



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

CHARLES IELPO MOURÃO

EFEITO DOS INIBIDORES DE FOLATO SOBRE O CRESCIMENTO,
SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E FATORES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS
DO COMPLEXO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

FORTALEZA

2012

CHARLES IELPO MOURÃO

EFEITO DOS INIBIDORES DE FOLATO SOBRE O CRESCIMENTO,
SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E FATORES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS
DO COMPLEXO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro

FORTALEZA

2012

CHARLES IELPO MOURÃO

EFEITO DOS INIBIDORES DE FOLATO SOBRE O CRESCIMENTO,
SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS E FATORES DE VIRULÊNCIA DE CEPAS
DO COMPLEXO *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas Área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovada em ___/___/2012.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr.^a Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Profa. Dr.^a Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira
Faculdade Christus

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará-UECE

*À minha mãe, Juliêta da Silva Ielpo, exemplo
de força e superação, e a quem devo a vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo ânimo de seguir em frente diante de todas as adversidades.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela oportunidade da minha formação.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará, local de execução desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro desta pesquisa.

À Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, orientadora deste trabalho, pelas diversas oportunidades concedidas e os constantes ensinamentos em Microbiologia Médica ao longo de seis valiosos anos, a quem sou bastante grato. Meu profundo respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela sua constante disponibilidade em colaborar para o engrandecimento deste trabalho.

Aos demais professores integrantes da equipe do Centro Especializado em Micologia Médica, Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante e Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pela oportunidade de trabalho em um dos maiores centros de referência em Micologia Médica do Norte e Nordeste do Brasil.

À Banca Examinadora, por aceitar cordial e prontamente o convite, contribuindo para a melhoria desse trabalho, em especial à Profa. Dr.^a Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira, exemplo de simpatia e otimismo.

Ao Carlos Eduardo Cordeiro Teixeira e ao George Candido Nogueira, pela grande e fiel amizade e, acima de tudo, pela ajuda incondicional na confecção deste trabalho, desde os experimentos laboratoriais às coletas ambientais.

Aos estudantes do Centro Especializado em Micologia Médica, em especial àqueles que transformaram as longas horas de trabalho em momentos salutares, a saber: Daniele Miranda, Francisca Jakelyne de Farias Marques, Ramila Macedo de Brito, Paula Bittencourt Vago, Lucas Pereira de Alencar e Kylvia Rocha de Castro e Silva.

À Dra. Delia Jéssica Astete Medrano e Dr. Lauro Vieira Perdigão Neto pelos constantes ensinamentos sobre Infectologia e Microbiologia, bem como por ter contribuído bastante para o melhoramento deste trabalho.

À Terezinha de Jesus Santos Rodrigues, e ao Daniel Teixeira Lima, pelo apoio técnico para a realização deste e de outros trabalhos no laboratório.

A todas as outras pessoas que fizeram parte indiretamente desse trabalho, muito obrigado!

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos."

Fernando Pessoa

RESUMO

A criptococose é uma micose sistêmica de caráter oportunista causada principalmente pela inalação de propágulos fúngicos das espécies *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* em suas duas variedades, var. *grubbi* e var. *neoformans*, cuja patogenicidade se baseia na expressão de fatores de virulência, diretamente envolvidos no estabelecimento e manutenção da infecção, estando relacionados à produção de cápsula, melanina, lipases, proteases e urease, além da formação de biofilme. O arsenal antifúngico disponível para o tratamento da criptococose atualmente é limitado e restrito a poucas classes de drogas, o que gera a necessidade da realização de estudos de prospecção de novas drogas antifúngicas e a descoberta de novos alvos moleculares em *Cryptococcus*. Nos últimos anos, diversos estudos têm mostrado o potencial antifúngico de drogas inibidoras da síntese do ácido fólico em fungos patogênicos, e diante disso, propomos investigar, *in vitro*, os efeitos de inibidores de folato em *C. neoformans* e *C. gattii*, avaliando a ação dessas drogas sobre a sensibilidade, sensibilidade antifúngica e produção de fatores de virulência. Para tanto, foi analisado o perfil de sensibilidade antifúngica de cepas de *C. gattii* (n=15) e *C. neoformans* (n=15) frente às combinações de Sulfametoxazol-Trimetoprim e Sulfadiazina-Pirimetamina, bem como seu perfil de resistência às drogas antifúngicas. Adicionalmente, investigamos o efeito dos inibidores de folato sobre a produção de fatores de virulência e formação de biofilme nas cepas de *C. gattii* (n=7) e *C. neoformans* (n=7) estudadas. Foram realizadas também coletas ambientais visando investigar possíveis nichos ecológicos preferenciais de cepas de *Cryptococcus* na cidade de Fortaleza e região metropolitana. Todas as cepas testadas foram sensíveis à ação inibitória das drogas testadas, porém não demonstraram efeitos significantes sobre os fatores de virulência, exceto a formação de biofilme. Assim, acreditamos que os resultados desse estudo podem contribuir para uma maior compreensão acerca do potencial antifúngico dos inibidores de folato sobre espécies de *Cryptococcus*.

Palavras-chave: Antifolatos, Biofilme, *Cryptococcus*, Resistência Antifúngica.

ABSTRACT

Cryptococcosis is an opportunistic systemic mycosis caused mainly by inhalation of fungal propagules of the species *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans* in its two varieties, var. *grubbi* and var. *neoformans*, whose pathogenicity is based on the expression of virulence factors directly involved in the establishment and maintenance of infection, and is related to the production of capsule, melanin, lipases, proteases and urease, in addition to biofilm formation. The antifungal drugs available for the treatment of cryptococcosis is currently limited and restricted to a few classes of drugs, which generates the need to carry out research studies of new antifungal drugs and the discovery of new molecular targets in *Cryptococcus*. In recent years, several studies have shown the potential antifungal drug inhibiting synthesis of folic acid in pathogenic fungi, and before that, we propose to investigate *in vitro* effects of folate inhibitors in *C. gattii* and *C. neoformans*, evaluating the action of these drugs on the sensitivity, antifungal resistance and production of virulence factors. To this end, we analyzed the antifungal susceptibility profile of strains of *C. gattii* (n=15) and *C. neoformans* (n=15) compared the combination of SMT-TMP and SDZ-PIR, and profile of resistance to antifungal drugs. Additionally, we investigated the effect of folate inhibitors on the production of virulence factors and biofilm formation in strains of *C. gattii* (n=7) and *C. neoformans* (n=7) studied. Was collected from in order to investigate possible environmental niches preferred strains of *Cryptococcus* in the city and metropolitan region of Fortaleza, Ceará. All strains tested were sensitive to the inhibitory action of the drugs tested, but showed no significant effects on the virulence factors, except for biofilm formation. Thus, we believe that the results of this study may contribute to greater understanding of the antifungal potential of folate inhibitors on species of *Cryptococcus*.

Key words: Antifolates, Antifungal Resistance, Biofilm, *Cryptococcus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01.	Principais pesquisadores envolvidos na descoberta e descrição do gênero <i>Cryptococcus</i>	16
FIGURA 02.	Representação esquemática da atual classificação taxonômica de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	19
FIGURA 03.	Atual composição do Complexo <i>Cryptococcus neoformans</i> a partir de estudos moleculares.	21
FIGURA 04.	Microscopia de diferentes cepas de <i>Cryptococcus</i> sp., em coloração com nigrosina, com presença de cápsula polissacarídica.....	22
FIGURA 05.	Aspectos morfofisiológicos das leveduras do Complexo <i>Cryptococcus neoformans</i>	23
FIGURA 06.	Principais condições que afetam o desenvolvimento da cápsula de <i>Cryptococcus</i>	25
FIGURA 07.	Diferentes micrografias evidenciando o polissacarídeo capsular de <i>Cryptococcus</i>	26
FIGURA 08.	Formação de biofilme de <i>Cryptococcus</i> sp.	29
FIGURA 09.	Principais nichos ecológicos do Complexo <i>Cryptococcus neoformans</i> descritos na literatura mundial.	30
FIGURA 10.	Mapa de ocorrências global e nacional de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> . 31	
FIGURA 11.	Ciclo infeccioso de <i>Cryptococcus</i>	34
FIGURA 12.	Via metabólica da síntese do ergosterol.	39
FIGURA 13.	Conexão molecular entre os ciclos biossintéticos do ácido fólico e do ergosterol.....	41
FIGURA 14.	Média geométrica dos valores de CIM de SMX-TMP e SDZ-PIR para as espécies <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	56
FIGURA 15.	Produção de ergosterol celular por <i>Cryptococcus</i>	60
FIGURA 16.	Porcentagem de redução do biofilme maduro de <i>Cryptococcus</i> após submetido à ação dos inibidores de folato e anfotericina B.	63
FIGURA 17.	Inibição da formação de biofilme de <i>Cryptococcus</i> sp. por SMX-TMP, SDZ-PIR e anfotericina B.	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 01.	Detalhamento das coletas realizadas durante o período de março de 2010 a março de 2011.....	53
TABELA 02.	Perfil de sensibilidade de <i>Cryptococcus</i> na forma planctônica frente às combinações de sulfametoxazol-trimetoprim e sulfadiazina-pirimetamina e drogas antifúngicas.....	55
TABELA 03.	Sensibilidade antifúngica de <i>Cryptococcus</i> após pré-exposição à doses subinibitórias de SMX-TMP e SDZ-PIR.....	58
TABELA 04.	Efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR e itraconazol sobre a produção de ergosterol celular de <i>Cryptococcus</i> sp.	59
TABELA 05.	Efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de protease por cepas de <i>Cryptococcus</i>	61
TABELA 06.	Efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de fosfolipase por cepas de <i>Cryptococcus</i> spp.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CEMM	Centro Especializado Em Micologia Médica
CGB	L-Canavanina Glicina Azul de Bromotimol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
GXM	Glucuronoxilomanana
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
PABA	Ácido para-aminobenzóico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-REA	<i>Restriction Enzyme Analysis of PCR</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TBE	Tris Borato EDTA
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 Histórico	15
1.2 Taxonomia.....	19
1.3 Aspectos morfofisiológicos	21
1.3.1 Patogenicidade	23
1.3.2 Fatores de virulência	23
1.4 Ecologia e Distribuição geográfica	29
1.5 Criptococose	33
1.5.1 Patogenia e epidemiologia.....	33
1.5.2 Diagnóstico laboratorial da criptococose	36
1.6 Drogas antifúngicas.....	37
1.7 Inibidores de folato	40
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo Geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Coletas, isolamento e identificação de amostras de origem ambiental.....	45
4.2 Obtenção de amostras de origem clínica.....	45
4.3 Testes de sensibilidade antifúngica.....	46
4.3.1 Preparo do inóculo	46
4.3.2 Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> frente a sulfametoxazol-trimetoprim e sulfadiazina-pirimetamina.....	46
4.3.3 Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> frente à antifúngicos	47
4.4 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a resistência antifúngica.....	47
4.5 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre o ergosterol celular	48
4.6 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de protease.....	48
4.7 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de fosfolipase.....	49
4.8 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre biofilme maduro de <i>Cryptococcus</i> spp.....	50
4.9 Inibição da formação de biofilme de <i>Cryptococcus</i> spp.	51

4.10 Análise estatística.....	51
5. RESULTADOS	52
5.1 Coletas, isolamento e identificação de amostras de origem ambiental	52
5.2 Sensibilidade <i>in vitro</i> frente a SMX-TMP e SDZ-PIR	54
5.3 Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> frente a antifúngicos	56
5.4 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a sensibilidade antifúngica	57
5.5 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre o ergosterol celular	59
5.6 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de proteases	60
5.7 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de fosfolipase.....	61
5.8 Efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre biofilme maduro de <i>Cryptococcus</i> spp.	62
5.9 Inibição da formação de biofilme de <i>Cryptococcus</i> spp.	63
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXO A – Artigo científico aceito para publicação	86

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Histórico

As leveduras patogênicas *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* são os principais agentes causadores da criptococose, uma micose sistêmica de caráter oportunista que acomete homens e animais. O gênero, que apenas em 1901 foi denominado como *Cryptococcus*, é conhecido desde 1894. Naquele ano, o microrganismo foi descrito de maneira quase simultânea por pesquisadores distintos. Primeiramente, Francesco Sanfelice (figura 1A), na Itália, isolou o fungo a partir de suco fermentado de pêssego, enquanto Otto Busse (figura 1B) e Abraham Buschke, em Greifswald, Alemanha, isolaram o patógeno a partir de material coletado de lesão de tibia em uma paciente de 31 anos (BARNETT, 2010).

Sanfelice propôs a denominação do agente de *Saccharomyces hominis*, enquanto Busse e Buschke denominaram a doença de “*Saccharomycosis hominis*” (BARNETT, 2010). Um ano após isolamento da levedura em seu laboratório, Sanfelice demonstrou a patogenicidade do fungo por meio de infecção em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e porcos da Índia (*Cavia porcellus*), quando verificou lesões semelhantes a tumores cancerígenos. A presença de uma cápsula celular nas amostras observadas pelo pesquisador, não observada em *S. hominis*, o levou a propor a denominação do agente à época para *S. neoformans* (CASADEVALL; PERFECT, 1998; BARNETT, 2010). No mesmo ano, Sanfelice publicou a descrição do primeiro isolamento de *Cryptococcus* spp. em linfonodos de bovino (*Bos taurus*), denominando o microrganismo encontrado de *S. litogenes* (BARNETT, 2010).

Em 1895, Ferdinand Curtis (figura 1D) relatou na França o segundo caso de criptococose humana. Após isolar o fungo de uma lesão de quadril, propôs sua denominação de *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*. No mesmo ano, o autor descreveu o caso de um paciente com meningite, isolando o microrganismo e denominando-o como *Megelococcus myxoides*. Em 1901, Jean-Paul Vuillemin (figura 1C) isolou o fungo a partir de lesão pulmonar em um suíno, bem como em amostras de leite de gado. Um ano depois, seu grupo descreveu o primeiro relato da infecção em equinos, isolando o patógeno em lesão pulmonar (JUNGERMAN; SCHWARTZMAN, 1972; LAZÉRA et al., 2005; CASADEVALL; PERFECT, 1998; BARNETT, 2010).

Após diversos relatos em animais e alguns casos em humanos, Vuillemin reviu os achados até a época e, em 1901, transferiu os microrganismos descritos para o gênero *Cryptococcus*, diferenciando-os do gênero *Saccharomyces* por não fermentarem açúcares

nem produzirem ascósporos (JUNGERMAN; SCHWARTZMAN, 1972; LAZÉRA et al., 2005; CASADEVALL; PERFECT, 1998).

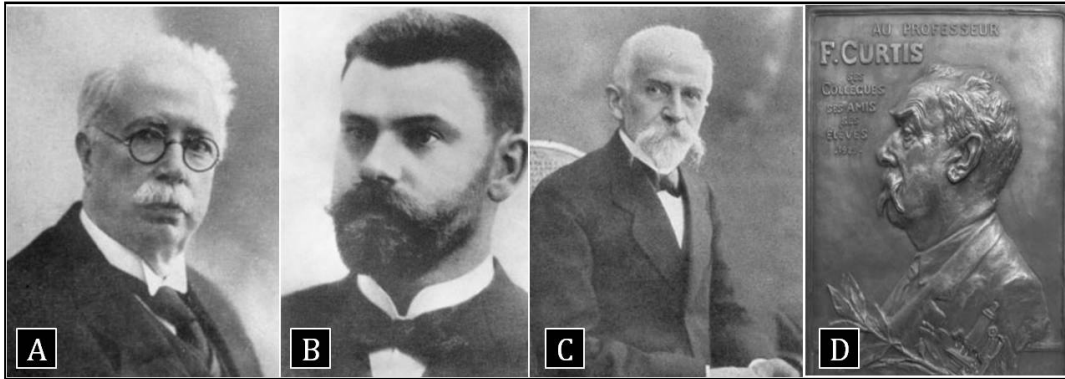


Figura 1. Principais pesquisadores envolvidos na descoberta e descrição do gênero *Cryptococcus*. A: Francesco Sanfelice; B: Otto Busse (1867–1922); C: Jean-Paul Vuillemin (1861–1932); D: Ferdinand Curtis (1858–1937). Fonte: BARNETT, 2010.

A primeira descrição de meningite associada a *Cryptococcus* spp. data de 1895 com os trabalhos de Ferdinand Curtis. Dez anos depois, Von Hanseman, em 1905, descreveu um provável caso de meningite criptocócica que daria início a uma série de outros relatos em humanos. No quadro descrito por Von Hanseman, cistos gelatinosos presentes no tecido analisado o levaram a descrever a infecção como um tuberculoma cerebral. Entretanto, dois casos subsequentes da mesma doença foram determinantes para a conclusão de que o quadro clínico descrito era condizente com meningoencefalite e não com tuberculose cerebral, gerando com isso um melhor conhecimento acerca do seu agente etiológico (CASADEVALL; PERFECT, 1998; BARNETT, 2010).

Em 1916, após observação de pacientes com meningite, Scottdart e Cutler identificaram áreas claras ao redor dos tecidos parasitados como sugestivas de lise celular. Sem fazer referências aos casos relatados até aquela data, os pesquisadores propuseram então uma nova espécie patogênica, denominando-a *Torula histolytica*. Entretanto, tais áreas claras nada mais eram do que agrupamentos de leveduras dotadas de cápsula, considerada até os dias atuais o fator de virulência estrutural mais importante do fungo (CASADEVALL; PERFECT, 1998; SOUZA et al., 2009).

