

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

Queila da Silva Rosa

**Alterações morfofisiológicas envolvidos na adaptação de
Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* à anfotericina B**

Governador Valadares – MG

2020

Queila da Silva Rosa

**Alterações morfofisiológicas envolvidos na adaptação de
Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* à anfotericina B**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Gabriella Freitas Ferreira

Governador Valadares – MG
2020

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva Rosa, Queila.

Alterações morfofisiológicas envolvidos na adaptação de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* à anfotericina B / Queila Silva Rosa. -- 2020.

89 p.

Orientador: Gabriella Freitas Ferreira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2020.

1. Adaptação. 2. Evolução Adaptativa. 3. Anfotericina B. I. Freitas Ferreira, Gabriella, orient. II. Título.

Queila da Silva Rosa Bragança

**Alterações morfofisiológicas envolvidas na adaptação de *Cryptococcus neoformans* e
Cryptococcus gattii à anfotericina B**

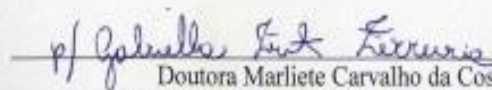
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora - *campus* Governador Valadares como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 18 de setembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Doutora Gabriella Freitas Ferreira - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – *campus* Governador Valadares

p/ 

Doutora Marliete Carvalho da Costa
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

p/ 

Doutor Felipe Alves de Almeida
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – *campus* Governador Valadares

AGRADECIMENTOS

Chegar a este ponto enche meu coração de alegria e sinto um alívio em dizer: Consegui chegar até aqui! Muito almejo conquistar, mas esta conquista, me deixa imensamente feliz e aumenta meu desejo de continuar. Por isso, muito tenho a agradecer.

Primeiramente a Deus, pela conquista, pela força para continuar lutando, mesmo quando quase tudo parecia perdido.

À minha família, pela paciência, amor, incentivo e apoio desde o início da minha caminhada.

À Universidade Federal de Juiz de Fora/GV e ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular, que me proporcionaram essa oportunidade.

Aos coordenadores, professores, técnicos e colegas que possibilitaram um bom andamento e conclusão desta dissertação.

À minha Orientadora Dra. Gabriella, em especial, pelo apoio, paciência e conhecimento adquirido neste percurso. Pelo incentivo em sempre buscar o melhor e por todo apoio pessoal. Este período junto a você, me proporcionou grandes aprendizados profissionais, e pessoais, que me fizeram crescer e me tornar uma pessoa melhor. Muito obrigada, foi de grande valia.

Ao Dr. Felipe Alves e Dra. Marliete Carvalho pelo aceite em participar da banca de avaliação, por toda dedicação e auxílio na melhoria deste trabalho.

Aos meus colegas do laboratório multiusuários de Microbiologia/UFJF, que se tornaram amigos e sempre fizeram deste ambiente um local harmônico e amigável. Obrigada por toda ajuda, compreensão e força nos momentos mais difíceis.

Ao professor Dr. Daniel Assis, pelo apoio, disponibilidade e abertura do laboratório de Micologia/UFMG, o que possibilitou a realização de muitos experimentos. E aos colegas do laboratório de Micologia pela ajuda em realizar os experimentos, pelo acolhimento e apoio.

Aos meus amigos, que apoiaram e torceram por mim.

A todos que direta ou indiretamente participaram da minha formação.

Aos que conheci nesse período, que de alguma forma trouxeram leveza, aconchego, felicidade e amor a minha vida. A todos vocês MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O gênero *Cryptococcus* é composto por leveduras capsuladas com capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros, como os mamíferos. Neste gênero, destacam-se como agentes etiológicos da criptococose humana *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A anfotericina B (AmB) e os azólicos são os fármacos de primeira escolha na terapia medicamentosa. Este tratamento farmacológico normalmente se prolonga por mais de seis meses, sendo frequente a recorrência mesmo após terapia antifúngica. Há uma lacuna na literatura de como as células criptocócicas respondem a exposição contínua à AmB e quais estratégias *Cryptococcus* utilizam para se adaptarem frente a este estresse. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações morfofisiológicas envolvidas na adaptação de *C. neoformans* e *C. gattii* à AmB. Foram realizados ensaios para: avaliar a suscetibilidade de linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* à AmB; expor as linhagens a concentrações crescentes de AmB e obter clones expostos/adaptados; avaliar curva de morte; verificar o perfil de crescimento; analisar se a adaptação à AmB altera a morfometria, a produção de espécies reativas (ERs), a sobrevivência intracelular a macrófagos, a interação entre o sequestrador de peroxinitrito e inibidor de superóxido dismutase, a peroxidação lipídica e o potencial zeta. Assim, foi observado que duas linhagens de *C. neoformans* e cinco de *C. gattii* conseguiram crescer em concentrações superiores a concentração inibitória mínima (CIM) inicial, sendo estas classificadas como adaptadas. Os clones resultantes do processo de evolução adaptativa não apresentaram alteração na susceptibilidade à AmB no teste de microdiluição em caldo, exceto a linhagem de *C. neoformans* ATCC WM148, e em ágar após passagens sem a presença da droga. Na curva de morte e na curva de crescimento não foi observado padrão entre as linhagens. Os clones adaptados apresentaram redução da espessura da cápsula e redução do diâmetro celular, exceto a linhagem *C. neoformans* ATCC WM626, bem como produziram menor quantidade de ERs na presença da AmB. Apresentou aumento do índice fagocítico após 24 h de fagocitose, redução da proliferação intracelular para *C. neoformans* ATCC WM148, aumento da proliferação celular para as linhagens de *C. gattii* e aumento do estresse oxidativo, exceto para *C. neoformans* ATCC WM626. Na interação com sequestrado de peroxinitrito e inibidor de SOD a interação foi

indiferente entre eles. A linhagem de *C. neoformans* ATCC WM626 apresentou aumento da peroxidação lipídica quando tratada com CIM de H₂O₂. De maneira geral, as linhagens apresentaram redução da magnitude elétrica negativa após adaptação à AmB. Estes resultados fornecerão subsídios para o preenchimento de lacunas sobre o entendimento da exposição/adaptação de *C. neoformans* e *C. gattii* à AmB, assim como as alterações fenotípicas ocorridas nas células que contribuíram para este fenômeno.

Palavras chave: Adaptação. Evolução adaptativa. *Cryptococcus*.

SUMMARY

The *Cryptococcus* genus is composed of capsulated yeasts capable of infecting a variety of hosts, such as mammals. In this genus, they stand out as the etiological agents of human cryptococcosis *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Amphotericin B (AmB) and azoles are the drugs of choice in drug therapy. This pharmacological treatment usually lasts for more than six months, with recurrence being frequent even after antifungal therapy. There is a gap in the literature on how cryptococcal cells respond to continuous exposure to AmB and what strategies *Cryptococcus* use to adapt to this stress. Thus, the aim of this study was to evaluate the morphophysiological changes involved in the adaptation of *C. neoformans* and *C. gattii* to AmB. Tests were carried out to: evaluate the susceptibility of *C. neoformans* and *C. gattii* strains to AmB; expose strains to increasing concentrations of AmB and obtain exposed/adapted clones; evaluate death curve; check the growth profile; to analyze whether adaptation to AmB changes morphometry, the production of reactive species (ERs), intracellular survival to macrophages, the interaction between peroxynitrite scavenger and superoxide dismutase inhibitor, lipid peroxidation and zeta potential. Thus, it was observed that two strains of *C. neoformans* and five of *C. gattii* managed to grow in concentrations above the initial minimum inhibitory concentration (MIC), which were classified as adapted. The clones resulting from the adaptive evolution process did not change in AmB susceptibility in the broth microdilution test, except for the *C. neoformans* ATCC WM148 strain, and in agar after passing without the drug. In the death curve and the growth curve, no pattern was observed between the strains. The adapted clones showed a reduction in the capsule thickness and a reduction in cell diameter, except for the *C. neoformans* ATCC WM626 strain, as well as producing a lower amount of ERs in the presence of AmB. It showed an increase in the phagocytic index after 24 h of phagocytosis, a reduction in intracellular proliferation for *C. neoformans* ATCC WM148, an increase in cell proliferation for *C. gattii* strains and an increase in oxidative stress, except for *C. neoformans* ATCC WM626. In the interaction with peroxynitrite sequestered and SOD inhibitor, the interaction was indifferent between them. The *C. neoformans* ATCC WM626 strain showed an increase in lipid peroxidation when treated with H₂O₂ MIC. In general, the strains showed a reduction in the negative electrical

magnitude after adaptation to AmB. These results will provide subsidies to fill in gaps on the understanding of the exposure/adaptation of *C. neoformans* and *C. gattii* to AmB, as well as the phenotypic changes that occurred in the cells that contributed to this phenomenon.

Keywords: Adaptation. Adaptive evolution. *Cryptococcus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Incidência global de meningite criptocócica em 2014	17
Figura 2 - Resposta imune à infecção por <i>Cryptococcus</i>	20
Figura 3 - Estabelecimento e disseminação da infecção no hospedeiro.	22
Figura 4 - Linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	52
Figura 5 - Curva de morte das linhagens selvagens e seus clones adaptados à AmB de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	54
Figura 6 - Curvas de Crescimento de Linhagens de <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Cryptococcus gattii</i> Selvagens e Adaptadas à Anfotericina B.	55
Figura 7 - Curvas de crescimento das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	57
Figura 8 - Produção de espécies reativas de oxigênio por linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> na presença ou ausência de AmB.....	60
Figura 9 - Peroxidação lipídica de linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> tratadas ou não com AmB e H ₂ O ₂	62
Figura 10 - Teste de interação da AmB com o sequestrador de peroxinitrito e inibidor de superóxido dismutase em linhagens selvagens e adaptadas à AmB de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	65
Figura 11 - Índice de fagocitose das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	67
Figura 12 - Indução da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em macrófagos por linhagens selvagens e seus clones adaptados ÀmB de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> em 3 e 24 h de fagocitose	68
Figura 13 - Índice de proliferação das linhagens selvagens e seus clones adaptados à AmB de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> após 24 h de fagocitose	70
Figura 14 - Análise de potencial zeta de células selvagens e adaptadas à AmB de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Concentração inibitória mínima das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptadas à anfotericina B de *C. neoformans* e *C. gattii*48
- Tabela 2 - Morfometria das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*50
- Tabela 3 - Área sob a curva de crescimento das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii*...56
- Tabela 4 - CIM de peróxido de hidrogênio para as linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii*...61
- Tabela 5 - Índice de concentração inibitória fracionada da interação entre AmB e sequestrador de peroxinitrito e inibidor de superóxido dismutase.....64

LISTA DE ABREVIATURAS ESIGLAS

μm	Micrômetros
μg	Microgramas
μL	Microlitros
5-FC	Flucitocina
AmB	Anfotericina B
App1	Proteína antifagocítica única
ASC	Área sobre a curva
ASD	Ágar sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHT	Butilhidroxitolueno
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CMCE	Concentração Máxima de Crescimento frente à exposição de AmB
CO ₂	Dióxido de carbono
CR	Receptores de complemento
DCs	Células dendríticas (do inglês <i>dendrit cells</i>)
DCFH-DA	2,7-diclorofluoresceína diacetato
DETC	diethyldithiocarbamate
DHR 123	Dihydrorhodamine 123
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FeTPPS	5,10,15,20-tetraquis (4'-sulfonatofenil) porfirinato de ferro III
<i>g</i>	Força <i>g</i>
GalXM	Galactoxilomanano
GXM	Glicuronoxilomanano
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN γ	Interferon- γ
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
IL	Interleucina
IPR	Índice de proliferação intracelular
IRIS	Síndrome Inflamatória de Reconstituição do Sistema Imune
kg	Quilograma
M1 e 2	Macrófagos via ativação clássica
M-CSF	<i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
mg	Miligramas
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
Min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MOPS	3-[N-morfolino]propano-ácido sulfônico
ND	Não determinado
NF- κ B	Fator nuclear κ B
nm	Nanômetro
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão salina fosfato
PRN	Peroxinitrito
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RPMI	1640 - Meio em caldo Roswell Park Memorial Institute
S/V	Razão superfície sobre volume celular
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
sub-CIM	Concentração subinibitória de CIM
SUS	Sistema único de saúde
TBAR	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Luz ultravioleta
VO	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	ECOLOGIA E PROCESSO DE DISSEMINAÇÃO	14
1.2	EPIDEMIOLOGIA	16
1.3	PROCESSO DE INFECÇÃO E RESPOSTA IMUNE.....	18
1.4	FORMAS CLÍNICAS.....	23
1.5	FATORES DE VIRULÊNCIA	24
1.6	TRATAMENTO MEDICAMENTOSO	27
1.6.1	Agentes Antifúngicos	28
1.6.2	Corticoesteróides	30
1.7	RESISTÊNCIA E OUTROS FENÔMENOS DE ADAPTAÇÃO AOS ANTIFÚNGICOS.....	30
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	ESPECÍFICOS.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	36
4.2	LINHAGENS E DESENHO EXPERIMENTAL	36
4.3	DETERMINAÇÃO DA CIM <i>IN VITRO</i> À ANFOTERICINA B POR MICRODILUIÇÃO.....	37
4.4	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i> À ANFOTERICINA B EM ÁGAR	38
4.5	EVOLUÇÃO ADAPTATIVA À ANFOTERICINA B	38
4.6	VISUALIZAÇÃO DO TAMANHO DA CÉLULA E CÁPSULA	39
4.7	CURVA DE MORTE	40
4.8	CURVA DE CRESCIMENTO.....	40
4.9	MENSURAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS DESAFIO COM ANFOTERICINA B	41
4.10	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	41
4.11	TESTE DE INTERAÇÃO DA AMB COM SEQUESTRADOR DE PEROXINITRITO E COM INIBIDOR DE SUPERÓXIDO DISMUTASE <i>IN</i> <i>VITRO</i>	42

4.12	ENSAIO DE FAGOCITOSE.....	43
4.12.1	Obtenção e Diferenciação das Células Precursoras de Macrófagos.....	43
4.12.2	Ensaio de Fagocitose.....	44
4.12.3	Quantificação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Peroxinitrito no Ensaio de Fagocitose	44
4.12.4	Proliferação Intracelular.....	45
4.12.5	Proliferação Celular.....	45
4.13	MENSURAÇÃO DO POTENZIAL ZETA.....	46
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5	RESULTADOS.....	47
5.1	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i> À ANFOTERICINA B.....	47
5.2	MORFOMETRIA.....	49
5.3	CURVA DE MORTE	53
5.4	CURVA DE CRESCIMENTO.....	55
5.5	MENSURAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS DESAFIO COM ANFOTERICINA B	59
5.6	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	61
5.7	TESTE DE INTERAÇÃO DA AMB COM SEQUESTRADOR DE PEROXINITRITO E COM INIBIDOR DE SUPERÓXIDO DISMUTASE <i>IN VITRO</i>	63
5.8	ENSAIO DE FAGOCITOSE.....	66
5.8.1	Quantificação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio e Peroxinitrito no Ensaio de Fagocitose	68
5.8.2	Proliferação Celular.....	69
5.9	ANÁLISE DE POTENCIAL ZETA	71
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÃO.....	80
8	REFERÊNCIAS.....	81
9	ANEXOS	87
	ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	87

1 INTRODUÇÃO

Cryptococcus é um importante patógeno humano que infecta principalmente pacientes imunocomprometidos pela infecção causada pelo HIV ou pelo uso de quimioterápicos em decorrência de câncer ou transplantes (CAVALHEIRO et al. 2018), uso de corticoesteróides, anticorpos monoclonais e outros (GUARANA; VIDAL; NUCCI, 2018). No entanto, indivíduos imunocompetentes também podem ser infectados e desenvolver quadro clínico grave (GARELNABI; MAY, 2018).

O gênero *Cryptococcus* é composto por leveduras capsuladas, da classe dos *Basidiomycetes*. Para este gênero, foram descritas aproximadamente 70 espécies, com maior destaque para *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, os quais são os principais agentes etiológicos da criptococose (KWON-CHUNG et al. 2014).

Os principais causadores da criptococose são *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, diferem entre si em sorotipos, morfologia, etiologia, ecologia e epidemiologia (KWON-CHUNG et al. 2014). *Cryptococcus neoformans* apresenta os sorotipos A, D e AD e tipos moleculares VN III. *Cryptococcus gattii* apresenta os sorotipos B e C, ambos com tipos moleculares VG I, VG II, VG III, VG IV (MAZIARZ; PERFECT, 2016; ACHESON et al. 2018).

Normalmente, *C. neoformans* apresentam células com formas globosas, já *C. gattii* apresentam células desde globosas e oblongas a células elípticas. Quanto a morfologia dos teleomorfos, os de *C. neoformans* são basidiósporos oblongos a elípticos com parede rugosa e *C. gattii* produzem basidiósporos na forma bacilar com paredes externas. Além disso, estas duas espécies podem ser diferenciadas pelas fontes de carbonos e nitrogênio utilizadas (KWON-CHUNG et al. 2014).

1.1 ECOLOGIA E PROCESSO DE DISSEMINAÇÃO

No meio ambiente, as espécies de *Cryptococcus* são bem distribuídas em diferentes nichos ecológicos (MAY et al. 2016; KWON-CHUNG et al. 2014). *Cryptococcus neoformans* é uma levedura cosmopolita, com distribuição global, podendo ser isolada em diferentes materiais, principalmente em excreções de

pombos (OLIVEIRA; TREVIJANO-CONTADOR; GARCIA-RODAS, 2019). Essa associação contribui para um aumento considerável na infecção das grandes massas de populações urbanas (MAY et al. 2016). O isolamento de *C. neoformans* já foi realizado em mais de 36 gêneros arbóreos e têm aumentado em várias partes do mundo, sendo principalmente encontrado em cascas, cavidades e em madeiras em decomposição (KWON-CHUNG et al. 2014).

Alguns relatórios publicados descreveram casos autóctones de infecções humanas e animais em áreas consideradas não suspeitas, evidenciando a distribuição global de criptococose por *C. gattii*. No entanto, também há relatos de infecções por *C. gattii* relacionadas a viagens de moradores de áreas consideradas livres desse patógeno (CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011).

Anteriormente *C. gattii* era considerado fungos de regiões tropicais e subtropicais. Porém, em 1999, esta espécie foi identificada na ilha de Vancouver, British Columbia, indicando um nicho ecológico maior que o anteriormente conhecido. Sua ocorrência no Canadá tem sido associada as variadas árvores nativas, o que facilita o estabelecimento e proliferação neste ambiente temperado (ACHESON et al. 2018).

Há indicativos de que células de *C. gattii* podem ser encontradas em plantas, solo, ar e água. Animais e seres humanos que entram em contato com este patógeno podem permanecer assintomáticos, mas um pequeno número pode desenvolver uma grave infecção nos pulmões e cérebro (CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011).

Cryptococcus podem utilizar plantas como um reservatório, apresentando a capacidade de crescer, se multiplicar e produzir propágulos infecciosos. Esta associação é importante para manutenção de sua diversidade genética e fatores de virulência, que são fundamentais para infecção de hospedeiros animais e humanos (SPRINGER; MOHAN; HEITMAN, 2017).

Hospedeiros alternativos como amebas de vida livre e nematóides do solo podem ter um papel importante na distribuição e virulência de diferentes linhagens criptocócicas. *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* podem sobreviver, replicar nestes hospedeiros e, conseqüentemente disseminar estas leveduras (MAY et al. 2016). A interação de *Cryptococcus* com amebas, por exemplo, pode desencadear o

surgimento de mecanismos de defesa contra a fagocitose por fagócitos humanos (MALIEHE et al. 2020).

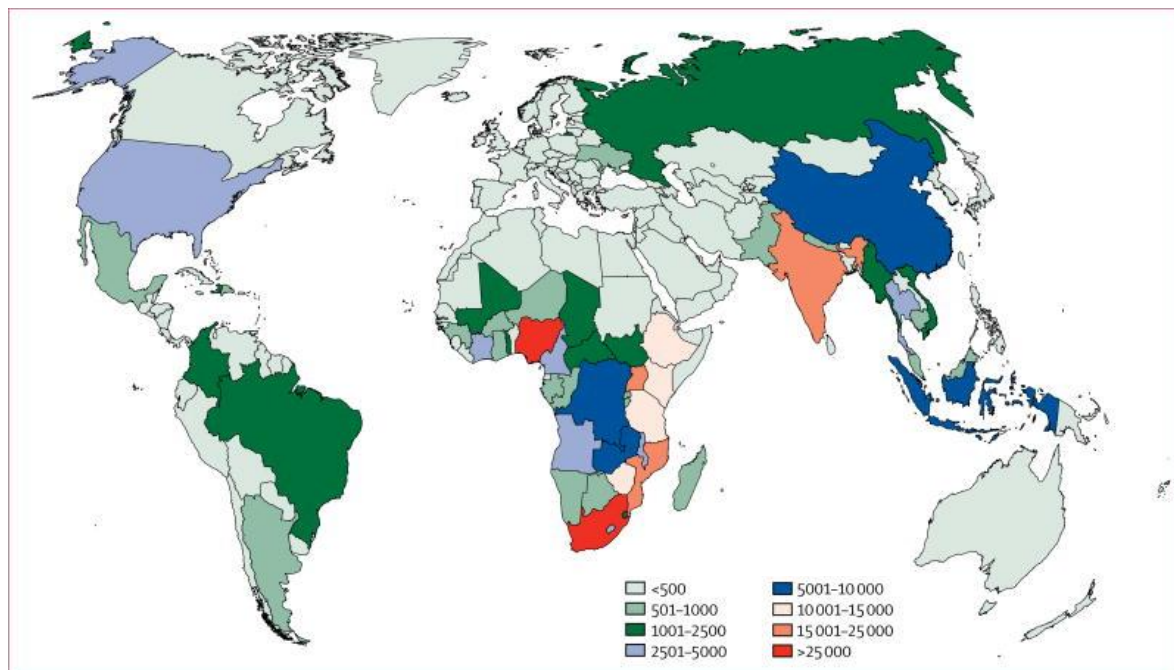
1.2 EPIDEMIOLOGIA

A meningite criptocócica foi estimada com uma incidência global de 220 mil casos por ano, com maior risco para os pacientes imunocomprometidos. Em 2014, 15% das mortes de pacientes HIV positivos foram decorrentes da meningite criptocócica. Em países desenvolvidos e em desenvolvimento, mesmo com as terapias atuais, a incidência de mortalidade ainda é alta. A mortalidade por meningite criptocócica em 2014 em países de baixa renda foi de 70%, nos países de renda média foi de 40%, de 20 a 30% na Europa, e 20% na América do Norte (MOURAD; PERFECT, 2018).

