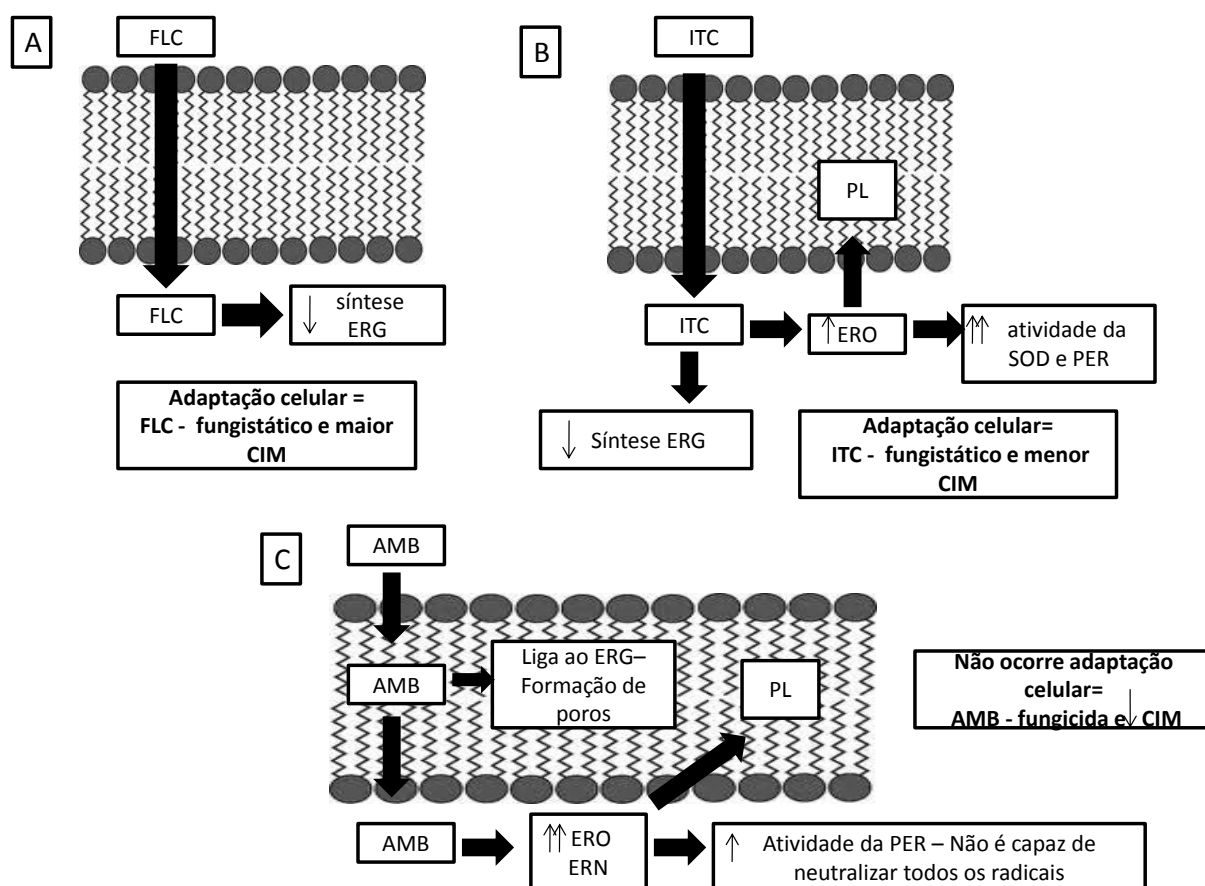


Figura 4. Representação esquemática do papel do estresse oxidativo e nitrosativo causado pelo itraconazol (ITC) e anfotericina B (AMB) em células de *C. gattii*. (A) Fluconazol (FLC) não promove a formação de radicais livres e interfere apenas na síntese do ergosterol (ERG), o que resulta em uma ação fungistática e em altos valores de CIM. (B) De uma maneira dinâmica, ITC reduz os níveis de ergosterol, mas também induz estresse oxidativo em *C. gattii* no início do tratamento levando a peroxidação lipídica (PL), a qual é suficiente para ativar o sistema antioxidante celular. O resultado é um efeito fungistático e menores valores de CIM. (C) A anfotericina B se liga ao ergosterol e também induz a um intenso estresse oxidativo e nitrosativo nas células fúngicas (levando à PL). Esses dois mecanismos fungicidas não permitem uma eficiente adaptação celular, resultando em valores baixos de CIM.

O peroxinitrito é uma espécie reativa com pequena meia-vida e um potente indutor de morte celular (BROWN et al., 2009). Embora não seja um radical livre por sua natureza química (não possui elétrons desemparelhados), é um potente agente

oxidante que danifica os tecidos de diversas maneiras, incluindo a peroxidação lipídica e inativação de enzimas (VIRA et al., 2003). O presente estudo demonstrou que a adição do FETPPS, um sequestrador de peroxinitrito, diminuiu a atividade da SOD após todos os tratamentos testados (incluindo no controle de crescimento). Estudos prévios demonstraram que o óxido nítrico eficientemente compete com a SOD pelo superóxido (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). Assim, no sistema testado, o peroxinitrito foi constantemente removido pelo FETPPS, provavelmente modificando o equilíbrio da formação dessa espécie pela reação entre óxido nítrico e superóxido. Além do mais, a atividade da peroxidase foi também reduzida pelo FETPPS quando adicionado nas células tratadas com itraconazol e anfotericina B. Esses resultados podem ser explicados pela redução do substrato para essa enzima (peróxido de hidrogênio), que provavelmente está reduzido pela diminuição da ativação da SOD. A Figura 5 apresenta uma síntese desse mecanismo proposto.

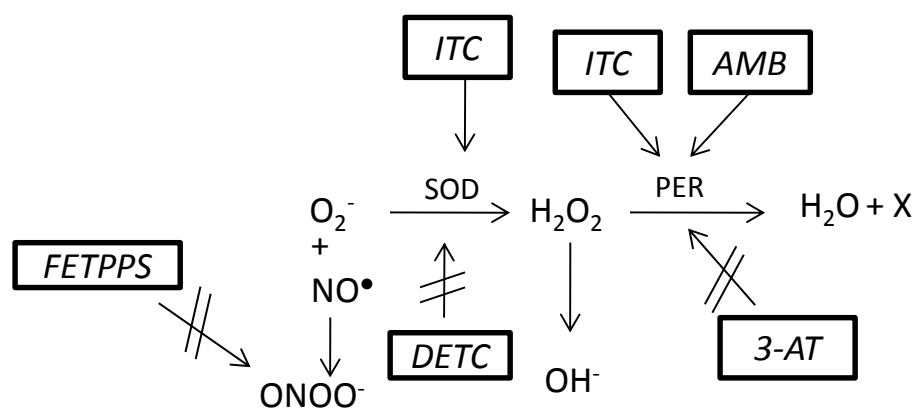


Figura 5. Representação esquemática do sistema antioxidante e o mecanismo de ação do 3-AT, DETC e FETPPS

3-AT – inibidor da catalase 3-amino-1,2,4-triazol; DETC – inibidor da SOD diethyldithiocarbamato; FETPPS – sequestrador de peróxinitrito 5,10,15,20-Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato Iron (III), Chloride; SOD – superóxidodismutase; PER – peroxidase; ITC – itraconazol; AMB – Anfotericina B

Itraconazol é uma alternativa ao tratamento de primeira escolha (poliênicos e fluconazol) para a criptococose em circunstâncias especiais, como a não tolerância ao

tratamento convencional pelo paciente, existência de interações medicamentosas prejudiciais e a persistência ou progressão da doença mesmo após terapia convencional (PERFECT et al., 2010). No entanto, há poucos estudos que examinam as consequências da exposição prolongada das células de *C. gattii* frente ao itraconazol. Nesse estudo, foram apresentadas as primeiras evidências que a heterorresistência de *C. gattii* aos itraconazol está associada com a menor susceptibilidade ao estresse oxidativo e ao aumento da virulência.