O ano de 1935 foi decisivo para consolidar *Cryptococcus* como uma levedura patogênica. Apesar de Sanfelice ter relatado infecção experimental em animais de laboratório, além dos casos de doenças em animais e humanos, não havia um consenso sobre a existência de um agente único causando as enfermidades descritas (CASADEVALL; PERFECT, 1998; SOUZA et al., 2009; BARNETT, 2010). Rhoda Benham reviu todos os casos e, a partir de estudos morfológicos, de patogenia e reatividade a fatores séricos, concluiu que os isolados eram semelhantes. Até então, *S. neoformans*, *Blastomyces neoformans*, *C. hominis* e *T. histolytica* haviam sido denominações dadas para a levedura, e os termos sacaromicose, blastomicose, oidiomicose e torulose fizeram referência à infecção causada pelo fungo em homens e animais (JUNGERMAN; SCHWARTZMAN, 1972; CASADEVALL; PERFECT, 1998; LAZÉRA et al., 2005; BARNETT, 2010).

Os estudos antigênicos de Benham foram expandidos por Edward Evans e seus colaboradores, em 1949. A partir de testes de aglutinação em tubo, foram descritos os três primeiros sorotipos conhecidos para *Cryptococcus* sp., baseados em respostas antigênicas diferentes geradas pelo polissacarídeo capsular do fungo. Tais estudos permitiram a descrição dos sorotipos A, B e C, estabelecendo assim uma heterogeneidade taxonômica para a espécie *C. neoformans*. O sorotipo D, o quarto a ser descrito, foi definido somente em 1964, a partir de estudos com anticorpos e estudos sorológicos em pacientes com criptococose (BARNETT, 2010).

Chester Emmons em 1951 demonstrou a existência de *Cryptococcus* em material ambiental. Apesar de Sanfelice ter sido o primeiro autor a relatar *Cryptococcus* em uma fonte ambiental, Emmons é reconhecido por investigar e definir a presença do microrganismo no ambiente. Seus trabalhos propuseram a associação do fungo com habitats de aves e solos ricos em excretas destas, além de ninhos de aves e madeira em decomposição. Outro dado importante evidenciado em seus estudos foi uma predileção da levedura por fezes de pombos (*Columba livia*) e outras aves, como passeriformes (EMMONS, 1955; LAZÉRA et al., 2000).

Em um trabalho realizado em 1955, Emmons investigou 127 amostras ambientais, obtendo positividade para *C. neoformans* em 14 delas. Destas, dez eram oriundas de áreas freqüentadas por pombos. Oito anos após, Alejo corroborou os achados de Emmons, quando isolou o fungo em 71% das amostras de solos ricos em excretas de pombos (EMMONS, 1955; LAZÉRA et al., 2000).

Friedrich Staib, em 1962, descreveu características importantes do fungo relacionadas ao seu crescimento em meios complexos, bem como à produção de melanina. Em seus estudos, empregou meios de cultura suplementados com excrementos de aves ou com sementes de níger (*Guizotia abyssinica*), o que lhe permitiu observar que as colônias de *C. neoformans* crescidas naqueles meios apresentavam cor marrom. Carol Shaw e L. Kapica, em 1972, identificaram esse pigmento como melanina, uma vez que também havia tal pigmentação quando o fungo era submetido a crescimento em meios contendo extrato de batatas. Eles inferiram que a tirosina, aminoácido precursor da melanina, era utilizada pelo fungo para produzir a pigmentação acastanhada, uma vez que a tirosina, reconhecidamente, é a substância responsável pelo escurecimento da batata. O meio de Staib, contendo extrato de semente de *G. abyssinica*, ainda hoje é utilizado como um dos métodos de identificação de *Cryptococcus* sp. (CASADEVALL; PERFECT, 1998; LAZÉRA et al., 2005; BARNETT, 2010).

Em 1970 foi relatado na África por Gatti e Eeckels um caso de meningite causada por leveduras capsuladas de formas alongadas, sendo descrito o agente como uma variedade da espécie *C. neoformans*, que passaria a ser chamada de variedade *gattii*. Na mesma década, Kwon-Chung (1975) descreveram dois tipos sexuais para *C. neoformans*: *MAT α* e *MAT a* (SORREL et al., 2001; LAZÉRA et al., 2005; LIN, 2009)

Duas décadas após ter sido descrito como agente patogênico, em 1990 foi relatado o isolamento da variedade *gattii* na natureza, em associação com troncos de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) em decomposição na Austrália (ELLIS; PFEIFFER, 1990) sendo a partir de então relacionados com madeira em decomposição, inclusive no Brasil. Diversas plantas como eucalipto (*Eucalyptus* sp.), oitizeiro (*Moquilea tomentosa*) e cássia-rosa (*Cassia grandis*) foram descritas como prováveis fontes ambientais do microrganismo (LAZERA et al., 1996). Anos mais tarde, vários autores isolaram *C. neoformans* var. *gattii* em outras espécies de eucalipto, não só na Austrália, mas também na América Central (PFEIFFER; ELLIS, 1992; LICEA et al., 1996). Os achados do microrganismo em árvores e madeira em decomposição levaram a alguns autores proporem a possibilidade destes nichos serem fontes naturais do fungo (LAZERA et al., 1993, 1998 e 2000; RANDHAWA et al., 2001). Aproximadamente três décadas após sua descrição, estudos de filogenética e de nichos ecológicos permitiram a reclassificação da então variedade *gattii* como uma nova espécie, sendo denominada como *C. gattii* (KWON-CHUNG et al., 2002; LIN, 2009).

1.2 Taxonomia

Os membros do gênero *Cryptococcus* são basidiomicetos e encontram-se atualmente classificados de acordo com o estado teleomorfo (figura 2). Apresentam reprodução sexuada e assexuada, sendo as formas sexuadas das espécies descritas em 1975 (*Filobasidiella neoformans*, teleomorfo de *C. neoformans*) e 1976 (*Filobasidiella bacillispora*, teleomorfo de *C. gattii*) por Kwon-Chung (BARNETT, 2010).

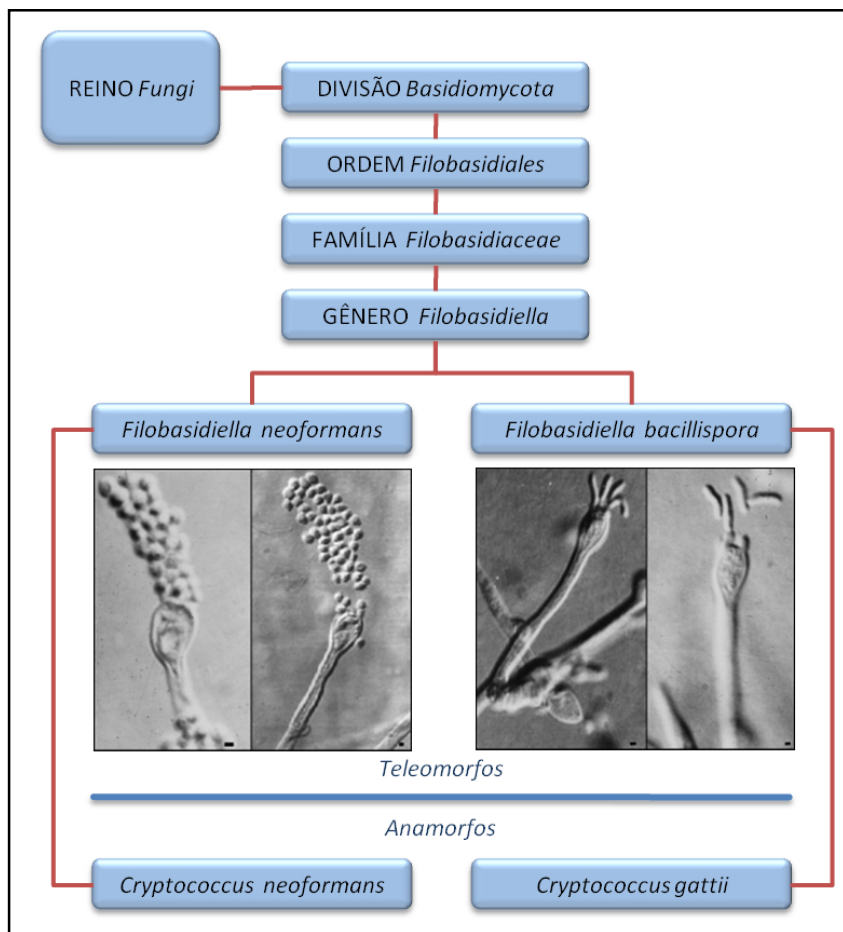


Figura 2. Representação esquemática da atual classificação taxonômica de *C. neoformans* e *C. gattii*. Baseada nas informações contidas em CASADEVALL; PERFECT (1998). Fonte das imagens: Kwon-Chung; Varma (2006).

Antígenos capsulares de reatividade sorológicas diferentes são considerados a base para a identificação dos fungos do complexo *Cryptococcus neoformans*. Até 1999, *C. neoformans* era classificado em duas variedades, de acordo com seus antígenos capsulares, sendo *C. neoformans* var. *neoformans* correspondente aos sorotipos A, D e

AD, e *C. neoformans* var. *gattii* correspondente aos sorotipos B e C (NAKAMURA et al., 1998).

A partir de 1999, autores sugeriram que, devido a características genéticas, as espécies deveriam ser reagrupadas em três variedades, mantendo-se a variedade *gattii* e passando a existir a variedade *grubii*, correspondente ao sorotipo A. O sorotipo D e o híbrido AD foram mantidos como variedade *neoformans* (CHERNIAK; NEILL; SHENG, 1998; LIN; HEITMAN, 2006).

Após estudos de nichos ecológicos e filogenéticos, por meio de diversas técnicas baseadas em PCR e outras como RAPD, RFLP, AFLP e MLST, as espécies do complexo *Cryptococcus* foram novamente reorganizadas taxonomicamente. Atualmente, são conhecidas duas variedades para a espécie *C. neoformans*: *neoformans* e *grubii*. O fungo *C. gattii* foi elevado ao nível de espécie, uma vez que não há evidências de recombinação genética entre *C. neoformans* e *C. gattii*, apesar do fato de haver diferenças pontuais na fisiologia, patogênese, epidemiologia e sensibilidade às drogas antifúngicas entre esses organismos. De acordo com a literatura, as duas espécies e suas variedades são agrupadas em um complexo, denominado complexo *Cryptococcus neoformans* (CHERNIAK; NEILL; SHENG, 1998; FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999; IKEDA et al., 2002; GATES; THORKILDSON; KOZEL, 2004; DAMBRÓS, 2005; LIN; HEITMAN, 2006; RIBEIRO; NGAMSKULRUNGROJ, 2008). Porém, nos dois últimos anos, a denominação para esse complexo vem mudando. Alguns autores usam a denominação Complexo *C. neoformans-C. gattii* (GAGO et al., 2011; ESPINEL-INGROFF et al., 2012), Complexo *C. neoformans/gattii* (GRAHAM et al., 2011) ou ainda Complexo *Cryptococcus* (FENG et al., 2011).

Não obstante a divisão das espécies em sorotipos, o complexo *Cryptococcus neoformans* é ainda dividido em genótipos ou tipos moleculares. Atualmente são conhecidos nove tipos moleculares para as espécies do complexo (BOVERS et al., 2008). A composição atual detalhada do complexo *Cryptococcus neoformans* está representada esquematicamente na figura 3.

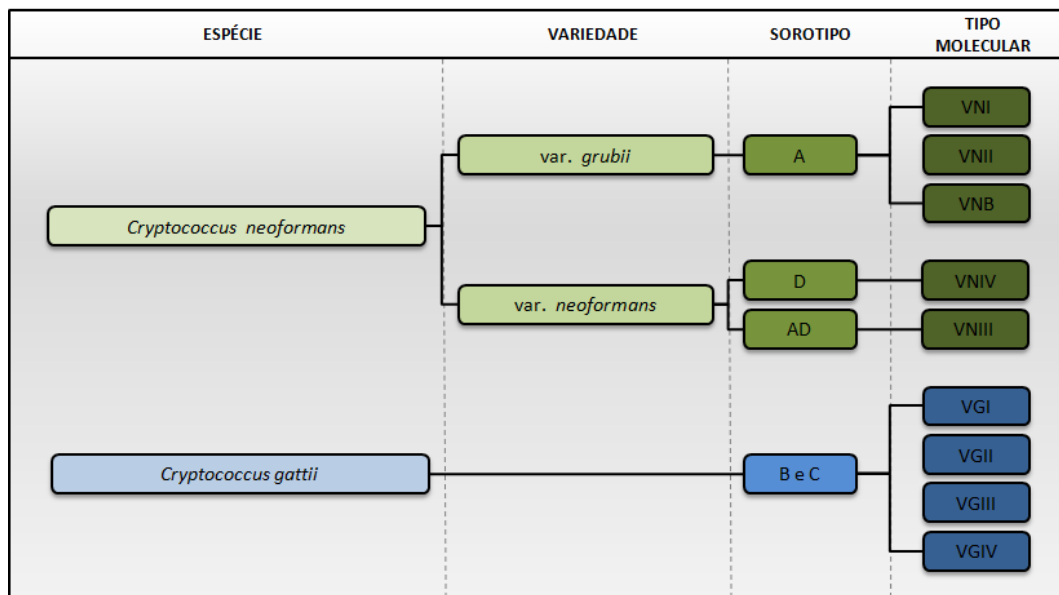


Figura 3. Atual composição do Complexo *Cryptococcus neoformans* a partir de estudos moleculares. Baseado em MA; MAY(2009).

Além da classificação dos fungos do Complexo em cinco sorotipos, baseados na reatividade capsular de cada um, bem como em tipos moleculares, são conhecidos dois tipos conjugantes (ou *Mating-type*) relacionados ao complexo *Cryptococcus*: α e α . Destes, o mais prevalente no meio ambiente e nos achados clínicos corresponde ao tipo α , ou *MAT* α . Dados da literatura apontam que cerca de 95% dos isolados de origem ambiental e clínica são do sorotipo A, *Mating-type* α . Essa prevalência pode ser explicada pelo fato dos basidiósporos, principalmente *MAT* α , serem mais facilmente dispersos no ambiente do que as leveduras na forma vegetativa. (BOEKHOUT et al., 2001; MARTINEZ et al., 2001; KWON-CHUNG et al., 2002; RIBEIRO; NGAMSKULRUNGROJ, 2008).

1.3 Aspectos morfofisiológicos

Apesar da distribuição geográfica, nichos ecológicos e perfil de patogenicidade *in vivo*, que possibilitam distinguir as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* (MORA et al., 2010; SPRINGER; CHATURVEDI, 2010), há muitas semelhanças nas suas características morfofisiológicas. De um modo geral, as espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* se apresentam como leveduras haplóides capsuladas, de forma esférica a ovalada, uni ou bibrotante, com tamanho variando entre 4 a 10 μm de diâmetro (figura 4), sem hifas ou pseudo-hifas (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

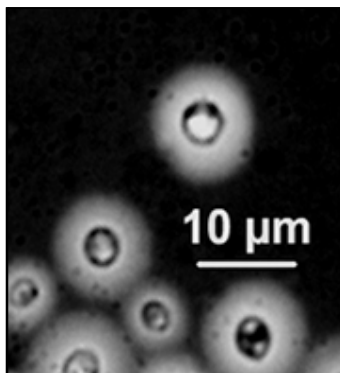


Figura 4. Microscopia óptica de diferentes células de *Cryptococcus* sp., em coloração com nigrosina, com presença de cápsula polissacarídica. Fonte: CEMM, 2011.

Em meios de cultura micológicos, como Agar Batata, Agar Extrato de Malte e Levedura e Agar Sabouraud Dextrose a 2% (figura 5A), *Cryptococcus* apresenta colônias em tons marfim, com aspecto brilhante, textura mucóide e bordas. Em meios diferenciais, como o Agar ASN (Agar Semente de Níger) e Ágar Caféico, indutores da produção de melanina, as colônias podem se apresentar com cores variando entre castanho a marrom (figura 5B) (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004; COSTA, 2009). Hidrolisam amido, produzem urease (figura 5C), assimilam inositol e não fermentam açúcares (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

A espécie *C. neoformans* pode ser diferenciada de *C. gattii* por meio da prova de utilização do meio CGB (Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol). Essa diferenciação, de um modo geral, se baseia em diferenças no metabolismo de nitrogênio de ambas as espécies, bem como na capacidade que *C. gattii* possui de assimilar glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, além da sua resistência à ação da L-canavanina, um análogo da arginina. (CASADEVALL; PERFECT, 1998; CASADEVALL et al., 2000, ESCANDÓN et al., 2006).