A maioria dos casos relatados de criptococose são em indivíduos jovens do sexo masculino HIV positivo, porém entre indivíduos saudáveis, a mortalidade é maior também entre os homens (FIRACATE et al. 2018). Guess et al. (2019) em seu estudo observa diferenças biológicas entre a resposta imune masculina e feminina em infecção por *C. neoformans*. Foi observado que os homens apresentaram um déficit inerente na resposta mediada por células T, o que pode contribuir para um maior número de óbitos entre os homens. Corroborando com os dados, Costa et al. (2020), demonstra que em infecção por *C. gattii*, o 17- β -estradiol coordena positivamente a resposta imune em camundongos fêmeas, assim a criptococose pode ser influenciada pelo sexo.

Alguns estudos sugerem que na América Latina mais de cinco mil indivíduos ao ano são acometidos por meningite criptocócica, com cerca de 2400 mortes anuais (FIRACATIVE et al. 2018). A figura 1 mostra a incidência global de casos de meningite criptocócica no ano de 2014, que segundo Rajasingham et al. (2018), foi de 223.100 casos, com 73% destes casos ocorrendo na África Subsaariana.

Figura 1 – Incidência global de meningite criptocócica em 2014



Fonte: Modificado de Rajasingham et al. (2018).

Firacate et al. (2018) em seu estudo apontou que o número de casos totais no Brasil entre 1972 e 2014 foi de 1.747, com destaque para o Rio de Janeiro com ocorrência de 8346 casos, representando quase 50% dos casos. Em todas as regiões brasileiras, a criptococose é comumente causada por *C. neoformans*. Já *C. gattii* tem uma tendência geográfica e macrorregional Norte e Sul do país. Na macrorregião Nordeste, nos estados do Amazonas, Roraima, Pernambuco, Piauí e Bahia sua ocorrência é endêmica. Na macrorregião Sudeste, nos estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul as infecções por *C. gattii* são esporádicas (TRILLES et al. 2008).

No Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, que é considerado referência em doenças infecciosas, foi realizado um estudo por consultas aos registros de pacientes com diagnóstico de criptococose no período de janeiro de 1995 a dezembro de 2005, foram identificados 123 casos de criptococose. Em 77 casos foi possível identificar o agente etiológico: 69 casos (89,6%) foi devido a *C. neoformans* e oito casos (10,4%) devido a *C. gattii* (LINDENBERG et al. 2008).

Outro estudo em que se analisou a ocorrência de criptococose no Brasil foi o realizado por Lomes et al. (2016), em que foi conduzida uma revisão retrospectiva no período de janeiro de 2007 a dezembro de 2014, no Hospital Emílio Ribas,

hospital público terciário considerado centro de referência em doenças infecciosas na cidade de São Paulo. Neste estudo foram identificados 29 pacientes com diagnóstico confirmado para criptococose, que não eram HIV positivos e transplantados. Destes casos identificados, 11 foram classificados seus agentes causadores, sendo quatro casos (36,4%) classificados como causados por *C. neoformans* e sete casos (63,6%) por *C. gattii*.

1.3 PROCESSO DE INFECÇÃO E RESPOSTA IMUNE

Fungos ambientais de maneira geral desencadeiam uma resposta pró-inflamatória no hospedeiro humano. Porém, células criptococócicas parecem ser imunologicamente inertes, estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* em baixos níveis. Assim, esses patógenos podem modular a resposta imune gerada pelo hospedeiro com o objetivo de atenuar a inflamação, evitar sua morte por células fagocíticas e, conseqüentemente, se disseminar no SNC (MAY et al. 2016).

O processo de infecção é semelhante para *C. neoformans* e *C. gattii*, sendo o número maior de dados da literatura para *C. neoformans*. No hospedeiro durante a resposta inflamatória de *C. neoformans*, são recrutadas células como neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos (células T CD4+ e CD8+, células B e células natural *killer*). Dentre essas células, os macrófagos ativados, neutrófilos e os linfócitos, são capazes de promover a morte das células fúngicas ou inibir seu crescimento *in vitro* (GARRO et al. 2011).

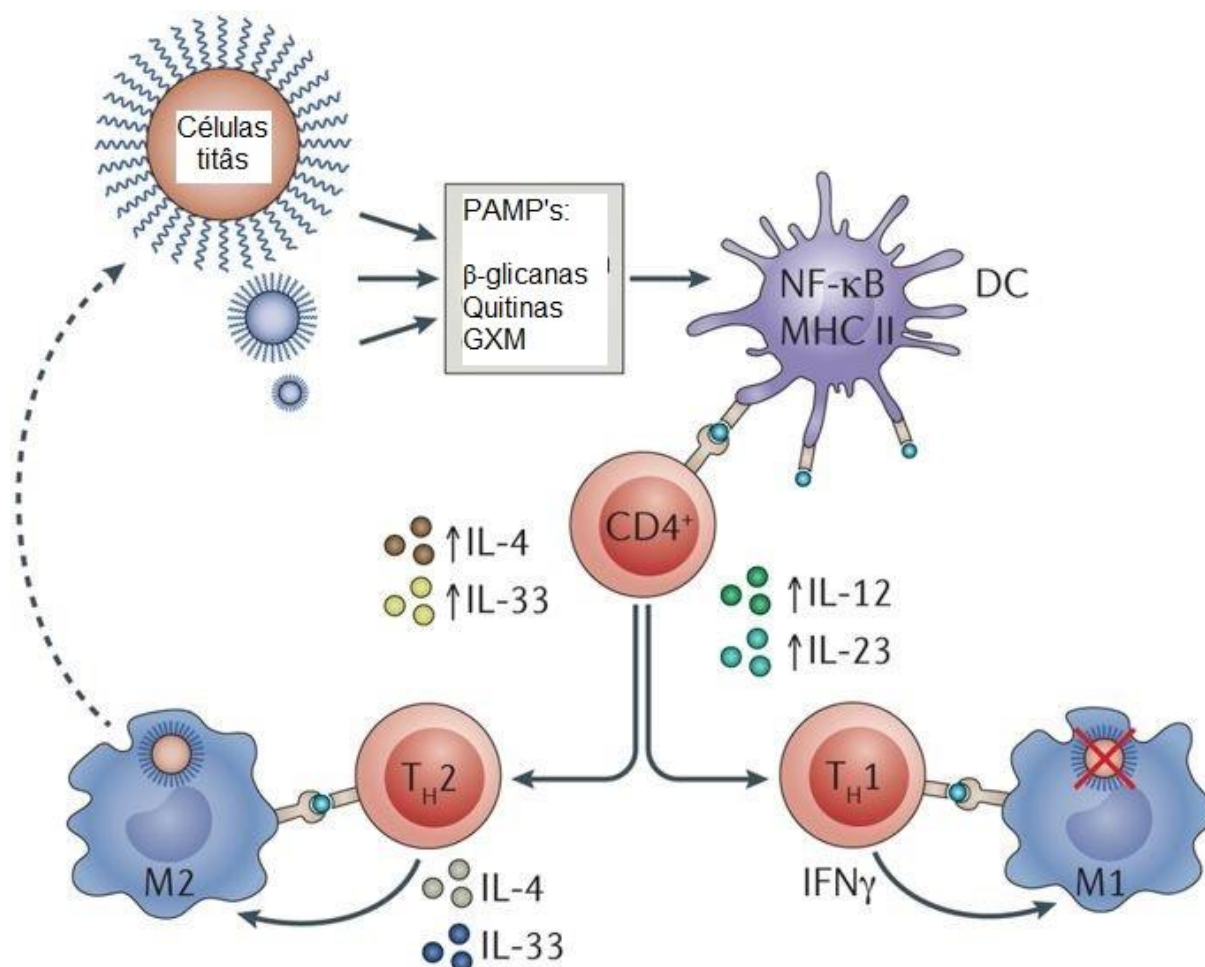
Os fagócitos são as principais células efetoras da imunidade contra patógenos fúngicos, e quando essas respostas fagocíticas estão comprometidas, torna-se um fator de risco importante para o desenvolvimento de infecções graves (ERWIG; NEIL; GOW, 2016).

Desse modo, a criptococose inicia após a inalação das células de leveduras desidratadas ou esporos dispersos no meio ambiente. Estas leveduras nos espaços alveolares, encontram primariamente os macrófagos e as células dendríticas (MAY et al. 2016). Neste local, essas leveduras promovem um acúmulo de fagócitos com o objetivo de realizar uma depuração fagocítica. Esse processo é possível através do reconhecimento de moléculas específicas dos fungos na superfície celular, que são

os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) dos fagócitos (ERWIG; NEIL; GOW, 2016).

Esse pode ser feito por células imune sentinelas, principalmente as células dendríticas (do inglês *dendritic cells* - DCs). As DCs convocam as células T, induzindo as células T CD4⁺ a secretar citocinas que podem ativar uma resposta do tipo de célula T auxiliar 1 (T_H1) ou citocinas que ativam uma resposta do tipo T_H2. Na resposta do tipo T_H1 há secreção de interleucina-12 (IL-12) e IL-23, assim as células T_H1 produzem citocinas pró-inflamatórias, como o interferon- γ (IFN γ), que podem controlar uma infecção fúngica, como mostrado na figura 2 (MAY et al. 2016).

No entanto, alguns PAMPs fúngicos podem influenciar a ativação de DC, incluindo a modulação dos níveis do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) ou da sinalização do fator nuclear κ B (NF- κ B). A ativação de uma resposta T_H2, com produção de citocinas, como IL-4 e IL-33; leva a um ambiente anti-inflamatório que afeta a ativação de macrófagos por via ativação clássica M1 e por ativação alternativa M2, como mostrado na figura 2 (MAY et al. 2016). Com a ativação de resposta tipo T_H2 os macrófagos têm algumas de suas funções inibidas, como a fagocitose e a depuração intracelular. Com isso, hospedeiros com esta resposta podem apresentar maiores cargas fúngicas (VOELZ, LAMMAS, MAY, 2009).

Figura 2 - Resposta imune à infecção por *Cryptococcus*

Nature Reviews | Microbiology

Fonte: Adaptado de May et al. (2016)

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos; GXM–glicuronoxilomanano; NF-κB – Fator nuclear kappa B; MHC–complexo principal de histocompatibilidade classe II; DC–célula dendrítica; CD4⁺–Grupamento de diferenciação; IL–Interleucina; T_H1–T helper 1; T_H2–T helper 2; IFN_γ–Interferon gama; M1–Ativação de macrófagos por via clássica; M2–Ativação de macrófagos por via alternativa.

Após esse reconhecimento, as células fúngicas são engolfadas, tem-se a formação do fagossomo (ERWIG; NEIL; GOW, 2016). O pH do fagossomo começa a cair rapidamente, o que limita o crescimento microbiano e ativa proteases ácidas dentro deste compartimento para degradar seu conteúdo (MAY; CASADEVALL, 2018). Assim, as células fúngicas podem ser eliminadas devido a presença de agentes antimicrobianos, incluindo enzimas hidrolíticas e oxidantes nos fagolisossomos, ou podem escapar dos fagócitos promovendo sua lise ou serem

expulsos sem a lise da célula fagocítica (ERWIG; NEIL; GOW, 2016). *Cryptococcus* respondem ao ambiente do fagossomo remodelando sua sua cápsula. Essa mudança promove um sinal de alerta para a célula hospedeira, que pode ativar respostas como vomocitose e lise. No entanto, vários patógenos intracelulares desenvolveram estratégias para neutralizar o pH fagossômico, conseqüentemente conseguem escapar deste processo de digestão, porém este mecanismo não está totalmente compreendido (MAY; CASADEVALL, 2018).

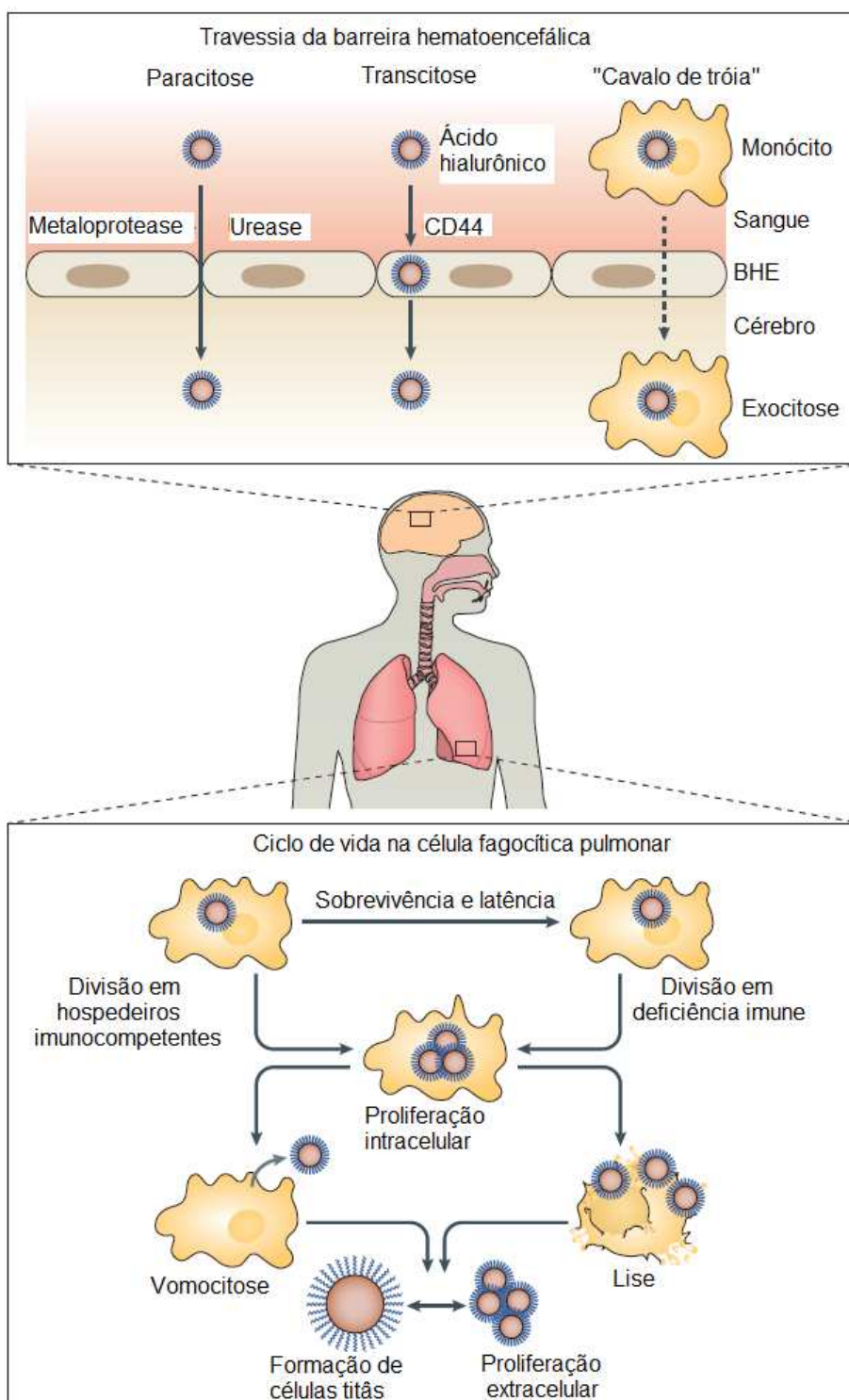
No entanto é importante destacar que para uma resposta imune efetiva, as células fagocíticas devem ser estimuladas por citocinas que ativem a imunidade celular, como IL-12 e IFN- γ . A imunidade celular desempenha papéis direto na eliminação de patógenos, tendo como alvo a célula infectada. Se liberadas citocinas como por IL-4, será estimulada uma resposta imune humoral, porém esta resposta não será efetiva, pois estas citocinas conduzem uma resposta mediada por anticorpos (BONILLA; OETTGEN, 2010).

Células criptococócicas podem mascarar esta resposta imune. Assim, durante a infecção elas podem eliminar os carboidratos complexos glicuronoxilomanano (GXM) e galactoxilomanano (GalXM) que compõem a maior parte de sua cápsula. Com isso suprimir a via pró-inflamatória do NF- κ B e reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF. Além disso, podem interferir na maturação de células dendríticas, reduzindo a apresentação de antígenos dependentes de MHC (classe II) e assim inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IL-23 (MAY et al. 2016).

Apesar das diferentes etiologias da doença por *C. neoformans* e *C. gattii*, é possível que ambas espécies, tenham a influência de sinalização por citocinas do tipo T_H1 e T_H2 em comum para a patogênese da criptococose. Sendo demonstrado um papel protetor das citocinas do tipo T_H1 e uma resposta não protetora do tipo T_H2. Assim, pacientes com HIV com alteração na resposta T_H1, apresentam macrófagos com capacidade reduzida em lidar com a infecção por *Cryptococcus* e promover uma depuração eficiente (VOELZ, LAMMAS, MAY, 2009).

Por fim, o processo de disseminação do fungo no hospedeiro pode acontecer por três rotas (Figura 3).

Figura 3 - Estabelecimento e disseminação da infecção no hospedeiro.



Início da infecção através da inalação de células cryptocólicas, no pulmão estas são reconhecidas pelo sistema de defesa e por seus mecanismos de escape podem crescer formando células titãs ou exibir características antifagocíticas expressas pela cápsula. Porém, se fagocitadas as células fúngicas podem crescer, multiplicar e lisar a célula do fagócito, com isso disseminam para outros locais, com tropismo pelo SNC. No SNC as células podem atravessar a barreira hematoencefálica por três mecanismos paracitose, transcitose e "cavalo de tróia". Fonte: Adaptade de May et al. (2016).

Na primeira rota, as células de *Cryptococcus* forçam as junções das células endoteliais em um processo conhecido como paracitose, usando proteases como Mpr1 para promover a migração transendotelial. A urease produz amônia, que é tóxica para as células de mamíferos, é possível que esta tenha atuação local na parede do vaso endotelial, facilitando a entrada de fungos. Já o segundo mecanismo, ocorre por transcitose onde o ácido hialurônico presente na superfície da célula criptocócica se liga ao CD44 no endotélio lumial, e conseqüentemente, a levedura e a célula do hospedeiro ficam ligadas. Essa ligação induz uma remodelação na actina dependente de proteína quinase C das células do hospedeiro e com isso, a célula de *Cryptococcus* é englobada (MAY et al. 2016). E por fim, o terceiro mecanismo que é a hipótese do cavalo de tróia, em que o patógeno está associado a uma célula de defesa e com isso, consegue atravessar a barreira de proteção (DENHAM; BROWN, 2018). Neste mecanismo o patógeno é conduzido a tecidos distantes dentro da célula de defesa sem ser exposto ao sistema imune (GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA, 2012). No entanto, durante uma infecção é possível que estes três mecanismos possam ocorrer simultaneamente, mesmo possuindo elementos diferentes (MAY et al. 2016).

Após a saída das leveduras dos pulmões, estas alcançam a corrente sanguínea, podendo alcançar diferentes locais, com maior predisposição ao Sistema Nervoso Central (SNC) que é forma mais grave (MAY et al. 2016; BIVANCO; MACHADO E MARTINS, 2006; MITCHELL; PERFECT, 1995).

1.4 FORMAS CLÍNICAS

A infecção e reinfecção por *C. neoformans* é frequente em grandes centros urbanos, devido sua presença no ambiente. Porém, são raros os casos da doença demonstrando uma resistência natural ao fungo. Geralmente a infecção ocorre por inalação e dificilmente por inoculação direta do agente na pele, sendo os pulmões e cérebro os principais órgãos afetados (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006). No entanto o acometimento do indivíduo está relacionado ao seu estado imunológico (MORETTI et al. 2008).

A infecção pode ser sintomática ou assintomática e normalmente se resolve espontaneamente (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006). As manifestações podem ser desde localizadas e autolimitadas até a ocorrência da doença disseminada com falência respiratória. A lesão pulmonar primária normalmente nodular, pode ocorrer em qualquer das três zonas pulmonares radiológicas (cortical, medular ou cernal), com características gelatinosas e raramente evolui para calcificação (MORETTI et al. 2008). Os sintomas da criptococose vão desde infecção aguda como tosse, febre, dor no tórax, pneumonia até insuficiência respiratória grave; ou ainda sintomas de infecção crônica com presença de nódulos, massas, cavidades, derrame pleural, infiltrado intersticial ou linfadenopatias (BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006).

Da infecção pulmonar pode ocorrer disseminação para o SNC, devido *C. neoformans* e *C. gattii* possuir tropismo por esta região. A forma clínica mais comum é a meningoencefalite, com ocorrência em mais de 80% dos casos, que pode ser de forma isolada ou associada ao acometimento pulmonar (MORETTI et al. 2008). As manifestações mais comuns na infecção criptocócica do SNC são cefaleia, náusea e febre. Podem ocorrer outras manifestações menos comuns como, meningismo, confusão mental, convulsões, alterações visuais e déficit neurológico (DUARTE et al. 2017).

Além da infecção pulmonar e do SNC, *Cryptococcus* podem alcançar outros locais como a pele, próstata, ossos, fígado, baço, rins, tireóide, linfonodos, supra-renais e coração (MAY et al. 2016; BIVANCO; MACHADO; MARTINS, 2006; MITCHELL; PERFECT, 1995).

1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

Cryptococcus neoformans e *C. gattii* apresentam diversos fatores de virulência que o permitem infectar o hospedeiro, tais como capacidade de crescer a 37 °C, síntese de cápsula, a melanização e secreção de enzimas (MAY et al. 2016). Além destes fatores, também apresentam algumas características que dificultam o processo de fagocitose, como alterar sua morfometria para células titãs e

microcélulas, alterar a composição e organização da parede celular, o que altera o reconhecimento destas células pelo sistema imune (ERWIG; NEIL; GOW, 2016).

Células de *Cryptococcus* sp. são altamente capazes de crescer em temperaturas fisiológicas de hospedeiros mamíferos. Em estudos foram identificados genes que conferem esta capacidade às células, a função destes genes são variadas, atuam desde a montagem da parede celular, sinalização de estresse, integridade da membrana, metabolismo básico, *splicing* pré-RNA_m, remodelação da cromatina entre outros (KWON-CHUNG et al. 2014).

A cápsula de *C. neoformans* possui capacidades anti-fagocíticas, age suprimindo a proliferação de linfócitos T, atua na indução da citocina anti-inflamatória IL-10 e ainda interfere na produção de TNF α e IL-1 β que são importantes citocinas pró-inflamatórias. Dentro dos fagócitos, durante a fagocitose, a cápsula das células fúngicas, confere proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROs), radicais e moléculas antifúngicas que são produzidas pelos macrófagos, por exemplo as defensinas (HERNÁNDEZ-CHÁVEZ et al. 2017).

A cápsula apresenta duas camadas de polissacarídeos, compostas por glicuronoxilomanano (GXM) e β curonoxilomannogalactano (GXMGal). É formada por glicanos, quitinas, quitosonas e glicoproteínas. Pode ainda conter monoproteínas, ácido hialurônico e ácido siálico (KWON-CHUNG et al. 2014). A espessura da cápsula se correlaciona com a virulência e com a capacidade do fungo de evitar a fagocitose. Isso é ainda mais acentuado devido a presença de uma proteína antifagocítica única App1, que bloqueia a captação fagocítica pela ligação aos receptores de complemento CR3 e CR2 (ERWIG; NEIL; GOW, 2016).