A heterorresistência ao itraconazol foi intrínseca para todas as linhagens de *C. gattii* analisadas. É importante notar que a resistência adquirida foi perdida de uma maneira gradual depois de repetidas subculturas em meios não suplementados com a droga, resultando em reversão à susceptibilidade original. A seleção das subpopulações heterorresistentes foi evidenciada apenas quando se utilizou o inóculo concentrado de 10^9 UFC/mL a 37°C. Baseado nos resultados, pode-se inferir a possibilidade da seleção de populações heterorresistentes em pacientes com alta carga fúngica e que utilizam itraconazol por um longo período de tempo. Outros pesquisadores usaram o mesmo procedimento para o estabelecimento de clones heterorresistentes a azólicos de *Candida* (CLAUDINO et al., 2009). Entretanto, nesse estudo foi utilizada a temperatura de 37°C para simular a temperatura do corpo dos mamíferos, já que a capacidade dos fungos em modificar a sua fisiologia e a sua taxa de crescimento a essa temperatura é fundamental para a capacidade de infectar os seres humanos (PERFECT, 2006).

Os clones heterorresistentes de todos os isolados demoraram mais tempo para apresentar redução populacional, sendo que algumas linhagens exibiram também redução do efeito pós-antifúngico. Com base nas características farmacodinâmicas descritas, pode-se supor que as células heterorresistentes necessitariam de uma prolongada e contínua exposição ao itraconazol para sofrerem o efeito fungistático proposto para essa droga (CRAIG, 1993).

É importante ressaltar que o nível de heterorresistência ao itraconazol (NHI) variou entre os isolados, de modo que foram observados três perfis distintos: baixo, intermediário e alto nível de heterorresistência. O fenômeno de heterorresistência alterou a morfologia celular e induziu a redução do tamanho da cápsula e do diâmetro celular. É importante ressaltar que foi verificada uma correlação positiva entre a relação superfície sobre volume (S/V) das células originais e os NHIs; e uma correlação negativa entre o tamanho da cápsula dos clones heterorresistentes e os NHIs. Efeitos

semelhantes foram observados em células de *C. neoformans* expostas a concentrações subinibitórias do fluconazol, voriconazol, anfotericina B e terbinafina (NOSANCHUK et al., 1999; DUIN et al., 2004; GUERRA et al., 2012). De acordo os princípios básicos da biologia celular, há significativas vantagens em ser uma célula pequena, visto que uma razão elevada de S/V suporta troca de nutrientes mais rapidamente por volume celular comparada com uma célula grande. Esse fato influencia em vários aspectos da evolução celular, pois que uma menor quantidade de nutrientes permite um maior crescimento de população de células pequenas do que grandes (MADIGAN et al., 2013).

Ainda, foi demonstrada uma diminuição significativa do tamanho da cápsula e dos níveis de ergosterol provocada pela heterorresistência ao itraconazol, o que provavelmente tornou as células fúngicas mais aptas a se adaptarem ao estresse causado por esse fármaco. Alguns autores relataram que o crescimento da cápsula requer grande gasto de energia e está associado com uma menor taxa de multiplicação celular fúngica (ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004; MAXSON et al., 2007). Embora a cápsula funcione como um fator de resistência frente a algumas drogas antifúngicas (ex: anfotericina B), ela não interfere na ação do itraconazol em células de *C. neoformans* (ZARAGOZA et al., 2008). Além do mais, a exposição de células de *C. neoformans* a concentrações subinibitórias de fluconazol altera a quantidade de lipídeos celulares (GHANNOUM et al., 1994). Dado que a síntese da cápsula está associada ao acúmulo de vesículas na parede celular (SAKAGUCHI et al., 1993), é possível que a inibição da síntese do ergosterol resulte em membranas defeituosas que interferem com o tráfico de vesículas necessário para a síntese da cápsula, o que explicaria os resultados encontrados.

O estresse provocado pelo itraconazol induz a formação de dissomia em cromossomos específicos, especialmente no cromossomo 1, que está fortemente relacionado com o gene *ERG11* (SIONOV et al., 2010). Foram observados diferentes padrões de banda entre as linhagens originais e heterorresistentes pela técnica de eletroforese em campo pulsátil, sugerindo um mecanismo de adaptação frente ao estresse gerado pelo itraconazol. A duplicação e a perda de genes são ferramentas muito utilizadas na evolução dos fungos (WAPINSKI et al., 2007). Dessa forma, presume-se que a reorganização do genoma vista nos clones heteroresistentes é uma consequência da diminuição da susceptibilidade aos azólicos.

As células heterorresistentes que se originaram das linhagens com menor (L135/03) e alto NHI (L27/01) foram significativamente mais fagocitadas quando comparadas com as células originais da mesma linhagem. Esses resultados podem ser explicados por alterações na cápsula (tamanho e carga) observadas nos clones heterorresistentes (CROSS et al., 1993; BOSE et al., 2003; GRECHI et al., 2011). Como as células criptocócicas são carregadas negativamente (NOSANCHUK et al., 1999; SANTOS et al., 2014), hipotetiza-se que a heteroresistência ao itraconazol diminui a carga negativa das células fúngicas e reduz a repulsão eletrostática entre as leveduras e os macrófagos, aumentando a fagocitose.

Embora o aumento da cápsula em *C. neoformans* confira maior resistência ao estresse oxidativo, sendo postulado como um possível mecanismo para a sobrevivência desse fungo em meio intracelular (ZARAGOZA et al., 2008), os dados desse estudo apontam que a heterorresistência aumenta a taxa de proliferação intracelular dentro dos fagócitos. Para melhor entender esses resultados, avaliou-se a susceptibilidade dos clones heterorresistentes ao estresse oxidativo gerado pelo itraconazol. Interessantemente, os clones heterorresistentes foram mais resistentes ao estresse oxidativo do que as células originais da mesma linhagem. Além do mais, a linhagem com alto valor de NHI (L27/01) apresentou menores níveis de ERO e de TBARS do que a linhagem com baixo valor de NHI. Esses resultados demonstram que a menor susceptibilidade ao estresse oxidativo nos clones heterorresistentes poderia ser explicado pela superexpressão das enzimas peroxidase e superoxidodismutase.

O sistema antioxidante do *Cryptococcus* o protege contra radicais livres e a morte intracelular pelos macrófagos (OLSZEWSKI et al., 2010). Estudos anteriores demonstraram que melanina, superoxidodismutase (NARASIPURA et al., 2005), glutathiona peroxidase (MISSAL et al., 2005), e citocromo C peroxidase (GILES et al., 2005a) são exemplos de componentes do sistema antioxidante criptocócico. Além do mais, a superoxidodismutase 2 é essencial para o crescimento de *C. neoformans* a 37°C, devido ao seu papel de regular a concentração de ERO dentro da mitocôndria. Nesse sentido, pode-se supor que um conjunto de fatores observados nos clones heterorresistentes: alta razão S/V, menor tamanho da cápsula e maior atividade das enzimas superoxidodismutase e peroxidase, podem gerar condições favoráveis para que as células de *C. gattii* possam se proliferar dentro dos macrófagos (GILES et al., 2005b).