A termotolerância é fator característico das espécies, que permite crescimento em temperaturas próximas de 37 °C, sendo inibido em temperaturas mais elevadas quando incubado por períodos maiores do que 48 horas. (CASADEVALL; PERFECT, 1998; AMARO, 2006). O potencial hidrogeniônico (pH) do meio de cultura também apresenta influência direta no crescimento de *Cryptococcus*, que tolera valores de pH entre 4,0 e 7,5. Em meios alcalinos, há redução da capacidade de crescimento do fungo (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

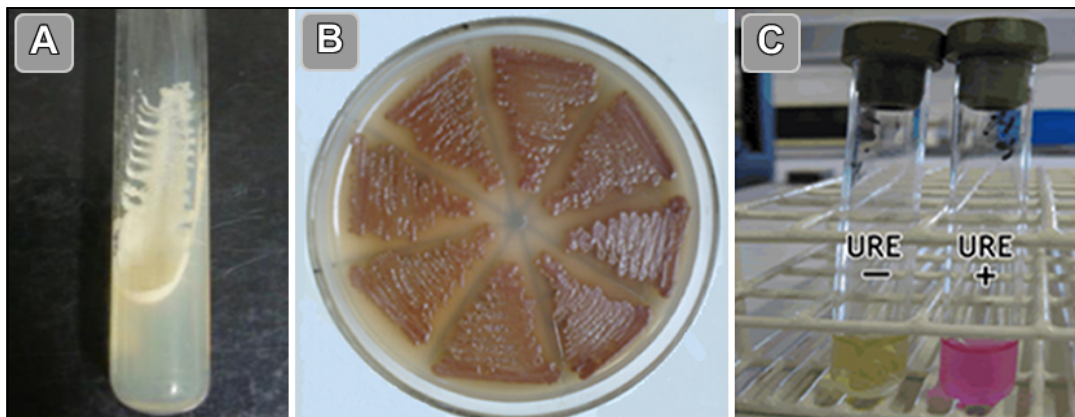


Figura 5. Aspectos morfofisiológicos das leveduras do Complexo *Cryptococcus neoformans*. A – Cultura de *Cryptococcus* com 48 horas de crescimento em Agar Sabouraud Dextrose 2%. B – Colônias acastanhadas de *Cryptococcus neoformans* em Agar Semente de Níger, após 72 horas de crescimento à 25 °C. C – Prova de produção de urease em caldo uréia de Christensen. O tubo que contém meio na coloração amarelada (URE-), mostra a ausência de produção da enzima urease. O tubo que contém meio com coloração rósea (URE+) indica produção da enzima urease por *Cryptococcus*. Fonte: CEMM, 2011.

1.3.1 Patogenicidade

O gênero *Cryptococcus* possui 39 espécies, porém as únicas que apresentam interesse médico e são reconhecidamente patogênicas são as aquelas agrupadas no Complexo *Cryptococcus neoformans*. Relatos de criptococose causadas por outras espécies como *C. laurentii*, *C. curvatus* e *C. albidus* são raros, provavelmente devido à dificuldade de sobreviverem em temperaturas próximas de 37 °C (CASADEVALL; PERFECT, 1998; LEE et al., 2004).

A patogenicidade dos fungos do Complexo *C. neoformans* é baseada na expressão de fatores de virulência, que são componentes estruturais e/ou moleculares diretamente envolvidos no estabelecimento e manutenção da infecção, e que possibilitam a invasão e permanência do fungo nos tecidos e células, bem como a modulação do sistema imune do hospedeiro. A expressão de fatores de virulência é um fenômeno cepa-dependente, variando em frequência e intensidade em ambas as espécies do Complexo (BUCHANAN; MURPHY, 1998; BOVERS et al., 2008; MA; MAY, 2009).

1.3.2 Fatores de virulência

Os fatores de virulência desempenham um papel importante na patogênese da criptococose, e estão relacionados à produção de cápsula, produção de melanina,

produção de exoenzimas como lipases, proteases e urease e mudanças fenotípicas visando escape imune, bem como o sistema *Mating type* e sinalização de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), que atuam como fatores reguladores de virulência (COX et al., 2001; STEENBERGEN et al., 2001; VAN DUIN et al., 2002; CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003; COX et al., 2003; DAMBRÓS, 2005).

A cápsula é o fator de virulência mais importante e tem sido estudada de maneira intensa. *In vivo*, possui ação antifagocítica e imunossupressora, comprometendo a apresentação de antígenos às células T e afetando a produção de citocinas e ação do complemento (CASADEVALL; PERFECT, 1998; LACAZ et al, 2002; MA; MODY, 2002). Experimentos clássicos em modelos murinos demonstraram a importância vital da cápsula na patogênese fúngica de tal forma que, quando infectados com cepas mutantes acapsulares, os animais não desenvolveram a doença (FROMTLING; SHADOMY; JACOBSON, 1982; CHANG; KWON-CHUNG, 1994).

No meio ambiente, quando presente, a cápsula atua protegendo as células fúngicas contra desidratação em ambientes de baixa umidade (GATES; THORKILDSON; KOZEL, 2004; ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004). De maneira geral, os isolados de origem ambiental possuem cápsula com diâmetro relativamente pequeno. Tais isolados, inclusive quando mantidos em condições normais de cultivo, mantêm cápsula reduzida (ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004). Entretanto, *in vivo* ou em condições *in vitro* que simulem tecidos parasitados de algum hospedeiro, há um considerável aumento no tamanho da cápsula. Diversos fatores parecem estar relacionados com esse processo (figura 6), tais como a presença de aminoácidos, vitaminas, diferentes fontes de carbono, ausência ou baixas concentrações de minerais, concentração de O₂ e CO₂, pH alcalino e baixa osmolaridade (FELDMESSER; KRESS; CASADEVALL, 2004; ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004; ZARAGOZA; CASADEVALL, 2006; ZARAGOZA et al., 2010).

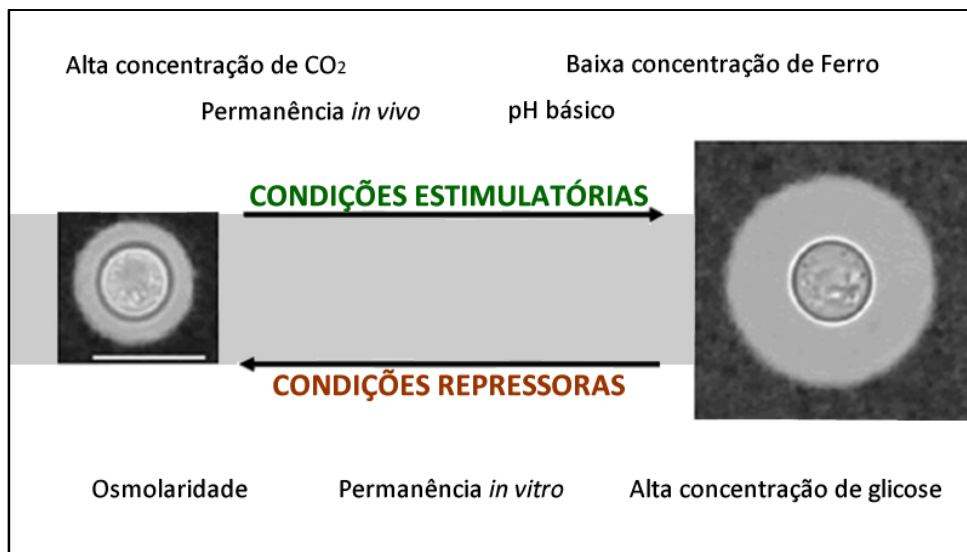


Figura 6. Principais condições que afetam o desenvolvimento da cápsula de *Cryptococcus*. Adaptado de ZARAGOZA; CASADEVAL (2004).

Bioquimicamente, a cápsula é constituída por dois polissacarídeos principais: a glucuronoxilomanana (GXM), que é seu principal constituinte e responsável por aproximadamente 90 a 95% de toda sua a composição, e galactoxilomanana (GalXM), que corresponde a aproximadamente 5 a 8% da estrutura. O percentual restante (1 a 3%) é formado por mananoproteínas, cujo papel biológico ainda não foi completamente elucidado (MITCHELL; PERFECT, 1995; CASADEVALL; PERFECT, 1998; ZARAGOZA et al, 2010). Diversas ferramentas podem ser utilizadas para estudar a cápsula e sua composição bioquímica, como microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e imunofluorescência. A representação da estrutura capsular feita a partir de tais ferramentas é mostrada na figura 7 (MAXSON et al., 2007). Sabe-se também que a estrutura capsular é extremamente variável, sendo considerada cepa-dependente (CHERNIAK et al., 1995).

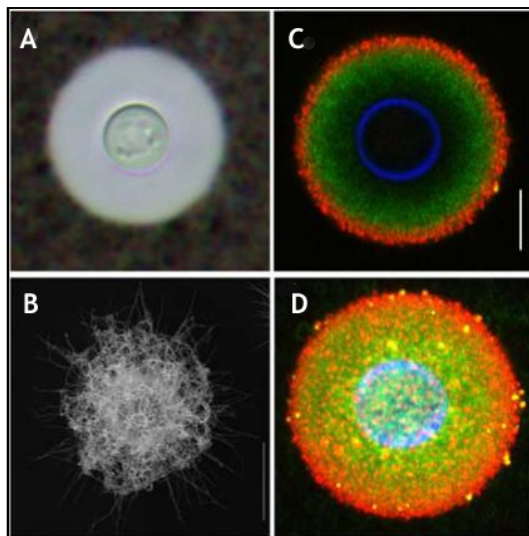


Figura 7. Diferentes micrografias evidenciando o polissacarídeo capsular de *Cryptococcus*. A) Célula visualizada por microscopia ótica em tinta da Índia. Aumento: 1000X. B) Microscopia eletrônica de varredura. C) Imunofluorescência usando anticorpos monoclonais específicos para detecção da cápsula. D) Célula de *C. neoformans* marcada com dois anticorpos monoclonais diferentes para a cápsula. A parede celular está representada em azul. Adaptado de ZARAGOZA et al. (2009).

A melanina, um pigmento hidrofóbico de alto peso molecular, é fundamental na sobrevivência do fungo no meio ambiente, na patogênese da criptococose e na disseminação do fungo para sítios extrapulmonares, principalmente o sistema nervoso central (SNC) (COX et al., 2001; CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003; REOLON et al., 2004; EISENMAN et al., 2009). A predileção do fungo pelo SNC parece estar associada com sua capacidade de converter catecolaminas em melanina, uma vez que em áreas do cérebro ricas nesses compostos há infecção frequente por *Cryptococcus* (REOLON et al., 2004; PEDROSO et al., 2007).

A melanina possui papel protetor contra alguns agentes antifúngicos, bem como contra danos oxidativos causados por células do sistema imune e radiações ionizantes, devido à sua capacidade de reter enzimas hidrolíticas fúngicas próximo à parede celular. (IKEDA et al., 2003; REOLON et al., 2004; PEDROSO et al., 2007). Além disso, protege as células fúngicas da fagocitose pelos macrófagos, que é uma das etapas mais importantes na defesa do hospedeiro frente ao fungo (WANG; AISEN; CASADEVALL, 1995; EISENMAN et al., 2009).

A capacidade de *Cryptococcus* em produzir melanina está associada à presença de substratos adequados, como a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e catecolaminas, bem como a expressão de fenoloxidase pelo fungo (GARCIA-RIVERA et al., 2005).

Apesar dos conhecimentos acerca dos mecanismos envolvidos no processo de melanização de *Cryptococcus* ainda serem incipientes, sabe-se que tal fenômeno parece ser responsável pela resistência do fungo a derivados poliênicos e equinocandinas (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006).

A produção de exoenzimas como fosfolipase, proteases e urease também está diretamente ligada à sobrevivência no ambiente, bem como a patogênese fúngica. A produção de cápsula e termotolerância têm relação direta com a produção de fosfolipases, permitindo elevação da atividade enzimática. A fosfolipase atua digerindo membranas celulares e causando lise celular, além de degradar o líquido surfactante pulmonar, facilitando sua adesão nesse sítio (VIDOTTO et al., 1996; SANTAGELO et al., 1999; KARKOWSKA-KULETA et al., 2009). Apesar da baixa atividade proteolítica de *Cryptococcus* durante o processo infeccioso, as proteases secretadas pelo fungo ocasionam degradação aos tecidos do hospedeiro e destroem enzimas e proteínas importantes na resposta imune, tais como imunoglobulinas e parte do sistema complemento no sítio da infecção (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009; CAMPOS; BARONI, 2010).

A urease é uma metaloenzima considerada um importante fator de virulência em diversos microrganismos (TORRES-RODRIGUEZ et al., 2008). No meio ambiente, a urease, assim como as proteases, atua na função nutricional. É uma enzima importante na captação de nitrogênio, mas que não apresenta ainda funções bem definidas na patogênese da criptococose. Até o momento, assume-se que a produção de urease esteja relacionada com a disseminação do microrganismo para diversos órgãos, inclusive facilitando a invasão ao SNC via danos na barreira hemato-encefálica (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009; CAMPOS; BARONI, 2010).

Torres-Rodriguez et al. (2008) demonstraram que *C. neoformans* produz mais urease do que *C. gattii*. Anteriormente, seu grupo de pesquisa já havia demonstrado em modelo experimental murino de criptococose que cepas de *C. gattii* apresentavam baixos níveis de produção de urease quando comparadas a cepas de *C. neoformans* (TORRES-RODRIGUEZ et al., 2002). A partir dos resultados descritos, os autores sugerem que *C. gattii* possui um conjunto enzimático mais complexo do que *C. neoformans*, com participação de outras enzimas, como lacase e fosfolipase produzidas em maior quantidade, atuando em conjunto durante a infecção, o que poderia explicar a maior patogenicidade de *C. gattii* quando comparado à *C. neoformans* (CASADEVALL;

STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003; KARKOWSKA-KULETA et al., 2009; CAMPOS; BARONI, 2010).

Adicionalmente, alguns autores têm demonstrado a capacidade de *Cryptococcus* produzir biofilme em materiais sintéticos como placas de poliestireno e itens prostéticos invasivos, além de cateteres de derivação ventriculoatrial, relacionando esse fato ao surgimento de infecções crônicas (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005; MARTINEZ; FRIES; 2010). Biofilmes são comunidades microbianas que crescem aderidos a alguma superfície sólida, envolvidos por uma matriz exopolimérica secretada pelos microorganismos em associação (MARTINEZ; CASADEVALL; 2005; MARTINEZ; CASADEVALL; 2006).

Especificamente acerca de *Cryptococcus* sp., a produção de biofilme pelas espécies (figura 8) envolve a adesão das células em uma dada superfície, a formação de microcolônias e a produção de uma matriz polissacarídica rica em glucuronoxilomanana (GXM) (MARTINEZ; CASADEVALL; 2005). De fato, a formação de biofilme é considerada uma importante estratégia de sobrevivência de alguns microorganismos, inclusive outras leveduras como *Candida* sp., tanto na natureza quanto nos tecidos do hospedeiro, estando a cronicidade da doença diretamente ligada à falha terapêutica (RAMAGE et al., 2002; RAMAGE; WICKES; LÓPEZ-RIBOT; 2007; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

Em estudo realizado por Martinez e Casadevall (2006), foi evidenciado que *Cryptococcus*, na forma de biofilme, apresentava resistência aos derivados azólicos fluconazol e voriconazol, quando comparado à forma planctônica. No mesmo estudo, foi demonstrada ainda a necessidade de altas concentrações de anfotericina B – cerca de 20 vezes maiores, considerando o ponto de corte proposto pelo CLSI (2008) – para inibir o crescimento de *Cryptococcus* na forma de biofilme em comparação às células planctônicas. Desse modo, a falha terapêutica pode estar relacionada com o fato de que os biofilmes são verdadeiras barreiras físicas que impedem a penetração das drogas no meio, aumentando a resistência de *Cryptococcus* aos agentes antifúngicos enquanto biofilme quando comparado à sua forma planctônica (AL-FATTANI; DOUGLAS; 2004; MARTINEZ; CASADEVALL; 2006).

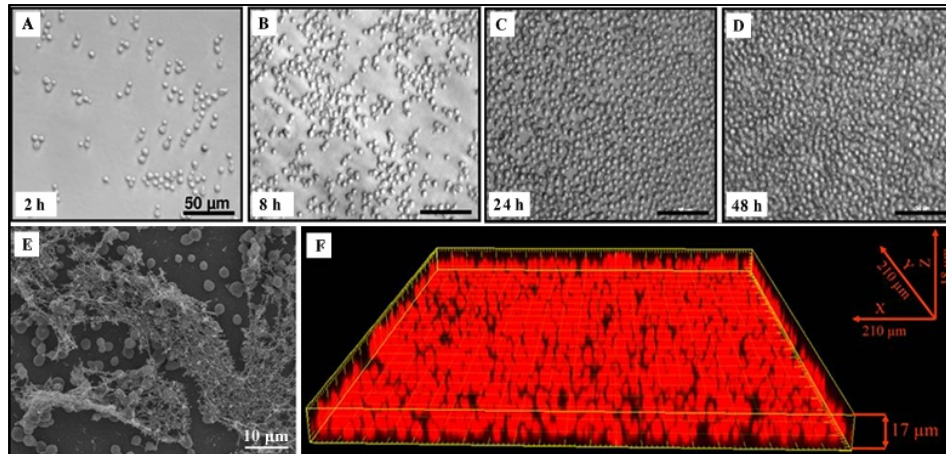


Figura 8. Formação de biofilme de *Cryptococcus* sp. A-D: Imagens de microscopia óptica mostrando as fases de formação e desenvolvimento de biofilme por *C. neoformans*. (A) Fase de adesão após 2 horas de contato do fungo com a placa de poliestireno. (B) Fase intermediária, após 8 horas de adesão, revelando o crescimento celular e formação de microcolônias. (C) Fase madura do biofilme, após 24 horas de crescimento. (D) Fase madura do biofilme, após 48 horas de crescimento. Assim como em (C), há uma densa rede de células unidas em uma camada de matriz extracelular. (E) Microscopia eletrônica de biofilme de *C. neoformans* durante a fase madura, após 48 horas de adesão. (F) Microscopia confocal de biofilme de *C. neoformans* durante a fase madura, após 48 horas de adesão. As células metabolicamente ativas são vistas em vermelho. Fonte das imagens: A-D: MARTINEZ; CASADEVALL (2006); E: MARTINEZ; FRIES (2010); F: RAVI et al., (2009).