A capacidade da cápsula de alterar seu tamanho conforme as condições ambientais permite à célula fúngica aumentar significativamente seu tamanho durante o processo de infecção, contribuindo como mecanismo de escape (GARCÍA-RODAS; ZARAGOZA, 2012). E também oferece proteção contra a droga antifúngica anfotericina B (AmB). Com isso, ajuda o patógeno a sobreviver no interior do fagossomo. Assim, as células se tornam extremamente grandes, com 14 a 20 vezes maior que o tamanho das células típicas em cultivo *in vitro*. Estas células são denominadas células titãs, as quais são mais resistentes a tensões oxidativas e nitrosativas, bem como apresentam maior virulência (HERNÁNDEZ-CHÁVEZ et al. 2017). Além das células titãs, foram observadas células anormalmente pequenas,

denominadas gotas ou microcélulas medindo 2–4 μm de tamanho mesmo com uma parede celular espessada. No entanto, atualmente há pouco conhecimento sobre esse tipo de célula, porém esta parece ser metabolicamente inativa e apresenta um papel importante durante o estágio latente da doença (MAY et al. 2016).

A parede interna de *Cryptococcus* possui uma camada de melanina, que são compostos fenólicos polimerizados amorfos complexos (ERWIG; NEIL; GOW, 2016) sintetizados a partir de substratos como 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e outros componentes di/polifenóis (KWON-CHUNG et al. 2014). Esse pigmento desempenha um importante papel na proteção da célula contra o estresse do ambiente (KWON-CHUNG et al. 2014). Impedem a ativação do complemento, neutralizam peptídeos antimicrobianos e protegem as células dos mecanismos de morte oxidativa (ERWIG; NEIL; GOW, 2016).

Nas células de *Cryptococcus*, a presença da melanina contribui para a resistência mecânica, redução da suscetibilidade à degradação enzimática, resistência à luz ultravioleta (UV) e aumento da resistência à fagocitose. Essa resistência à fagocitose, em *C. neoformans*, tem sido relacionada com alterações na carga da superfície celular que contribuem para a inibição da fagocitose e também para a redução da produção de óxido nítrico pelos macrófagos (HERNÁNDEZ-CHÁVEZ et al. 2017).

Cryptococcus neoformans produz muitas enzimas de degradação e algumas determinadas como fatores de virulência, como a urease e fosfolipase B. As funções desempenhadas por essas enzimas favorecem a sobrevivência intracelular destas células, promovem ruptura das membranas das células hospedeiras para entrada no tecido, imunomodulação e contribuem para a disseminação dos fungos do pulmão para o cérebro. A fosfolipase B presente na superfície celular promove maior adesão da célula fúngica às células pulmonares do hospedeiro, que é imprescindível para o início da criptococose pulmonar intersticial e também favorece a hidrólise da membrana das células permitindo a entrada no tecido do hospedeiro. Já a urease contribui para a propagação do fungo no pulmão e facilita a travessia na barreira hematoencefálica. A falta dessas enzimas de degradação resulta na redução da virulência, ao contrário da ausência da cápsula de polissacarídeos que resulta em células avirulentas (KWON-CHUNG et al. 2014).

Cryptococcus neoformans também produz grandes quantidades de DNase extracelular, que age na degradação do DNA do hospedeiro. As atividades destas enzimas são mais fortes em cepas clínicas em comparação com as ambientais, sugerindo que a DNase atue como um fator de virulência. Da mesma forma as proteases, que agem na quebra de proteínas contribuindo para a invasão do tecido, colonização e alteração da resposta imune do hospedeiro que são importantes na penetração e na virulência (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015).

Outras enzimas que auxiliam na virulência de *Cryptococcus* são as superóxidos dismutases (SODs) que convertem o superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Estas contribuem para a virulência de *Cryptococcus* por facilitar o seu crescimento dentro de macrófagos, em um mecanismo que envolve sua proteção contra o superóxido gerado pela resposta imune do hospedeiro. A produção de SOD é regulada pela temperatura, sendo que a 37 °C há aumento da sua expressão quando comparado a 25 °C. Assim, na temperatura corporal, o aumento da produção de SOD contribui para a proteção do fungo contra agentes oxidantes produzidos pelas células efectoras do hospedeiro (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015).

A homeostase de metais é um fator de virulência, visto que alguns metais são de extrema importância para a virulência da célula fúngica. Seu excesso ou escassez pode afetar diversos aspectos de sua biologia e reduzir sua capacidade de virulência, como influenciar na transcrição gênica, formação de cápsula, disponibilidade de co-fatores enzimáticos e produção de melanina. Outro fator de virulência está relacionado a expressão de genes responsáveis pela transcrição de enzimas que tornam o fungos mais adaptáveis a variação de gases (KWON-CHUNG et al. 2014).

1.6 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO

O tratamento medicamentoso da Criptococose se baseia principalmente em agentes antifúngicos e corticoesteróides. Os principais fármacos utilizados são a anfotericina B e fluconazol (FALCI; PASQUALOTTO, 2015). Também podem ser

utilizados o itraconazol, voriconazol e a flucitosina que não é comercializada no Brasil (PASA, 2011).

1.6.1 Agentes Antifúngicos

A AmB é um antimicrobiano pertencente a classe dos polienos que possui como característica a baixa solubilidade. Possui amplo espectro de ação com eficácia para candidíase, criptococose, aspergilose, histoplasmoses, blastomicose, coccidiomicose, mucormicose, esporotricose, fusariose e outras feohifomicoses. A AmB apresenta efeitos diretos sobre a membrana celular e efeitos intracelulares de indução de estresse oxidativo como mecanismos de ação. O efeito da AmB na membrana de *Cryptococcus* deve-se a sua interação com o ergosterol, que é um esteróide essencial da membrana celular dos organismos fúngicos (FALCI; PASQUALOTTO, 2015).

A estrutura poliênica da molécula de AmB forma complexos com o ergosterol, o que leva a formação de poros na membrana resultando em extravasamento de íons da célula devido a perda de sua integridade e conseqüentemente, ocasionando a morte celular (FALCI; PASQUALOTTO, 2015). Outro mecanismo de ação da AmB é a indução do estresse oxidativo, por induzir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo este responsável pelo seu efeito antimicrobiano. Em condições fisiológicas, os radicais livres são produzidos naturalmente nas mitocôndrias na cadeia respiratória, contribuindo para sinalização, adaptação metabólica e imunidade. Porém, na presença de oxidantes, luz UV ou outros estímulos externos, há um aumento da concentração endógena de ERO que produzem alterações em diferentes macromoléculas, como proteínas, lipídios e DNA. Estas alterações eventualmente desencadeiam danos nas células e conseqüentemente, levam a morte celular (MESA-ARANGO et al. 2014).

Outro importante fármaco usado no tratamento da criptococose é o fluconazol, que é um composto triazólico, com alta biodisponibilidade e boa penetração no sistema nervoso central. Seu mecanismo de ação resulta na inibição da enzima lanosterol 14- α demetilase no complexo citocromo P-450 dos fungos. Esta inibição leva a um bloqueio da conversão de lanosterol em ergosterol, e conseqüentemente,

a redução do ergosterol e acúmulo de precursores resultando na perda da integridade da membrana (FALCI; PASQUALOTTO; 2015).

No tratamento da meningite criptocócica é preconizado um regime de três pontos: indução, consolidação e manutenção. Na indução da terapia intravenosa é indicado de 0,7 a 1 mg/kg/dia de AmB ou 3 a 4 mg/kg/dia de AmB lipossomal ou 5 mg/kg/dia de complexo lipídico de AmB e 100 mg/kg/dia de flucitocina (5-FC) por pelo menos duas semanas. Para a fase de consolidação, oito semanas após a indução da terapia, 800 mg/dia de fluconazol se mostrou eficaz no tratamento. Na fase final da terapia pode ser usado 200 mg/dia de fluconazol para manutenção por seis a 12 meses em pacientes não infectados por HIV e pelo menos 12 meses para pacientes HIV positivo (MOURAD; PERFECT, 2018).

Segundo Moretti et al. (2008) em um consenso feito por profissionais brasileiros, o tratamento das formas pulmonares de criptococose em HIV negativo ou com pesquisa de antígeno criptocócico e cultura em líquido cefalorraquidiano negativos, na forma clínica leve a moderada, o tratamento consiste em 6 a 12 meses. Essa terapia é feita com fluconazol 200-400 mg/d ou itraconazol 200-400 mg/d VO ou AmB 0,5-1 mg/kg/d e na forma clínica grave deve ser tratado como meningoencefalite. Criptococose com formas pulmonares em pacientes HIV positivo ou cultura positiva de espécime respiratório, sem envolvimento do SNC, o tratamento consiste em fluconazol 200 a 400 mg/dia VO por 6 a 12 meses e observação ou itraconazol 200 a 400 mg/dia VO por 6 a 12 meses e observação. A fase de manutenção com fluconazol 200 a 400 mg/dia ou itraconazol 200 a 400 mg/dia e a forma grave deve ser tratada como meningoencefalite.

Para criptococose pulmonar leve a moderada, outras infecções extra SNC e infecções não disseminadas a monoterapia com fluconazol tem sido recomendada. Outros triazol como itraconazol, posaconazol e isavuconazol tem alcançado sucesso no tratamento de alguns casos de meningite criptocócica, porém foram considerados menos confiáveis, devido sua baixa penetração no SNC, problemas com a biodisponibilidade (MOURAD; PERFECT, 2018).

1.6.3 Corticoesteróides

O uso sistêmico de corticóides é uma intervenção que pode ser considerada benéfica em relação ao manejo da Síndrome Inflamatória de Reconstituição do Sistema Imune (IRIS) na meningite criptocócica. No entanto, a duração da terapia, a dose precisa, o uso de prednisona ou dexametasona são incertos e requerendo estudos futuros. Assim, o uso rotineiro de corticóides para o manejo de criptococose não é recomendado (MOURAD; PERFECT, 2018).

1.7 RESISTÊNCIA E OUTROS FENÔMENOS DE ADAPTAÇÃO AOS ANTIFÚNGICOS

Resistência é um termo utilizado para descrever a capacidade dos microrganismos crescerem em altas concentrações do antimicrobiano. Essa capacidade independente da duração do tratamento, e pode ser quantificado pela concentração inibitória mínima (CIM) do antimicrobiano. A CIM é a quantidade mínima exigida da droga para impedir o crescimento das células frente ao antimicrobiano. As concentrações utilizadas em testes em laboratórios de microbiologia clínica geralmente são limitadas às concentrações utilizadas na prática clínica (BRAUNER et al. 2016).

A resistência microbiana é adquirida geneticamente e transmitida às gerações subsequentes (GEFEN; BALABAN, 2009). Isso leva a diminuição da eficácia do antimicrobiano e com isso será necessária uma concentração maior para realização do mesmo efeito em uma linhagem resistente (BRAUNER et al. 2016).

Olszewski; Zhang; Huffnagle (2010) mostraram em seu trabalho que a superexpressão de bombas transportadoras ABC (incluindo AFR1) é um dos principais mecanismos de resistência criptocócica aos azóis e outras drogas não relacionadas. Este mecanismo consiste na eliminação dos fármacos pelas células criptocócicas (OLSZEWSKI; ZHANG; HUFFNAGLE, 2010). O fenótipo de resistência ao fluconazol pode estar relacionado a uma mutação pontual no gene ERG11, que promove trocas de aminoácidos, como a troca da glicina por arginina (G470R) (GAGO

et al. 2016) e troca da glicina por serina (G484S) (RODERO et al. 2003). Yi-Chun et al. (2015) em um estudo de 12 anos observou que em 89 isolados de *C. neoformans*, 34% destes não eram susceptíveis ao fluconazol. E a taxa de isolados não susceptíveis aumentavam significativamente no decorrer do tempo, assim como apresentaram uma tendência crescente da média geométrica da CIM de fluconazol (YI-CHUN et al. 2015).

A resistência a AmB é rara e comumente causada pela diminuição da quantidade de ergosterol ou por alteração no lipídio alvo resultando em uma redução da ligação da AmB. Algumas células fúngicas possuem uma mutação na sua via de biossíntese de ergosterol levando a síntese de compostos do tipo ergosterol, que apresentam menor afinidade de ligação à AmB (ELLIS, 2002).

A tolerância aos antimicrobianos é diferente dos outros mecanismos de resistência, pois não envolve uma mudança na CIM. A tolerância pode ser definida como a capacidade do microrganismo crescer na presença transitória e em altas concentrações de um antimicrobiano (BRAUNER et al. 2016). Esta capacidade herdada ou não, de sobreviver na presença transitória do antimicrobiano sem alteração na CIM, geralmente ocorre por redução na multiplicação celular (FERREIRA; SANTOS, 2017). Tantos fatores genéticos como fatores fisiológicos são conhecidos por alterar a susceptibilidade à ação do antimicrobiano sem alteração da CIM, ou seja, esses fatores tornam os microrganismos tolerantes ao antimicrobiano (TUOMANEN et al. 1986). A tolerância está relacionada com uma resposta adaptativa frente a drogas bacteriostáticas/fungistáticas (BRAUNNER, 2016). Para Bastos et al. (2018), a tolerância aos azólicos pode estar relacionada a um aumento na expressão do gene ERG11 em *C. neoformans* e *C. gattii* e na expressão dos genes da bomba de efluxo (AFR1 e MDR1) para *C. neoformans*.

Outro mecanismo relacionado na capacidade de sobrevivência das células microbianas é a persistência. O termo persistente é usado para designar uma pequena população de células que sobrevivem ao tratamento com antimicrobianos mesmo em altas concentrações (GRANT; HUNG, 2013), estando relacionados a antimicrobianos fungicidas/bactericidas (BRAUNNER, 2016). A persistência é um evento dependente do tempo ou da dose. Quando a persistência é dependente do tempo ela pode ser caracterizada por conter uma subpopulação de microrganismos que são tolerantes, comumente apresenta um tempo de latência maior ou uma

reduzida taxa de crescimento quando comparada com a maioria da população. Já a população considerada persistente por dose dependente, apresenta uma subpopulação de células temporariamente mais tolerantes que a maioria da população, o que pode ser considerada por alguns autores como heterorresistente (FERREIRA; SANTOS, 2017).

Embora não exista uma definição precisa e distinta que possa envolver todos os microrganismos, o termo heterorresistência geralmente é descrita como uma resistência de um subconjunto de uma população de células a certos antimicrobianos, que são considerados susceptíveis (FALAGAS et al. 2008). Após a remoção ou redução da concentração do agente antimicrobiano, esta resposta adaptativa é suspensa mostrando que é uma característica reversível. O mecanismo utilizado por esta subpopulação é a expressão de proteínas relacionadas à resistência as drogas antimicrobianas, que após a remoção da droga essa característica é cessada (FERREIRA; SANTOS, 2017).

Devido a necessidade de se adaptarem ao estresse do ambiente, fungos e bactérias utilizam em diferentes maneiras os fenômenos de resistência, tolerância e persistência (FERREIRA; SANTOS, 2017).

Chen et al. (2017) visando compreender a microevolução de *Cryptococcus* em seu hospedeiro, analisou cultivos isolados a partir amostras do líquido cefalorraquidiano de 18 pacientes sul-africanos com meningite criptocócica recorrente, sendo que 16 pacientes receberam tratamento com fluconazol e/ou AmB. Em alguns destes pacientes os genes *BYR4* (CNAG_06325) e *ERG11* estavam associados ao aumento da resistência ao fluconazol. O gene *Byr4* é um regulador dose-dependente de citocinese, considerado essencial para a resistência de *C. neoformans* var. *grubii* ao fluconazol. Assim, a deleção de um único nucleotídeo, a timina afetou dois terços do comprimento da proteína, provavelmente causando uma perda da função do gene *Bry4*. Portanto, a resistência à fluconazol relatado neste caso pode estar diretamente associada a essa mutação (CHEN et al. 2017).

No entanto, estudos com exposição contínua de *Cryptococcus* sp. a AmB e os efeitos decorrentes desta exposição ainda são incipientes. Alguns estudos utilizaram a exposição à AmB para adaptação de outras espécies fúngicas, como descrito por Claudino et al. (2009), em que linhagens de *Candida* sp. foram expostas a concentrações crescentes de AmB e fluconazol. Estes autores observaram que

nenhuma das linhagens utilizadas no estudo aumentaram os valores de CIM para AmB, mesmo após passagens em meios em concentrações crescentes do antifúngico de 0,5 a 3,0 µg/ml. Park et al. (1994) também analisaram a adaptação de *Aspergillus niger* ao estresse de curto prazo induzido pelos antifúngicos AmB, miconazol e cetoconazol. Posteriormente, estes autores observaram que *A. niger* tornou-se menos sensíveis aos referidos antimicrobianos e por isso, definido como uma adaptação ao estresse de curto prazo causada pela exposição ao antifúngico.

2 JUSTIFICATIVA

Os dados disponíveis no Sistema de Informações sobre Morbidade Hospitalar do SUS geridos pelo Ministério da Saúde mostram que, no período de 2010 a 2019, o número de internações decorrentes de micoses no Brasil foi superior 114 milhões, correspondendo a mais de quatro milhões óbitos. Essas internações geraram um gasto de mais de 105 bilhões com serviços hospitalares. Por criptococose, a mortalidade no Brasil, no período de 2010 a 2018 foi de 1788 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Muitas das infecções sistêmicas causadas por fungos possuem dificuldade de remissão completa com tratamento medicamentoso, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (BOYCE et al. 2017). Estima-se que 10% dos indivíduos acometidos pela infecção por *Cryptococcus* sp. desenvolvem a criptococose recorrente mesmo após receber o tratamento antifúngico utilizado na clínica médica (CHEN et al. 2017).

A forma como os fungos se adaptam em seu hospedeiro ainda não está totalmente elucidada (BOYCE et al. 2017). Muitos estudos avaliam as características presentes nas células que facilitam as adaptações destes em ambientes hostis, o que interfere na capacidade de causar a doença, sendo categorizado por estes autores como microevolução (BOYCE et al. 2017; CHEN et al. 2017). Desta forma, entender quais alterações fenotípicas ocorrem nas células de *Cryptococcus*, como contribuem para estas adaptações frente ao estresse causado pelos antifúngicos comumente utilizados na prática clínica, e como estes fenótipos podem se alterar de acordo com a ocorrência de cada fenômeno, é de extrema importância, uma vez que, estes fatores podem influenciar o curso da infecção.

3 OBJETIVOS

Avaliar as alterações morfofisiológicas envolvidas na adaptação de *C. neoformans* e *C. gattii* à AmB.

3.1 ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de *C. neoformans* e *C. gattii* frente à AmB;
- Avaliar a capacidade de adaptação de diferentes linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* à AmB;
- Analisar a morfometria das células selvagens e seus clones adaptados à AmB quanto a espessura da cápsula, diâmetro celular e relação superfície volume;
- Determinar o tempo de morte das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB;
- Determinar o tempo de crescimento das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB;
- Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio pelas células de *Cryptococcus* após desafio com AmB;
- Comparar as linhagens selvagens e seus clones adaptados à AmB através do ensaio de fagocitose, e identificar diferenças entre o índice fagocítico, índice de proliferação celular e proliferação intracelular e produção de espécies reativas;
- Verificar se há sinergismo, indiferença ou antagonismo na interação entre AmB, FeTPPS e DETC em linhagens selvagens e seus clones adaptados à AmB.
- Verificar se há alteração da peroxidação lipídica das linhagens selvagens e seus respectivos clones após adaptação à AmB;
- Verificar se há alteração do potencial zeta por linhagens selvagens e seus clones adaptados a AmB.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado utilizando linhagens de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, com os seguintes métodos descritos abaixo.

4.1 DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O protocolo para estudos em animais do presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil, sob número 88/2019 (Anexo A).

4.2 LINHAGENS E DESENHO EXPERIMENTAL

O estudo foi realizado com 10 linhagens de *C. neoformans* e 10 linhagens de *C. gattii*, todas cedidas gentilmente pelo prof. Dr. Daniel Assis Santos, e pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Micologia, da Universidade Federal de Minas Gerais (Quadro 1). As linhagens foram mantidas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) a 4 °C.

Os ensaios de CIM, adaptação à AmB e morfometria foram realizados para todas as linhagens. Já os demais testes foram realizados para duas linhagens de cada espécie, sendo para as selvagens e as que apresentaram melhor adaptação à AmB no processo de evolução adaptativa (Quadro 1).

Quadro 1 - Linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* utilizadas neste estudo

Linhagens de <i>C. neoformans</i>	Genótipo/Sorotipo	Origem
ATCC 28957 (ATCC ® 28957 TM)	ND/Sorotipo D	Clínica; Lesão óssea humana
ATCC 24067 (ATCC ® 24067 TM)	ND/Sorotipo D	Clínica; Maryland, EUA
ATCC 62066 (ATCC ® 62066 TM)	ND/Sorotipo A	Clínica; França
ATCC H99 (ATCC ® 208821 TM)	VN I / A	Clínica; Nova York
ATCC WM148 (ATCC® MYA-4564TM)	VN I / A	Clínica, Austrália
ATCC WM628 (ATCC ® MYA-4566 TM)	VN III / AD	Clínica, Austrália
ATCC WM629 (ATCC ® MYA-4567 TM)	VN IV / D	Clínica, Austrália
ATCC WM626 (ATCC ® MYA-4565 TM)	VN II / A	Clínica, Austrália
P3	ND /ND	Clínica, Brasil
RN-01	ND /ND	Clínica, Brasil
Linhagens de <i>C. gattii</i>	Genótipo/Sorotipo	Origem
ATCC 32608 (ATCC ® 32608 TM)	VG III / C	Clínica, Califórnia
ATCC WM179 (ATCC ® MYA-4560 TM)	VG I / B	Clínica, Austrália
ATCC WM161 (ATCC ® MYA-4562 TM)	VG III / B	Ambiental, San Diego
ATCC R265 (ATCC ® MYA-4093 TM)	VG IIa / B	Clínica, Canadá
ATCC WM779 (ATCC ® MYA-4563 TM)	VG IV / C	Veterinária, Africa do Sul
ATCC WM178 (ATCC ® MYA-4561 TM)	VG II / B	Clínica, Austrália
L28/02	ND	Clínica, Brasil
L27/01	VG II	Clínica, Brasil
LMM818	ND	Clínica, Brasil
ICB 181	ND	Ambiental, Brasil

Nota: ATCC: *American Type Culture Collection*; ND Não determinado.
Em negrito linhagens adaptadas à anfotericina B.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CIM *in vitro* À ANFOTERICINA B POR MICRODILUIÇÃO

As CIMs das linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* frente à AmB foram determinadas pelo teste de microdiluição de acordo com o protocolo da *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI M27-A3) (CLSI, 2008).