Para determinar se a heterorresistência altera a virulência desse fungo, inocularam-se células originais e heterorresistentes de *C. gattii* em camundongos C57BL/6 por via intratraqueal e intravenosa. Os clones heterorresistentes foram mais virulentos em ambas as vias testadas. Dentro desse contexto, é importante ressaltar que uma das primeiras características descritas da relação *Cryptococcus*-hospedeiro é a sua capacidade de proliferar dentro dos macrófagos (DIAMOND; BENNETT, 1973). Essa habilidade desse fungo sobreviver dentro do fagossomo depende da sua capacidade de conseguir nutrientes para proliferar (JOHNSTON; MAY, 2013). Os resultados aqui apresentados apontam que os clones heterorresistentes tiveram mais êxito em sobreviver dentro dos macrófagos (células menores e com maior possibilidade de troca de nutrientes por superfície celular, conforme discuto anteriormente), e esse fenômeno pode explicar o aumento da virulência em modelo murino. As alterações nos clones heterorresistentes achadas nesse trabalho estão resumidas na figura 6.

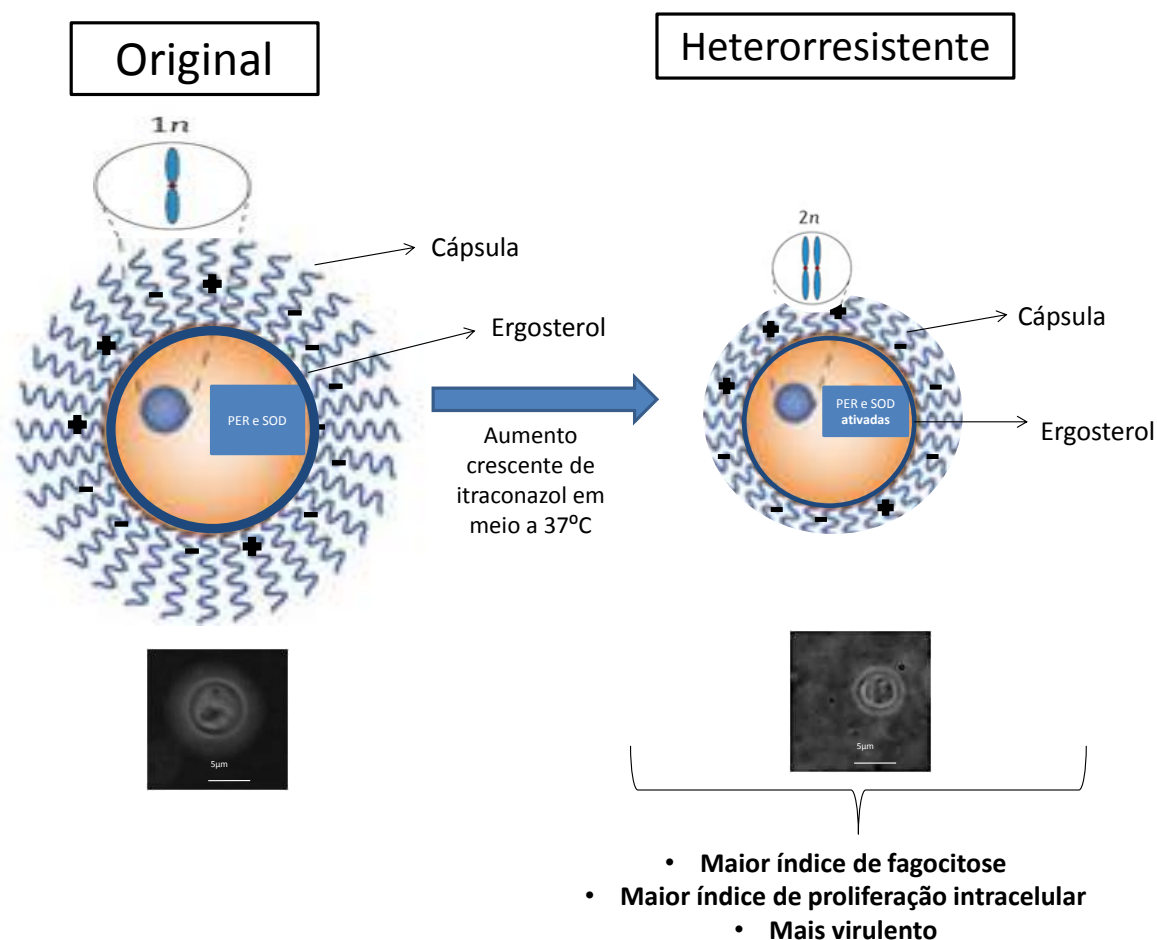


Figura 6. Resumo das alterações observadas nos clones heterorresistentes quando comparados com a linhagem original. As linhagens originais foram submetidas a concentrações crescentes de itraconazol, o que levou ao desenvolvimento dos clones heterorresistentes (esses clones voltaram ao perfil de suscetibilidade inicial após dez cultivos diários em meio sem droga). Os clones heterorresistentes tiveram diminuição do conteúdo de ergosterol, diminuição da relação S/V e do tamanho da cápsula, aumento da carga da superfície celular, ativação das enzimas peroxidase e superóxidodismutase e alteração cromossômica. A heterorresistência ao itraconazol fez com que os fungos fossem mais fagocitados, mas também se proliferassem mais no interior dos macrófagos, o que levou ao aumento da virulência em modelo murino.

Para entender melhor a influência da heterorresistência na virulência, foram realizados dois experimentos com camundongos infectados com a linhagem L135/03: contagem das unidades formadoras de colônias em órgãos e histopatologia. Uma alta

carga fúngica nos pulmões e cérebro nos camundongos infectados com os clones heterorresistentes induziu um menor infiltrado inflamatório depois de 10 dias de inoculação. Sabe-se que a presença de uma resposta balanceada é crítica para o prognóstico da criptococose, de modo que citocinas do tipo TH1 e TH17 resultam em redução da proliferação intracelular (VOELZ et al., 2009). Além do mais, pesquisadores observaram que citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-13 tem um efeito não protetor, enquanto uma resposta Th1 não eficiente é associada com o desenvolvimento da meningite criptocócica (SIDDIQUI et al., 2005). Nesse sentido, os resultados desse estudo mostraram que camundongos infectados com clones heterorresistentes apresentam alta carga fúngica e menor infiltrado inflamatório nos pulmões, o que resultou em pior prognóstico. Foi também observado que os fungos heterorresistentes foram mais fagocitados e tiveram alta taxa de proliferação dentro dos macrófagos. Esses resultados corroboram com as observações realizadas pelos pesquisadores que tentaram relacionar as interações entre macrófago-Cryptococcus e o prognóstico das infecções dos pacientes infectados por essas linhagens. Eles observaram que os isolados que apresentaram alta taxa de fagocitose e alta taxa de proliferação intracelular tinham cinco vezes mais risco de morte (ALANIO et al., 2011). Essas relações foram resumidas na Figura 7.

Os clones heterorresistentes apresentaram redução do tamanho da cápsula, e esse dado ratifica estudos anteriores que sugerem que células com grande quantidade de polissacarídeo celular possuem mais dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica e se estabelecer no sistema nervoso central (CHARLIER et al., 2005).