1.4 Ecologia e Distribuição geográfica

Os fungos do Complexo *Cryptococcus neoformans* são seres ubíquos e que possuem ampla distribuição na natureza. *C. neoformans* tem sido associado à excretas de aves e madeira em decomposição, enquanto *C. gattii* é observado em regiões tropicais e subtropicais, associado às plantas como *Eucalyptus* sp. (eucalipto), *Cassia grandis* (cássia rosa) e *Ficus microcarpa* (fícus) (figura 9) (CASADEVALL; PERFECT, 1998; LAZERA et al., 2000; IKEDA et al., 2003; ESCANDÓN et al., 2006; LIN; HEITMAN, 2006; RIBEIRO; NGAMSKULRUNGROJ, 2008).



Figura 9: Principais nichos ecológicos do Complexo *Cryptococcus neoformans* descritos na literatura mundial. A - tronco de árvore em decomposição. B - Pombos (*Columba livia*) aglomerados em espaço público. C - *Ficus* sp. Fonte própria.

Em um extenso estudo de levantamento bibliográfico acerca da ocorrência mundial de *Cryptococcus*, Springer; Chaturvedi (2010) conseguiram mapear os principais nichos ecológicos de *C. gattii* e relacioná-los com *C. neoformans*. Especificamente sobre *C. gattii*, neste trabalho os autores reuniram informações de ocorrência da espécie em 48 países, associado a 54 espécies diferentes de árvores tanto nativas quanto exóticas. Além das espécies vegetais mais comumente descritas na literatura, alguns arbustos nativos da Austrália ocidental e do oeste dos Estados Unidos, como *Alnus rubra* e *Angophora costata*, espécies do continente europeu como alguns pinheiros (*Pinus* spp.) e ulmeiros (*Ulmus campestris*), e do continente africano como o tamarindeiro (*Tamarindus indica*) e o amendoim-acácia (*Tipuana tipu*) também foram associados ao fungo (SPRINGER; CHATURVEDI, 2010). Um quadro de ocorrência mundial baseado nestas informações é mostrado na figura 10.

Em outro estudo acerca da relação de *Cryptococcus* com espécies vegetais, Xue e colaboradores (2007) corroboram os dados presentes na literatura que tratam da associação de *C. gattii* e *Eucalyptus* sp., além da relação de *C. neoformans* e diversas outras espécies arbóreas. Os autores sugerem ainda que a produção de hormônios vegetais, tais como o ácido indol-3-acético (AIA), um hormônio da classe das auxinas, parece estimular, em *C. gattii*, o acasalamento entre diferentes tipos sexuais e sua filamentação na natureza. Desse modo, infere-se ainda que a interação de ambas as espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* com diferentes espécies vegetais parece ser vital para o fungo completar o seu ciclo sexual (XUE et al., 2007).

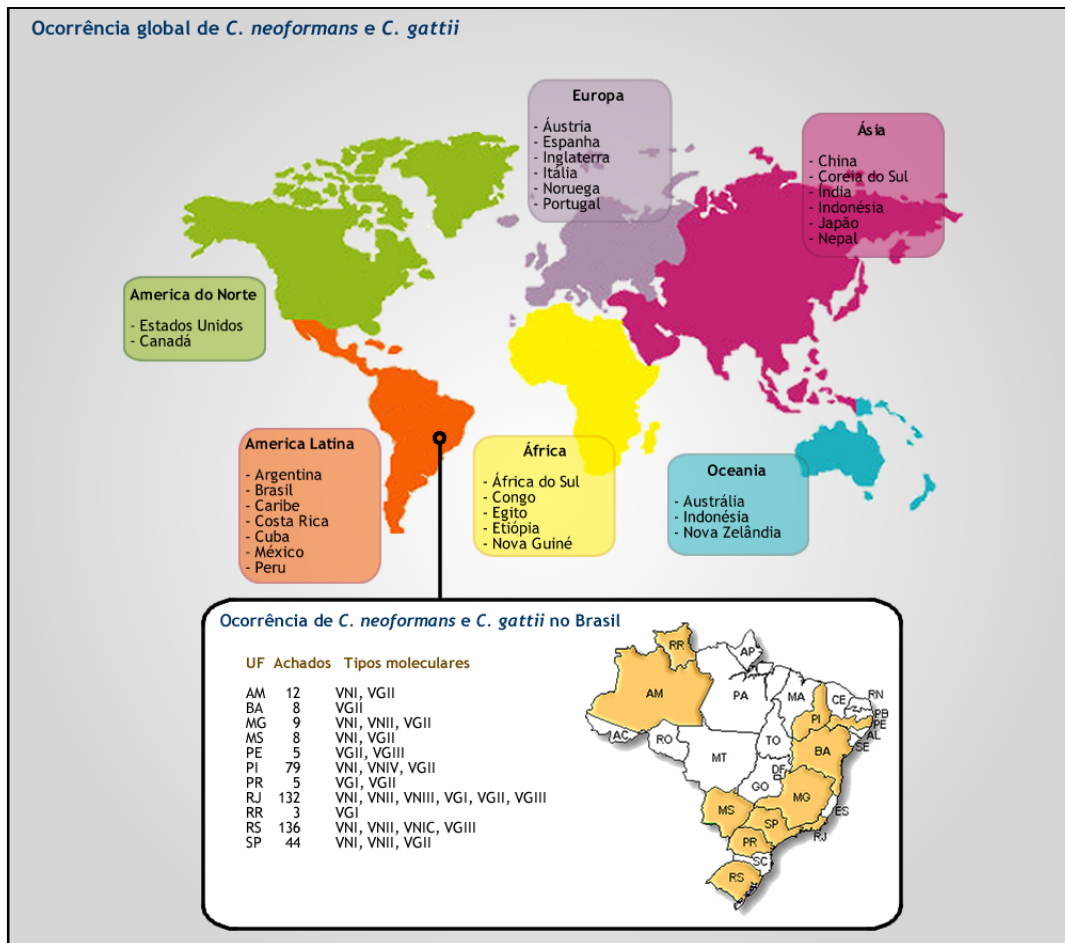


Figura 10: Mapa de ocorrências global e nacional de *C. neoformans* e *C. gattii*. Unidades da Federação do Brasil (UF) - AM: Amazonas, BA: Bahia; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; PE: Pernambuco; PI: Piauí; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RR: Roraima; RS: Rio Grande do Sul; SP: São Paulo. Mapa baseado em informações contidas em TRILLES et al. (2008) e SPRINGER; CHATURVEDI (2010), com adaptações.

Alguns aspectos bioquímicos da associação de *Cryptococcus* sp. com excretas de aves tem sido investigados. Kwon-Chung (1991) demonstrou que adaptações bioquímicas facilitam essa relação, uma vez que altos níveis de creatinina parecem criar uma pressão seletiva contra bactérias e outras leveduras, favorecendo o desenvolvimento de *Cryptococcus*. Além disso, Nielsen e colaboradores (2007) relataram que, quando submetida a crescimento em meios de cultura suplementados com guano de pombos, a levedura produz uma pigmentação acastanhada correspondente à produção de melanina, sendo mais pigmentado à medida que a concentração de guano no meio aumenta. Neste mesmo trabalho, os autores inferem que parece haver um maior crescimento de *C.*

neoformans de ambas as variedades em excretas de pombos, ao passo que *C. gattii* não é bem adaptado para sobreviver neste ambiente em períodos maiores do que duas semanas (NIELSEN et al., 2007);

Mais recentemente, em trabalho realizado por Costa e colaboradores (2009), 322 amostras coletadas em cloacas de pombos (*C. livia*) e 47 amostras de excretas secas das mesmas aves foram investigadas quando à presença do fungo. *Cryptococcus* spp. foi isolado em aproximadamente 27% das amostras de excretas, porém não houve isolamento do fungo nas amostras veterinárias. Outros estudos também demonstraram a presença do fungo em excrementos de outras aves, como galináceos, psitacídeos e passeriformes (CASADEVALL et al., 1992; GRISEO et al., 1995; LOPEZ-MARTINEZ et al., 1995; ABEGG et al., 2006).

Apesar de a literatura evidenciar que excretas de aves ou solos contaminados por esse material sejam as fontes ambientais nas quais *Cryptococcus* é isolado com maior frequência, o fungo também tem sido isolado de ambientes não-avícolas, do ar e principalmente de árvores, tanto saudáveis quanto em decomposição (LAZERA et al., 2000; LAZÉRA et al., 2004; LIN; HEITMAN, 2006; BOVERS; HAGEN; BOEKHOUT, 2008). Em diversos relatos, há isolamento tanto de *C. neoformans* quanto de *C. gattii* nessas fontes, o que sugere que ambas as espécies podem compartilhar o mesmo nicho ecológico, mesmo que de maneira restrita. Em relação às duas variedades de *C. neoformans*, não há ainda relatos de associações específicas com árvores, sendo frequentemente isoladas de madeira em diversas áreas, inclusive em regiões onde a flora é bastante diversificada (LIN; HEITMAN, 2006).

Especificamente sobre *C. gattii*, este tem sido isolado de fontes ambientais com maior frequência em amostras de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), seja da planta íntegra ou em decomposição. Isto sugere que pode haver uma associação preferencial do fungo com a espécie vegetal (LAZERA et al., 2000; LIN; HEITMAN, 2006). Na ilha de Vancouver, no Canadá, onde a criptococose foi considerada como uma epidemia em 2004, *C. gattii* foi isolado em várias espécies de plantas nativas, como diversas coníferas, carvalho (*Quercus* sp.) e cedro (*Cedrela fissilis*). Curiosamente, o isolamento da espécie em eucalipto, planta considerada exótica na região, foi considerado nulo ou quase inexistente (LAZERA et al., 2004; BARTLETT, 2004; LIN; HEITMAN, 2006; DATTA et al., 2009). No Brasil, além de eucalipto, *C. gattii* tem sido isolado com frequência em ocos e troncos de diversas árvores, como *Mangifera indica*, *Marlierea tomentosa* e *Guettarda acreana* (LAZERA et al., 2004; BARTLETT, 2004).

1.5 Criptococose

1.5.1 Patogenia e epidemiologia

Fungos do Complexo *Cryptococcus neoformans* são agentes etiológicos da criptococose, uma micose sistêmica potencialmente fatal adquirida principalmente pela inalação de propágulos fúngicos. De caráter oportunista, está frequentemente associada à imunossupressão, sendo que sua maior incidência é relacionada com pacientes com leucemia ou infecção pelo vírus HIV, além daqueles submetidos à corticoterapia (KAWAKAMI, 2004; LIN; HEITMAN, 2006). Dependendo do *status* imune do paciente, pode manifestar-se como infecção pulmonar, lesão granulomatosa ou ainda doença disseminada em sítios extrapulmonares, com maior frequência no SNC, onde causa quadro de meningoencefalite com altas taxas de mortalidade (BICANIC; HARRISON, 2004; GATES; THORKILDSON; KOZEL, 2004; KAWAKAMI, 2004; DUNCAN et al., 2006; LIN; HEITMAN, 2006).

A criptococose acomete homens e animais, porém não há relatos na literatura de transmissão horizontal entre nenhuma das espécies atingidas. Acredita-se que a infecção tenha início pela inalação de propágulos fúngicos de tamanho variando de três a cinco micrômetros (basidiósporos ou blastoconídios pouco capsulados) presentes no ar (LIN; HEITMAN, 2006; CONSENSO, 2008).

Após inalação, *Cryptococcus* pode colonizar o trato respiratório do hospedeiro sem produzir doença. Em pacientes hígidos, a infecção geralmente é assintomática e normalmente tende à cura. Pode ocorrer também infecção sintomática na área subpleural dos pulmões. Em alguns quadros, o fungo pode permanecer latente. Neste caso, havendo queda considerável na imunidade do hospedeiro, ou então quando o mesmo já é portador de alguma doença imunossupressora, a forma latente pode ser reativada, sendo o fungo disseminado via corrente sanguínea e causando infecção sistêmica, a depender ainda da densidade do inóculo inalado e da virulência do microorganismo (LIN; HEITMAN, 2006).

Após alcançar a corrente sanguínea, o fungo pode causar infecções localizadas na pele, ossos e articulações, pulmões, trato genitourinário, dentre outros. Dependendo da condição imunológica do paciente, *Cryptococcus* pode apresentar uma importante condição neurotrópica, culminando em casos de meningite com elevada taxa de mortalidade (BICANIC; HARRISON, 2004; LIN; HEITMAN, 2006). O ciclo infeccioso de *Cryptococcus* está esquematicamente representado na figura 11.

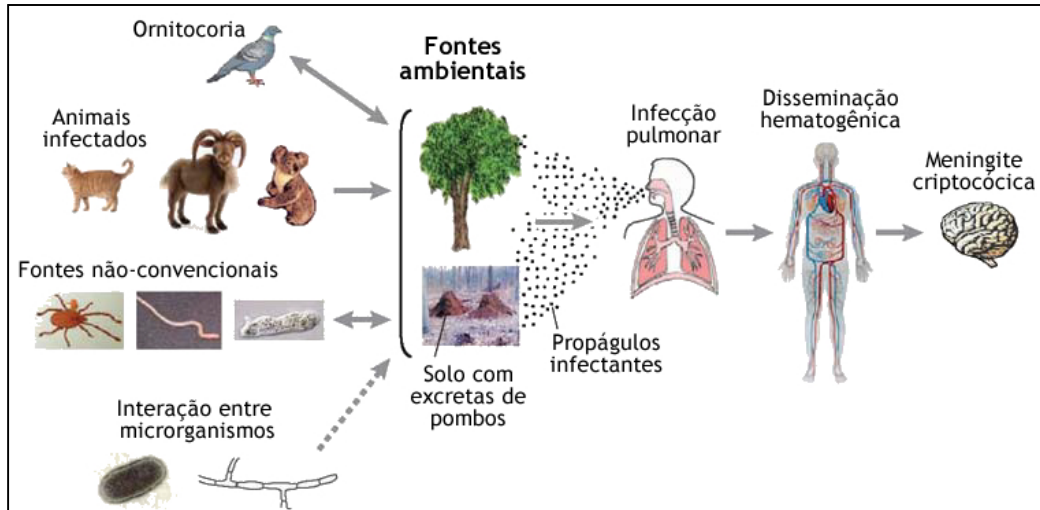


Figura 11: Ciclo infeccioso de *Cryptococcus*. O fungo pode sobreviver no solo, associado a fezes de aves ou outros animais, bem como pode estar associado à insetos, aracnídeos, bactérias ou amebas. Pássaros, em especial pombos, podem ser responsáveis pela dispersão de partículas fúngicas, assim como animais terrestres como gatos e cabras podem contribuir para essa dispersão. Outro nicho possível para o estabelecimento de *Cryptococcus* são as árvores. Depois de inalados, propágulos fúngicos podem causar uma infecção pulmonar restrita, ou podem se disseminar pela corrente sanguínea, atingindo outros órgãos como o cérebro. Adaptado de LIN; HEITMAN (2006).

Mundialmente, grande parte das infecções que afetam pacientes imunodeprimidos é causada por *C. neoformans* de ambas as variedades. *C. gattii* também apresenta uma elevada morbidade nesse grupo de pacientes, e não há distinção no quadro clínico da criptococose originada por uma das espécies em particular. *C. gattii* é ainda o agente que mais causa criptococose em indivíduos imunocompetentes, tendo propensão a causar criptocomas e lesões focais no Sistema Nervoso Central, com alta morbidade neurológica e ainda apresentando moderada resistência à terapia com antifúngicos usuais (CASADEVALL; PERFECT, 1998; SORRELL, 2001; BICANIC; HARRISON, 2004; IQBAL et al., 2010).

Estudos e relatos clínicos demonstram que as duas espécies mostram comportamentos diferentes na sua patogênese, porém causam sintomas semelhantes. A imunossupressão, principalmente causada por HIV, ainda é o principal fator de risco para o aparecimento da micose, mesmo após a introdução da terapêutica antiretroviral altamente eficaz (*highly active antiretroviral therapy* – HAART) (MAZUELOS; GARCÍA, 2010; OLSZEWSKI et al., 2010).

Estudos globais demonstram que 6 a 8% dos pacientes acometidos de aids irão desenvolver em algum momento criptococose. Estima-se que a taxa de mortalidade é cerca de 45 a 65% nos primeiros 12 meses após o início da terapia antiretroviral (TINTELNOT et al., 2004; MAZUELOS; GARCÍA, 2010; OLSZEWSKI et al., 2010). Em um importante estudo publicado por Park e colaboradores (2009), os autores estimaram ocorrerem no ano de 2006 quase um milhão de casos de meningite criptocócica em todo o mundo, sendo que aproximadamente 720 mil casos da doença foram atribuídos ao continente africano. A América Latina respondeu por cerca de 10% dos casos e, de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde, a criptococose foi mais letal do que a soma dos casos de tuberculose e hepatite B e C (UNAIDS, 2006; 2007; PARK et al., 2009).

No Brasil, a criptococose é a segunda doença neurológica mais prevalente em indivíduos com aids, tendo ainda um alto índice de mortalidade, mesmo após o início da terapia antifúngica. Dados da década passada revelam que a taxa de mortalidade média nesses pacientes varia de 15 a 30% (PAPPALARDO et al., 2007; CHARLIER et al., 2008).