A diluição seriada da AmB foi realizada em meio em caldo Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) suplementado com 3-[N-morfolino]propano-ácido sulfônico (MOPS) na faixa de concentração de 0,03 a 16 mg/L.

Após incubação prévia por 48 h das linhagens de *Cryptococcus*, colônias isoladas foram coletadas e ressuspensas em salina estéril, de modo a alcançar a concentração de 1 a 5×10^6 UFC/ml. Em seguida, as amostras foram diluídas em RPMI-1640 suplementado com MOPS até a concentração de 1 a 5×10^3 UFC/ml.

Em cada poço das microplacas de 96 poços foram adicionados 100 μ L da diluição do meio em caldo RPMI-1640 contendo o antimicrobiano em concentração decrescente e 100 μ L da suspensão das linhagens de *Cryptococcus*, de modo que o inóculo final foi de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/ml. No controle positivo foi utilizado somente o inóculo e no controle negativo foi utilizado apenas o meio.

As microplacas foram incubadas a 35 °C. Após 72 h de incubação, as CIMs foram determinadas visualmente dos poços, sendo que os poços sem turvação foram considerados que houve inibição do fungo.

O mesmo experimento também foi realizado utilizando o inóculo final de 0,5 a $2,5 \times 10^5$ UFC/ml. Todos os testes foram realizados em duplicatas em experimentos independentes.

4.4 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE *in vitro* À ANFOTERICINA B EM ÁGAR

As 20 linhagens de *Cryptococcus* foram submetidas ao teste de suscetibilidade à AmB em ASD. Suspensões dessas linhagens foram preparadas contendo 1 a 5×10^5 UFC/ml. Uma alíquota de 100 μ L foram inoculadas em placas de ASD suplementado com concentrações de AmB variando de 0,03 a 16 mg/L. As placas foram incubadas a 35 °C por 72 h. A CIM foi aquela onde não houve crescimento visível de colônias.

4.5 EVOLUÇÃO ADAPTATIVA À ANFOTERICINA B

A evolução adaptativa das linhagens de *Cryptococcus* foi realizada através de passagens consecutivas em concentrações crescentes de AmB conforme Oz et al. (2014) com modificações. Para isso, suspensões de todas as linhagens contendo 1 a 5×10^5 UFC/ml, foram preparadas e 100 μ L inoculados em ASD suplementado com

concentrações sub-CIM de AmB. Após 96 h de incubação a 37 °C, o procedimento foi repetido aumentando $\frac{1}{4}$ da concentração da AmB a cada passagem até que a resistência adaptativa fosse observada, através da concentração máxima de crescimento.

A concentração máxima de crescimento frente à exposição de AmB (CMCE) foi determinada como a máxima concentração em que as linhagens conseguiram crescer após as passagens sucessivas em AmB.

As colônias que cresceram na CMCE foram denominadas “expostas à AmB”. As linhagens que conseguiram crescer em concentrações iguais ou superiores a CIM inicial, ou seja, tiveram a razão CMCE/CIM maior ou igual a 1, foram classificadas como “adaptadas”. As células de *Cryptococcus* que não passaram por esse processo de evolução foram chamados de selvagens.

Todos os clones expostos à AmB foram submetidos aos testes de suscetibilidade à AmB em microdiluição conforme descrito no item 4.3, com o objetivo de observar se aconteceria alteração das CIMs.

Todos os clones expostos à AmB foram cultivados em dez passagens consecutivas em ASD sem a presença de AmB. Após estas passagens, foram realizados testes de susceptibilidade em ASD. Será considerado como alteração da susceptibilidade quando ocorrer aumento ou redução de 4x a CIM inicial.

4.6 VISUALIZAÇÃO DO TAMANHO DA CÉLULA E CÁPSULA

As células das linhagens selvagens e seus clones adaptados foram cultivados em ASD por 72 h a 35 °C. Após período de incubação, as células foram suspensas em tinta naquim, visualizadas em microscópio óptico e registradas em fotos. Em todas as linhagens, a espessura da cápsula e o diâmetro celular foram mensuradas em aproximadamente 50 células usando o programa ImageJ 1.40 g (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>; *National Institutes of Health* (NIH); Bethesda, MD) (ARAUJO et al. 2012) e expressos em micrômetros (μm). Posteriormente, a razão superfície sobre volume celular (S/V) foi calculada usando a fórmula $3/\text{raio}$ e expressa em μm (MADIGAN et al. 2012).

4.7 CURVA DE MORTE

As linhagens selvagens foram cultivadas em tubos contendo ASD e suas respectivas linhagens adaptadas em ASD contendo CMCE de AmB por 72 h. O inóculo final foi ajustado com 0,5 a $2,5 \times 10^5$ UFC/ml conforme descrito no item 4.3. Os testes foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços contendo as concentrações de CIM e duas vezes o valor de CIM (2xCIM) de AmB para cada linhagem. Cada experimento continha um controle negativo constituído de 200 μ L de meio RPMI-1640 suplementado com MOPS, e um controle positivo com 100 μ L de inóculo e 100 μ L de meio RPMI-1640 suplementado com MOPS.

As placas foram incubadas a 35 °C por 72 h e nos intervalos de 0, 6, 12, 24, 36, 48, 54 e 72 h alíquotas de 30 μ L foram removidas de cada poço, plaqueadas em placas de Petri contendo ASD e incubadas a 35 °C por 72 h. Após o período de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e construídas as curvas de morte em função do número de UFC recuperadas ao longo do tempo (PFALLER; SHEEHAN; REX, 2004).

4.8 CURVA DE CRESCIMENTO

A curva de crescimento das linhagens selvagens e dos clones adaptados à AmB foi realizada de acordo com Meletiadis et al. (2001), com modificações. As células de *Cryptococcus* em concentrações de 0,5 a $2,5 \times 10^5$ UFC/ml foram dispostas em microplacas de 96 poços com RPMI-1640 suplementado com MOPS. Estas microplacas foram incubadas em leitor de ELISA a 35 °C durante 72 h, as leituras foram realizadas em comprimento de onda de 600 nm, com intervalos de 30 min e em quatro replicatas.

As fases de crescimento foram definidas a partir da construção de um gráfico com os valores de absorbância em logaritmos neperianos em relação ao tempo e calculada a equação da reta para todas as linhagens. A fase de crescimento exponencial foi definida entre os tempos de crescimento em que a equação da reta foi próxima a 1. Com isso foi possível definir a fase de crescimento exponencial, assim como a fase lag e fase estacionária.

4.9 MENSURAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS DESAFIO COM ANFOTERICINA B

As linhagens selvagens e os respectivos clones adaptados à AmB foram utilizadas para mensurar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO). Assim, 0,5 a $2,5 \times 10^5$ UFC/ml de células foram tratadas com a CIM de AmB diluídas em RPMI-1640 suplementado com MOPS sem vermelho de fenol e incubados a 35 °C com 10 mM de 2',7'-dichlorofluoresceína diacetato (DCFH-DA; Invitrogen, Life Technologies). A fluorescência foi mensurada em um intervalo de tempo de até três horas utilizando um fluorímetro com comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 530 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados expressos em unidades arbitrárias (UA) (FERREIRA et al. 2013).

4.10 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os produtos da peroxidação lipídica foram mensurados por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (HERMES-LIMA; STOREY, 1995). As linhagens selvagens e os respectivos clones adaptados foram cultivados em ASD por 72 h a 35 °C. Para os tratamentos foram utilizados CIM de AmB, CIM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e para o controle foi utilizado apenas RPMI-1640 suplementado com MOPS. Após incubados por três h a 35 °C, os tubos foram centrifugados a 1643 g por 5 min, os sobrenadantes foram removidos, as células foram lavadas com água destilada e o peso úmido foi quantificado.

O centrifugado foi congelado e homogeneizado com 0,4 ml de ácido fosfórico 1,1%, 0,4 ml de uma solução contendo 1% de TBAR, 50 mM de NaOH e 0,1 mM de butilhidroxitolueno (BHT) e 0,2 ml de uma solução com 7% de ácido fosfórico (todas as soluções foram mantidas geladas durante a manipulação). Posteriormente, as amostras em pH 1,5 foram aquecidas a 98 °C por 60 min, resfriadas em gelo e foram adicionados 2,5 ml de butanol. As amostras foram agitaas vigorosamente e centrifugadas a 2000 g por 5 min. A fase orgânica foi adicionada em cubetas de quartzo e as absorbâncias a 532 nm foram mensuradas em espectrofotômetro. O

branco foi definido pela troca da solução de TBAR por uma solução de HCl a 3 mM. Os valores de TBARS foram expressos usando o coeficiente de extinção molar de $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.11 TESTE DE INTERAÇÃO DA AmB COM SEQUESTRADOR DE PEROXINITRITO E COM INIBIDOR DE SUPERÓXIDO DISMUTASE *IN VITRO*

O teste de interação da AmB com o sequestrador de peroxinitrito, 5,10,15,20-tetrakis (4'-sulfonatofenil) porfirinato de ferro III (FeTPPS) e dietilditiocarbamato (DETC) foi realizado para as linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptadas. O método utilizado foi o de microdiluição quadriculada. Este procedimento possibilita que drogas sejam combinadas em diferentes faixas de concentrações. Cada linhagem foi combinada com as respectivas drogas nas seguintes faixas de concentração AmB 2 a $0,03 \mu\text{g/ml}$, FeTPPS 400 a $0,29 \mu\text{M}$ e DETC 32 a $0,003 \text{ mM}$. A combinação foi obtida adicionando alíquotas de $50 \mu\text{L}$ de AmB aos poços da microplaca de 96 poços na orientação horizontal, da mesma forma que os outros compostos foram adicionados aos poços em sentido vertical e completado o volume final de $200 \mu\text{L}$ com a adição de $0,5$ a $2,5 \times 10^5$ UFC/ml de células. Todos os testes foram realizados em duplicada (SANTOS; BARROS; HAMDAN, 2006).

A interação entre as drogas foi quantificada pelo índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) e contruída a curva de interação. A interação foi calculada para diferentes concentrações e classificada em sinergismo quando $\text{ICIF} \leq 0,5$; indiferente quando $\text{ICIF} > 0,5$ e $\leq 4,0$ e em antagonismo quando $\text{ICIF} > 4,0$ (ODDS, 2003). A ICIF foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{ICIF} = \frac{\text{CIM AmB Combinada}}{\text{CIM AmB Isolada}} + \frac{\text{CIM FeTPPS ou DECT Combinado}}{\text{CIM FeTPPS ou DECT Isolado}}$$

4.12 ENSAIO DE FAGOCITOSE

O ensaio de fagocitose foi realizado conforme Oliveira et al. (2017), com modificações. As linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB, foram previamente cultivadas em ASD a 35 °C por 72 h.

4.12.1 Obtenção e diferenciação das células precursoras de macrófagos

As células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de camundongos C57BL/6. O animal foi eutanasiado com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), os fêmures e tíbias foram cuidadosamente extraídos e adicionados a um tubo de polipropileno contendo PBS estéril e, posteriormente, deixados em etanol 70% por 1 min. As células foram removidas utilizando meio RPMI-1640 e uma seringa com agulha 0,70 x 25 mm e transferidas a um tubo de polipropileno estéril (OLIVEIRA et al. 2017).

As células foram ressuspensas em 10 ml de meio RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 30% de sobrenadante de cultura de células L-929, 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES pH 7,2 e 100 unidades/ml de penicilina G potássica. O sobrenadante das células L-929 contém quantidade significativa de Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos (M-CSF, do inglês *Macrophage-Colony Stimulating Factor*) que é um fator de crescimento essencial na diferenciação de células progenitoras a macrófagos.

A suspensão de células foi colocada em placas de Petri e incubadas a 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂ por sete dias, sendo o meio renovado a cada 48 h. Ao fim dos sete dias, o sobrenadante foi descartado e a cultura de células lavada com 5 ml de PBS estéril para eliminação das células não aderentes. Em seguida, 3 ml de PBS contendo 10 mM EDTA foram adicionados às células e incubadas no gelo por 10 min. As células aderidas à placa e já diferenciadas em macrófagos foram ressuspensas e transferidas para tubo de polipropileno estéril. As células foram centrifugadas a 200 g por 5 min a 4 °C e ressuspensas em 5 ml de meio RPMI-1640 contendo 10% soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 25 mM de

HEPES pH 7,2, 100 unidades/ml de penicilina G potássica e 5% de sobrenadante de cultura de células L-929. As células viáveis foram contadas usando Azul de Trypan, plaqueadas em placas de cultura de 24 e 96 poços, incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 24 h, as células foram utilizadas para ensaios de fagocitose, índice de proliferação celular, índice de proliferação intracelular (IPR), quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio em três e 24 h (OLIVEIRA et al. 2017).

4.12.2 Ensaio de fagocitose

Suspensões de *C. neoformans* e *C. gattii* foram preparadas e contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan para infecção dos macrófagos. As células foram opsonizadas em soro murino a 10% por 1 h a 37 °C e ressuspendidas em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino. A quantidade de células viáveis foi ajustada para $0,4 \times 10^5$ células por poço na proporção de 2:1 de células de *Cryptococcus* para macrófagos e adicionadas à cultura de macrófagos nas placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO₂, por três e 24 h após a infecção por *Cryptococcus*. Após os períodos de incubação, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas, lavadas em PBS estéril, secas, fixadas com metanol gelado, montadas em lâminas e coradas com o corante panótico rápido, conforme sugerido pelo fabricante, para visualização da fagocitose. A contagem dos macrófagos foi realizada por meio de microscopia óptica e a capacidade fagocítica foi expressa em percentual de células de *Cryptococcus* internalizadas (OLIVEIRA et al. 2017).

4.12.3 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio e peroxinitrito no ensaio de fagocitose

A quantidade endógena de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peroxinitrito (PRN) foi mensurada utilizando sondas específica em um ensaio fluorimétrico

(SOARES et al. 2011). Neste ensaio, as células obtidas da medula foram tratadas como no ensaio de fagocitose descrito no item 4.11.2, diferindo apenas o meio, em que foi utilizado o caldo RPMI-1640 sem fenol *red*. Após os períodos de incubação de três e 24 h, a mistura foi incubada a 37 °C por 30 min com 20 nM de DCFH-DA e dihidrorhodamine 123 (DHR 123; Invitrogen, Life Technologies) para quantificação de ERO e PRN, respectivamente. Posteriormente, a fluorescência em um fluorímetro usando comprimentos de onda de excitação de 485 nm e emissão de 530 nm foi mensurada. Os ensaios para quantificação da produção de ERO e PRN foram realizados para as linhagens selvagens, seus respectivos clones adaptados e os macrófagos, em sextuplicada, e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência.

4.12.4 Proliferação Intracelular

A taxa de proliferação intracelular de *Cryptococcus* nos macrófagos foi realizado conforme descrito por Ma et al. (2009). As células de *Cryptococcus* não internalizadas presentes no sobrenadante foram removidas e plaqueadas em ASD. Em seguida, os poços foram lavados com 200 µL de PBS. Os macrófagos aderidos foram lisados após 3 e 24 h com 200 µL de água esterilizada e incubados a 37 °C por 30 min. Após o período de incubação, 50 µL do lisado foi coletado, plaqueado em ASD e incubado a 35 °C por 72 h para determinação do número de UFC. Os resultados foram expressos em UFC/ml após 3 e 24 h de inoculação.

4.12.5 Proliferação celular

A taxa de proliferação intracelular e extracelular de *Cryptococcus* nos macrófagos foram realizadas conforme descrito por Ma et al. (2009) com modificações, como descrito no item 4.11.5. Alíquotas de 50 µL do lisado e 50 µL do sobrenadante foram incubadas por 3 e 24 h e plaqueados em ASD. Em seguida o

número de UFC foi determinado em expressos em UFC/ml após 3 e 24 h de inoculação.

4.13 MENSURAÇÃO DO POTENZIAL ZETA

O potencial zeta (ζ) de células selvagens de *C. neoformans* e *C. gattii* e seus respectivos clones adaptados foram calculados em um analisador de potencial zeta (ZetaPlus, Brookhaven Instruments Corp., Holtsville, NY), como descrito por Ferreira et al. (2015) com modificações. As medições foram feitas a 25 °C com adição proporcional de AmB para obtenção de concentração de CIM, 2xCIM e 4xCIM.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism version 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados como estatisticamente significativos quando o p valor foi menor que o nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$).

Na curva de crescimento das linhagens, foi utilizado o parâmetro Área Sobre a Curva (ASC) para comparar os grupos, utilizando uma integral com a finalidade de encontrar a área desta curva, onde as mesmas são definidas por equações diferenciais de primeira ordem.

5 RESULTADOS

Os resultados abaixo são descritos para as linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii*.

5.1 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE *in vitro* À ANFOTERICINA B

Os valores de CIM obtidos no teste de susceptibilidade antifúngica por microdiluição em caldo RPMI-1640 com inóculo contendo 10^3 UFC/ml das linhagens selvagens apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao teste realizado com o inóculo contendo 10^5 UFC/ml das mesmas linhagens de *C. neoformans* (0,13 e 0,34 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) e para *C. gattii* (0,19 e 0,36 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptadas à anfotericina B de *C. neoformans* e *C. gattii*

Linhagens	CIM caldo 10 ³ UFC/ml (µg/ml)		CIM caldo 10 ⁵ UFC/ml (µg/ml)		CIM sólido (µg/ml)			
	Selvagem	Após exposição à AmB	Selvagem	Após exposição à AmB	Selvagem	CMCE	CMCE/CIM sólido (µg/ml)	Expostas após 10 passagens em ASB sem droga
<i>C. neoformans</i>								
ATCC 28957	0,06	0,12	0,25	0,25	0,25	0,16	0,64	0,50
ATCC 24067	0,25	0,25	0,50	0,12	1,00	0,50	0,50	2,00
ATCC 62066	0,06	0,06	0,12	0,12	0,25	0,125	0,50	1,00
ATCC H99	0,12	0,06	0,50	0,50	1,00	0,50	0,50	1,00
ATCC WM148	0,25	0,03	0,50	0,50	0,25	0,39	1,56	1,00
ATCC WM 628	0,25	0,25	0,12	0,50	0,25	0,20	0,80	1,00
ATCC WM 629	0,06	0,25	0,50	0,12	0,25	0,16	0,64	0,50
ATCC WM 626	0,06	0,12	0,50	0,12	1,00	1,00	1,00	2,00
P3 ^C	0,12	0,12	0,25	0,50	1,00	0,50	0,50	1,00
RN-01 ^C	0,06	0,12	0,12	0,25	0,50	0,39	0,78	1,00
Média aritmética	0,13	0,14	0,34	0,30	0,58	0,39	0,74	1,10
Média geométrica	0,11	0,12	0,28	0,25	0,47	0,32	0,69	0,93
<i>C. gattii</i>								
ATCC 32608	0,12	0,12	0,50	0,50	0,25	0,32	1,28	0,50
ATCC WM179	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,20	0,80	0,50
ATCC WM161	0,25	0,25	0,50	0,50	0,25	0,50	2,00	1,00
ATCC R265	0,12	0,25	0,50	0,50	0,25	1,82	7,28	1,00
ATCC WM779	0,12	0,25	0,25	0,25	0,25	0,32	1,28	0,50
ATCC WM 178	0,25	0,06	0,25	0,50	0,25	0,32	1,28	1,00
L28/02 ^C	0,25	0,25	0,12	0,50	0,25	0,20	0,80	0,50
L27/01 ^C	0,25	0,12	0,25	0,25	0,12	0,09	0,72	0,50
LMM818 ^C	0,25	0,12	0,50	0,50	0,50	0,39	0,78	1,00
ICB 181 ^A	0,12	0,06	0,50	0,50	0,25	0,12	0,50	1,00
Média aritmética	0,19	0,17	0,36	0,43	0,26	0,43	1,67	0,75
Média geométrica	0,18	0,15	0,33	0,41	0,25	0,3	1,19	0,71

Em negrito linhagens adaptadas com CMCE/CIM ≥ 1 . Média de três experimentos em duplicatas. Nota: ^C: isolados clínicos; ^A: Isolados ambientais; ATCC: *American Type Culture Collection*; CIM – concentração inibitória mínima; AmB – Anfotericina B; CMCE – concentração máxima de crescimento frente à exposição de anfotericina B em meio sólido; ASB – Ágar Sabouraud Dextrose.

Quando analisadas as linhagens expostas à AmB, a CMCE foi 0,5 a 7,28 vezes maior em relação a CIM das linhagens selvagens em meio sólido (Tabela 1). Ressalta-se que duas linhagens de *C. neoformans* (ATCC WM148 e ATCC WM626) e cinco linhagens de *C. gattii* (ATCC 32608; ATCC WM161; ATCC R265; ATCC WM779 e ATCC WM178) conseguiram crescer em concentrações iguais ou superiores à CIM inicial em meio sólido. Essas linhagens foram consideradas adaptadas. *Cryptococcus gattii* ATCC WM161 e ATCC R265 se destacaram, visto que apresentaram razão CMCE/CIM de 2 e 7,28, respectivamente.

Os clones resultantes do processo de evolução adaptativa à AmB não apresentaram alteração na susceptibilidade quando comparados às respectivas linhagens selvagens pelo teste de microdiluição preconizado pela CLSI. Exceto a linhagem de *C. neoformans* ATCC WM148 em inóculo contendo 10^3 UFC/ml, pois estas apresentaram redução da susceptibilidade após exposição a AmB (0,25 - 0,03 µg/ml) (Tabela 1).

As linhagens expostas à AmB foram submetidas a 10 passagens sucessivas em ASD sem a presença de AmB. Assim, as linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* após evolução adaptativa em AmB e 10 passagens em meio sem droga não alteraram a susceptibilidade apresentada inicialmente por suas respectivas linhagens selvagens.

Foram realizados testes anteriores com inóculos menores e observou-se que, com o inóculo de 10^5 UFC/ml, conseguíamos uma melhor quantificação do número de colônias em ágar para realizar o teste de adaptação.