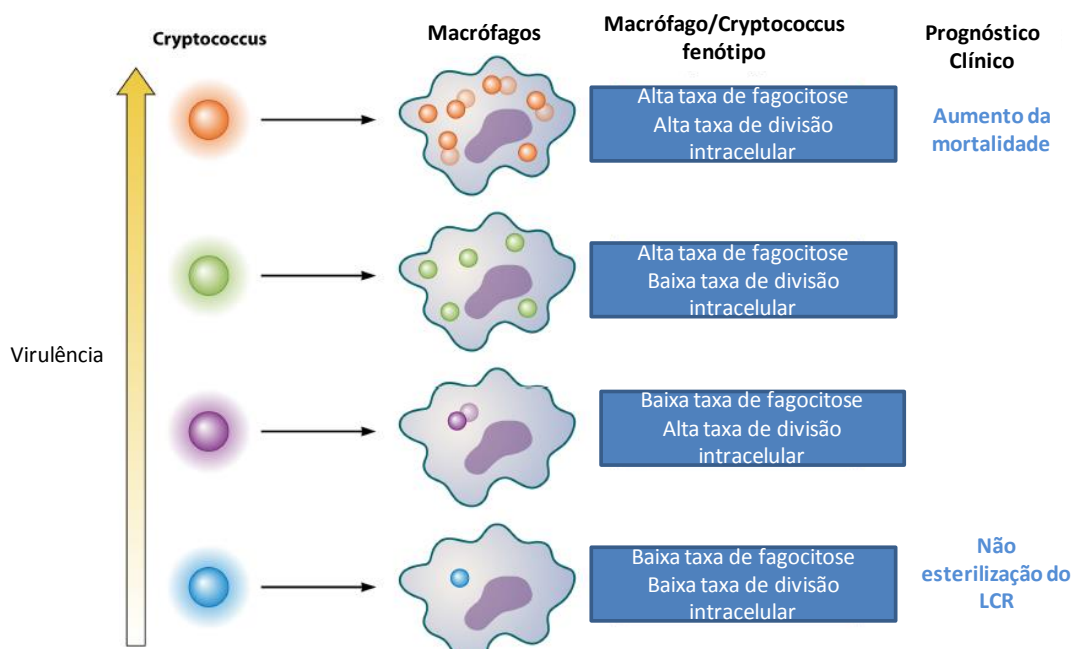


Figura 7. A virulência de linhagens clínicas de *C. neoformans* foi correlacionada com a interação fungo-macróforo. Pacientes que apresentaram isolados com alto índice de fagocitose e de proliferação celular apresentaram pior prognóstico. Já aqueles pacientes que apresentaram isolados com baixo índice de fagocitose e de taxa de proliferação celular apresentaram dificuldade de eliminar os fungos do fluido cerebrospinal após duas semanas de tratamento com antifúngicos (Fonte: MANSOUR et al., 2011).

Apesar de *C. gattii* ser intrinsicamente heterorresistente ao itraconazol, todas as linhagens voltaram ao mesmo perfil de sensibilidade ao itraconazol após dez cultivos seguidos em meio sem droga. Esses resultados são similares aos dados encontrados na literatura (SIONOV et al., 2009; VARMA et al., 2010). De forma interessante, as células oriundas dessa décima cultura foram tão virulentas quanto os clones heterorresistentes e foram menores que as linhagens originais. Outra observação importante é que as colônias recuperadas do pulmão e do cérebro dos animais infectados continuaram com o mesmo perfil de susceptibilidade que os clones heterorresistentes. Postula-se que as diferenças de perfil de suscetibilidade dos clones

heterorresistentes que passaram por duas situações distintas: 1) repiques sucessivos em meio sem droga (retorno a suscetibilidade inicial) e 2) inoculados em modelo murino e recuperados em órgãos dos animais (manutenção do nível de resistência) podem ser explicadas porque, *in vitro*, as linhagens precisam ainda se adaptar aos radicais livres oriundos das células fagocíticas, e em *vitro* não há estresse. Como mencionado anteriormente, os fungos expostos ao itraconazol aumentaram a atividade do sistema enzimático antioxidante para sobreviver ao estresse oxidativo e à peroxidação lipídica gerada por esse fármaco. Nesse sentido, acredita-se que ocorre uma “adaptação cruzada” e, por causa disso, as células recuperadas dos camundongos continuaram menos susceptível ao itraconazol. Assim, processo de heterorresistência interferiria na virulência de maneira mais duradoura que a resistência ao itraconazol.

Finalmente os dados aqui apresentados mostram um importante papel dos estresses oxidativo e nitrosativo gerados pelos azólicos e pela anfotericina B contra *C. gattii*. Também verificou-se que a heterorresistência ao itraconazol é um mecanismo intrínseco em todos os isolados de *C. gattii* testados e representa um mecanismo adaptativo para a sobrevivência diante do estresse causado pelos azólicos. Ainda, foi demonstrado que a heterorresistência altera a morfologia celular (S/V e tamanho da cápsula), níveis de ergosterol e aumenta a atividade das enzimas antioxidantes. Essas modificações podem representar mecanismos adicionais da inefetividade do tratamento de pacientes com itraconazol, visto que a heterorresistência modifica parâmetros farmacodinâmicos e aumenta a virulência das células de *C. gattii*.

4 CONCLUSÕES

1. Esse estudo foi pioneiro em demonstrar o papel do estresse oxidativo e nitrosativo gerado pelos azólicos e anfotericina B em *C. gattii*.
2. O itraconazol induz a produção de espécies reativas de oxigênio no início do tratamento simultaneamente com a redução dos níveis de ergosterol celular e a ativação do sistema enzimático antioxidante. Esse efeito resulta em um efeito fungistático com valores muito baixos de concentração inibitória mínima.
3. Nesse trabalho descreveu-se a importância da anfotericina B em promover o estresse oxidativo e nitrosativo nas células de *C. gattii*.
4. Em nosso conhecimento, esse estudo foi o primeiro a descrever o fenômeno da heterorresistência do *C. gattii* ao itraconazol.
5. A heterorresistência ao itraconazol leva a alterações morfológicas e fisiológicas nas células de *C. gattii*, as tornando mais virulentas em modelo murino.,
6. As alterações morfológicas em células criptocócicas são resultado de adaptação às condições ambientais hostis, como a pressão causada pelo itraconazol.
7. A heterorresistência ao itraconazol pode ser um mecanismo de ação adicional que explicaria a não remissão da infecção de pacientes com criptococose tratados com itraconazol.

5 PERSPECTIVAS

- Estudar o desenvolvimento da heterorresistência das linhagens de *C. gattii* em modelo murino, pela infecção de camundongos com linhagens originais e tratamento com itraconazol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANIO et al. Cryptococcus Dynamics of Cryptococcus neoformans-macrophage interactions reveal that fungal background influences outcome during cryptococcal meningoencephalitis in humans. **Mbio**, v.9, p. e00158-11, 2011.

ALANIO et al. Cryptococcus neoformans Host Adaptation: Toward Biological Evidence of Dormancy. **Mbio**, v.31, p. e02580-14, 2015.

ARAUJO, G.S. et al. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cellulars. **PLoS One**, v.7, p. 1-11, 2012.

ARTHINGTON-SKAGGS, B.A. et al. Quantification of ergosterol content: Novel method for determination of Fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v; 37, p. 3332-3337, 1999.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology**, v.271, p. C1424-37, 1996.

BADIEE, P.; ALBORZI, A. Susceptibility of clinical Candida species isolates to antifungal agents by E-test, southern Iran: a five year study. **Iran Journal of Microbiology**, v. 3, p. 183-188, 2011.

BALTAZAR, L.M. et al. Melanin protects *Paracoccidioides brasiliensis* from the effects of antimicrobial photodynamic inhibition and antifungal drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, pii: AAC.04917-14, 2015.