Outros dados epidemiológicos revelam que a doença é mais prevalente em homens com idade entre 30 e 39 anos, dos quais 90% dos acometidos são portadores do vírus HIV. Contudo, verifica-se que a espécie *C. neoformans* var. *grubii* é a mais prevalente no mundo, seguido por *C. gattii*, sorotipo B (TRILLES et al., 2008; BYRNES III et al., 2010). Sobre os dados relacionados ao Brasil, diversos autores relatam os mesmos achados, exceto nos estados da região Nordeste, onde a prevalência é de *C. gattii* (LEAL et al., 2008; SANTOS et al., 2008; TRILLES et al., 2008). Entretanto, um recente estudo realizado na Bahia por Matos e colaboradores (2012) evidencia que *C. neoformans* também pode ser mais prevalente no Nordeste do que *C. gattii*. Investigando 62 cepas de *Cryptococcus* isoladas de pacientes com meningite, 48 amostras foram identificadas como *C. neoformans* genótipo VNI, uma amostra do genótipo VNII e as 13 cepas restantes foram identificadas como *C. gattii* genótipo VGII (MATOS et al., 2012).

Nos estados da região Sul, Sudeste e Centro-Oeste, *C. neoformans* var. *neoformans* é predominante e tem sido encontrado com maior frequência, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Mato Grosso, respectivamente (ALDEIDA et al., 2007; MATSUMOTO et al., 2007; LEAL et al., 2008; SANTOS et al., 2008; TRILLES et al., 2008; FAVALESSA et al., 2009). Já na região Norte do país, Santos e colaboradores (2008) analisaram o perfil epidemiológico de 56 amostras

isoladas de pacientes com meningite no estado do Pará, obtendo uma frequência de 35,7% (n=20) de *C. gattii* (SANTOS et al., 2008).

1.5.2 Diagnóstico laboratorial da criptococose

O diagnóstico laboratorial da criptococose é baseado principalmente no achado microscópico de blastoconídios encapsulados em amostras biológicas, principalmente líquido cefalorraquidiano (LCR) visualizados em coloração negativa com tinta da China. Além da pesquisa do fungo nos materiais supracitados, o cultivo e isolamento do fungo em meios de cultura é outro método comprobatório de criptococose, principalmente em amostras de líquido, e ainda de sangue, escarro, lavado brônquico e aspirado de medula óssea (OHKUSU et al., 2002; CONSENSO, 2008).

Outro método também realizado para diagnóstico da criptococose é o exame histopatológico. A presença do microrganismo no tecido analisado é indicativa e/ou confirmatória da doença. Em tecidos corados por hematoxilina-eosina (HE), *Cryptococcus* pode se apresentar de forma esférica a ovalada, com diâmetro variável (2 a 20 µm) e cora-se em tons de rosa ou azul claro. Nessa coloração, a cápsula não se cora devido aos seus componentes mucopolissacarídicos, gerando um halo ao redor de levedura (PEDROSO et al., 2006; CONSENSO, 2008). Outras técnicas de coloração como mucicarmim de Mayer, Fontana-Masson, impregnação com prata através do método de Gomori-Grocott e a coloração por ácido periódico de Schiff (PAS) são também realizadas em muitas rotinas laboratoriais, sendo as duas últimas as mais utilizadas para detectar *Cryptococcus* nos tecidos do paciente (LAZÉRA; IGREJA; WANKE, 2004; CONSENSO, 2008).

Métodos de diagnóstico imunológicos são também empregados na rotina diagnóstica, sendo a detecção do antígeno capsular em fluidos biológicos uma técnica extremamente sensível e rápida, realizada principalmente em líquido cefalorraquidiano e soro. A técnica de detecção de antígeno capsular por aglutinação em látex apresenta positividade superior a 90% dos casos em pacientes com meningite criptocócica, e também pode ser realizada em outras amostras biológicas, tais como sangue, soro, urina e lavado brônquico alveolar (BROUWER et al., 2004; CONSENSO, 2008).

Ferramentas moleculares e métodos automatizados e semiautomatizados estão sendo cada vez mais utilizados como auxílio ao diagnóstico laboratorial da criptococose. Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), tais como PCR-REA e *nested* PCR têm sido usadas para detecção e sequenciamento de regiões específicas do

genoma de *Cryptococcus*, contribuindo para o diagnóstico da doença. Outras ferramentas moleculares também baseadas em PCR, como PCR *fingerprint*, PCR-RFLP, AFLP e MLST tem se mostrado bastante eficazes na diferenciação dos sorotipos e tipos moleculares dos fungos do complexo. Embora os métodos semiautomatizados e automatizados, como API 20C AUX (BioMérieux), BacT/ALERT 3D (BioMérieux), e VITEK 2 (BioMérieux) sejam usados com frequência na rotina laboratorial (HATA et al., 2007; SIDRIM et al., 2010) sua capacidade discriminatória é bastante limitada (CORDEIRO et al., 2011).

1.6 Drogas antifúngicas

Nas últimas décadas, a descoberta e o uso de novas drogas antibacterianas e imunossupressoras foram capazes de aumentar consideravelmente a sobrevivência dos pacientes, principalmente aqueles que apresentam deficiência no sistema imunológico. Entretanto, o uso constante e/ou inadequado desses fármacos ocasionou um aumento na incidência de micoses nestes pacientes, sejam estas superficiais ou sistêmicas. A lista de substâncias químicas que possuem ação antifúngica ainda é restrita quando comparada à variedade de drogas antibacterianas disponíveis. As drogas antifúngicas possuem mecanismos de ação bem definidos, podendo ter ação fungicida ou fungistática, agindo de maneira direta ou indireta sobre o microrganismo. (LACAZ; NEGRO, 1991; POLAK, 1999; NOBRE et al., 2002).

O arsenal antifúngico disponível para o tratamento da criptococose atualmente é limitado e restrito a poucas classes de drogas. Dentre estas, anfotericina B (AMB) tem sido a droga de escolha frente a infecções fúngicas sistêmicas, apesar de apresentar consideráveis efeitos colaterais. Derivados azólicos podem ser utilizados em substituição ao tratamento com AMB, ou ainda administrados em conjunto com a mesma (CASADEVALL; PERFECT, 1998; ZARAGOZA et al., 2005).

A anfotericina B é um poliênico derivado de *Streptomyces nodosus* e, desde sua primeira utilização em 1956, propiciou uma nova perspectiva no tratamento de micoses sistêmicas, aumentando a taxa de cura dos pacientes em mais de 45% dos casos. Possui um amplo espectro de ação, e atua por meio da ligação ao ergosterol na membrana plasmática e criação de vários microporos na estrutura, ocasionando, assim, a morte do fungo devido à saída de metabólitos essenciais, nucleotídeos e proteínas. No hospedeiro, pode estimular a produção de citocinas inflamatórias pelas células da imunidade inata (SAU et al., 2003; MA; MAY, 2009). Apesar da atividade antifúngica, apresenta diversos

efeitos colaterais no hospedeiro, dentre eles nefrotoxicidade em mais de 50% dos pacientes (CASADEVALL; PERFECT, 1998; BARQUIST et al., 1999; ZARAGOZA et al., 2005; VARMA; KWON-CHUNG, 2010).

Derivados azólicos, principalmente fluconazol (FLC), também têm sido amplamente utilizados no combate à criptococose, independentemente do agente etiológico envolvido (VARMA; KWON-CHUNG, 2010). Os azólicos são compostos fungistáticos que agem inibindo a via de síntese do ergosterol (figura 12), vital para a integridade e manutenção da membrana celular fúngica, através da inibição da enzima lanosterol 14 α -demetilase. Tal inibição leva à conseqüente má formação da membrana, alterando sua fluidez, permeabilidade e captação de nutrientes (SAU et al., 2003; JARVIS; HARRISON, 2007).

O itraconazol (ITR), um derivado triazólico sintético, apresenta boa ação inibitória contra *Cryptococcus* sp., e tem sido considerado como uma opção ao tratamento da criptococose quando o paciente não for responsivo ao tratamento com fluconazol, ou então como droga de manutenção e/ou terapia profilática, principalmente em indivíduos infectados com o vírus HIV (NGUYEN; YU, 1998; TRILLES et al., 2004; PFALLER et al., 2005; SILVA et al., 2008).

A fluocitocina (5-Fc) é uma droga sintética comumente utilizada para o tratamento da criptococose, mas não se encontra disponível para uso no Brasil. Normalmente é administrada em associação com anfotericina B devido a um aumento na eficácia do tratamento, mas por causar no paciente graves efeitos mielotóxico e hepatotóxico deve ser administrada com cautela (DISMUKES et al., 1987; BICANIC; HARRISON, 2004; BROUWER et al., 2004).

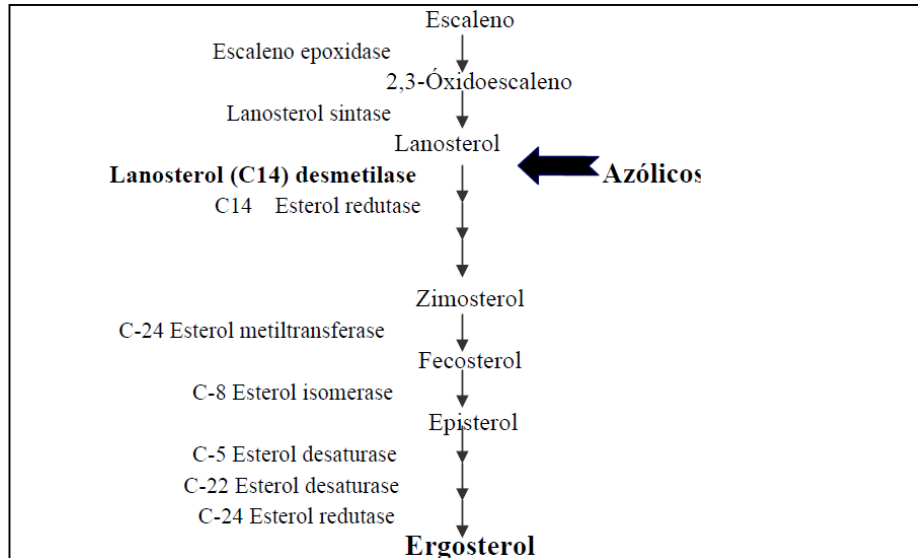


Figura 12: Via metabólica da síntese do ergosterol. A seta em destaque mostra o local de ação dos derivados azólicos. Adaptado de WHITTE et al. (1998).

As equinocandinas, classe de drogas antifúngicas que agem interferindo a formação da parede celular, através da inibição da 1,3 β -glucana sintase, não apresentam ação frente aos fungos do complexo *Cryptococcus neoformans*, embora a caspofungina possua atividade antifúngica *in vitro* frente a um amplo espectro de fungos filamentosos e leveduras clinicamente importantes, como *Candida* sp. Apesar de a caspofungina ser eficaz e bem tolerada *in vivo*, *Cryptococcus* sp. é resistente à sua ação antimicrobiana tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mesmo possuindo em sua parede celular o alvo de ação da droga. Esse fato pode ser devido à degradação da droga antes de atingir seu alvo molecular, ou então por alguma modificação na molécula de 1,3 β -glucana sintase presente na parede celular do fungo (PERFECT et al., 2010).

A ocorrência de isolados de *Cryptococcus* com resistência primária ou secundária à anfotericina B ou fluconazol é relativamente baixa, embora existam relatos descritos na literatura (PERKINS et al., 2005; SOUZA et al., 2005; SILVA et al., 2008). Entretanto, alguns estudos demonstraram que o uso de concentrações subinibitórias de derivados azólicos tem levado ao aparecimento de isolados resistentes *in vivo*, contribuindo para a manutenção da infecção no hospedeiro (GRAYBILL et al., 1998; PERKINS et al., 2005; PFALLER et al., 2005; VARMA; KWON-CHUNG, 2010). Além disso, há relatos de que a terapia de longa duração com fluconazol durante a criptococose pode contribuir para o aparecimento de isolados resistentes (PFALLER et al., 2005; TRILLES et al., 2011).

Devido aos riscos e aos problemas causados por cepas com resistência primária às principais drogas antifúngicas, há necessidade da realização de estudos de prospecção de novas drogas antifúngicas e a descoberta de novos alvos moleculares em *Cryptococcus*.

1.7 Inibidores de folato

Nos últimos anos, diversos estudos têm mostrado o potencial antifúngico de drogas inibidoras da síntese do ácido fólico em *Candida albicans* (NAVARRO-MARTINEZ et al., 2006), *Paracoccidioides brasiliensis* (HAHN et al. 2003; SCAVONE; BURGER, 2004), *Histoplasma capsulatum* (BRILHANTE et al., 2010) e *Aspergillus* spp. (HANAFY et al., 2007, HIDA et al., 2005, AFELTRA et al., 2002).

As sulfonamidas, derivados da *para*-aminobenzenossulfonamida, foram os primeiros antimicrobianos utilizados na história da medicina, tendo seu uso clínico relatado a partir de 1933. Possuem amplo espectro antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, exercendo, em geral, efeito bacteriostático (PETRI, 2006). O mecanismo de ação das sulfonamidas está representado de modo resumido na figura 13. Esse mecanismo de ação parece estar relacionado com a via biossintética do ergosterol, uma vez que são drogas inibidoras competitivas da DHP (dihidropteroato) sintase, enzima envolvida diretamente na síntese do ácido fólico nos microrganismos, incluindo os fungos, bem como um dos participantes do início da via sintética do ergosterol (HUGHES, 1991; HIDA et al., 2005). As combinações de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprim (TMP), bem como sulfadiazina (SDZ) e pirimetamina (PIR) são antimicrobianos que tem sido utilizado frequentemente como profilaxia para quadros de pneumonia causada por *Pneumocystis jiroveci* (PCP) em pacientes imunocomprometidos (HIDA et al., 2005; HANAFY et al., 2007). O trimetoprim apresenta efeito sinérgico quando em combinação com sulfametoxazol, sendo capaz de inibir seletivamente a diidrofolato redutase, uma enzima que reduz diidrofolato a tetraidrofolato (HANAFY et al., 2007).

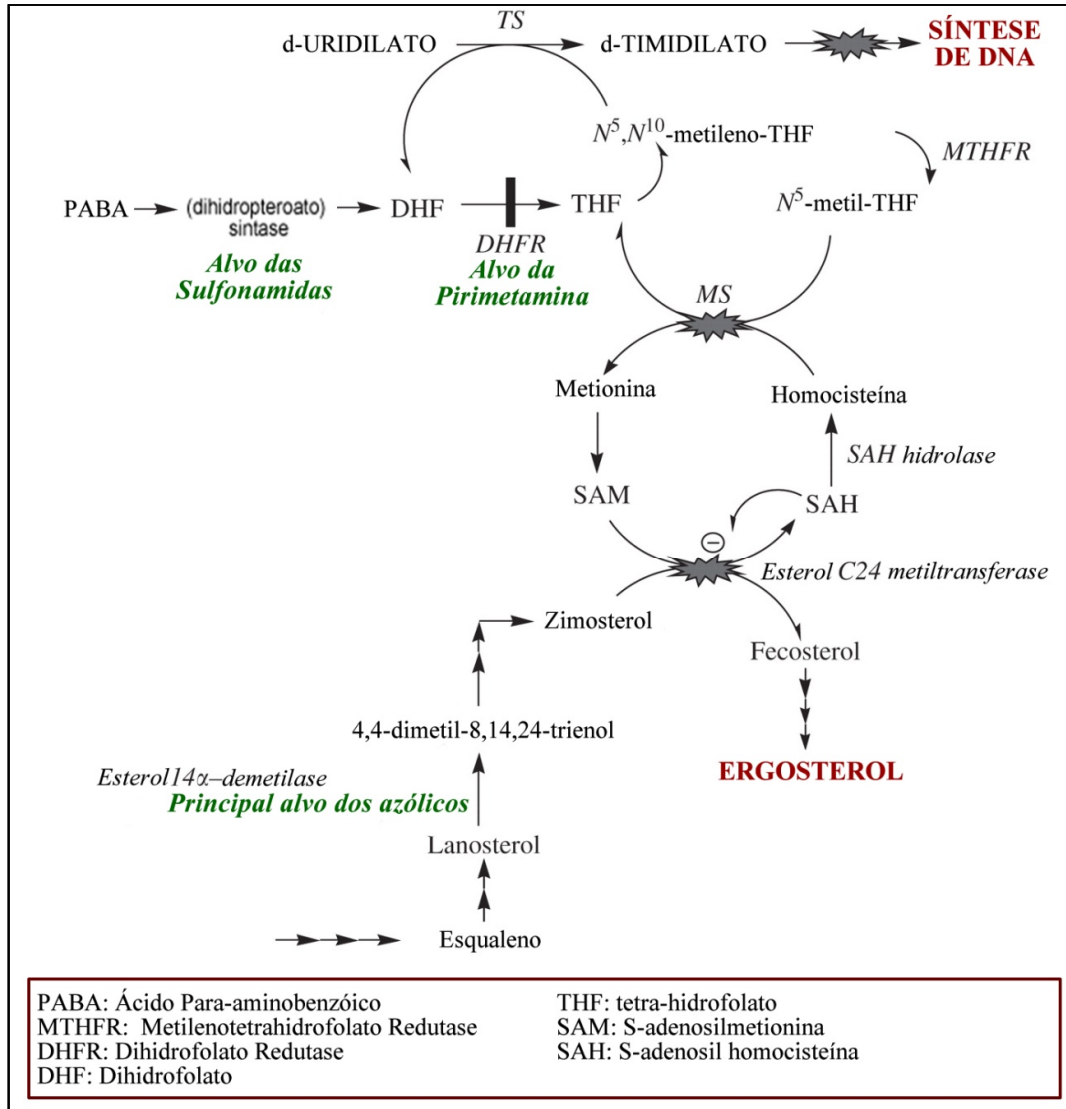


Figura 13: Conexão molecular entre os ciclos biossintéticos do ácido fólico e do ergosterol. Adaptado de Navarro-Martinez et al. (2006).