5.2 MORFOMETRIA

As células selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* foram analisadas em relação a suas características morfológicas conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Morfometria das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Linhagens	Espessura da cápsula (µm)	Diâmetro celular (µm)	Relação S/V (µm)	Espessura da cápsula (µm)	Diâmetro celular (µm)	Relação S/V (µm)
<i>C. neoformans</i>	Selvagens			Adaptadas		
ATCC 28957	0,50 ± 0,08*	2,78 ± 0,04*	2,20 ± 0,04*	0,61 ± 0,01*	3,10 ± 0,04*	1,90 ± 0,03
ATCC 24067	0,65 ± 0,01*	2,2 ± 0,04*	2,77 ± 0,05*	0,54 ± 0,01*	3,23 ± 0,03*	1,87 ± 0,02*
ATCC 62066	0,50 ± 0,01*	1,68 ± 0,02*	3,63 ± 0,06*	1,34 ± 0,02*	4,55 ± 0,05*	1,33 ± 0,01*
ATCC H99	0,57 ± 0,01*	1,82 ± 0,03*	3,36 ± 0,06*	0,61 ± 0,09*	2,02 ± 0,03*	3,01 ± 0,05*
ATCC WM148	0,55 ± 0,01*	3,61 ± 0,06*	1,69 ± 0,03*	0,52 ± 0,01*	3,42 ± 0,05*	1,78 ± 0,03*
ATCC WM628	0,47 ± 0,09*	1,84 ± 0,03*	3,33 ± 0,06*	0,41 ± 0,09*	2,48 ± 0,03*	2,44 ± 0,03*
ATCC WM629	0,95 ± 0,03*	3,98 ± 0,07*	1,54 ± 0,02*	0,61 ± 0,01*	2,93 ± 0,04*	2,07 ± 0,03*
ATCC WM626	0,63 ± 0,01*	3,43 ± 0,06	1,78 ± 0,03	0,55 ± 0,01*	3,45 ± 0,04	1,75 ± 0,02
P3	0,61 ± 0,01	1,68 ± 0,02*	3,60 ± 0,04*	0,63 ± 0,02	2,07 ± 0,03*	2,95 ± 0,05*
RN01	0,44 ± 0,09	1,68 ± 0,01*	3,59 ± 0,03*	0,45 ± 0,09	2,71 ± 0,02*	2,21 ± 0,02*
Média aritmética	0,59 ± 0,04	2,47 ± 0,29	2,75 ± 0,27	0,63 ± 0,08	3,00 ± 0,24	2,13 ± 0,17
<i>C. gattii</i>						
ATCC 32608	0,57 ± 0,01*	1,38 ± 0,02*	4,39 ± 0,07*	0,68 ± 0,01*	1,57 ± 0,02*	3,89 ± 0,06*
ATCC WM179	0,65 ± 0,01	1,25 ± 0,02*	4,86 ± 0,07*	0,61 ± 0,01	1,44 ± 0,02*	4,22 ± 0,07*
ATCC WM161	1,14 ± 0,06*	4,55 ± 0,14*	1,38 ± 0,04*	0,66 ± 0,05*	3,78 ± 0,13*	1,86 ± 0,04*
ATCC R265	0,64 ± 0,02*	3,57 ± 0,04*	0,81 ± 0,08*	0,27 ± 0,03*	1,72 ± 0,17*	1,67 ± 0,02*
ATCC WM779	0,75 ± 0,02	1,57 ± 0,03*	3,79 ± 0,06*	0,81 ± 0,02	1,81 ± 0,03*	3,38 ± 0,06*
ATCC WM178	0,62 ± 0,09	1,37 ± 0,02*	4,48 ± 0,08*	0,64 ± 0,01	1,51 ± 0,02*	4,06 ± 0,08*
L28/02	0,66 ± 0,01*	1,68 ± 0,02	3,61 ± 0,05	0,52 ± 0,08*	1,64 ± 0,02	3,72 ± 0,06
L27/01	1,13 ± 0,02*	1,45 ± 0,02*	4,22 ± 0,08*	1,08 ± 0,02*	1,31 ± 0,03*	4,57 ± 0,08*
LMM818	0,72 ± 0,01*	3,77 ± 0,06*	1,62 ± 0,03*	0,63 ± 0,01*	4,11 ± 0,06*	1,49 ± 0,02*
ICB 181	0,73 ± 0,01*	1,67 ± 0,02	3,65 ± 0,06	0,65 ± 0,01*	1,69 ± 0,01	3,57 ± 0,04
Média aritmética	0,76 ± 0,06	2,23 ± 0,39	3,28 ± 0,46	0,65 ± 0,06	2,06 ± 0,32	3,24 ± 0,36

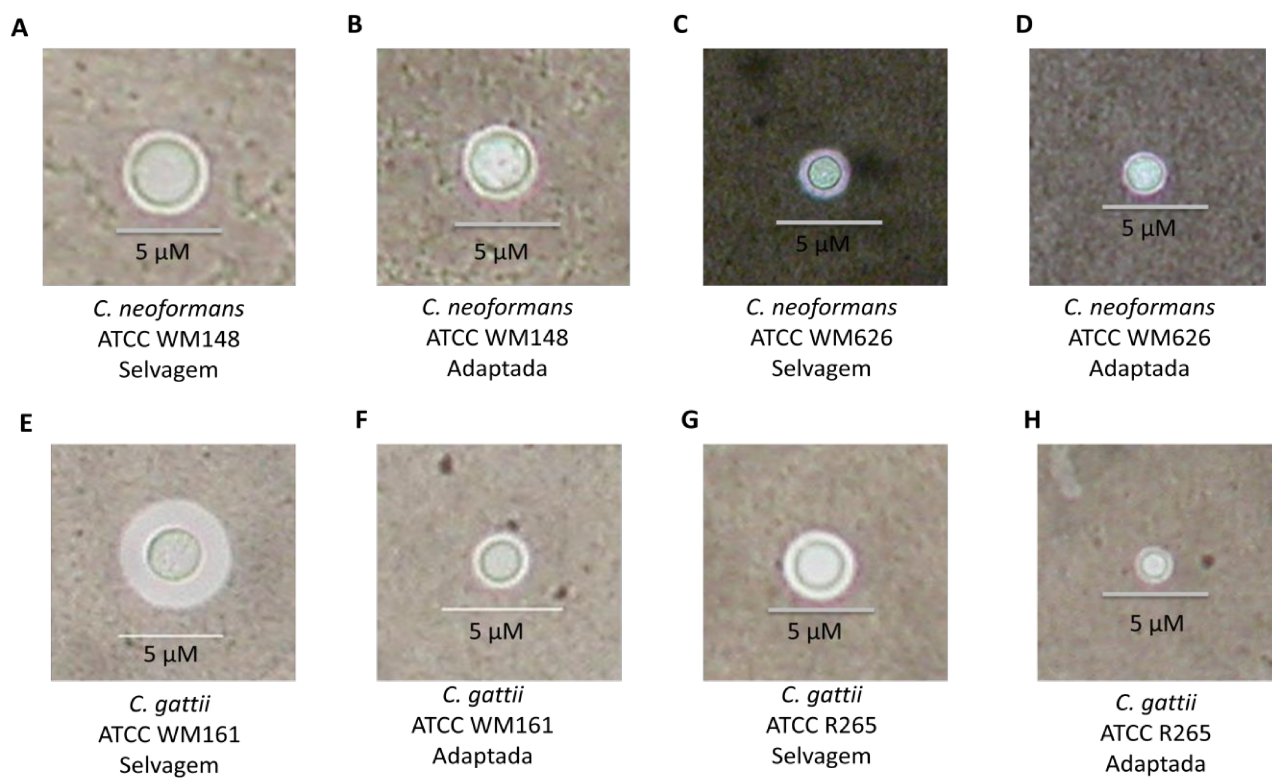
AmB: Anfotericina B; S/V: superfície/volume. Os dados são expressos em µm, apresentando a média ± erro padrão de aproximadamente cinquenta células analisadas. Em negrito as linhagens adaptadas à anfotericina B. Os asteriscos (*) representam a diferença estatística ($p < 0,05$) entre as linhagens adaptadas e selvagens.

As linhagens de *C. neoformans* expostas à AmB apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) de 21,46% do diâmetro celular ($2,47 \mu\text{m} \pm 0,29 - 3,00 \mu\text{m} \pm 0,24$) e uma redução de 22,55% da relação S/V ($2,75 \pm 0,27 - 2,13 \pm 0,17$) em relação às suas respectivas linhagens selvagens. Para as linhagens de *C. gattii* expostas à AmB houve uma redução significativa ($p < 0,05$) de 14,47% da espessura da cápsula ($0,76 \mu\text{m} \pm 0,06 - 0,65 \mu\text{m} \pm 0,06$) e redução de 7,62% do diâmetro celular ($2,23 \mu\text{m} \pm 0,39 - 2,06 \mu\text{m} \pm 0,32$) em relação às suas respectivas linhagens selvagens.

É importante observar que a linhagem de *C. neoformans* ATCC WM148 (CMCE/CIM = 1,0) e as linhagens de *C. gattii* ATCC R265 (CMCE/CIM = 7,28) e ATCC WM161 (CMCE/CIM = 2,0) adaptadas à AmB apresentaram redução da espessura da cápsula, redução do diâmetro celular e aumento da relação S/V ($p < 0,05$). Já a linhagem de *C. neoformans* ATCC WM626 (CMCE/CIM = 1,0) não apresentou diferença significativa para o diâmetro celular e relação S/V.

Na figura 4 são apresentadas células selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* ATCC WM148 (Figuras 4A e 4B, respectivamente) e ATCC WM626 (Figuras 4C e 4D, respectivamente) e de *C. gattii* ATCC WM161 (Figuras 4E e 4F, respectivamente) e ATCC R265 (Figuras 4G e 4H, respectivamente). Assim é possível observar as diferenças morfológicas entre as células, como a espessura da cápsula e diâmetro celular.

Figura 4 - Linhagens selvagens e de seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii*



Representação fotográfica das linhagens de *Cryptococcus*. (A) *Cryptococcus neoformans* ATCC WM148 selvagem e (B) adaptada; (C) *Cryptococcus neoformans* ATCC WM626 selvagem e (D) adaptada; (E) *Cryptococcus gattii* ATCC WM161 selvagem e (F) adaptada; (G) *Cryptococcus gattii* ATCC R265 selvagem e (H) adaptada. Imagens obtidas pelo programa ImageJ 1.40 g. Nota: ATCC: *American Type Culture Collection*.

5.3 CURVA DE MORTE

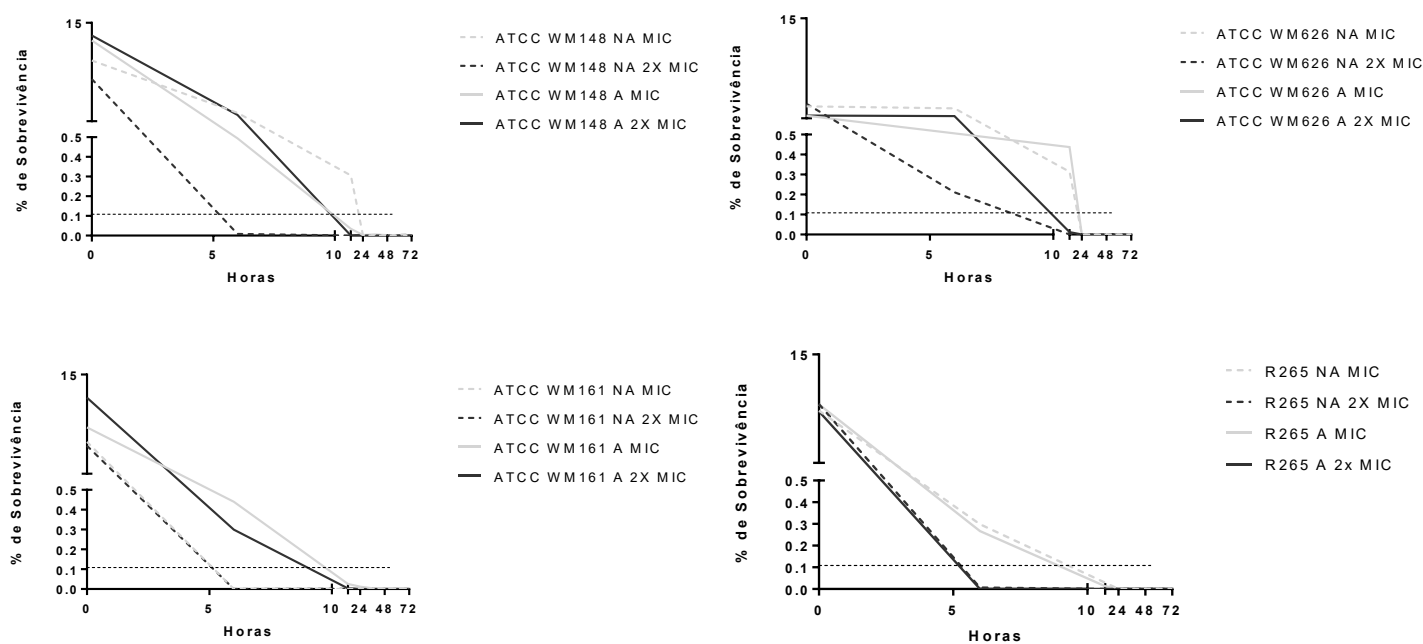
Na figura 5 são apresentadas as curvas de morte das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* ATCC WM 148 e ATCC WM626 e *C. gattii* ATCC WM161 e ATCC R265. As células de *Cryptococcus* foram expostas a CIM e duas vezes o CIM (2xCIM) de AmB durante 72 h. As duas linhagens selvagens de *C. neoformans* apresentaram 0,1% de sobrevivência em aproximadamente 24 h após exposição da CIM. Já as linhagens adaptadas de *C. neoformans* ATCC WM 148 e ATCC WM626 apresentaram redução de 99,9% de sobrevivência após 10 e 23 h de exposição à CIM de AmB, respectivamente. Para *C. gattii*, a redução de 99,9% das células viáveis selvagens ocorreu em tempo menor, em 5 h para a linhagem. As linhagens adaptadas de *C. gattii* ATCC WM161 e ATCC R265 em CIM de AmB, apresentaram 0,1% de sobrevivência em aproximadamente 10 e 9 h, respectivamente, após exposição à AmB.

Comparando o tempo de morte dessas linhagens selvagens com os clones adaptados à AmB observamos um efeito linhagem dependente e por isso não foi possível identificar padrões entre as linhagens. Uma vez que, para *C. gattii* ATCC R265 que apresentou melhor adaptação com razão de CMCE/CIM de 7,28 não houve alteração do tempo de morte da linhagem adaptada em relação à selvagem quando expostas à de CIM ou 2xCIM de AmB. O mesmo comportamento foi observado para *C. neoformans* ATCC WM626 na presença de CIM de AmB, que foi a linhagem com menor adaptação à AmB entre estas quatro linhagens, com razão CMCE/CIM igual a 1. Por outro lado, para *C. gattii* ATCC WM161 com razão CMCE/CIM igual a 2, houve uma diferença no tempo de morte, em que as linhagens adaptadas sobreviveram por um tempo maior quando comparadas com as selvagens, tanto em concentração de CIM quanto 2xCIM. Já *C. neoformans* ATCC WM148, com razão de CMCE/CIM de 1,56, também apresentou diferença no tempo para redução de 99,9% da população, que neste caso as linhagens adaptadas sobreviveram em menor tempo em relação às selvagens.

Quando expostas a 2xCIM de AmB, todas as linhagens selvagens e os clones adaptados à AmB apresentaram redução do tempo de sobrevivência em relação à CIM de AmB, exceto a linhagem selvagem de *C. gattii* ATCC WM161 e a linhagem adaptada de *C. neoformans* ATCCWM148.

Quando comparadas as linhagens selvagens com seus respectivos clones adaptados à AmB em 2xCIM de AmB, as linhagens adaptadas apresentaram aumento no tempo de sobrevivência em relação suas respectivas selvagens, como *C. neoformans* ATCC WM148 (5 h – 10 h), ATCC WM626 (9 h – 11 h), e *C. gattii* ATCC wm161 (5 h – 10 h) respectivamente, exceto para *C. gattii* ATCC R265 que ambas apresentaram cinco horas de sobrevivência.

Figura 5 - Curva de morte das linhagens selvagens e seus clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii*

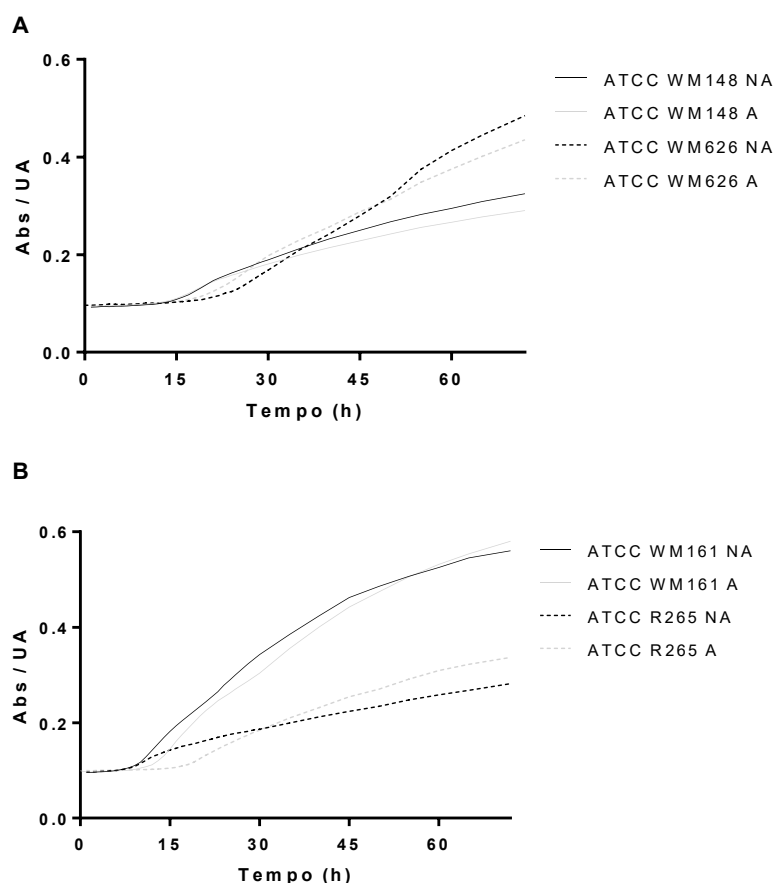


Linhas tracejadas representam as linhagens selvagens e linhas contínuas as linhagens adaptadas. Linhas cinzas representam CIM de AmB e linhas pretas representam 2xCIM de AmB. linha tracejada na horizontal representa redução de 99,9% da população. Linhagens selvagens e adaptadas em CIM e 2xCIM de anfotericina B de *C. neoformans* ATCC WM148 (A), *C. neoformans* ATCC WM626 (B), *C. gattii* ATCC WM161 (C), *C. gattii* ATCC R265 (D).

5.4 CURVA DE CRESCIMENTO

Na figura 6 estão apresentados os gráficos referentes ao crescimento das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii* em relação ao tempo.

Figura 6 - Curvas de Crescimento de Linhagens de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* Selvagens e Adaptadas à Anfotericina B.



Linhas pretas representam as linhagens selvagens e linhas cinzas as linhagens adaptadas. (A) Linhagens selvagens e adaptadas de *C. neoformans* ATCC WM148 e ATCC WM626; (B) Linhagens selvagens e adaptadas de *C. gattii* ATCC WM161 e ATCC R265. Dados apresentados em unidades de absorvância em relação ao tempo, com leituras em comprimento de ondas de 600 nm, obtidos em dois experimentos independentes em quatro replicatas.

Observamos que houve uma redução sem diferença significativa ($p < 0,05$) entre as curvas de crescimento das linhagens selvagens para as linhagens adaptadas como visto pela área sob a curva das linhagens de *C. neoformans* ATCC WM148 ($14,78 \pm 0,07 - 13,77 \pm 0,06$, respectivamente) e ATCC WM626 ($17,33 \pm 0,11 - 16,95 \pm 0,10$, respectivamente) e para *C. gattii* ATCC WM161 ($25,62 \pm 0,14 - 24,77 \pm 0,15$, respectivamente), exceto para *C. gattii* ATCC R265 ($14,00 \pm 0,05 - 14,95 \pm 0,07$, respectivamente) (Tabela 3).