BATES, D.W. et al. Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin b therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 686-93, 2001.

BICANIC, T.; HARRISON, T.S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin**, v.72, p.99-118, 2004.

BII, C.C. et al. Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. **Mycoses**, v.50, p.25-30, 2007.

BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v.147, p.891-907, 2001.

BOSE, I. et al. Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cellular**, v.2, p. 655-663, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

- BRANDT, M.E. et al. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.1856–1861, 1999.
- BROWN, A.J.P.; HAYNES, K.; QUINN, J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. **Current Opinion of Microbiology**, v.12, p.384–391, 2009.
- BROWN, S.M.; CAMPBELL, L.T.; LODGE, J.K. *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, p.320–325, 2007.
- CANUTO, M.M.; RODERO, F.G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **Lancet Infectious Diseases**, v.2 (9), p.550–563, 2002.
- CASADEVALL, A. et al. Susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis to amphotericin B and fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 1383–1386, 1993.
- CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 139, 1998.
- CAUWENBERGH, G. Cryptococcal meningitis: the place of itraconazole. **Mycoses**, v. 36, p. 221–228, 1993.
- CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Sources of *C. gattii* cryptococcosis. Atlanta: CDC, 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-gattii/causes.html>>. Acesso:31/05/2014.
- CHARLIER, C. et al. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. **American Journal of Pathology**, v. 166, p. 421–432, 2005.
- CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infectious Diseases Clinical of North American**, v.20, p. 507–544, 2006.
- CHEN, S.C. et al. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? **Journal of Infection Diseases**, v. 175, p. 414–420, 1997.
- CHIAPELLO, L.S. et al. *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan induces macrophage apoptosis mediated by nitric oxide in a caspase-independent pathway. **International Immunology**, v.20, p.1527–1541, 2008.
- CLAUDINO, A.L. et al. Mutants with heteroresistance to amphotericin B and fluconazole in *Candida*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 943–951, 2009.
- COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Hindawi Publishing Corporation**, v.2013, p.1–24, 2013.

COUTINHO, G. **Fatores de virulência e resistência a antifúngicos de amostras clínicas e ambientais de *Cryptococcus neoformans***. 126p. Dissertação. (Mestrado em Ciências), Coordenação de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, Brasil, 2006.

COWEN, L.E.; STEINBACH, W.J. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. **Eukaryotic Cellular**, v. 7, p.747–764, 2008.

COX, G.M. et al. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v.68 (2), p. 443-448, 2000.

CRAIG, W. Pharmacodynamics of antimicrobial agents as a basis for determining dosage regimens. **European Journal of Clinical Microbiology Infection Diseases**, v.12, p.S6-S8, 1993.

CROSS, C.E.; BANCROFT, G.J. Ingestion of acapsular *Cryptococcus neoformans* occurs via mannose and betaglucan receptors, resulting in cytokine production and increased phagocytosis of the encapsulated form. **Infection and Immunity**, v.63, p. 2604–2611, 1995.

DEL POETA, M. et al. Synergistic antifungal activities of bafilomycin A(1), fluconazole, and the pneumocandin MK-0991/caspofungin acetate (L-743,873) with calcineurin inhibitors FK506 and L-685,818 against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 739–746, 2000.

DIAMOND, R.D.; BENNETT, J.E. Growth of *Cryptococcus neoformans* within human macrophages *in vitro*. **Infection and Immunity**, v.7,p. 231–236, 1973.

DUIN, D.V. et al. Effects of Voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2014–2020, 2004.

ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.128, p.1642–1644, 1990.

ERNST, E.J.; KLEPSE, M.E.; PFALLER, M.A. Postantifungal Effects of Echinocandin, Azole, and Polyene Antifungal Agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44 (4), p. 1108-1111, 2000.

ESCRIBANO, P. et al. In vitro acquisition of secondary azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates after prolonged exposure to itraconazole: presence of heteroresistant populations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56 (1), p.174-178, 2012.

ESPINEL-INGROFF, A.; et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p. 5898–5906, 2012.

FALAGAS, M.E. et al. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? **Clinical Microbiology and Infection**, v.14 (2), p. 101-104, 2008.

FAN, M.; CURIE, B. P.; GUTELL, R.R. et al. The 16S-like, 5.8S and 23S-like rRNAs of the two varieties of *Cryptococcus neoformans*: sequence, secondary structure, phylogenetic analysis and restriction fragment polymorphisms. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, p.163-180, 1994.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; CASADEVALL, A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. **Microbiology**, v.147, p. 2355-2365, 2001.

FONSECA, F.L. et al. Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. **Infection and Immunity**, v. 78, p.3861–3870, 2010.

FRANZOT, S.P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37 (3), p.838-840, 1999.

GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G.; DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p.3204–3209, 1999.

GEORGI, A. et al. *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis in an immunocompetent person 13 months after exposure. **Infection**, v.37, p.370–373, 2009.

GHANNOUM, M.A.; et al. Sterol composition of *Cryptococcus neoformans* in the presence and absence of fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, p.2029-2033, 1994.

GILES S.S. et al. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 3491–3400, 2009.

GILES, S.S. et al. *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. **Eukaryotic Cellular**, v. 4, p.46–54, 2005b.

GILES, S.S. et al. Cytochrome c peroxidase contributes to the antioxidant defense of *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genetic Biology**, v.42, p.20–29, 2005a.

GILES, S.S. et al. The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. **Eukaryotic Cellular**, v.5, p. 1447–1459, 2006.

GRECHI, J. et al. Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* downregulates the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages. **Journal of Biology Chemistry**, v,286, p.14820–14829, 2011.

GRUSZECKI, W.I. et al. Organization of antibiotic amphotericin B in model lipid membranes. A mini review. **Cellular Molecular Biology Letters**; v.8, p.161–70, 2003.

GUERRA C.R. et al. Terbinafine inhibits *Cryptococcus neoformans* growth and modulates fungal morphology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p.582-590, 2012.

HAGEN, F. et al. Activated dormant *Cryptococcus gattii* infection in a Dutch tourist who visited Vancouver island (Canada): a molecular epidemiological approach. **Medical Mycology**, v.48, p.528–531, 2010.

HARRIS, J, et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. **Clinical Infection Diseases**, v.53, p.1188–1195, 2011.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. **American Journal of Physiology**, v.268, p. 1386–1393. v.1995.

HOANG, L.M.N. et al. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital Sciences Center (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p. 935-940, 2004.

HUERFANO, S.; CASTANEDA, A.; CASTANEDA, E. Experimental infection of almond trees seedlings (*Terminalia catappa*) with an environmental isolate of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.18, p.131–132, 2001.

HULL, C.M.; HEITMAN, J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Genetics**, v.36, p.557-615, 2002.

JARVIS, J.N. et al. Cerebrospinal Fluid Cytokine Profiles Predict Risk of Early Mortality and Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in HIV-Associated Cryptococcal Meningitis. **PLoS Pathogens**, v. 11, p. e1004754, 2015.

JOBINS, S.E.; HILL, C.J.; D'SOUZA-BASSEAL, J.M. et al. Immunoproteomic approach to elucidating the pathogenesis of cryptococcosis Caused by *Cryptococcus gattii*. **Journal of Proteome Research**, v.9, p. 3832–3841, 2010.

JOHNSTON, S.A.; MAY, R.C. *Cryptococcus* interactions with macrophages: evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. **Cellular Microbiology**, v. 15, p.403-411, 2013.

KHAN, A.; et al. Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. **FEMS Yeast Research**, v.11, p.114–122, 2011.