Embora utilizada principalmente para tratamento de infecções bacterianas, tais combinações tem apresentado inibição *in vitro* de *Aspergillus* spp. (HANAFY et al., 2007), *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* (BADDLEY et al., 2008; BRILHANTE et al., 2010) e *Coccidioides posadasii* (CORDEIRO et al., 2011).

Navarro-Martinez et al. (2006) sugerem que os inibidores de folato podem estar envolvidos na síntese do ergosterol fúngico, por meio da inibição de S-adenosilmetionina (SAM), um cofator enzimático do qual depende a esterol-C24-metiltransferase e que atua na via biossintética do ergosterol. Eles observaram que inibidores de folato provocaram

uma redução na produção de ergosterol por *Candida* sp., tanto quando testados isoladamente, quanto em combinação com derivados azólicos.

Contudo, os dados acerca do efeito *in vitro* e *in vivo* das sulfonamidas frente à *Cryptococcus* spp. ainda são incipientes, havendo poucos estudos relacionados. Hanafy e colaboradores (2007) foram os primeiros a investigar a sensibilidade de *Cryptococcus* quando exposto, *in vitro*, às sulfonamidas. Para tanto, os autores avaliaram cepas de *C. neoformans* var. *grubii* (n=5) frente a nove sulfonamidas diferentes, dentre elas SDZ e SMX, com concentração inibitória mínima de 256 µg/mL e 32 µg/mL, respectivamente (HANAFY et al., 2007). Apesar do estudo pioneiro, não há dados na literatura mais atual acerca dos efeitos das sulfonamidas em *Cryptococcus*, fazendo-se necessário investigar o seu efeito inibitório, bem como sua ação sobre a produção e síntese dos principais fatores de virulência relacionados aos fungos do complexo *Cryptococcus neoformans*.

2 JUSTIFICATIVA

Fungos do Complexo *Cryptococcus neoformans* são agentes etiológicos da criptococose, uma micose sistêmica de caráter oportunista potencialmente fatal e que acomete homens e animais. O arsenal antifúngico disponível para o tratamento da criptococose atualmente é limitado e restrito a poucas classes de drogas. Tal fato gera a necessidade da realização de estudos de prospecção de novas drogas antifúngicas e a descoberta de novos alvos moleculares em *Cryptococcus*.

Há também uma crescente preocupação com o aumento da resistência intrínseca de biofilmes fúngicos aos antimicrobianos, bem como da refratariedade terapêutica em infecções a eles relacionadas. Ademais, têm sido destacados estudos que visam apontar diferenças na sensibilidade antifúngica de diferentes espécies de *Cryptococcus*, bem como entre cepas da mesma espécie.

Na última década, vários estudos têm mostrado o potencial antimicrobiano de drogas inibidoras da síntese do ácido fólico em várias espécies e, embora seja essencialmente uma classe de drogas antibacterianas, os inibidores de folato têm apresentado, *in vitro* e *in vivo*, eficácia no combate a diversas espécies fúngicas.

Diante do exposto, propomos realizar uma busca por possíveis nichos ambientais dos fungos do Complexo *Cryptococcus neoformans*, visando contribuir para um melhor entendimento dos focos naturais desses microorganismos em nosso meio. Além disso, propomos investigar, *in vitro*, os efeitos de inibidores de folato em *C. neoformans* e *C. gattii*, avaliando a ação dessas drogas sobre o crescimento fúngico, a sensibilidade a antifúngicos e a produção de fatores de virulência.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito das combinações de sulfametoxazol-trimetoprim (SMX-TMP) e sulfadiazina-pirimetamina (SDZ-PIR) sobre o crescimento, sensibilidade antifúngica e produção de fatores de virulência de cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans*, bem como investigar sua presença no ambiente.

3.2 Objetivos específicos

1. Investigar os nichos ecológicos preferenciais de cepas de *Cryptococcus* de origem ambiental na cidade de Fortaleza e região metropolitana;
2. Determinar o perfil de sensibilidade de cepas ambientais e clínicas de *Cryptococcus* frente às combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR;
3. Investigar o efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a sensibilidade às drogas antifúngicas;
4. Investigar o efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de fosfolipase e protease;
5. Determinar o efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de ergosterol celular;
7. Avaliar o efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a formação de biofilme de *Cryptococcus* sp. e;
8. Avaliar o efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre biofilme maduro de *Cryptococcus* sp.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coletas, isolamento e identificação de amostras de origem ambiental

Foram realizadas coletas de amostras de troncos, ocos e cascas de árvores, além de excrementos secos de pombos (*Columba livia*) presentes em áreas urbanas da cidade de Fortaleza e Região Metropolitana, Ceará, Brasil, visando ao isolamento de fungos do Complexo *C. neoformans*. A coleta em espécimes vegetais foi realizada conforme metodologia proposta por Granados e Castañeda (2005). Para tanto, *swabs* estéreis foram friccionados nas superfícies e ocos das árvores e transferidos para tubos contendo solução salina estéril e levados imediatamente ao laboratório, onde foram semeados em placas contendo Agar Semente de Níger (ASN) e posterior incubação a 28 °C por até sete dias. Excretas de pombos foram coletadas e processadas segundo metodologia proposta por Reolon (2004). Amostras de fezes secas foram raspadas com espátulas e acondicionadas em frascos plásticos estéreis. Em cabine de fluxo laminar, as amostras foram maceradas e homogeneizadas em gral com pistilo de porcelana. Todos os procedimentos foram realizados com materiais previamente esterilizados em autoclave. Aproximadamente 1 g do homogenato foi pesado e suspenso em 30 mL de solução salina com cloranfenicol (50 µg/mL) e homogeneizado em agitador tipo Vortex[®] por três minutos e mantido em repouso por 30 minutos à temperatura de 25 °C. Após esse período, 100 µL do sobrenadante foram semeados em placas de Petri contendo ASN e incubados em estufa a 33 °C por até sete dias. Posteriormente, as colônias de coloração variando de creme a marrom foram repicadas para placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose 2% e posteriormente identificadas seguindo critérios morfológicos e fisiológicos descritos por De Hoog et al. (2000), que incluíram: prova da urease, assimilação de inositol e crescimento em meio CGB (Canavanina-Glicina-Azul de bromotimol).

4.2 Obtenção de amostras de origem clínica

Cepas de *Cryptococcus* spp. (n=10) isoladas a partir de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com meningoencefalite foram devidamente identificadas conforme metodologia descrita no item 4.1. Todas as cepas pertencem à Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (Faculdade de Medicina – UFC), onde são mantidas em estoque a -80 °C. O emprego desses isolados para fins acadêmicos foi autorizado Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas (Processo 007-2009).

4.3 Testes de sensibilidade antifúngica

4.3.1 Preparo do inóculo

Para preparo do inóculo de *Cryptococcus* spp., as cepas foram cultivadas em Ágar Batata Dextrose e incubadas à 35 °C por 48 h. Após crescimento, as células foram suspensas em 5 mL de solução salina 0,9% estéril e homogeneizadas em agitador tipo Vórtex[®] por até 15 segundos. A concentração do inóculo foi ajustada ao tubo 0,5 da escala de MacFarland. Em seguida, foram realizadas duas diluições consecutivas (1:100 e 1:20) em meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (HANAFY et al. 2007) de modo a se obter uma concentração final variando entre 0,25 e 1×10^3 células/mL (CLSI, 2008).

4.3.2 Testes de sensibilidade *in vitro* frente a sulfametoxazol-trimetoprim e sulfadiazina-pirimetamina

A sensibilidade de cepas *Cryptococcus* spp. (n=30) frente à sulfametoxazol-trimetoprim (SMX-TMP) e sulfadiazina-pirimetamina (SDZ-PIR) foi investigado utilizando o protocolo M27-A3 de microdiluição em caldo (CLSI, 2008), com pequenas alterações. Para tanto, soluções-estoque de SMX-TMP e SDZ-PIR foram preparadas em dimetil sulfóxido (DMSO) a 10% e armazenadas a -20 °C até o momento do uso. Os ensaios de microdiluição foram realizados em microplacas estéreis de 96 poços, utilizando o meio de cultura YNB. A concentração das drogas testadas variou de 7,61 µg/mL a 1000 µg/mL para SMX e SDZ, 0,39 µg/mL a 200 µg/mL para TMP e de 0,097 µg/mL a 50 µg/mL para PIR. A concentração inibitória mínima (CIM) foi arbitrariamente definida como aquela capaz de inibir 80% do crescimento fúngico visível quando comparado ao crescimento do controle, livre de quaisquer drogas, após 48 horas de incubação. Os ensaios de sensibilidade antifúngica foram realizados em duplicata. Foram incluídos controles de qualidade do experimento em cada placa utilizada, sendo: controle de esterilidade da droga e do meio de cultura utilizado, além do controle de crescimento fúngico em meio sem droga. Além disso, cepas padrão ATCC de *Candida krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019), foram incluídas no experimento e testadas frente aos antifúngicos Anfotericina B (AMB) e Fluconazol (FLC), tendo seus resultados analisados de acordo com os pontos de corte definidos pelo CLSI. (CLSI, 2008).

4.3.3 Testes de sensibilidade *in vitro* frente à antifúngicos

Visando investigar o efeito das drogas antifolato sobre o seu fenótipo de resistência antifúngica, a determinação do perfil de sensibilidade de cepas de *Cryptococcus* spp. (n=30) frente a antifúngicos foi realizada utilizando o protocolo M27-A3 de microdiluição em caldo, de acordo com o recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Para tanto, soluções-estoque de anfotericina B (AMB), caspofungina (CAS), itraconazol (ITR) e fluconazol (FLC) foram preparadas em dimetil sulfóxido (DMSO) a 10% e armazenadas à -20 °C até o momento do uso. Os ensaios de microdiluição foram realizados em microplacas estéreis de 96 poços, utilizando o meio de cultura RPMI 1640.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada segundo critérios estabelecidos pelo documento M27-A3, sendo para AMB aquela capaz de inibir 100% do crescimento fúngico visível quando comparado ao crescimento fúngico do controle, livre de quaisquer drogas, após 48 horas de incubação. Para ITR e FLC, a concentração inibitória mínima foi definida com aquela capaz de inibir 80% do crescimento fúngico visível comparado ao seu controle após 48 horas de incubação. Para CAS, a concentração inibitória mínima foi definida como aquela capaz de inibir de 80% do crescimento fúngico, em comparação ao tubo-controle após 24 horas de incubação. Os ensaios de sensibilidade antifúngica foram realizados em duplicata, bem como foram incluídos controles de qualidade do experimento em cada placa utilizada, tais como controle de esterilidade da droga, do meio de cultura utilizado e do crescimento fúngico sem droga. Além disso, foram utilizadas ainda cepas padrão ATCC de *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) (CLSI, 2008).

4.4 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a resistência antifúngica

Foi avaliado o efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a sensibilidade antifúngica de cepas de *Cryptococcus*. Para tanto, cepas de *C. gattii* (n=7) e *C. neoformans* (n=7) com sensibilidade reduzida frente às drogas antifúngicas anfotericina B (AMB), caspofungina (CAS), itraconazol (ITR) e fluconazol (FLC), foram selecionadas baseado em critérios de resistência estabelecidos na literatura, a saber: AMB (CIM \geq 1 $\mu\text{g/mL}$), CAS (CIM $>$ 2 $\mu\text{g/mL}$), ITR (CIM $>$ 1 $\mu\text{g/mL}$) e FLC (CIM \geq 64 $\mu\text{g/mL}$) (PFALLER et al., 2007; CLSI, 2008). As cepas escolhidas fazem parte da Micoteca do CEMM e o seu perfil de sensibilidade a antifúngicos foi previamente

mostrado por Costa et al. (2010) e confirmado de acordo com o item 4.3.3 desta metodologia.

Para tanto, as culturas foram mantidas sob agitação (150 rpm) por 24 horas em meio YNB suplementado com SMX-TMP e SDZ-PIR em concentrações sub-CIM estabelecidas de acordo com os resultados obtidos a partir da metodologia descrita no item 4.3.2. Controles do experimento foram mantidos em meio YNB sem adição de drogas. Após incubação, todas as amostras foram centrifugadas (2000 rpm) por cinco minutos para obtenção de *pellet* celular. Os ensaios de sensibilidade com drogas antifúngicas foram realizados de acordo com o descrito no item 4.3.3.

4.5 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre o ergosterol celular

Para determinar o efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a concentração de ergosterol, foi empregado o protocolo descrito por MORAN et al. (2007), no qual cepas de *C. gattii* (n=7) e *C. neoformans* (n=7) foram repicadas em Agar Batata Dextrose e mantidas por 48 horas a 37 °C. Em seguida, as células foram incubadas a 37 °C por 48 horas em 1 mL de YNB suplementado com as combinações de drogas na concentração referente à CIM, CIM/2 e CIM/4 de cada cepa na fase planctônica, bem como seus respectivos controles livres de drogas. Como droga controle para diminuição da concentração de ergosterol, foi utilizada ITC nas mesmas concentrações testadas para SMX-TMP e SDZ-PIR (CIM, CIM/2 e CIM/4). Após o período de incubação, o conteúdo de cada tubo foi transferido para microtubos estéreis e centrifugado por três minutos a 12000 rpm para formação de *pellet*. Após a centrifugação e retirada do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 0,5 mL de solução de hidróxido de potássio alcoólico (3,945 g KOH em 100 mL de álcool 60%) e procedeu-se incubação e banho-maria a 95 °C por uma hora. Após incubação, foram adicionados aos tubos 600 µL de hexano P.A., seguido de agitação moderada por 5 segundos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados (10000 g / 1 minuto) e toda a camada superior de hexano foi removida e transferida para microtubos estéreis, aos quais 1 mL de hexano P.A. foi adicionado. A quantificação do ergosterol foi realizada por meio de análise espectrofotométrica a uma absorvância de 295 nm.

4.6 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de protease

Foram escolhidas aleatoriamente cepas de *C. gattii* (n=7) e *C. neoformans* (n=7) para investigação do efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção

de protease. Para tanto, foi utilizada metodologia já descrita na literatura com pequenas modificações (CHARNEY; TOMARELLI, 1947; CENCI et al., 2008).

A partir de culturas crescidas em ágar batata por 48 horas, o inóculo fúngico foi preparado em solução salina estéril, com turvação semelhante ao tubo 4 da escala de McFarland. O microrganismo foi cultivado em meio YNB, adicionando-se 2 mL de cada suspensão fúngica em novo meio YNB (2 mL) suplementado com as combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR nas concentrações referentes a 2X, 1X e 0,5X a CIM de cada cepa, estabelecidas de acordo com os resultados obtidos a partir da metodologia descrita no item 4.3.2, bem como seus respectivos controles, sem adição de droga.

Após 48 horas de incubação sob agitação a 150 rpm, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos, e 1 mL do sobrenadante foi transferido para três tubos distintos. O conteúdo de um dos tubos foi considerado a substância de referência (branco) e o conteúdo dos outros dois tubos foi usado para testes em duplicata. Ao conteúdo do tubo de referência (branco), foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético e 1 mL de azoalbumina. Aos outros dois tubos, somente azoalbumina foi adicionada, em um volume de 1 mL em cada tubo. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 ° C por 48 horas, e a reação interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético em cada tubo testado. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 3000 rpm, e em 2 mL do sobrenadante de cada amostra foram adicionados 2 mL de NaOH 5% para posterior análise espectrofotométrica a 530 nm. Os resultados foram expressos em unidades de enzima por mililitro (U/mL) de sobrenadante, de acordo com a seguinte fórmula:
$$U = \frac{(abs_{teste} - abs_{branco}) - 0,01}{1,44} \times 1000$$
, onde “abs teste” representa a absorvância obtida no tubo teste e “abs branco” a absorvância medida no tubo de referência.

4.7 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de fosfolipase

O efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de fosfolipase foi avaliado de acordo com metodologia preconizada por Price et al. (1982), Vidotto et al. (2005) e Brilhante et al. (2011) com modificações. Para tanto, do grupo de microrganismos investigados neste trabalho, foram escolhidas aleatoriamente cepas de *C. gattii* (n=10) e *C. neoformans* (n=10).

Inóculos fúngicos foram preparados em solução salina estéril 0,9% (5 mL) e 900 µL foram adicionados em tubos contendo 3100 µL de meio de cultura YNB

suplementado com SMX-TMP e SDZ-PIR em 2X, 1X e 0,5X a concentração inibitória mínima de cada cepa estabelecidas de acordo com os resultados obtidos a partir da metodologia descrita no item 4.3.2, bem como seus respectivos controles, sem adição de droga.

Após incubação por 48 horas a 37 °C, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante descartado. Inóculo de cada cepa foi novamente preparado em solução salina estéril com uma turvação correspondente ao tubo 4 na escala de McFarland. Em seguida, 5 µL de cada inóculo foram colocados em um disco de 5 mm de papel-filtro estéril, o qual foi depositado sobre placas contendo Agar Sabouraud Dextrose 2%, suplementado com cloreto de sódio 1 mol/L, cloreto de cálcio 0,05 mol/L e 8% de emulsão de gema de ovo estéril. As placas foram incubadas a 35°C, durante sete dias (BRILHANTE et al., 2011).