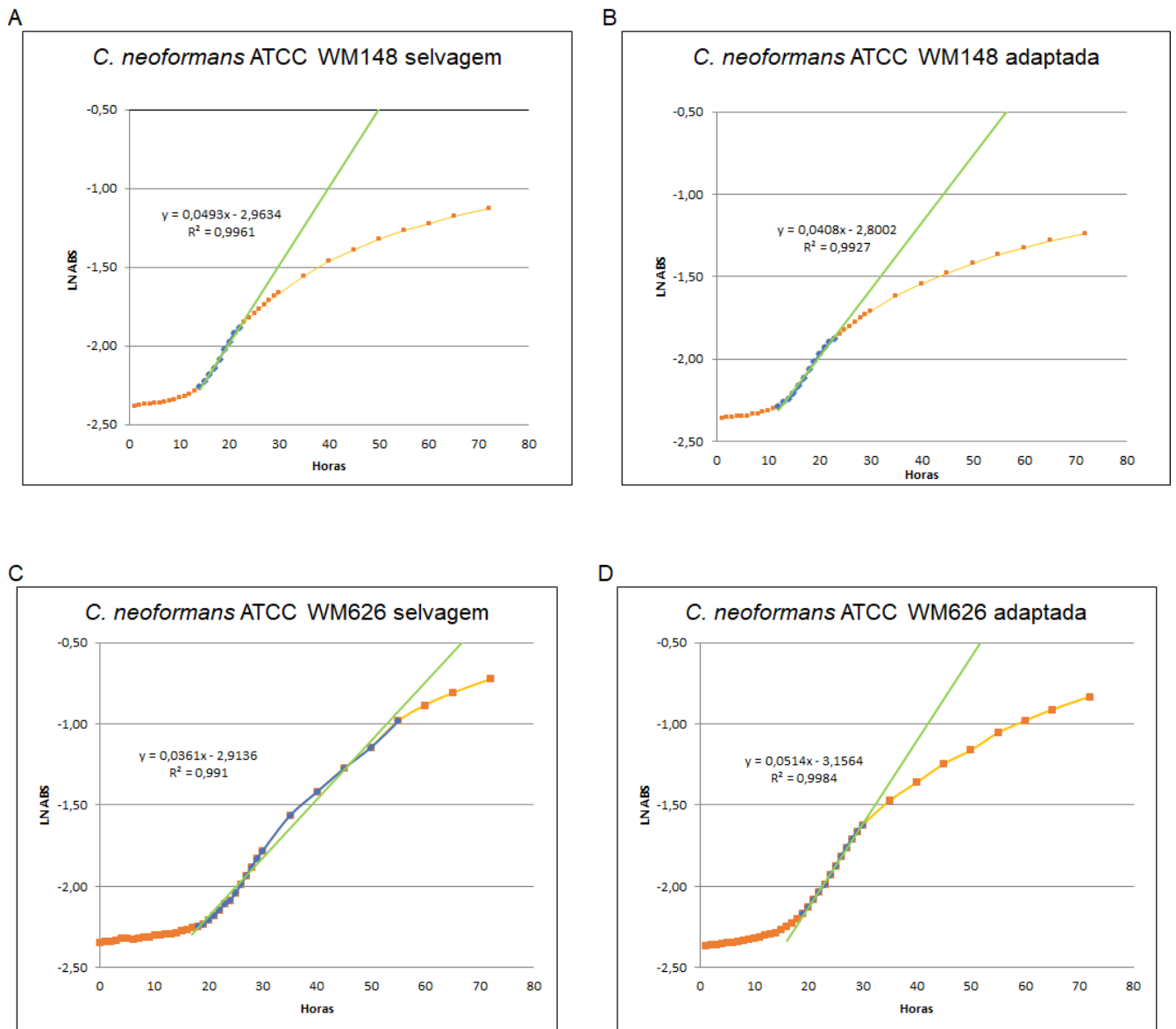
Tabela 3 - Área sob a curva de crescimento das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii*

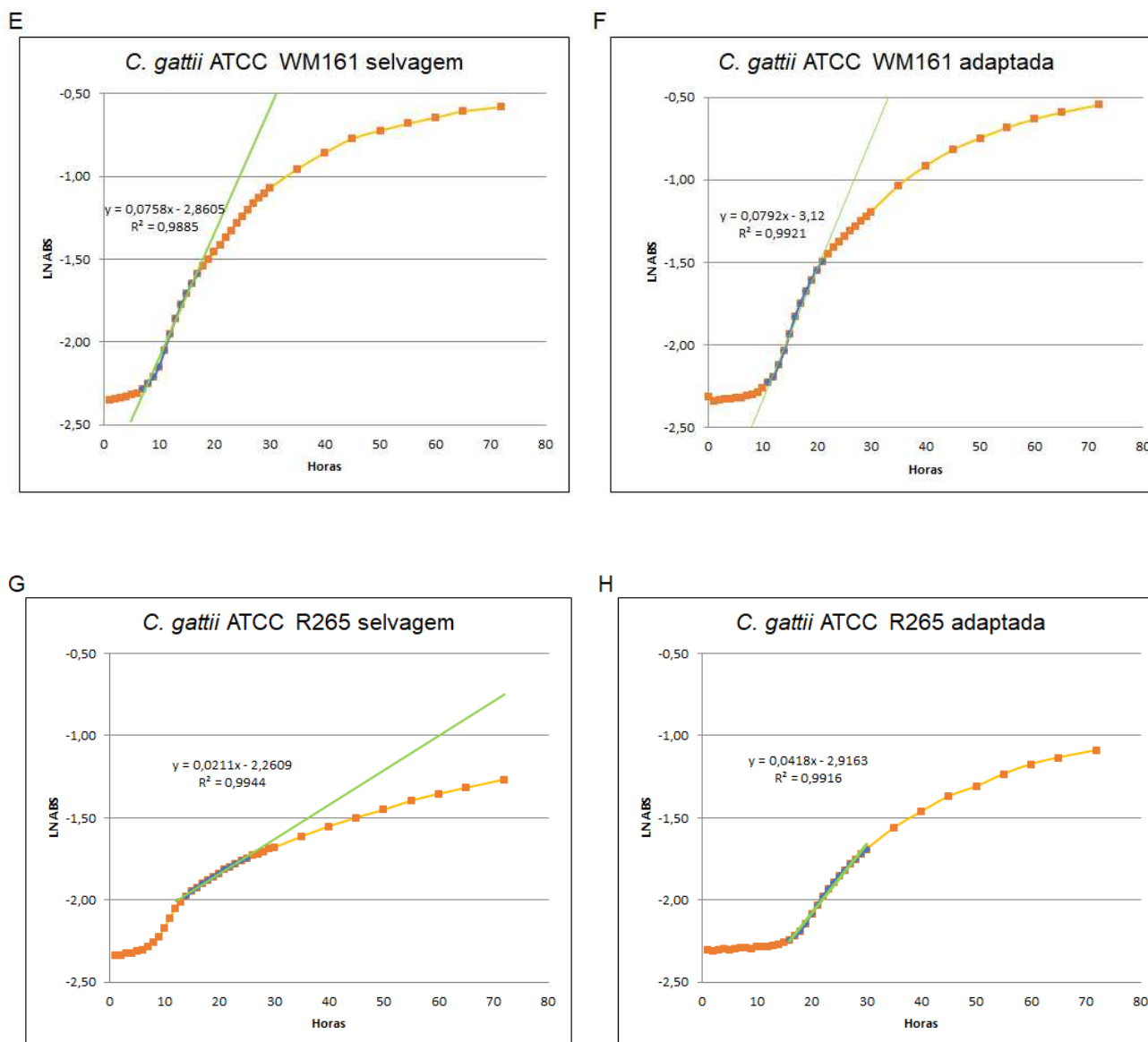
Linhagens	Selvagens	Adaptadas
<i>C. neoformans</i> ATCC WM148	$14,78 \pm 0,07$	$13,77 \pm 0,06$
<i>C. neoformans</i> ATCC WM626	$17,33 \pm 0,11$	$16,95 \pm 0,10$
<i>C. gattii</i> ATCC WM161	$25,62 \pm 0,14$	$24,77 \pm 0,15$
<i>C. gattii</i> ATCC R265	$14,00 \pm 0,05$	$14,95 \pm 0,07$

Dados apresentados em média \pm erro da média, obtidos em dois experimentos independentes em quatro replicatas.

As fases de crescimento foram determinadas a partir dos dados de absorbância em logaritmos neperianos. Com isso, foi criada uma equação da reta para diferenciação da fase de crescimento exponencial, sendo esta fase considerada quando o intervalo determinado apresentava r^2 próximo a 1. Estas fases de crescimento podem ser analisadas na figura 7.

Figura 7 - Curvas de crescimento das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii*





Curvas de crescimento das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* ATCC WM148 (A e B); ATCC WM626 (C e D) e *C. gattii* ATCC WM161 (E e F) ATCC R265 (G e H) em relação ao tempo. Pontos azuis correspondem a fase de crescimento exponencial. Linha contínua verde representa a linha de tendência.

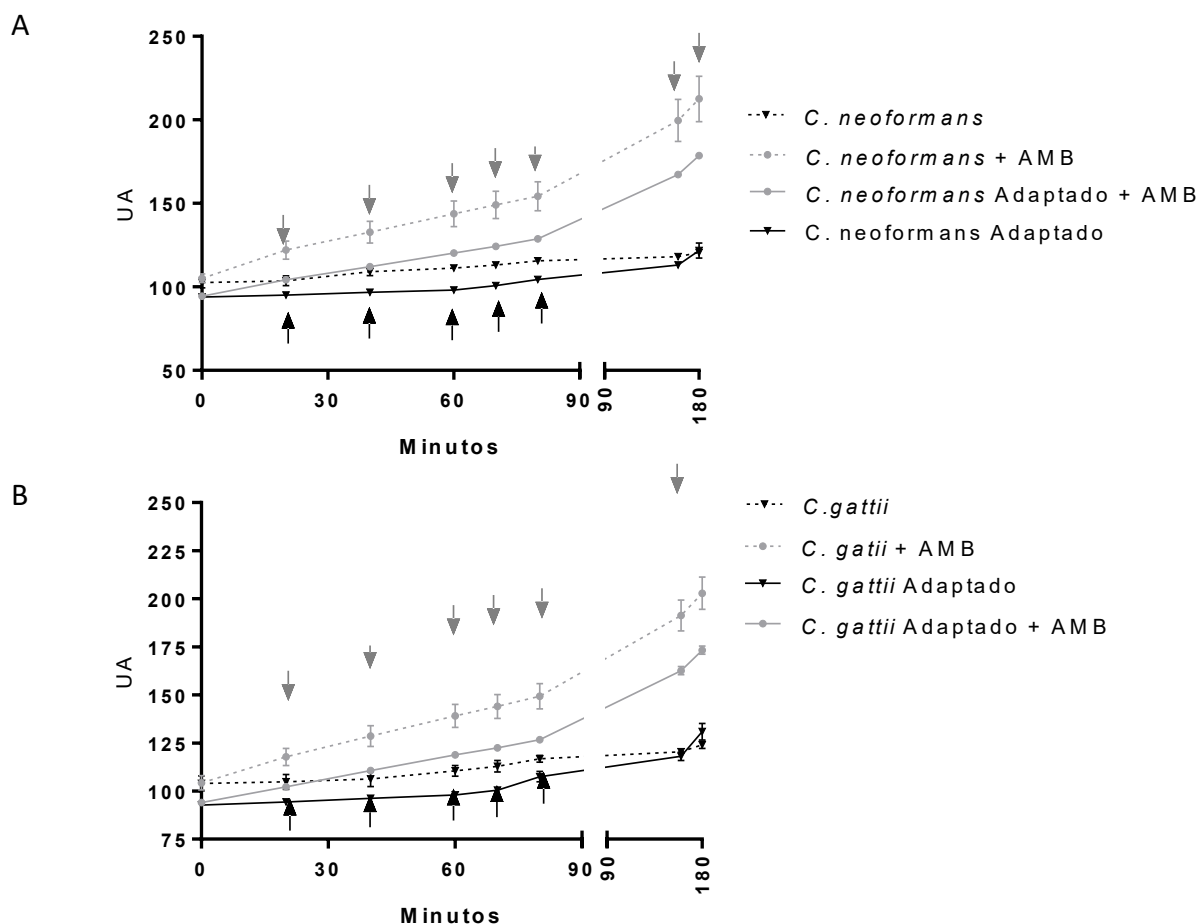
As linhagens adaptadas quando comparadas com suas respectivas linhagens selvagens apresentaram aumento no tempo de duração da fase lag, exceto para a linhagem adaptada de *C. neoformans* ATCC WM148 (12 – 14 h, respectivamente). A duração da fase de crescimento exponencial das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados, apresentaram tempos de duração semelhantes, exceto para a linhagem *C. neoformans* ATCC WM626 (37 – 11 h, respectivamente). Do mesmo modo, essa linhagem selvagem de *C. neoformans* ATCC WM626 apresentou a maior duração da fase de crescimento exponencial (37 h).

5.5 MENSURAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS DESAFIO COM ANFOTERICINA B

Após tratamento com CIM de AmB, que é um agente oxidante e indutora de estresse oxidativo e nitrosativo, as células selvagens e seus clones adaptados à AmB de *C. neoformans* ATCC WM148 e ATCC WM626 aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio após 3 h (152,4 e 128,7 UA, respectivamente) em comparação às células que não receberam o mesmo tratamento (111,7 e 103 UA, respectivamente). Do mesmo modo, as células selvagens e adaptadas de *C. gattii* ATCC WM161 e ATCC R265 que receberam o tratamento, apresentam aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (147,1 e 126,3 UA, respectivamente) em relação às células que não receberam este mesmo tratamento (112,4 e 104,8 UA, respectivamente), como apresentado na figura 8.

As linhagens selvagens tratadas com AmB de *C. neoformans* e de *C. gattii* (152,4 e 147,1 UA, respectivamente), apresentaram maior produção de EROs quando comparadas aos clones adaptados e tratadas com AmB (128,7 e 126,3 UA, respectivamente) (Figuras 8A e 8B). Assim, a produção aumentada de EROs foi independente se a linhagem era selvagem ou adaptada à AmB.

Figura 8 - Produção de espécies reativas de oxigênio por linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii* na presença ou ausência de AmB



Produção de espécies reativas de oxigênio por células de *C. neoformans* (A) e de *C. gattii* (B) selvagens e clones adaptados à AmB tratadas e não tratadas com anfotericina B em relação ao tempo. As curvas em cores cinzas representam as linhagens tratadas com anfotericina B; as curvas pretas as linhagens não tratadas com anfotericina B; as linhas pontilhadas as linhagens selvagens e as linhas contínuas os clones adaptados. As setas para baixo ou para cima representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as linhagens tratadas e não tratadas nos tempos determinados. As linhagens foram tratadas com $0,5 \mu\text{g/ml}$ de anfotericina B para a leitura em 3 h. Dados apresentados em unidades de absorbância em relação ao tempo, com leituras em comprimentos de onda a 485 nm , obtidos em dois experimentos e em quatro replicatas.

5.6 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

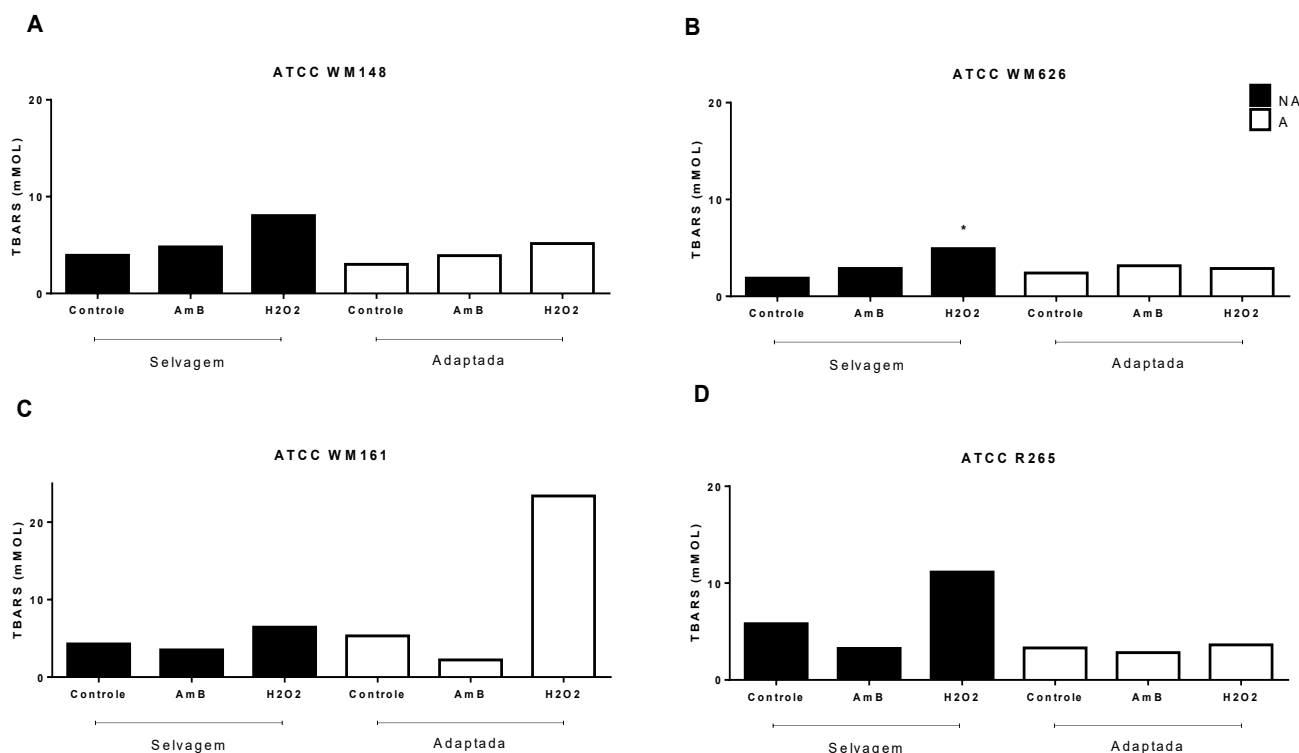
Os dados de peroxidação lipídica das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptadas à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii* tratadas ou não por 3 h com CIM de AmB e CIM de H₂O₂ (Tabela 4) estão apresentados na figura 9.

Tabela 4: CIM de peróxido de hidrogênio para as linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii*

Linhagens	Selvagens (g/ml)	Adaptadas (g/ml)
<i>C. neoformans</i> ATCC WM148	0,0026	0,0026
<i>C. neoformans</i> ATCC WM626	0,0053	0,0026
<i>C. gattii</i> ATCC WM161	0,0053	0,0053
<i>C. gattii</i> ATCC R265	0,0053	0,0053

Concentração inibitória mínima de peróxido de hidrogênio para linhagens selvagens e seus clones adaptados de *Cryptococcus*.

Figura 9 - Peroxidação lipídica de linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii* tratadas ou não com AmB e H₂O₂



Peroxidação lipídica de *C. neoformans* e *C. gattii* em três h de tratamento. Linhagens selvagens e adaptadas de *C. neoformans* ATCC WM148 (A); *C. neoformans* ATCC WM626 (B); *C. gattii* ATCC WM161 (C) *C. gattii* ATCC R265 (D). Barras pretas representam as linhagens selvagens e as barras brancas as linhagens adaptadas. Asteriscos indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. AmB – anfotericina B; H₂O₂ – peróxido de hidrogênio. Valores expressos em mMOL, em experimento realizado em triplicata.

As linhagens selvagens e seus clones adaptados à AmB quando tratadas com CIM de AmB apresentaram maior produção de TBARS em relação às não tratadas, exceto para *C. gattii* ATCC WM161 e ATCC R265. É importante ressaltar que todas as linhagens selvagens e adaptadas tratadas com CIM H₂O₂ apresentaram aumento da produção de TBARS em relação às linhagens não tratadas, porém não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) (Figura 9).

As linhagens adaptadas de *C. neoformans* ATCC WM148 e *C. gattii* ATCC ATCC R265 sem tratamento e as tratadas com AmB ou H₂O₂ tiveram menor produção de TBARS quando comparadas com suas respectivas linhagens selvagens. A linhagem adaptada de *C. neoformans* ATCC WM626 não tratada e

tratada com AmB apresentou maior produção de TBARS, e as tratadas com H₂O₂ apresentaram menor produção que suas respectivas selvagens e com as de mesmo tratamento. Comparando as linhagens adaptadas com suas respectivas selvagens e com as de mesmo tratamento, *C. gattii* ATCC WM161 não tratada e na presença de H₂O₂ apresentou aumento da produção de TBARS, diferentemente da linhagem tratada com AmB que apresentou uma redução, porém não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), como apresentada na figura 9.

De forma geral, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as linhagens selvagens e adaptadas, que não foram tratadas com as que receberam tratamentos com AmB ou H₂O₂, exceto para a linhagem de *C. neoformans* ATCC WM626 selvagem na presença de H₂O₂ em relação ao seu respectivo controle.

5.7 TESTE DE INTERAÇÃO DA AmB COM SEQUESTRADOR DE PEROXINITRITO E COM INIBIDOR DE SUPERÓXIDO DISMUTASE *IN VITRO*

Os índices de concentração inibitória fracionada da interação entre AmB e FeTPPS que é um sequestrador de peroxinitrito e DETC um inibidor de superóxido dismutase (SOD) para cada linhagem selvagem e seus clones adaptados à AmB de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são apresentados na tabela 5.

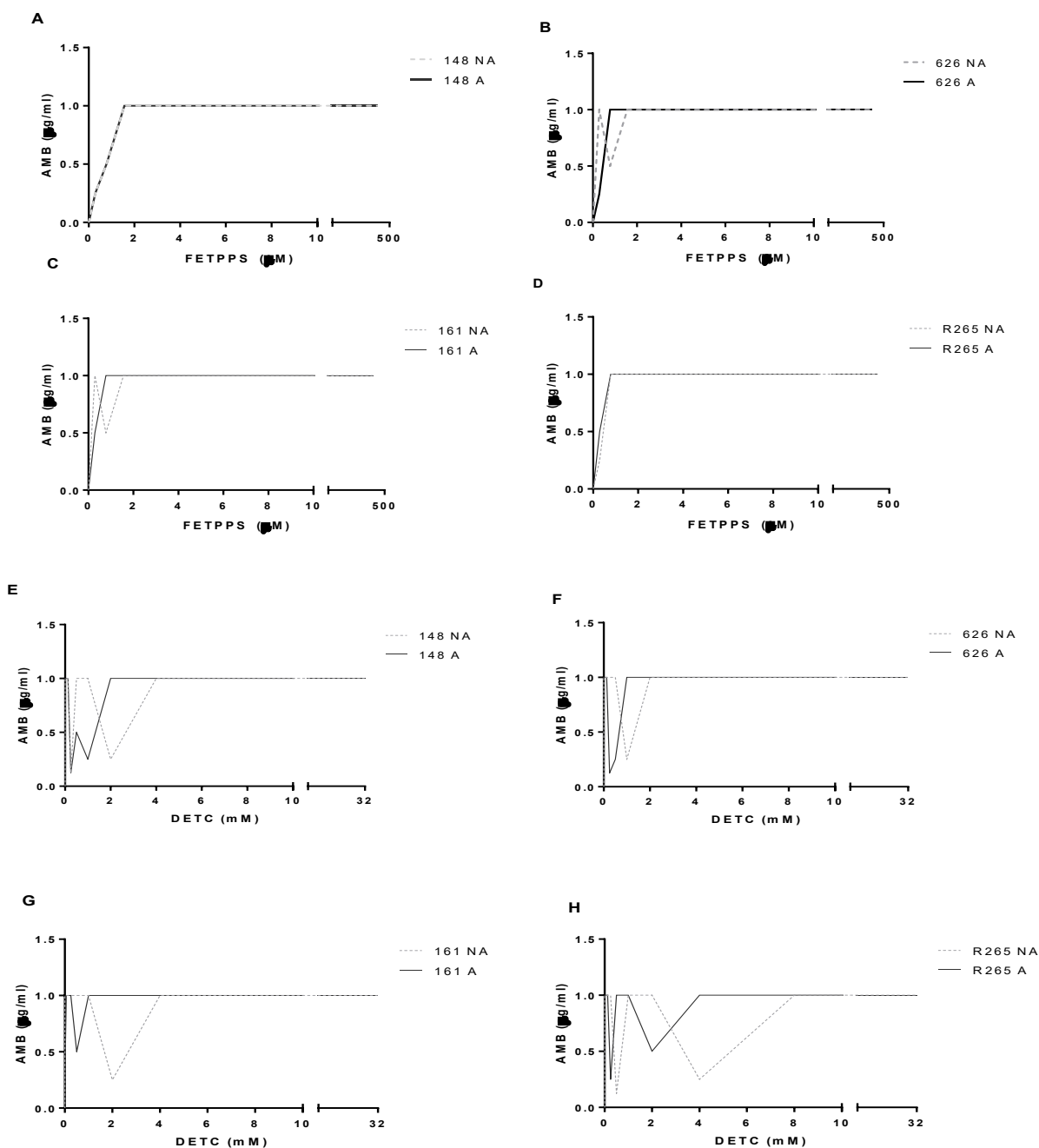
Tabela 5: Índice de concentração inibitória fracionada da interação entre AmB e sequestrador de peroxinitrito e inibidor de superóxido dismutase

Linhagens selvagens	CIM AmB	Média ICIF FeTPPS/Interação	Média ICIF DECT/Interação
<i>C. neoformans</i> ATCC WM148	0,25	2/Indiferente	0,5/Indiferente
<i>C. neoformans</i> ATCC WM626	0,25	2/Indiferente	1/Indiferente
<i>C. gattii</i> ATCC WM161	0,12	4/Indiferente	1/Indiferente
<i>C. gattii</i> ATCC R265	0,12	4/Indiferente	1/Indiferente
<hr/>			
Linhagens adaptadas à AmB			
<i>C. neoformans</i> ATCC WM148	0,5	1/Indiferente	2/Indiferente
<i>C. neoformans</i> ATCC WM626	0,5	0,5/Indiferente	2/Indiferente
<i>C. gattii</i> ATCC WM161	0,5	1/Indiferente	1/Indiferente
<i>C. gattii</i> ATCC R265	0,25	2/Indiferente	2/Indiferente

Interação de AmB, FETPPS e DETC. CIM – Concentração inibitória mínima; ICIF – índice de concentração inibitória fracionada; FeTPPS - 5,10,15,20-tetraquis (4'-sulfonatofenil) porfirinato de ferro III; DETC - dietilditiocarbamato.