KIDD, S.E. et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Applied Environment Microbiology**, v.73, p.1433–1443, 2007a.

KIDD, S.E. et al. *Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms. British Columbia, Canada. **Emergence Infection Disease**, v.13, p.51–57, 2007b.

KLEPSER, M.E. et al. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41 (6), p. 1392-1395, 1997.

KOBAYASHI, D. et al. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, p. 3113–3117, 2002.

KOZEL, T. R. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology**, v.3 (8), p.295-298, 1995.

KRONSTAD, J.W. et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, p.193-203, 2011.

KWON-CHUNG, K.J. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. **Mycology**, v.68, p.942-946, 1976.

LAMY-FREUND M.T. et al. Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation. **Journal of Antibiotic** (Tokyo), v. 38, p. 753-757, 1985.

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

LOEFFLER, J.; STEVENS, D.A. Antifungal drug resistance. **Clinical Infection Disease**, v.36 (suppl), p.S31-S41, 2003.

MA, H. et al. The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Virulence**, v.106 (31), p. 12980–12985, 2009.

MADIGAN, M.T.; BROCK, T.D. **Brock Biology of Microorganisms**. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 2012.

MANSOUR, M.K.; VYAS, J.M.; LEVITZ, S.M. Dynamic virulence: real-time assessment of intracellular pathogenesis links *Cryptococcus neoformans* phenotype with clinical outcome. **MBio**, v. 27;2(5), pii: e00217-11, 2011.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v.47, p.469–474, 1974.

MARTINEZ, L. R.; GARCIA-RIVERA, J.; CASADEVALL A. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) strains are more susceptible to heat than *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39 (9), p.3365-3367, 2001.

MATOS, C.S. et al. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **European Journal of Clinical Microbiology ; Infectious Diseases**, v. 31, p.1647–1652, 2012.

MAXSON, M.E. et al. The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 180-186, 2007.

MCMULLAN, B.J.; SORRELL T.C; CHEN, S.C. *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. **Future Microbiology**, v. 8, p. 1613-1631, 2013.

MIRZA, S.A.; PHELAN, M.; RIMLAND, D. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992–2000. **Clinical Infection Disease**, v.36, p.789–794, 2003.

MISSALL, T.; PUSATERI, M.; LODGE, J. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v.51, p.1447–1458, 2004.

MISSALL, T.A.; CHERRY-HARRIS, J.F.; LODGE, J.K. Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. **Microbiology**, v. 151, p.2573–2581, 2005.

MONDON, P. et al. Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.1856-1861, 1999.

MORA, D.J. et al. Cytokine profiles at admission can be related to outcome in AIDS patients with cryptococcal meningitis. **PLoS One**, v. 10, p. e0120297, 2015.

MWANZA, J.C. et al. Neuro-ophthalmological disorders in HIV infected subjects with neurological manifestations. **British Journal of Ophthalmology**, v.88, p.1455–1459, 2004.

NARASIPURA, S.D. et al. Characterization of Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 47, p.1681–1694, 2003.

NARASIPURA, S.D.; CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Characterization of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. **Molecular Microbiology**, v.55, p. 1782–1800, 2005.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v.30, p.599-609, 2012.

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

NOONEY, L.; MATTHEWS, R.C.; BURNIE, J.P. Evaluation of Mycograb, amphotericin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checkerboard and time-kill methodologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 51, p. 19-29, 2005.

NOSANCHUK, J.D. et al. Amphotericin B and Fluconazole Affect Cellular Charge, Macrophage Phagocytosis, and Cellular Morphology of *Cryptococcus neoformans* at Subinhibitory Concentrations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 233–239, 1999.

ODOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO Journal**, v. 16, p. 2576-2589.

OKAGAKI, L.H.; NIELSEN, K. Titan cell walls confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. **Eukaryotic Cellular**, v.11, p.820-826, 2012.

OLSZEWSKI, M.A.; ZHANG, Y.; HUFFNAGLE, G.B. Mechanisms of Cryptococcal Virulence and Persistence. **Future Microbiology**, v.5, p.1269-1288, 2010.

ORSI, C.F. et al. The ABC transporter-encoding gene AFR1 affects the resistance of *Cryptococcus neoformans* to microglia-mediated antifungal activity by delaying phagosomal maturation. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p.3012-310, 2009.

PERFECT, J.R.; COX, G.M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug Resistance Update**, v.2, p.259-269, 1999.

PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Research**, v.6, p. 463-468, 2006.

PERFECT, J.R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 Update by the infectious. **Diseases Society of America Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 291-322, 2010.

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

POSTERARO, B. et al. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole. **Molecular Microbiology**, v.47 (2), p.357–371, 2003

REN P. et al. Transcription factor STE12 α has distinct roles in morphogenesis, virulence, and ecological fitness of the primary pathogenic yeast *Cryptococcus gattii*. **Eukaryotic Cellular**, v. 5, p.1065–1080, 2006.

RODERO, L. et al. G484S amino acid substitution in lanosterol 14- α demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, p.3653–3656, 2003.

RUIZ, M.S. **Avaliação do fenômeno de heterorresistência em isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans***. 66p. Dissertação. (Mestrado em Ciências), Coordenação de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, Brasil, 2009.

SAKAGUCHI, N. et al. Ultrastructural study of *Cryptococcus neoformans* by quick-freezing and deep-etching method. **Mycopathologia**, v.121, p.133-41, 1993.

SANGALLI-LEITE F, et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection**, v.13, p. 457–467, 2011.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 20 (9). p. 462-470, 2002.

SANGUINETTI, M. et al. Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the *in vivo* response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 74 (2), p. 1352–1359, 2006.

SANTOS, W.R. et al. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 13-18, 2008.

SANTOS, J.R.A. et al. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, 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. 13, p. e112669, 2014.

SHAPIRO, R.S.; ROBBINS, N.; COWEN, L.E. Regulatory circuitry governing fungal: development, drug, resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, p. 213-267, 2011.

SHI M. et al. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **The Journal of Clinical Investigation**, v.120, p.1683-1693, 2010.

SIAFAKAS, A.R. et al. Cellular wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cellular wall integrity. **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.37508–37514, 2007.

SIDDIQUI, A.A. et al. IFN-gamma at the site of infection determines rate of clearance of infection in cryptococcal meningitis. **Journal of Immunology**, v. 1, p. 1746-1750.

SINGH N. et al. Pulmonary cryptococcosis in solid organ transplant recipients: clinical relevance of serum cryptococcal antigen. **Clinical Infection Disease**, v. 15, p.e12-8, 2008.

SIONOV, E. et al. Heteroresistance to Fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54 (7), p.2804–2815, 2009.

SIONOV, E.; LEE, H.; CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. **PLoS Pathogen**, v. 6, e1000848, 2010.

SIONOV, E.; LEE, H.; 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. 57, p. 5127-5130, 2013.

SMALL, J.M. et al. Strain variation in antiphagocytic activity of capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* serotype A. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 3751-3756, 1989.

SOARES, B. M. et al. *Cryptococcus gattii*: *In vitro* susceptibility to photodynamic inactivation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 357-364, 2011.

SOKOL-ANDERSON, M. et al. Role of cellular defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.32, p.702-705, 1998.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Medical Mycology**, v.39, p.155-168, 2001.

SPITZER, E.D. et al. Persistence of initial infection in recurrent *Cryptococcus neoformans* meningitis. **Lancet**, v.341, p. 595-596, 1993.

SPRINGER, D.J. et al. Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, **Plos one**, v. 5 (6), 1-16, 2010.