A atividade de fosfolipase (Pz) foi determinada pelo cálculo da razão entre o diâmetro da colônia de fungos e o diâmetro total, incluindo a colônia e a zona de precipitação. Assim, quando $Pz = 1$, o isolado possui atividade de fosfolipase negativa, quando $1 > Pz \geq 0,64$ o isolado apresenta atividade de fosfolipase positiva, e quando $Pz < 0,64$, o isolado possui atividade fortemente positiva para esta enzima (VIDOTTO et al, 2005; BRILHANTE et al., 2011).

4.8 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre biofilme maduro de *Cryptococcus* spp.

Para investigar o efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre o biofilme de *Cryptococcus* spp. foi empregado o modelo proposto por Martinez et al. (2010), com adaptações. Do conjunto de microrganismos utilizados neste trabalho, cepas de *C. gattii* (n=7) e *C. neoformans* (n=7) escolhidas aleatoriamente foram cultivadas em Agar Sabouraud Dextrose a 30 °C por 48 horas e transferidas para caldo Sabouraud Dextrose, sendo incubadas na mesma temperatura por 24 horas, sob agitação constante (150 rpm). Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação (3000 rpm, 10 minutos), lavadas duas vezes com tampão PBS estéril e, em seguida, ressuscitadas em 1 mL de meio mineral (20 mg/mL de tiamina, 30 mM de glicose, 26 mM de glicina, 20 mM MgSO₄.7H₂O, 58,8 mM KH₂PO₄). Aliquotas de 100 µL da suspensão fúngica foram transferidas para poços de placa de polipropileno de fundo chato, sendo incubado a 37 °C por 48 horas. Após incubação, o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e a camada de células lavadas três vezes com TBS (0,05% Tween 20 em tampão Tris). A

viabilidade do biofilme foi monitorada pela mudança na coloração do indicador resazurina (0,1 mg/mL diluída em meio RPMI), adicionado aos poços, seguindo-se incubação por até seis horas a 37 °C. Posteriormente, a solução foi retirada e a camada de células lavadas três vezes com TBS. Em seguida, aos poços foram adicionados 200 µL de cada combinação de antimicrobianos diluídos em meio mineral nas concentrações de 2 e 5 mg/mL, a fim de determinar a concentração fungicida mínima para o biofilme formado. Após incubação por 48 horas a 37 °C, o sobrenadante dos poços foi aspirado e adicionou-se 100 µL de metanol 100%, removido em seguida. A placa foi deixada em cabine de fluxo laminar por aproximadamente 10 minutos para secagem total de quaisquer líquidos presentes nos poços. Após secagem, foram adicionados aos poços 100 µL de solução aquosa de cristal violeta 0,3%. Passados 20 minutos, os poços foram lavados com água destilada estéril por duas vezes. Após o sobrenadante ser aspirado, foram adicionados aos poços 150 µL de solução de ácido acético 33% e após 30 segundos o conteúdo dos poços foi transferido para outra placa, seguido de leitura em espectrofotômetro a 550 nm (PEETERS et al., 2008).

4.9 Inibição da formação de biofilme de *Cryptococcus* spp.

Foi investigada também a capacidade de inibição da formação do biofilme de *Cryptococcus* spp. pelas combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR. A formação do biofilme seguiu o descrito no item anterior, com a utilização das mesmas cepas, exceto pela adição dos antimicrobianos SMX-TMP, SDZ-PIR ou AMB ao meio mineral em concentrações referentes a 1, 10 e 25 vezes a CIM de cada cepa na fase planctônica. Controles foram formados em meio mínimo livre de drogas. A viabilidade do biofilme foi monitorada pela mudança na coloração do indicador resazurina (0,1 mg/mL diluída em meio RPMI) após incubação a 37 °C por seis horas, além de coloração com cristal violeta, descrita no item 4.8 (PEETERS et al., 2008).

4.10 Análise estatística

Os dados de sensibilidade antifúngica foram comparados por ANOVA e teste de Tukey. Diferenças de tratamento foram avaliadas usando o teste de Wilcoxon. Foram considerados significantes resultados cujo p-valor seja menor que 0,05. As análises estatísticas foram realizadas com uso do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

5 RESULTADOS

5.1 Coletas, isolamento e identificação de amostras de origem ambiental

Foram realizadas 22 coletas ambientais, sendo 19 coletas em amostras vegetais e três coletas de excrementos de pombos (*Columba livia*) em diversas áreas urbanas da cidade de Fortaleza e Região Metropolitana, bem como em uma área serrana da zona Norte do Estado do Ceará, no período de março de 2010 a março de 2011. Ao total, foram colhidas e processadas 489 amostras vegetais de diferentes sítios, tais como ocos, troncos e raízes de plantas em decomposição e/ou hígidas, além de 40 amostras de excrementos secos de pombos. O detalhamento de todas as coletas está descrito na tabela 1.

Do total de amostras oriundas de vegetais (n=489), quatro amostras (0,81%) foram positivas para *Cryptococcus* sp., sendo os isolados obtidos a partir de ocos de mangueira (*Mangifera indica*) (n=2) localizadas no pólo de lazer da Lagoa de Maraponga, bairro da região sul de Fortaleza, e troncos de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) em decomposição (n=2), presentes na área periférica do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) localizado no bairro de Messejana, região sudeste de Fortaleza. A tabela 1 mostra detalhes sobre as coletas realizadas.

Em relação às coletas de excrementos de pombos, do total de 40 amostras, três (7,5%) foram positivas para *Cryptococcus* sp. Todas as amostras foram coletadas nas imediações do Campus do Porangabussu, área em que está situada a Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Tabela 1 – Detalhamento das coletas realizadas durante o período de março de 2010 a março de 2011.

Período	Município	Local	Georreferenciamento		Principais fontes coletadas	Amostras	Isolamento
Amostras vegetais							
Maio/10	Fortaleza	Parque Rio Branco	3°45'8.06"S	38°31'7.59"W	Troncos, raízes e solo superficial (≤10 cm)	10	0
Jun/10	Fortaleza	Faculdade de Medicina UFC	3°44'55.80"S	38°33'6.54"W	Troncos de árvores	23	0
Jun/10	Fortaleza	Faculdade de Medicina UFC	3°44'55.80"S	38°33'6.54"W	Troncos de árvores	26	0
Jun/10	Fortaleza	Messejana	3°49'43.38"S	38°28'44.55"W	Troncos e ocos de <i>Eucalyptus</i> sp.	26	0
Jul/10	Fortaleza	Campus do Pici UFC	3°44'21.07"S	38°34'16.30"W	<i>M. indica</i> e <i>Eucalyptus</i> sp.	25	0
Jul/10	Fortaleza	Campus do Pici UFC	3°44'27.16"S	38°34'30.56"W	<i>M. indica</i> e <i>A. occidentale</i>	25	0
Ago/10	Fortaleza	Pólo de Lazer de Maraponga	3°47'25.20"S	38°34'3.85"W	<i>M. indica</i> e <i>D. lutescens</i>	28	2
Ago/10	Caucaia	Manguezal do Rio Ceará	3°42'1.96"S	38°37'58.64"W	Troncos e ocos de plantas nativas	31	0
Ago/10	Fortaleza	Messejana	3°49'43.38"S	38°28'44.55"W	<i>Eucalyptus</i> sp.	25	2
Ago/10	Meruoca	Serra da Meruoca	3°35'9.40"S	40°27'11.65"W	Troncos e ocos de plantas nativas	25	0
Ago/10	Caucaia	Parque Botânico do Ceará	3°42'49.45"S	38°38'28.93"W	Troncos e ocos de plantas nativas	32	0
Set/10	Fortaleza	Parque do Cocó	3°45'8.41"S	38°29'2.68"W	Troncos e ocos de plantas nativas	47	0
Set/10	Fortaleza	Messejana	3°49'52.94"S	38°30'3.84"W	<i>A. occidentale</i>	28	0
Out/10	Fortaleza	Messejana	3°49'43.38"S	38°28'44.55"W	<i>Eucalyptus</i> sp.	25	0
Nov/10	Caucaia	Parque Botânico do Ceará	3°42'49.45"S	38°38'28.93"W	Troncos e ocos de plantas nativas	32	0
Jan/11	Fortaleza	Castelão	3°48'19.87"S	38°31'33.45"W	<i>Eucalyptus</i> sp. e <i>C. limon</i>	11	0
Fev/11	Fortaleza	Faculdade de Medicina UFC	3°44'55.80"S	38°33'6.54"W	<i>M. indica</i> , <i>C. echinata</i> e <i>T. catappa</i>	25	0
Fev/11	Fortaleza	Campus do Pici UFC	3°44'37.45"S	38°34'48.71"W	<i>M. indica</i> e <i>Eucalyptus</i> sp.	25	0
Mar/11	Fortaleza	Pólo de Lazer de Maraponga	3°47'25.20"S	38°34'3.85"W	<i>M. indica</i> e <i>D. lutescens</i>	20	0
Amostras veterinárias							
Mar/10	Fortaleza	Faculdade de Medicina UFC	3°44'55.80"S	38°33'6.54"W	Fezes secas de <i>C. livia</i>	18	1
Mar/10	Fortaleza	Faculdade de Medicina UFC	3°44'55.80"S	38°33'6.54"W	Fezes secas de <i>C. livia</i>	13	2
Abr/10	Fortaleza	Faculdade de Medicina UFC	3°44'55.80"S	38°33'6.54"W	Fezes secas de <i>C. livia</i>	9	0

Espécies vegetais: mangueira (*Mangifera indica*); cajueiro (*Anacardium occidentale*); palmeira (*Dypsis lutescens*); limoeiro (*Citrus limon*); pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*); castanhola (*Terminalia catappa*).

5.2 Sensibilidade *in vitro* frente a SMX-TMP e SDZ-PIR

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) das drogas testadas frente às cepas de *Cryptococcus* sp. encontram-se dispostas na tabela 2. Para a espécie *C. gattii*, os valores de CIM para a combinação de SMX-TMP variaram de 62,5 µg/mL a 250 µg/mL (média geométrica: 119,4 µg/mL) para SMX e 12,5 µg/mL a 50 µg/mL (média geométrica: 22,79 µg/mL) para TMP. Em relação à combinação SDZ-PIR, os valores de CIM para *C. gattii* variaram de 125 µg/mL a 500 µg/mL (média geométrica: 238,7 µg/mL) para SDZ e 6,25 µg/mL a 25 µg/mL (média geométrica: 10,39 µg/mL) para PIR.

Considerando os testes realizados com a espécie *C. neoformans*, os valores de CIM para a combinação de SMX-TMP variaram de 7,81 µg/mL a 62,5 µg/mL (média geométrica: 23,68 µg/mL) para SMX e 1,56 µg/mL a 6,25 µg/mL (média geométrica: 4,52 µg/mL) para TMP. Em relação à combinação SDZ-PIR, os valores de CIM para *C. gattii* variaram de 15,625 µg/mL a 500 µg/mL (média geométrica: 75,19 µg/mL) para SDZ e 0,781 µg/mL a 25 µg/mL (média geométrica: 5,96 µg/mL) para PIR.

Desse modo, todas as cepas avaliadas foram inibidas pelas combinações antibióticas testadas. Os valores de CIM agrupados para espécies demonstraram que, para *C. gattii*, há necessidade de concentrações maiores de cada droga em combinação para inibir seu crescimento ($p < 0,001$) (figura 14).

Tabela 2. Perfil de sensibilidade de *Cryptococcus* na forma planctônica frente às combinações de sulfametoxazol-trimetoprim e sulfadiazina-pirimetamina e drogas antifúngicas.

Cepa	Espécie	Sorotipo	Origem	CIM (µg/mL)				
				SMX/TMP	SDZ/PIR	AMB	FLC	ITR
03-02-062	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	125/25	500/25	0,5	128	0,5
03-02-069	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	125/25	250/12,5	1	8	0,25
03-02-070	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	62,5/12,5	125/6,25	0,5	32	0,125
03-02-071	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	62,5/12,5	250/12,5	1	64	0,5
03-02-073	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	250/50	500/25	2	128	0,5
05-03-028	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	125/25	250/12,5	0,125	64	1
05-03-029	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	125/25	250/12,5	0,5	64	0,25
05-03-030	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	62,5/12,5	125/6,25	1	32	1
05-03-031	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	125/25	125/6,25	1	64	1
05-03-032	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	125/25	250/12,5	0,5	64	0,5
05-03-033	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	125/25	125/6,25	0,5	32	0,25
03-02-074	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	125/25	250/6,25	0,5	32	0,25
05-02-080	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	125/25	250/12,5	0,5	64	1
05-03-037	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	250/25	500/6,25	0,25	64	0,25
05-02-082	<i>C. gattii</i>	C	Clínica	125/25	250/12,5	1	64	1
Média Geométrica				119,4/22,79	238,7/10,39	0,603	50,64	0,457
03-02-057	<i>C. neoformans</i>	A	Clínica	15,625/3,125	62,5/3,125	1	64	0,5
03-02-061	<i>C. neoformans</i>	A	Clínica	31,25/6,25	15,625/0,781	0,5	32	1,0
03-02-060	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	31,25/6,25	62,5/3,125	0,25	16	1,0
03-02-063	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	62,5/12,5	125/6,25	0,125	32	0,5
03-02-064	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	15,625/3,125	125/6,25	0,25	2	0,5
03-02-065	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	31,25/6,25	62,5/3,125	1	8	0,5
03-02-066	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	7,81/1,56	500/25,0	0,25	8	0,25
03-02-067	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	15,625/3,12	62,5/3,125	1	32	0,5
03-02-068	<i>C. neoformans</i>	A	Clínica	62,5/12,5	125,0/6,25	1	64	0,5
03-02-072	<i>C. neoformans</i>	A	Clínica	31,25/6,25	15,625/0,781	0,5	64	0,25
03-02-075	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	15,625/3,12	62,5/3,125	0,5	16	0,5
03-02-078	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	31,25/6,25	125/6,25	0,125	8	0,5
03-02-080	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	15,625/3,12	125/6,25	0,25	8	0,5
03-02-084	<i>C. neoformans</i>	A	Ambiental	15,625/1,56	62,5/3,125	0,5	8	0,5
05-01-050	<i>C. neoformans</i>	A	Clínica	31,25/6,25	62,5/3,125	0,5	32	0,5
Média Geométrica				23,68/4,52	75,19/5,96	0,42	17,55	0,5
Cepas Padrão								
WM148	<i>C. neoformans</i>	A	Clínica	3,906/0,78	31,25/1,562	0,25	2	0,25
WM626	<i>C. neoformans</i>	A	Clínica	3,906/0,78	31,25/1,562	0,5	16	0,5
WM628	<i>C. neoformans</i>	AD	Clínica	3,906/0,78	15,625/0,78	0,125	8	0,5
WM629	<i>C. neoformans</i>	D	Clínica	7,81/1,56	31,25/1,562	0,25	8	0,25
WM179	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	250/50	250/12,5	1	32	0,25
WM178	<i>C. gattii</i>	B	Clínica	125/25	250/12,5	0,5	64	1
WM161	<i>C. gattii</i>	B	Ambiental	125/25	250/12,5	0,5	32	0,5
WM779	<i>C. gattii</i>	C	Clínica	125/25	250/12,5	1	64	1
Média Geométrica				26,28/5,25	81,05/22,78	0,42	17,45	0,46
Controle de Qualidade								
ATCC 6258	<i>Candida krusei</i>	-	Clínica	NT	NT	1	64	NT
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	-	Clínica	NT	NT	1	1	NT

SMX: Sulfametoxazol; TMP: Trimetoprim; SDZ: Sulfadiazina; PIR: Pirimetamina; AMB: Anfotericina B ; FLC: Fluconazol. ITR: Itraconazol. Para Caspofungina (CAS), todas as cepas apresentaram CIM > 16 µg/mL. NT: não testado

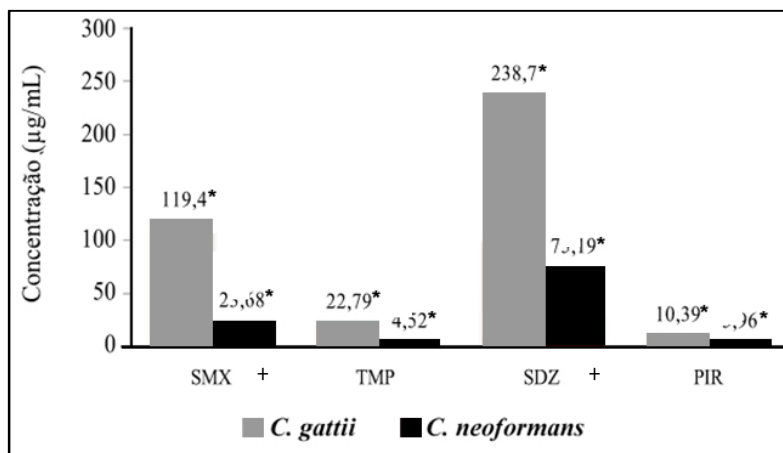


Figura 14 - Média geométrica dos valores de CIM de SMX-TMP (sulfametoxazol-trimetoprim) e SDZ-PIR (sulfadiazina-pirimetamina) para as espécies *C. gattii* e *C. neoformans*. *Resultados estatisticamente diferentes quando comparados entre as duas espécies ($p < 0,05$).