A combinação entre a AmB e o sequestrador de peroxinitrito e o inibidor de superóxido dismutase apresentou para todas as linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados à AmB uma interação indiferente entre eles, como apresentado na figura 10.

Figura 10 - Teste de interação da AmB com o sequestrador de peroxinitrito e inibidor de superóxido dismutase em linhagens selvagens e adaptadas à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii*

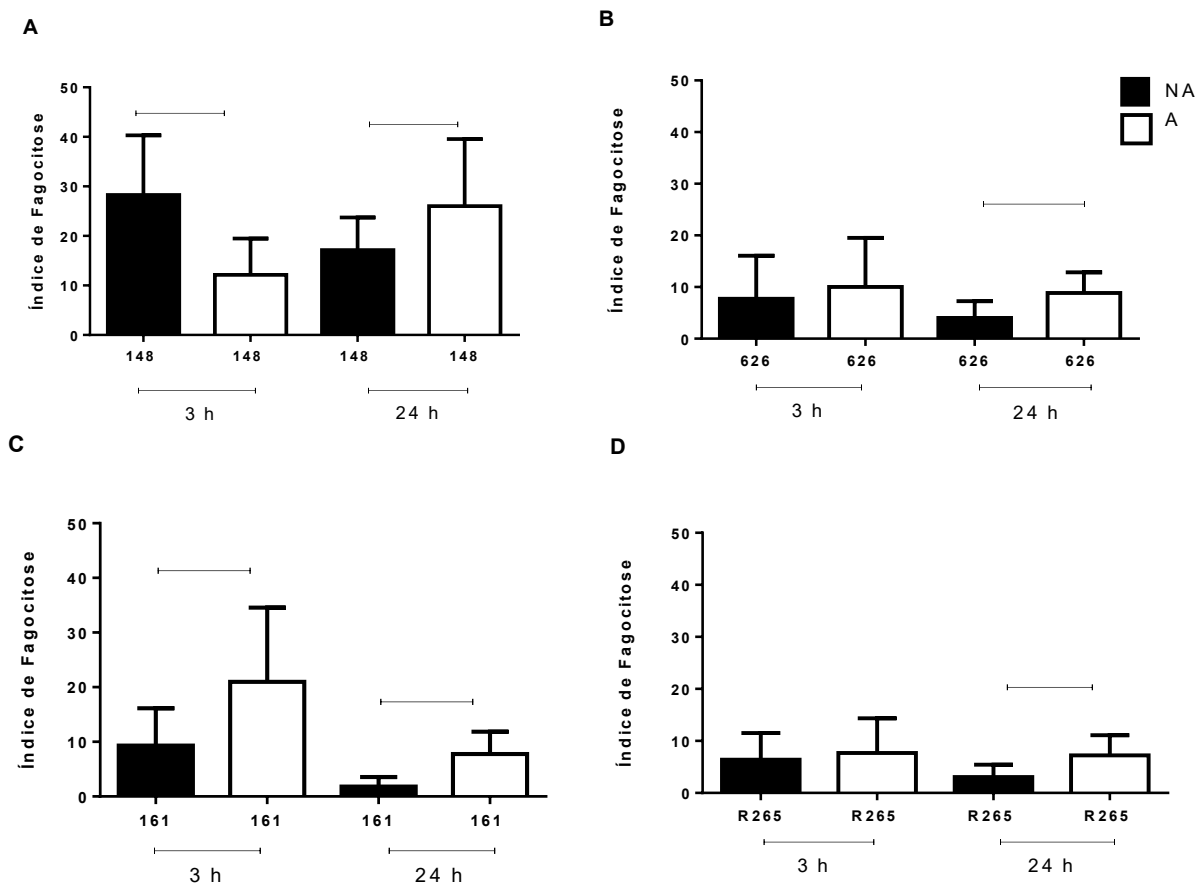


Teste de interação entre AmB, FETPPS e DETC. Linhas tracejadas claras apresentam as linhagens selvagens e as contínuas escuras as adaptadas. Linhagens selvagens e adaptadas de *C. neoformans* ATCC WM148 (A) e ATCC WM626 (B); *C. gattii* ATCC WM161 (C) e ATCC R265 (D); *C. neoformans* ATCC WM148 (E) e ATCC WM626 (F); *C. gattii* ATCC WM161 (G) e *C. gattii* ATCC R265 (H).

5.8 ENSAIO DE FAGOCITOSE

No ensaio de fagocitose foi possível observar um aumento do índice fagocitose dos clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii* no tempo de 24 h em relação a suas respectivas selvagens (Figura 11). No tempo de 3 h, a linhagem de *C. neoformans* ATCC WM148 apresentou uma redução no índice de fagocitose (Figura 11A), diferentemente da linhagem de *C. gattii* ATCC WM161 (Figura 11B) que apresentou aumento. Por outro lado, para as demais linhagens não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) neste tempo.

Figura 11 - Índice de fagocitose das linhagens selvagens e seus respectivos clones adaptados de *C. neoformans* e *C. gattii*

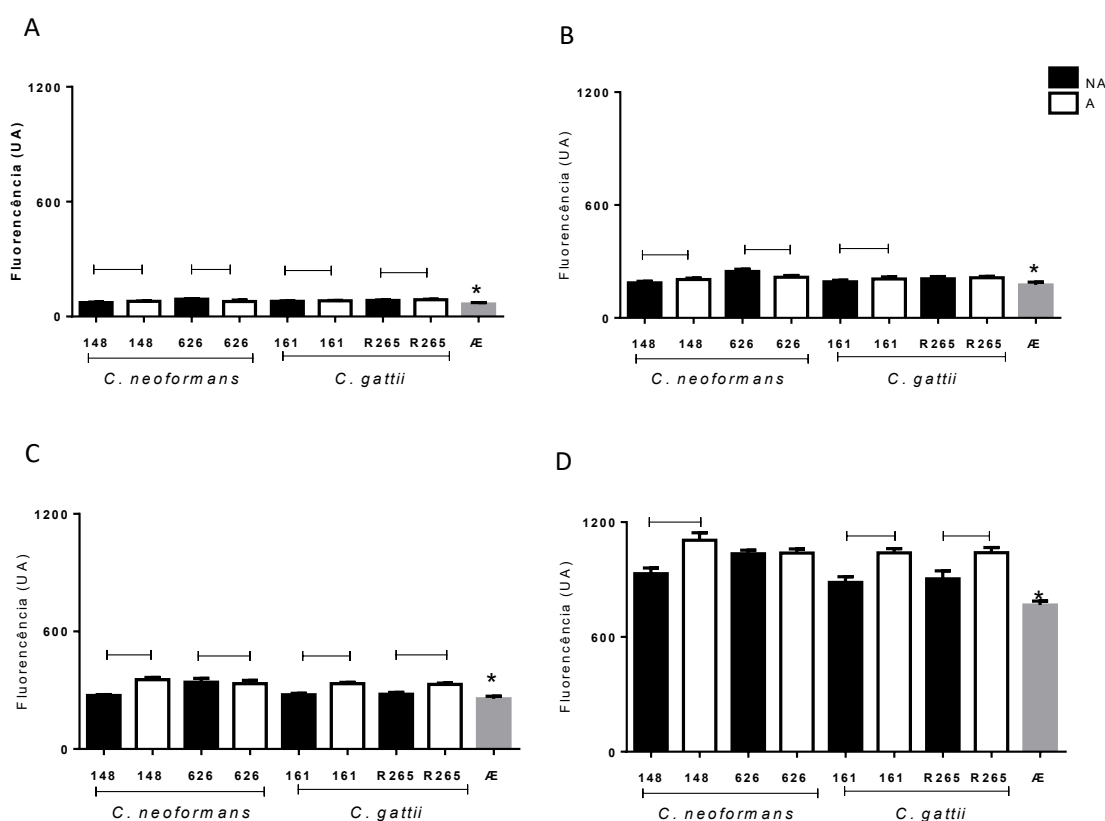


Índice de fagocitose das linhagens selvagens e clones adaptados de *C. neoformans* ATCC WM148 (A), *C. neoformans* ATCC WM626 (B), *C. gattii* ATCC WM161 (C), e *C. gattii* ATCC R265 (D) em 3 e 24 h. As barras pretas indicam as linhagens selvagens e as barras brancas indicam os clones adaptados. As linhas conectoras indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados obtidos em dois experimentos e em quatro replicatas.

5.8.1 Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio e peroxinitrito no ensaio de fagocitose

O estresse oxidativo/nitrosativo gerado durante a fagocitose também foi avaliado após 3 e 24 h de inoculação de células *Cryptococcus* juntamente com macrófagos, conforme mostrados na figura 12.

Figura 12 - Indução da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em macrófagos por linhagens selvagens e seus clones adaptados ÀmB de *C. neoformans* e *C. gattii* em 3 e 24 h de fagocitose



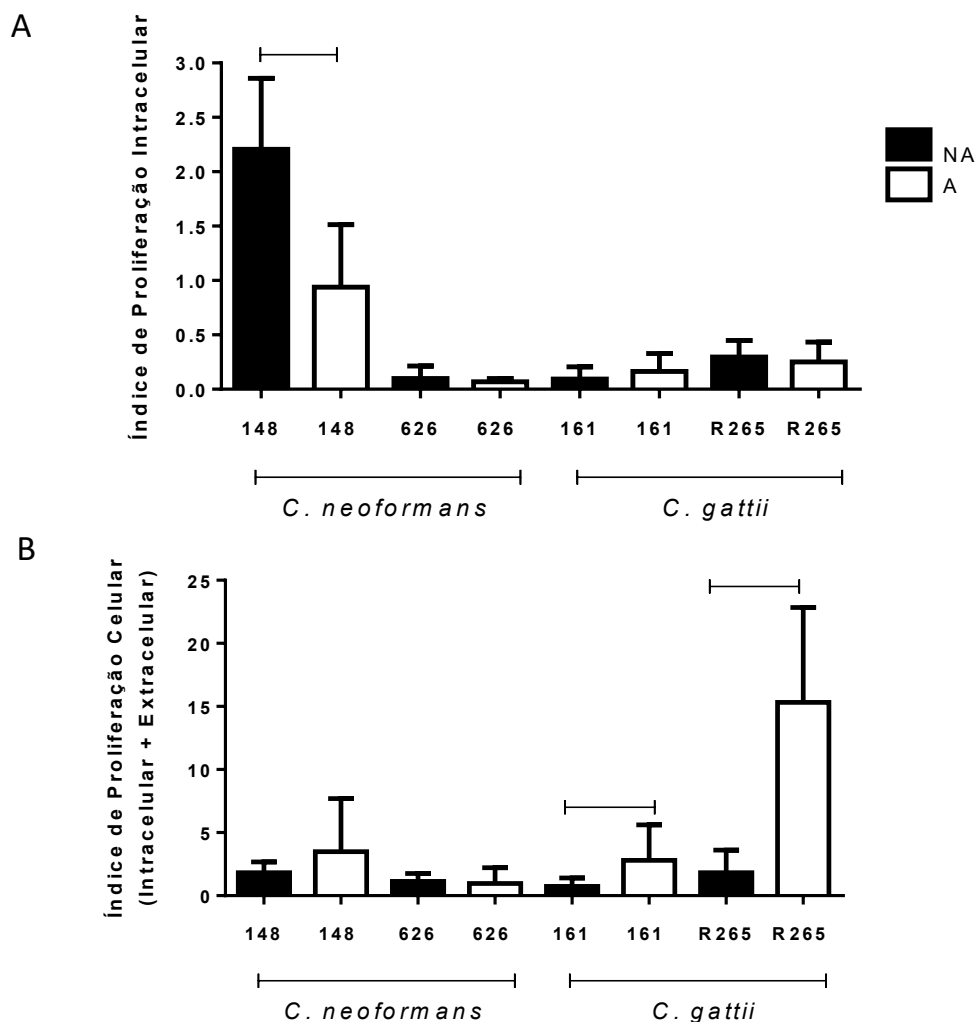
Produção de espécies reativas de oxigênio e peroxinitrito em macrófagos pelas linhagens selvagens e clones adaptadas de *C. neoformans* e *C. gattii* em 3 (A e C, respectivamente) e 24 h (B e D, respectivamente) de fagocitose. As barras pretas indicam as linhagens selvagens, as barras brancas indicam os clones adaptados e as barras cinzas indicam os macrófagos. As linhas conectoras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os clones adaptados e linhagens selvagens. Os asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os macrófagos e todas as linhagens analisadas. Resultados expressos em unidades de absorbância, com leituras em comprimento de onda em 485 nm, obtidos em dois experimentos e em quatro replicatas.

Os resultados demonstraram que os macrófagos desafiados com os clones adaptados tiveram maior produção de ERO (Figura 12A) e PRN (Figura 12C) que os macrófagos desafiados com as linhagens selvagens no tempo de 3 h, com exceção da linhagem de *C. neoformans* ATCC WM626. No tempo de 24 h, os macrófagos desafiados com os clones adaptados de *C. neoformans* ATCC WM148, *C. gattii* ATCC WM161 e ATCC R265 tiveram maior produção de PRN quando comparados aos desafiados com as respectivas células selvagens (Figura 12D). O mesmo aconteceu para ERO nas linhagens *C. neoformans* ATCC WM148 e *C. gattii* ATCC WM161 (Figura 12B). Já os macrófagos desafiados com os clones da *C. neoformans* ATCC WM 626 continuaram a produzir menor quantidade de ERO que aqueles desafiados com as células selvagens (Figura 12B).

5.8.2 Proliferação Celular

Na figura 13 são representados os índices de proliferação de *C. neoformans* e *C. gattii* após 24 h de fagocitose. O índice de proliferação intracelular é a proliferação somente dentro das células de macrófagos, já a proliferação celular, considera a proliferação intra e extracelular das células de macrófagos.

Figura 13 - Índice de proliferação das linhagens selvagens e seus clones adaptados à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii* após 24 h de fagocitose



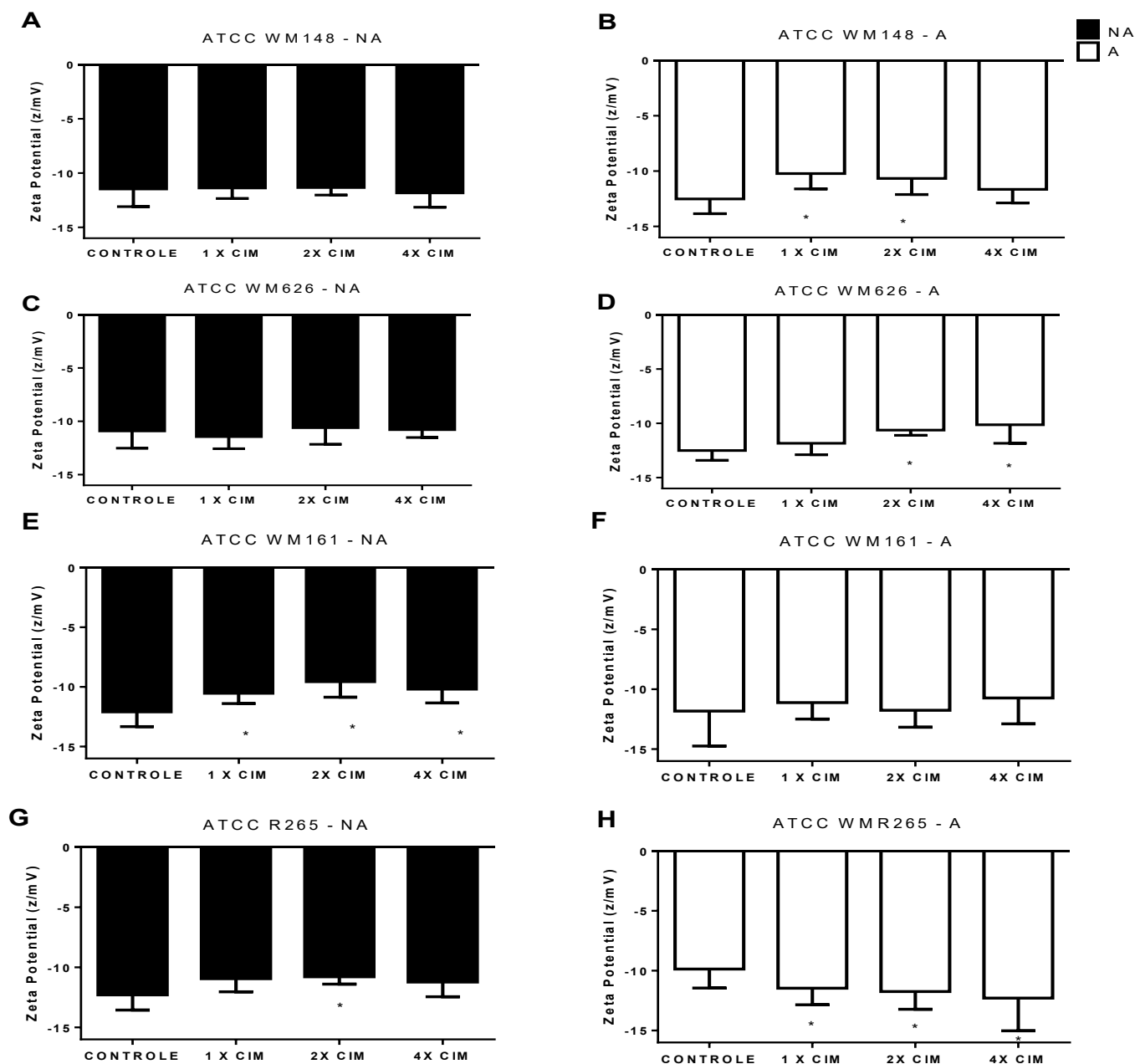
Índice de proliferação intracelular (A) e índice de proliferação celular (B) de *C. neoformans* ATCC WM148 e ATCC WM626 e *C. gattii* ATCC WM161 e ATCC R265 em 24 h de fagocitose. As barras pretas indicam as linhagens selvagens e as barras brancas indicam os clones adaptados. As linhas conectoras indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Resultados obtidos em dois experimentos e em quatro replicatas.

Quando analisado os índices de proliferação intracelular das linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*, observa-se que apenas os clones adaptados à AmB de *C. neoformans* ATCC WM148 apresentaram uma redução da proliferação em relação à linhagem selvagem (Figura 13A). Por outro lado, apenas os clones adaptados à AmB de *C. gattii* apresentaram maior proliferação celular que suas respectivas células selvagens (Figura 13B).

5.9 ANÁLISE DE POTENCIAL ZETA

O potencial zeta das células selvagens e seus respectivos clones adaptadas a AmB de *C. neoformans* e *C. gattii* são apresentados na figura 14.

Figura 14 - Análise de potencial zeta de células selvagens e adaptadas à AmB de *C. neoformans* e *C. gattii*



Análise de potencial zeta de *C. neoformans* e *C. gattii* em concentrações crescentes de AmB. (A) linhagem de *C. neoformans* ATCC WM148 selvagem e (B) adaptada. (C) *C. neoformans* ATCC WM626 selvagem e (D) adaptada. (E) *C. gattii* ATCC R265 selvagem e (F) adaptada. (G) *C. gattii* ATCC WM161 não adaptada e (H) adaptada. Barras pretas representam as linhagens selvagens e as barras brancas as linhagens adaptadas. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. Valores expressos em z/mV, em experimento realizado em triplicata.

Todas linhagens de *C. neoformans* selvagens quando expostas a concentrações crescentes de AmB não apresentaram alterações significativas ($p < 0,05$) no potencial elétrico da membrana. Já as linhagens adaptadas à AmB de *C. neoformans* apresentaram uma redução da magnitude negativa do potencial elétrico em concentrações crescentes de AmB, com diferença significativa ($p < 0,05$) como mostrado na figura 14.

Cryptococcus gattii ATCC WM161 selvagem apresentou redução do potencial elétrico quando exposto as diferentes concentrações de AmB avaliadas (Figura 14E), diferentemente do seu respectivo clone adaptado à AmB ($p < 0,05$) (Figura 14F). *Cryptococcus gattii* ATCC R265 selvagem apresentou redução da magnitude elétrica negativa apenas quando adicionada a concentração de 2xCIM (Figura 14G), porém na linhagem adaptada à AmB houve aumento do potencial elétrico negativo celular em todas as concentrações de AmB avaliadas (Figura 14H). Assim, pode ser que a adaptação a AmB sofrida por esta linhagem, que apresentou a maior razão de CMCE/CIM pode ter influenciado na cápsula e potencial elétrico destas células.

6 DISCUSSÃO

As três principais famílias de antifúngicos utilizadas no tratamento clínico de diversas infecções fúngicas são compostas pelos polienos, azóis e equinocandinas (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al. 2015). O uso indiscriminado destes, induziram uma pressão seletiva sobre as cepas e assim, emergência da resistência por desenvolvimento de uma resistência secundária ou uma substituição de espécies susceptíveis por resistentes (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al. 2015).

Os métodos de microdiluição são realizados devido a necessidade de vigilância da resistência antifúngica, principalmente pelo aumento de cepas resistentes associadas à falha do tratamento. Dessa forma, a CLSI M27-A3 indica para AmB inibição de 100% do crescimento fúngico visível no teste de susceptibilidade antifúngica (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al, 2015). Este trabalho foi realizado seguindo este parâmetro para determinação da CIM de AmB, de acordo com a CLSI M27-A3. Observamos que após a adaptação à AmB, as linhagens apresentavam a mesma susceptibilidade inicial no teste de microdiluição. O mesmo ocorreu no teste de susceptibilidade em ágar, quando as linhagens expostas foram cultivadas 10 vezes consecutivamente em meio sem droga.

Neste trabalho observamos que a CIM para as linhagens selvagens variou de 0,12 e 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Semelhantemente, Carneiro et al. (2019), ao analisar 13 linhagens de *C. gattii* observaram que no teste de microdiluição em caldo com inóculo em 1 a 5×10^3 UFC/ml em AmB, os valores de CIM variaram de 0,25 a 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Após a adaptação das linhagens selvagens à AmB, seus clones adaptados apresentaram a mesma susceptibilidade inicial. O mesmo foi observado por Ferreira et al. (2015), que identificaram e classificaram o nível de heterorresistência de linhagens de *C. gattii* em concentrações crescentes de itraconazol e após 10 passagens em meio sem droga, observaram que as linhagens apresentavam a mesma susceptibilidade inicial. Do mesmo modo, Varma; Kwon-Chung (2010), que após adaptação de linhagens de *C. gattii* em fluconazol, e após passagens sucessivas em meio sem droga, estas retornaram à susceptibilidade anterior.