STANO, P. et al. App1: an antiphagocytic protein that binds to complement receptors 3 and 2. **The Journal of Immunology**, v.182, p.84–91, 2009.

STEENBERGEN, J.N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes Infection**, v.5, p. 667–675, 2003.

STEENBERGEN, J.N.; SHUMAN, H.A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy Science of the USA**, v.18, p.15245-15250, 2001.

SZABO, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.6, p.662-680, 2007.

TOMAZETT, P.K. et al. Response of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb01 to stressor agents and cellular wall osmoregulators. **Fungal biology**, v. 115, 62-59, 2011.

TUCKER, S.C.; CASADEVALL, A. Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99 (5), p.3165-3170, 2002.

TRILLES, L. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.455-462, 2008.

VANDENBOSCH D. et al. Fungicidal activity of miconazole against *Candida* spp. biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p. 694–700, 2010.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K.J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54 (6), p. 2303–2311, 2010.

VECCHIARELLI, A.; MONARI, C. Capsular Material of *Cryptococcus neoformans*: Virulence and Much More. **Mycopathologia**, v. 173, p.375–386, 2012.

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

VIRA'G, L.; et al. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. **Toxicology Letters**, v. 11, p.113-124, 2003.

VOELZ, K.; LAMMAS, D.A.; MAY, R.C. Cytokine Signaling Regulates the Outcome of Intracellular Macrophage Parasitism by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v.77 (8), p. 3450–3457, 2009.

WAPINSKI, I. et al. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. **Nature**, v. 449, p.54–61, 2007.

WITT, M.D.; et al. Identification of patients with acute AIDS-associated cryptococcal meningitis who can be effectively treated with fluconazole: the role of antifungal susceptibility testing. **Clinical Infection Diseases**, v.22, p.322-328, 1996.

XU, C. et al. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. **Cellular Host Microbe**, v.1, p.263–273, 2007.

YASUOKA, A. et al. Influence of molecular sizes of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide on phagocytosis. **Microbiology and Immunology**, v. 38, p. 851-856, 1994.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biological Procedures Online**, v.6, p. 10-15, 2004.

ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cellular Microbiology**, v.10, p. 2043-2057, 2008.

ZARAGOZA, O. et al. The Capsule of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**, v.68, p.133-216, 2009.

ZARAGOZA, O. et al. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS Pathogens**, v. 6, p.e1000945, 2010.

ZARAGOZA, O. Multiple Disguises for the Same Party: The Concepts of Morphogenesis and Phenotypic Variations in *Cryptococcus neoformans*. **Frontier Microbiology**, v. 6, p.181, 2011.

ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 409-413, 2013.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO (Março/2012 a Junho/2015)

Participação em eventos:

- I Simpósio de Microbiologia da UFMG. 2014.
- V Congresso Brasileiro sobre o Uso Racional de Medicamentos. 2014.
- 12º Congresso de Farmácia e Bioquímica de Minas Gerais. 2013.
- 11º Simpósio de Pesquisa e Iniciação Científica. 2013.
- IX Fórum de Microbiologia. 2013.
- XXI ALAM Congresso Latinoamericano de Microbiologia. 2012.
- XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology. 2012.

Formação complementar:

- **CURSO DE NORMAS, BENEFÍCIOS E REGULAMENTOS DA UFJF**, promovido pela Faculdade de Educação Física e Desportos da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob a coordenação da professora Eliana Lúcia Ferreira, realizado entre os dias 10 de Fevereiro e 21 de agosto de 2014. **Carga horária total de 40 horas. Concluído.**
- **METODOLOGIA DE ELABORAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA**, Turma A - 2014.2 à distância, promovido pela Universidade Federal de Juiz de Fora, realizado entre os dias 01 de setembro e 28 de setembro de 2014. **Carga horária total de 20 horas. Concluído.**
- **ATUALIZAÇÃO NA LÍNGUA PORTUGUESA**, Turma B - 2014.2 à distância, promovido pela Universidade Federal de Juiz de Fora, realizado entre os dias 08 de setembro e 03 de novembro de 2014. **Carga horária total de 50 horas. Concluído.**
- **SEMINÁRIO DE INTEGRAÇÃO 2014**, promovido pela Universidade Federal de Juiz de Fora, realizado entre os dias 12 de novembro e 07 de dezembro de 2014, com atividades presenciais e à distância. **Carga horária de 20 horas. Concluído.**
- **SEMINÁRIO SOBRE O SISTEMA NACIONAL DE AVALIAÇÃO DA EDUCAÇÃO SUPERIOR (SINAES)**, promovido pela Universidade Federal de

Juiz de Fora, realizado no dia 21 de novembro de 2014. **Carga horária de 04 horas. Concluído.**

- **OFICINA USO RACIONAL DE MEDICAMENTOS NA SEGURANÇA DO PACIENTE EM ATEÇÃO PRIMÁRIA: DESAFIOS E CONQUISTAS**, promovido pelo V Congresso Brasileiro sobre o Uso Racional de Medicamentos, realizado no dia 21 de setembro de 2015. **Carga horária de 04 horas. Concluído.**

Resumos publicados em anais de Congressos:

- **FERREIRA, G.F.**; SANTOS, J.R.A.; COSTA, M.C.; HOLANDA, R.A.; FREITAS, G.J.C.; SANTOS, A.R.C.; TAVARES, P.B.; SANTOS, D.A. Heterorresistência ao itraconazol altera a morfologia e aumenta a virulência de *C. gattii*. Em: I Simpósio de Microbiologia da UFMG, Belo Horizonte, 2014.
- KELMANN, R.G.; NASCIMENTO, A.P.; ALESSANDRI, A.L.O.F.; **FERREIRA, G.F.**; VIERA, L.B.; PAULA, P.A.B.; TAVARES, A.A.; ALVES, O.M.R.P.; FREITAS, L.A.; GAEDE, R.P.S. Levantamento de dados autorreferidos relativos à hipertensão arterial e diabetes mellitus na Feira de Saúde do Idoso em Governador Valadares – MG. Em: II Seminário de Nacional de Saúde Coletiva promovido pelo Núcleo de Estudo da Pessoa Idosa da UFJF-GV, Governador Valadares, 2014.
- KELMANN, R.G.; NASCIMENTO, A.P.; ALESSANDRI, A.L.O.F.; **FERREIRA, G.F.**; VIERA, L.B.; PAULA, P.A.B.; FREITAS, L.A.; GAEDE, R.P.S. Feira de Saúde do Idoso em Governador Valadares – MG: Atuação das interfaces farmácia e departamento básico de saúde. Em: II Seminário de Nacional de Saúde Coletiva promovido pelo Núcleo de Estudo da Pessoa Idosa da UFJF-GV, Governador Valadares, 2014.
- **FERREIRA, G. F.** ; MONTEIRO, A. S. ; SANTOS, A. R. C. ; SANTOS, D. A. Avaliação de mecanismos de heterorresistência do *C. gattii* ao itraconazol. Em: 11 Simpósio de Pesquisa e Iniciação Científica da Univale, Governador Valadares, 2013.
- **FERREIRA, G. F.** ; GONCALVES, L. P. ; BALTAZAR, L.M. ; SANTOS, J. R. A. ; RAMOS, L. H. ; FREITAS, G. J. C. ; Resende-Stoianoff, M.A. ; Santos, D.A. . Avaliação dos mecanismos de heterorresistência do *Cryptococcus gattii* ao itraconazol.

Em: IX Fórum de Microbiologia - Professor Romain Rolland Golgher, Belo Horizonte, 2013.