Mecanismos de microevolução permitem que microrganismos desenvolvam uma capacidade de se adaptarem a diferentes condições adversas em um curto espaço de tempo (CHEN et al. 2017). Esses mecanismos são estimulados por mudanças do

ambiente, conduzindo a patogênese e alteração do nicho ecológico desses microrganismos (DAMBUZA et al. 2018). No curso de uma infecção, a microevolução pode selecionar subpopulação de uma população, fazendo com que essa subpopulação adquira novos traços que aumentem a virulência. Essas alterações podem ser decorrentes de mutações já existentes ou adquiridas em resposta ao ambiente, pelo processo de evolução adaptativa (BOYCE et al, 2017). Entender esses fatores, sua influência na adaptação ao hospedeiro e a redução da susceptibilidade aos medicamentos se destacam como objetivos para busca de novas estratégias e/ou medicamentos para estas infecções (CHEN et al. 2017). Neste estudo observamos que as 10 linhagens de *C. neoformans* e 10 linhagens de *C. gattii* após evolução adaptativa obtiveram em média uma razão de CMCE/CIM de 1,2 em meio ASD. No entanto, a susceptibilidade foi mantida após a evolução adaptativa, confirmada pelo teste de susceptibilidade.

É importante observar que os resultados encontrados no ensaio de tempo de curva de morte foram linhagem-dependente tanto para as linhagens selvagens como para as linhagens adaptadas. Na curva de tempo de morte pode ser definido o tempo de duração mínimo suficiente para reduzir 99 % da população microbiana em um tratamento fungicida (BRAUNER et al. 2016). Neste trabalho, as linhagens quando submetidas em concentração de CIM de AmB sua ação fungicida foi em aproximadamente entre cinco e 24 h após exposição. Pappalardo et al. (2009) analisaram 40 isolados de *C. neoformans* obtidos de 20 pacientes com SIDA e meningite criptocócica. Estes isolados foram submetidos a 1 µg/ml de AmB e sua atividade fungicida ocorreu entre seis e 48 h após incubação, tempo semelhante ao encontrado na curva de morte do presente trabalho.

Na curva de crescimento das linhagens estudadas observamos algumas variações no tempo de duração das fases de crescimento. A fase lag é importante para adaptação, síntese de enzimas e metabólitos necessárias ao meio no qual as células estão inseridas (MADIGAN; BROCK, 2016). Nesta fase observamos que as linhagens que passaram pelo processo de evolução adaptativa à AmB aumentaram o tempo necessário para essa adaptação em relação às linhagens selvagens de *C. neoformans* ATCC WM626 (19 – 18 h) e *C. gattii* ATCC WM161 (11 – 7 h) e ATCC R265 (16 – 14 h), respectivamente, exceto a linhagem de *C. neoformans* ATCC WM148 (12 – 14 h). A fase exponencial é influenciada por características do meio na

qual as células estão inseridas, assim como suas características próprias. Células menores apresentam uma vantagem metabólica significativa em seu crescimento (MADIGAN; BROCK, 2016). Assim, as linhagens que apresentaram os maiores tempos de duração da fase exponencial (37 – 14 h, respectivamente) foi a linhagem selvagem de *C. neoformans* ATCC WM626 e a linhagem adaptada *C. gattii* ATCC R265, que foram as células com menores diâmetro vistas pela morfometria ($3,43 \mu\text{m} \pm 0,06$ e $1,72 \mu\text{m} \pm 0,17$, respectivamente), as demais linhagens apresentaram tempo de duração similares.

Um dos principais fatores de virulência de leveduras é a presença de cápsula. Esta tem a capacidade de conferir resistência contra estresses, como a desidratação, espécies reativas e compostos antimicrobianos (ZARAGOZA et al. 2011; ZARAGOZA et al. 2008). Assim, a cápsula pode interferir na resposta imune do hospedeiro, devido suas propriedades antifagocíticas. No curso de uma infecção, as células de *C. neoformans* podem sofrer alterações no tamanho total de suas células. Em uma célula normal de *C. neoformans in vitro*, o tamanho celular varia de 5 a 7 μm , no entanto durante a infecção, são encontradas leveduras que variam de 1 a 100 μm de tamanho (ZARAGOZA et al. 2011). Neste trabalho, após adaptação ao estresse com AmB, foi observado redução da espessura da cápsula e aumento da relação superfície e volume, com exceção da linhagem de *C. neoformans* ATCC WM626, possivelmente por ser a linhagem que apresentou menor adaptação à AmB. Assim, células menores se adaptam mais rapidamente a mudanças de condições ambientais em comparação às células maiores (FERREIRA et al. 2015). Comparadas com as células maiores, estas apresentam maior capacidade em estabelecer trocas de nutrientes e também produtos de excreção. Isso confere uma vantagem metabólica significativa que pode afetar o crescimento e outras propriedades (MADIGAN; BROCK, 2016).

Quando analisada a capacidade de *Cryptococcus* produzirem ERO frente a AmB, que é uma indutora de estresse oxidativo e nitrosativo (FERREIRA et al. 2013), percebe-se que os clones adaptados apresentaram menor produção de ERO quando comparada às selvagens. Isso pode ter ocorrido devido a adaptação a esse agente oxidante. Ferreira et al. (2013), após tratar a linhagem de *C. gattii* 32068 com a CIM de AmB, observaram que este tratamento resultou em uma produção significativamente aumentada de ERO. Sendo assim, é possível que estas células

tenham aumentado sua capacidade antioxidante, o que possibilitou sobrevivência aos ERO (FERREIRA et al. 2013).

A combinação de compostos com antifúngicos teve por objetivo observar se houve uma interação sinérgica, antagônica ou indiferente entre eles. Assim, combinamos FeTPPS que é um sequestrador de peroxinitrito e DETC um inibidor de superóxido dismutase (SOD) com a AmB. Isso possibilitou ter uma ideia da influência das enzimas antioxidantes na adaptação dessas linhagens submetidas ao teste com AmB (FERREIRA et al. 2013). Conforme resultados obtidos, as linhagens selvagens e adaptadas de *C. neoformans* e *C. gatti* apresentaram indiferença diante da interação com a AmB. Possivelmente, quando combinadas com o inibidor de superóxido dismutase e o sequestrador de peroxinitrito e com a AmB estas linhagens apresentaram outros mecanismos antioxidantes que compensaram a ação e não interferiram com a ausência da SOD.

As células de *Cryptococcus* adaptadas a AmB, quando tratadas com CIM de AmB e H₂O₂ não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na peroxidação lipídica em relação ao controle, exceto a linhagem de *C. neoformans* ATCC WM626 na presença de peróxido de hidrogênio. Com o objetivo de avaliar a formação de TBARS, Alves et al. (2017) utilizou o eugenol para tratamento de linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii* e observaram altos níveis de TBARS, indicando danos aos lipídios. Já Ferreira et al. (2015) ao induzir heterorresistência em linhagens de *C. gattii* observou que as linhagens heterorresistentes tinham uma produção de TBARS reduzida em relação às selvagens. Assim, as células heterorresistentes se adaptaram ao estresse oxidativo causado pelo itraconazol, sobreviveram a este estresse e à peroxidação lipídica pela ativação de sua maquinaria antioxidante (FERREIRA et al. 2015). Provavelmente, o mesmo pode ter ocorrido neste trabalho, em que as células adaptadas ao estresse oxidativo causado pela AmB, pode ter acionado sua maquinaria antioxidante e sobrevivo a este estresse e a peroxidação lipídica.

É interessante notar que após ser fagocitado pelas células fagocíticas, o *Cryptococcus* induz mecanismos que o possibilita escapar destas células. Tem-se postulado que esse mecanismo de escape possa ocorrer por algum desses mecanismos. Por lise das células dos fagócitos (MAY et al. 2016), quando há proliferação da célula fúngica e ocorre lise da membrana celular do fagócito (MA et

al. 2006). Por expulsão não lítica dos fungos, conhecido como vomocitose ou extrusão, que induz a fusão da membrana fagossômica com a membrana plasmática, resultando na expulsão dessas células do fagócito (MAY et al. 2016) e ambas células permanecem vivas (MA et al. 2006). Outro mecanismo é por transferência lateral direta das leveduras para outras células do hospedeiro (MAY et al. 2016).

Assim, de forma geral observamos que as células adaptadas apresentaram uma redução da espessura da cápsula e do diâmetro celular. Com isso, houve uma redução do potencial elétrico negativo na superfície dessas células na presença do estresse causado pela AmB em algumas concentrações. E estas células que apresentaram maior índice de fagocitose, possivelmente foi decorrente da redução da repulsão eletrostática entre essas células e os macrófagos. De maneira geral, os macrófagos que internalizaram células adaptadas, apresentaram maior produção de ERO e PRN para destruição destas células que os macrófagos que internalizaram as células selvagens, sugerindo maior resistência destas células ao estresse. Em ambas as espécies, as células adaptadas não apresentam diferença significativa no índice de proliferação intracelular. No entanto, as células de *C. gattii* apresentaram maior índice de proliferação celular, sendo possível inferir neste caso um mecanismo de expulsão não lítica para explicar parcialmente os resultados encontrados, onde as leveduras de *Cryptococcus* conseguiram escapar da destruição pelos macrófagos e proliferar externamente.

Este mecanismo de expulsão não lítica, Segundo Alvarez; Casadevall, (2006), é desencadeado por componentes microbianos, por ações dirigidas pelas células fúngicas e não pelos macrófagos, e alguns aspectos necessários do hospedeiro. Como a presença de cápsula, produção de fosfolipase B e urease são fatores das células fúngicas e a integridade da membrana, a acidez dos fagossomos, o citoesqueleto de actina, produção de interferon tipo I, IL-4, IL-13 são fatores do hospedeiro que podem alterar a taxa de expulsão não lítica (SEOANE et al. 2019).

As células de *Cryptococcus* apresentam carga negativa devido a presença da cápsula e melanina (NOSANCHUK et al. (1999); FERREIRA et al. (2015); ALVES et al. (2017). Neste trabalho, sugerimos que as células em contato com a AmB reduziram seu potencial elétrico negativo, e ao reduzirem a espessura da cápsula também influenciou nesta redução de potencial elétrico e provavelmente houve

menor repulsão eletrostática entre essas células e macrófagos, mostrando um maior índice de fagocitose para as células adaptadas no tempo de três e 24 h, exceto para linhagem de *C. neoformans* ATCC WM148 em três h de fagocitose. O mesmo perfil foi descrito por Ferreira et al. (2015) que após identificar níveis de heterorresistência de *C. gattii* ao itraconazol, observou que a magnitude da carga negativa foi reduzida nas células heterorresistentes e menor repulsão eletrostática entre essas células e macrófagos. Da mesma forma, Santos et al. (2014) observou que a linhagem de *C. gattii* 27/01 após passagens em concentrações crescentes de fluconazol apresentou redução da espessura da cápsula, redução do potencial elétrico negativo e provável redução da repulsão eletrostática e com isso aumentou a fagocitose destas células.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho com os experimentos realizados, foi possível identificar algumas alterações morfofisiológicas ocorridas nas células das linhagens de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* após adaptação à anfotericina B. Possivelmente a adaptação a este antifúngico, que é um indutor de estresse oxidativo e nitrosativo proporcionou à estas células meios para sobreviver a este ambiente de estresse. Assim, de maneira geral estas células que apresentaram crescimento acima da concentração de CIM que foram consideradas como adaptadas, apresentaram alterações em sua morfometria, produção de espécies reativas de oxigênio e no índice de fagocitose, sendo estes alguns dos possíveis meios de adaptação ao estresse. A continuidade deste estudo, com essa adaptação *in vivo* poderia elucidar os possíveis mecanismos de adaptação ao antifúngico e possibilitar observar as alterações que possam ocorrer durante uma infecção com essas linhagens que suportam e sobrevivem ao estresse causado pela AmB.

8 REFERÊNCIAS

- ACHESON, E. S. et al. Searching for clues for eighteen years: Deciphering the ecological determinants of *Cryptococcus gattii* on Vancouver Island, British Columbia. **Med Mycol**, v. 56, n. 2, p. 129-144. 2018.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. et al. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 57, n. 19, p. 57-64, 2015.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 12, p. 1173-1185. 2015.
- ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagosome Extrusion and Host-Cell Survival after *Cryptococcus neoformans* Phagocytosis by Macrophages. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2161–2165, 2006.
- ALVES, J. C. O. et al. Eugenol induces phenotypic alterations and increases the oxidative burst in *Cryptococcus*. **Frontiers Microbiol**, v. 8, n. 2419, p. 1-12, 2017.
- 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.
- BASTOS, R. W. et al. Environmental Triazole Induces Cross-Resistance to Clinical Drugs and Affects Morphophysiology and Virulence of *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 62, n. 1, 2018.
- BIVANCO, F. C.; MACHADO, C.d'Aparecida S.; MARTINS, E. L. Criptococose cutânea. **Arq Med ABC**, v. 31, n. 2, p. 102-109, 2006.
- BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive Immunity. **J. Allergy Clin. Immunol**, v. 125, n. 2, p. 33-40.
- BOYCE, K. J. et al. Mismatch Repair of DNA Replication Errors Contributes to Microevolution in the Pathogenic Fungus. **MBio**, v. 8, n. 3, 2017.
- BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 14, p. 320-330, May 2016.
- CARNEIRO, H. C. S. et al. Effect of non-antifungal agrochemicals on the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*. **Med. Micol**, v. 58, n. 1, p 47-53, 2019.
- CAVALHEIRO, M. et al. Host-Pathogen Interactions Mediated by MDR Transporters in Fungi: As Pleiotropic as it Gets! **Genes**, v. 9, n. 7, 2018.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 11, p. 564–571. 2011.

CHEN, Y. et al. Microevolution of Serial Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *C. gattii*. **MBio**, v. 8, n. 2, 2017.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, CLSI document M27-A3, Wayne, PA., 2008.

CLAUDINO, A. L. R. et al. Mutants With Heteroresistance to Amphotericin B and Fluconazole in *Candida*. **Braz. J. Microbiol**, v. 40, n. 4, 2009.

DAMBUZA, I. M. et al. The *Cryptococcus neoformans* Titan cell is an inducible and regulated morphotype underlying pathogenesis. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 5, p. 1-28, 2018.

COSTA, M. C. et al. 17- β -Estradiol increases macrophage activity through activation of the G-protein-coupled estrogen receptor and improves the response of female mice to *Cryptococcus gattii*. **Cellular Microbiology**. v. 22, n. 2, p. 1-14, 2020.

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

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

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 49, n. 1, p. 7-10, 2002.0p

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

FALAGAS, M. E. et al. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? **Clin Microbiol Infect**, v. 14, n. 2, p. 101-104, 2008.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clin Biomed Res**, v. 35, n. 2, 2015.

FERREIRA, G.; SANTOS, D. Heteroresistance and fungi. **Mycoses**, v. 60, n. 9, p. 562-568, 2017.

FERREIRA, G. F. et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 68, p. 1801-1811, 2013.

- FERREIRA, G. F. et al. Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 59, n. 8, 2015.
- FIRACATIVE, C. et al. The status of cryptococcosis in Latin America. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 1-23, 2018.
- GAGO, S. et al. Molecular identification, antifungal resistance and virulence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus deneoformans* isolated in Seville, Spain. **Mycoses**, v. 60, n. 1, p. 40-50, 2016.
- GARCÍA-RODAS, R.; ZARAGOZA, O. Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 64, p. 147–161, 2012.
- GARELNABI, M.; MAY, R. C. Variability in innate host immune responses to cryptococcosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, p. 1-5, 2018.
- GARRO, A. P. et al. Eosinophils elicit proliferation of naive and fungal-specific cells in vivo so enhancing a T helper type 1 cytokine profile in favour of a protective immune response against *Cryptococcus neoformans* infection. **Immunology**, v. 134, p. 198–213, 2011.
- GEFEN, O.; BALABAN, N. Q. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. **FEMS Microbiol Rev**, v. 33, n. 4, p. 704-717, 2009.
- GUESS, T. E. et al. An inherent T cell deficit in healthy males to *C. neoformans* infection may begin to explain the sex susceptibility in incidence of cryptococcosis. **Biol Sex Differ**, v. 10, n. 44, p. 2-17, 2019.
- GRANT, S. S.; HUNG, D. T. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. **Virulence**, v. 4, n. 4, p. 273-283, 2013.
- HERMES-LIMA, M.; STOREY, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. **Am. J. Physiol**, v.268, p. 1386–1393, 1995.
- HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, M. J. et al. Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition. **J. Fungi**, v. 3, n. 51, p. 2-28, 2017.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, p. 1-27, 2014.
- LASS-FLÖR, C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. **Mycoses**, v 52, n. 3, p. 197-205, 2009.
- LINDENBERG, A. E. S. et al. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 50, n. 2, p. 75-78, 2008.

- LOMES, N. R. et al. Cryptococcosis in non-HIV/non-transplant patients: A Brazilian case series. **Med Mycol**, v. 54, n. 7, p. 669-676, 2016.
- MA, H. et al. Expulsion of Live Pathogenic Yeast By Macrophag. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2156-2160, 2006.
- Ma, H. et al.. The fatal fungal outbreak on Vancouver island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 106, n. 31, p. 12980–12985, 2009.
- MADIGAN, M.T.; BROCK, T.D. Brock Biology of Microorganisms. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 2012.
- MADIGAN, M.T.; BROCK, T.D. Microbiologia de Brock. 14° ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MALIEHE, M. et al. Environmental Factors That Contribute to the Maintenance of *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 1-19, 2020.
- MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 2, p. 106-17, 2016.
- MAY, R C.; CASADEVALL, A. In Fungal Intracellular Pathogenesis, Form Determines Fate. **mBIO**, v. 9, n. 5, p. 1-5, 2018.
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infect Dis Clin North Am.** v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.
- MELETIADIS, J. et al. Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. **J. Clin. Microbiol.** v. 39, n. 2 p. 478–484. 2001.
- MESA-ARANGO, A. C. et al. The Production of Reactive Oxygen Species Is a Universal Action Mechanism of Amphotericin B against Pathogenic Yeasts and Contributes to the Fungicidal Effect of This Drug. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informações sobre Morbidade Hospitalar do SUS. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02>
Acesso em: 22/04/2020.
- MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the Era of AIDS—100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 8, n. 4, p. 515–548, 1995.
- MORETTI, M.L. et al. Consenso em criptococose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.
- MOURAD, A.; PERFECT, J. R. Present and Future Therapy of *Cryptococcus* Infections. **J Fungi**, v. 4, n. 3, p. 1-10, 2018.

NOSANCHUK, J. D. et al. Amphotericin B and Fluconazole Affect Cellular Charge, Macrophage Phagocytosis, and Cellular Morphology of *Cryptococcus neoformans* at Subinhibitory Concentrations. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 2, p. 233-239, 1999.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 52, n.1, p. 1, 2003.

OLIVEIRA, L. V.N. et al. Influenza A Virus as a Predisposing Factor for Cryptococcosis. **Front Cell Infect Microbiol**. v, 7, n. 419, p. 1-13, 2017.

OLIVEIRA, H. C.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; GARCIA-RODAS, R. Cryptococcal Pathogenicity and Morphogenesis. **Current Fungal Infection Reports**. v. 13, n.8, p. 67-76, 2019.

OLSZEWSKI, M. A.; ZHANG, Y. E HUFFNAGLE, G. B. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. **Future Microbiol**, v. 5, n. 8, p. 1269-1288, 2010.

OZ, T. et al. Strength of Selection Pressure Is an Important Parameter Contributing to the Complexity of Antibiotic Resistance Evolution. **Mol Biol Evol**. v. 31, n. 9, p. 2387-2401, 2014.

PAPPALARDO, M. C. M. S. et al. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time–kill methodology. **Mycology**, v. 64, p. 146-151, 2009.

PARK, JONG-CHU. et al. Adaptation of *Aspergillus niger* to several antifungal agents. **Microbiology**, v. 140, n. 9, p. 2409-2414. 1994.

PFALLER, M. A.; Sheehan, D. J.; Rex, J. H. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 17, n. 2, p. 268–280, 2004.

PASA, C. R. Tipagem molecular e susceptibilidade antifúngica de *Cryptococcus* isolados de pacientes em hospital universitário com investigação domiciliar. 2011, dissertação de mestrado, (Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste)-Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

RAJASINGHAM, R. et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **Lancet Infect Dis**. v. 17, n. 8, p. 873–881, 2017.

RODERO, L. et al. G484S Amino Acid Substitution in Lanosterol 14- Demethylase (ERG11) Is Related to Fluconazole Resistance in a Recurrent *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolate. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 47, n. 11, p. 3653–3656, 2003.

SEOANE, P. I. et al. Viral infection triggers interferon-induced expulsion of live *Cryptococcus neoformans* by macrophages. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 2, p. 1-16,2020.

- SANTOS, D. A.; BARROS, M. E. S.; HAMDAN, J. S. Establishing a Method of Inoculum Preparation for Susceptibility Testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **J. Clin. Microbiol**, v. 44, n. 1, p. 98-101, 2006.
- SANTOS, J. R. A. et al. Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus gattii* and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1-14, 2014.
- SOARES, B. M. et al. *Cryptococcus gattii*: In vitro susceptibility to photodynamic inactivation. **Photochem. Photobiol**, v. 87, n. 2, p. 357-364, 2011.
- SPRINGER, D.J.; MOHAN, R.; HEITMAN, J. Plants promote mating and dispersal of the human pathogenic fungus *Cryptococcus*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, 2017.
- TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, 2008.
- TUOMANEN, E.; DURACK, D. T.; TOMASZ, A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 30, n. 4, p. 521-527, 1986.
- VARMA, A.; KWON-CHUNG, K.J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to Fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n. 6, p. 2303-2311, 2010.
- VOELZ, K.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C. Cytokine Signaling Regulates the Outcome of Intracellular Macrophage Parasitism by *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.** v. 77, n. 8, p. 3450–3457, 2009.
- YI-CHUN, C. et al. Increasing trend of fluconazole-non-susceptible *Cryptococcus neoformans* in patients with invasive cryptococcosis: a 12-year longitudinal study. . **BMC Infect. Dis.** v. 15, n. 277, p. 1-7, 2015.
- ZARAGOZA, O. et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 2043-2057, 2008.
- ZARAGOZA, O. Multiple disguises for the same party: the concepts of morphogenesis and phenotypic variations in *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers Microbiol**, v. 2, n 181, p. 1-9, 2011.

9 ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 88/2019
Título do projeto: Impacto da influência da persistência e da adaptação de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* frente a anfotericina B na interação com macrófagos derivados de medula
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Daniel de Assis Santos
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 10/06/2019. Validade: 10/06/2019 à 09/06/2024

Belo Horizonte, 10/06/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_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) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br