- **FERREIRA, G. F.**; SANTOS, J. R. A. ; COSTA, M. C. ; Santos, D.A. . Heterorresistência de *Cryptococcus gattii* ao fluconazol. Em: 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Natal, 2013..
- **FERREIRA, G. F.** ; BALTAZAR, L.M. ; SANTOS, J.R.A. ; GOUVEA, L. F. ; CARNEIRO, H. C. S. ; MONTEIRO, A. S. ; FRAGA, Lúcia Alves de Oliveira ; SANTOS, D. A. . Envolvimento do estresse oxidativo na ação do itraconazol frente ao fungo *Cryptococcus gattii*. Em: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.
- **FERREIRA, G. F.** ; SILVA, T.S. TEIXEIRA-CARVALHO, A. ; MARTINS FILHO, O. ; MORENO, E. ; MALAQUIAS, L.C.C.; FRAGA, L.A.O . Impact of SEA in chronic osteomyelitis caused by *S. aureus*: chemokine secretion. Em: XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology, Campos do Jordão, 2012.

Artigos publicados:

- **Ferreira, G. F.** ; Baltazar, L.M. ; Santos, J. R. A. ; Monteiro, A. S. ; Fraga, L. A. O. ; Resende-Stoianoff, M. A. ; Santos, D.A. . 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, p. 1-11, 2013.
- Santos, J. R. A. ; Holanda, R.A. ; Frases, S. ; Bravim, M. ; Araujo, G. S. ; Santos, P. C.; Costa, M. C. ; Ribeiro, M. J. A. ; **Ferreira, G. F.** ; Baltazar, L.M. ; Miranda, A. S. ; Oliveira, D. B. ; Santos, C. M. A. ; Fontes, A. C. L. ; Gouveia, L.F. ; Resende-Stoianoff, M.A. ; Abrahao, J. S. ; Teixeira, A. L. ; Paixao, T. A. ; Souza, D. G. ; Santos, D.A. . Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine cryptococcosis. **Plos One**, v. 9, p. p. e112669, 2014.

- Souza, F. B. ; Souza, M. M. F. ; Damasceno, P. V. D. ; Barros, M. C. G. ; oiola, C. O. L. ; Monteiro, A. S. ; **Ferreira, G. F.** Avaliação *in vitro* das atividades antimicrobianas de extratos etanólicos de *Arnica montana L.*, *Bauhinia forficata* e *Plantago major* sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 18-28, 2014.

Artigo aceito para publicação:

- **Ferreira, G.F.**; Santos, J.R.A.; Costa, M.C.; Holanda, R.A.; Denadai, A.M.L.; Freitas, G.J.C.; Santos, A.R.C.; Tavares, P.B.; Paixão, T.A.; Santos, D.S. Heteroresistance to itraconazole alters the morphology and increases the virulence of *Cryptococcus gattii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. AAC00466-15R1. doi:10.1128/AAC.00466-15

Projetos de Pesquisa submetidos a Agências de Fomento

- Colaboração no Projeto: “Avaliação das atividades biológicas antimicrobiana e modulação da resposta imunológica por derivados do ácido ursólico” submetido pelo Edital Fapemig Edital Universal. Coordenadora Profa. Dra Sandra Bertelli Ribeiro de Castro (UFJF); Colaboradores: Profa. Ms. Gabriella Freitas Ferreira (UFJF), Profa. Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga (UFJF), Profa. Dra. Alda Maria Soares Silveira (UFJF), Profa. Dra. Ydia Mariele Valadares (UFJF), Prof. Dr. Caio César de Souza Alves (IFMG).
- Colaboração no Projeto: “Estudo químico das folhas de *Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh* biomonitorado pela atividade antifúngica *in vitro* frente a *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans*” submetido pelo Edital Fapemig Edital Universal. Coordenadora Profa. Dra Ivanildes Vasconcelos Rodrigues (UFJF); Colaboradores: Profa. Ms. Gabriella Freitas Ferreira (UFJF), Profa. Dra. Karen Luise Lang (UFJF), Prof. Dr. Daniel Assis Santos (UFMG), Profa. Dra. Ydia Mariele Valadares (UFJF).
- Colaboração no Projeto: “Avaliação das atividades anti-hipuricêmica, anti-inflamatória e antimicrobiana dos diterpenos do café: cafestol e caveol”

submetido pelo Edital MCTI/CNPq/Universal 14/2014 - Faixa A. Coordenadora Profa. Dra. Luciana Souza Guzzo Costa (UFJF); Colaboradores: Profa. Ms. Gabriella Freitas Ferreira Corrêa (UFJF), Profa. Dra. Dênia Antunes Saúde Guimarães (UFOP), Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte (UFMG), Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero (UFMG), Profa. Dra. Andrea de Souza Monteiro (Universidade Ceuma). Aprovado.

- Colaboração no Projeto: “Detecção de genes relacionados às enzimas β - lactamases em amostras de hemocultura e em isolados bacterianos empregando a técnica de amplificação isotérmica de DNA (LAMP)” submetido ao Edital Universal número 01/2014 – UNIVERSAL/FAPEMA. Coordenadora Profa. Dra. Andrea de Souza Monteiro (Universidade Ceuma). Colaboradores: Profa. Ms. Gabriella Freitas Ferreira Corrêa (UFJF), Profa. Dra. Maria Rosa Bomfim (Universidade Ceuma), Ms. Vitor Santos (UFMG), Dr. Nilton Barnabé Rodrigues (CPqRR), Prof. Dr. Sirlei Garcia Marques (Universidade Ceuma). Aprovado.

Outras atividades:

- Professora da Universidade Federal de Juiz de Fora- Campus Governador Valadares;
- Integrante do Grupo de Pesquisa do CNPq: DinPar – Doenças Infecto-Parasitárias. Líderes: Prof. Dr. Fábio Alessandro Pieri (UFJF), Pauline Martins Leite (UFJF).

ANEXOS

PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA

De: "CEUA" <ceua@prpq.ufmg.br>

Para: das@ufmg.br

Enviadas: Sexta-feira, 1 de Fevereiro de 2013 15:29:02

Assunto: Novo Protocolo Registrado

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Daniel de Assis Santos,

Esta é uma mensagem automática de notificação de recebimento do seu projeto intitulado

"Avaliação de mecanismos envolvidos na heterorresistência de *Cryptococcus gattii* ao itraconazol" sob o número de protocolo 19 / 2013 para ser avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG) dentro do prazo ESTIMADO de 15 dias.

O(a) senhor(a) receberá neste e-mail a decisão do seu processo e também poderá, a qualquer momento, entrar em nosso sistema e analisar o status do seu protocolo.

Belo Horizonte, 01/02/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br



Universidade Federal de Minas Gerais
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

OF. CETEA-003/14

Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2014.

Sr.
Prof. Daniel de Assis Santos
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
Nesta

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG informa que na reunião ordinária do dia 17/02/2014, em face da solicitação apresentada por V. Sa., aprovou o pedido de adendo ao projeto de pesquisa protocolado sob o número 19/2013, título " *Avaliação de mecanismos envolvidos na heterorresistência de Cryptococcus gattii ao itraconazol* " para a inclusão de 48 camundongos machos C57BL/J6 para:

1- acrescentar o experimento curva de sobrevivência para verificar a influência do fenômeno da heterorresistência do *Cryptococcus gattii* ao Itraconazol.

Sendo o que nos apresenta no momento, ficamos à sua inteira disposição para outros esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente

Profa. Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenadora da CEUA/UFMG

Protocolo 200 / 2015 - Avaliação de mecanismos envolvidos na heterorresistência de *Cryptococcus gattii* ao itraconazol in vivo