5.3 Testes de sensibilidade *in vitro* frente a antifúngicos

O perfil de sensibilidade de *Cryptococcus* spp. frente à antifúngicos foi investigado utilizando o protocolo M27-A3. Todos os resultados obtidos estão dispostos na tabela 1. Parte dos resultados dispostos na tabela 1 é oriunda da pesquisa realizada por Costa e colaboradores (2010) em nosso laboratório, que foram confirmados pela repetição dos testes e expandidos neste trabalho. Em relação à espécie *C. gattii*, para anfotericina B, a CIM variou de 0,125 µg/mL a 1 µg/mL (média geométrica: 0,603 µg/mL). Em relação aos derivados azólicos testados, os valores de CIM para fluconazol variaram de 8 µg/mL a 128 µg/mL (média geométrica: 50,64 µg/mL) e para itraconazol, os valores variaram de 0,125 µg/mL a 1 µg/mL (média geométrica: 0,457 µg/mL).

Para a espécie *C. neoformans*, os valores de CIM para anfotericina B variaram de 0,125 µg/mL a 1 µg/mL (média geométrica: 0,42 µg/mL). Para fluconazol, a CIM variou de 2 µg/mL a 64 µg/mL (média geométrica: 17,55 µg/mL). Para itraconazol, os valores de CIM obtidos variaram de 0,25 µg/mL a 1 µg/mL (média geométrica: 0,5 µg/mL).

Para caspofungina, todas as cepas, de ambas as espécies, apresentaram valor de CIM > 16 µg/mL.

5.4 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a sensibilidade antifúngica

As combinações dos inibidores de folato testadas foram capazes de aumentar a sensibilidade antifúngica das cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*. Os resultados obtidos neste estudo estão presentes na tabela 3.

Após pré-exposição aos inibidores de folato em concentrações subinibitórias, as cepas de *C. gattii* e *C. neoformans* testadas apresentaram diminuição das concentrações inibitórias mínimas de anfotericina B, fluconazol e itraconazol ($p < 0,05$).

Tabela 3. Sensibilidade antifúngica de *Cryptococcus* após pré-exposição à doses subinibitórias de SMX-TMP e SDZ-PIR.

Cepa	Espécie	CIM (µg/mL)								
		AMB	SMX-TMP AMB*	SDZ-PIR AMB*	FLC	SMX-TMP FLC*	SDZ-PIR FLC*	ITR	SMX-TMP ITR*	SDZ-PIR ITR*
03-02-062	<i>C. gattii</i>	0,5	0,3125	0,625	128,0	32,0	128,0	0,5	0,5	0,25
03-02-069	<i>C. gattii</i>	1,0	0,156	0,3125	8,0	2,0	4,0	0,25	0,125	0,0625
03-02-073	<i>C. gattii</i>	2,0	0,156	0,625	128,0	8,0	32,0	0,5	0,0625	0,5
05-03-029	<i>C. gattii</i>	0,5	0,125	0,125	64,0	8,0	16,0	0,25	0,0625	0,0625
05-03-030	<i>C. gattii</i>	1,0	0,125	0,25	32,0	8,0	32,0	1,0	0,125	0,25
05-03-031	<i>C. gattii</i>	1,0	0,5	0,125	64,0	16,0	16,0	1,0	0,125	0,125
05-03-032	<i>C. gattii</i>	0,5	0,125	0,25	64,0	32,0	16,0	0,5	0,0625	0,25
03-02-057	<i>C. neoformans</i>	1,0	0,3125	0,625	64,0	8,0	32,0	0,5	0,125	0,25
03-02-060	<i>C. neoformans</i>	0,25	0,125	0,125	16,0	8,0	8,0	1,0	0,5	0,5
03-02-063	<i>C. neoformans</i>	0,125	0,078	0,125	32,0	32,0	32,0	0,5	0,25	0,5
03-02-067	<i>C. neoformans</i>	1,0	0,3125	0,625	32,0	32,0	16,0	0,5	0,25	0,25
03-02-068	<i>C. neoformans</i>	1,0	0,156	0,3125	64,0	8,0	16,0	0,5	0,25	0,25
03-02-072	<i>C. neoformans</i>	0,5	0,0625	0,156	64,0	16,0	32,0	0,25	0,25	0,125
05-02-075	<i>C. neoformans</i>	1,0	0,03125	0,156	8,0	4,0	8,0	0,25	0,0625	0,03125

*Pré-exposição a drogas inibidoras de folato, seguido por ensaio de microdiluição para drogas antifúngicas.

SMX: Sulfametoxazol ; TMP: Trimetoprim ; SDZ: Sulfadiazina ; PIR: Pirimetamina; AMB: Anfotericina B ; FLC: Fluconazol. ITR: Itraconazol. Valores em µg/mL.

5.5 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre o ergosterol celular

Após pré-exposição às concentrações inibitórias e subinibitórias de sulfametoxazol-trimetoprim e sulfadiazina-pirimetamina, foi verificada a produção de ergosterol nas cepas de *C. gattii* (n=7) e *C. neoformans* (n=7) investigadas (figura 15).

As combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR em ambas as concentrações testadas, foram capazes de reduzir a produção de ergosterol quando comparada ao controle ($p < 0,05$). A tabela 4 mostra a média geométrica da concentração de ergosterol produzido por todas as cepas do conjunto experimental. As combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR, na concentração referente à CIM, causaram diminuição de, no mínimo, 21,5% na produção de ergosterol de *Cryptococcus*. Além disso, para concentrações subinibitórias (CIM/2), houve redução da produção de ergosterol de no mínimo 9,5%.

Tabela 4. Efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR e itraconazol sobre a produção de ergosterol celular de *Cryptococcus* sp.

Espécie	Controle	SMX-TMP		SDZ-PIR		ITR	
		CIM*	CIM/2*	CIM*	CIM/2*	CIM*	CIM/2*
<i>C. neoformans</i>	5,053	2,921	3,838	2,537	3,348	1,429	2,367
<i>C. gattii</i>	6,908	3,625	5,011	3,454	3,795	1,684	2,942

Dados referentes à média geométrica dos valores obtidos de concentração de ergosterol produzido, expressos em μM .

*Asteriscos indicam que os resultados são estatisticamente diferentes dos controles ($p < 0,05$).

Apesar de não haver diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre o efeito causado por SMX-TMP e SDZ-PIR, ambas as combinações se mostraram eficazes quando comparadas ao derivado azólico itraconazol ($p < 0,05$), usado como controle positivo deste experimento.

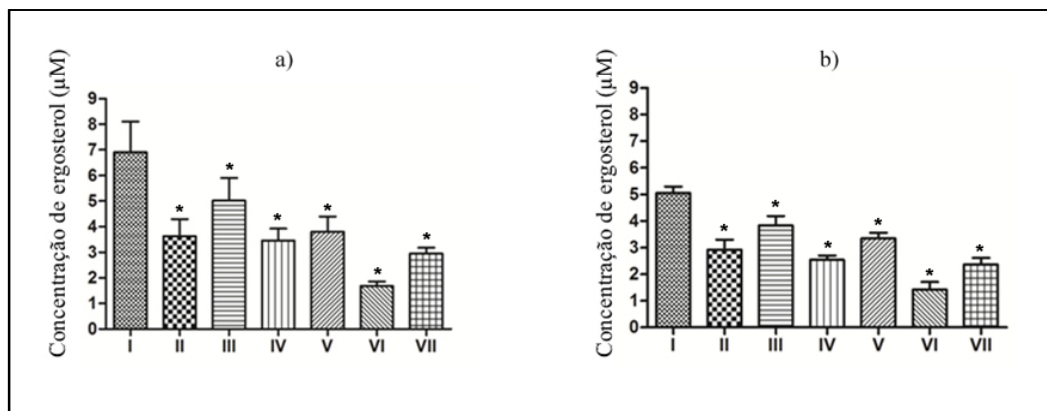


Figura 15. Produção de ergosterol celular de *C. gattii* (a) e *C. neoformans* (b). As células foram cultivadas em meio YNB sem adição de antimicrobianos como controle (I) ou expostas a concentrações de SXM-TMP CIM (II), SXM-TMP CIM/2 (III), SDZ-PIR CIM (IV), SDZ-PIR CIM/2 (V), ITC CIM (VI) e ITC CIM/2 (VII). Asteriscos indicam que os resultados são estatisticamente diferentes dos controles ($p < 0,05$).

5.6 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de proteases

As leituras de absorbância medidas nos tubos teste em comparação aos tubos controle foram convertidas em unidades enzimáticas, cujos valores são mostrados na tabela 5. De maneira geral, foi visto que as combinações testadas agem de maneira inversa sobre a produção de protease quando observados apenas os valores de absorbância. SMX-TMP não apresenta efeito significativo sobre a produção de protease. Entretanto, concentrações maiores das drogas geram ligeira diminuição da absorbância quando comparada ao controle, cuja tendência é se equiparar à do controle de acordo com a diminuição da concentração de droga no meio. Em relação aos valores expressos em unidades enzimáticas, não houve significância estatística.

Em relação ao efeito de SDZ-PIR, a absorbância foi maior nos testes que empregaram uma maior quantidade de droga, inclusive quando comparados aos controles. Apesar de os resultados não apresentarem significância estatística, pôde-se inferir que maiores concentrações de droga provocam um leve aumento na produção de protease, tendendo a se equiparar ao controle à medida que a concentração de droga diminui, se considerarmos apenas os valores de absorbância.

Tabela 5. Efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de protease por cepas de *Cryptococcus*.

CEPA	ESPECIE	SMX-TMP				SDZ-PIR			
		CT	CIM	CIM /2	CIM /4	CT	CIM	CIM /2	CIM /4
03-02-062	<i>C. gattii</i>	0,001	0,003	0,010	0,001	0,001	0	0	0
03-02-069	<i>C. gattii</i>	0,002	0	0	0,006	0,002	0	0	0
03-02-070	<i>C. gattii</i>	0	0	0	0,001	0	0	0	0,001
05-03-032	<i>C. gattii</i>	0,001	0	0	0	0	0	0	0
03-02-057	<i>C. neoformans</i>	0	0,008	0,020	0,008	0	0	0	0,001
03-02-060	<i>C. neoformans</i>	0,003	0	0	0	0,003	0,001	0,002	0
03-02-068	<i>C. neoformans</i>	0	0	0	0	0,006	0	0	0
03-02-072	<i>C. neoformans</i>	0	0,007	0,005	0	0	0	0	0

CT: Controle. Os valores representam o total de unidades de enzima produzidas por mililitro de meio de cultura.

Aos valores negativos, foi atribuído o valor Zero, cujos resultados não são mostrados nesta tabela.

5.7 Efeito das combinações SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de fosfolipase

O efeito das combinações testadas sobre a produção de fosfolipase de cepas de *Cryptococcus* spp. encontra-se detalhado na tabela 6. Os Valores negativos, sem alteração na atividade de Fosfolipase em relação aos controles foram suprimidos da respectiva tabela. Os resultados obtidos não mostraram significância estatística ($p > 0,05$), apesar de algumas cepas apresentarem diferenças nos valores de Pz.

Em relação ao efeito de SMX-TMP sobre *C. gattii*, foi observado que a combinação não alterou a produção de fosfolipase em três das sete cepas testadas. Duas cepas mostraram uma redução da atividade produtora e apenas uma das sete cepas apresentaram aumento da expressão de fosfolipase. SDZ-PIR causou aumento da produção de fosfolipase em três das sete cepas testadas, ao passo que reduziu tal atividade em uma cepa, bem como não causou diferença de expressão em duas cepas.

Em relação a *C. neoformans*, verificamos que a combinação de SMX-TMP reduziu a produção de fosfolipase em duas cepas, ao passo que SDZ-PIR reduziu a expressão em apenas uma cepa. Houve aumento da produção de fosfolipase em uma cepa de *C. neoformans* quando submetida à combinação de SMX-TMP na sua respectiva CIM, e em duas cepas quando submetidas à combinação de SDZ-PIR. Três das sete cepas de *C. neoformans* não apresentaram diferenças na produção de fosfolipase para ambas as combinações.

Tabela 6. Efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre a produção de fosfolipase por cepas de *Cryptococcus* spp.

CEPA	ESPÉCIE	CONTROLE	CIM SMX-TMP	CIM SDZ-PIR
03-02-062	<i>C. gattii</i>	++	++	+
03-02-069	<i>C. gattii</i>	++	+	++
03-02-070	<i>C. gattii</i>	+	++	++
03-02-073	<i>C. gattii</i>	+	+	++
05-02-080	<i>C. gattii</i>	++	+	++
05-02-081	<i>C. gattii</i>	+	+	++
03-02-074	<i>C. gattii</i>	++	++	+
05-03-028	<i>C. gattii</i>	++	+	+
05-03-029	<i>C. gattii</i>	++	+	+
03-02-061	<i>C. neoformans</i>	+	++	++
03-02-060	<i>C. neoformans</i>	++	+	+
03-02-063	<i>C. neoformans</i>	++	++	++
03-02-064	<i>C. neoformans</i>	+	+	+
03-02-065	<i>C. neoformans</i>	++	+	++
03-02-066	<i>C. neoformans</i>	+	+	++
03-02-066	<i>C. neoformans</i>	+	+	+
03-02-084	<i>C. neoformans</i>	+	-	-
03-02-068	<i>C. neoformans</i>	+	++	+

(-) Atividade Negativa; (+) Atividade Positiva; (++) Atividade Muito Positiva.

CIM – Concentração inibitória mínima.

5.8 Efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre biofilme maduro de *Cryptococcus* spp.

Neste trabalho foi investigado efeito das combinações de SMX-TMP e SDZ-PIR sobre biofilmes já formados de *C. gattii* e *C. neoformans*. Observou-se que as drogas SMX-TMP, SDZ-PIR e anfotericina B apresentaram capacidade de reduzir quantitativamente o biofilme depois de formado ($p < 0,05$) (figura 16). A exposição do biofilme a SMX-TMP gerou redução média de 92%, ao passo que SDZ-PIR ocasionou redução de até 83%. Em relação à ação fungicida de anfotericina B frente ao biofilme formado, houve redução do biofilme de até 95% quando comparado ao biofilme formado não submetido à ação de quaisquer drogas. Apesar de anfotericina B aparentar uma maior redução no biofilme formado, não foi observado diferenças significantes ao comparar o efeito inibitório de ambas as combinações de sulfonamidas com a anfotericina B ($p > 0,05$).

Os gráficos foram produzidos levando em consideração a porcentagem de redução de cada droga quando comparada à porcentagem do controle (100%), não exposto à ação de quaisquer drogas. Observou-se ainda que a adição de resazurina às amostras testadas revelou que, mesmo após o contato com as drogas, as células do biofilme submetidas à todas as concentrações de drogas ainda se mantiveram viáveis, ainda que a superfície do biofilme estivesse bastante reduzida.

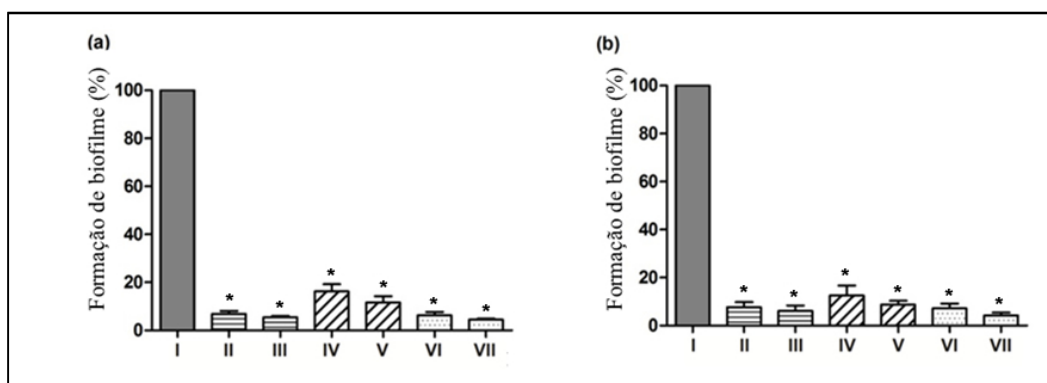


Figura 16. Redução do biofilme maduro de *Cryptococcus* após submetido à ação dos inibidores de folato e anfotericina B. (a) Inibição de biofilme de *C. gattii* (n=7) e (b) *C. neoformans* (n=7) após 48 horas de contato com SMX-TMP, SDZ-PIR e AMB. Resultados da ação das drogas são estatisticamente diferentes dos controles ($p < 0,05$). (I) Controle. (II) SMX-TMP 2000 µg/mL – 400 µg/mL. (III) SMX-TMP 5000 µg/mL-1000 µg/mL. (IV) SDZ-PIR 2000 µg/mL-100 µg/mL. (V) SDZ-PIR 2000 µg/mL-250 µg/mL. (VI) AMB 64 µg/mL. (VII) AMB 150 µg/mL.

5.9 Inibição da formação de biofilme de *Cryptococcus* spp.

A capacidade de SMX-TMP e SDZ-PIR inibir a formação de biofilme de *Cryptococcus* sp. foi avaliada quantitativamente. Após pré-exposição das cepas às diversas concentrações das drogas testadas, a capacidade de tais cepas montarem biofilme foi diminuída, porém não foi inibida totalmente. Os resultados estão dispostos na figura 17, e revelam que ambos os inibidores de folato, assim como a anfotericina B agem de maneira semelhante, reduzindo significativamente a capacidade das cepas produzirem biofilme. Apesar desse fato, não foi observado diferenças significativas ao comparar o efeito inibidor de ambas as combinações de sulfonamidas com o da anfotericina B ($p > 0,05$).

Os gráficos foram produzidos levando em consideração o percentual de inibição de biofilme de cada droga comparado ao controle (100%), sem adição de drogas.

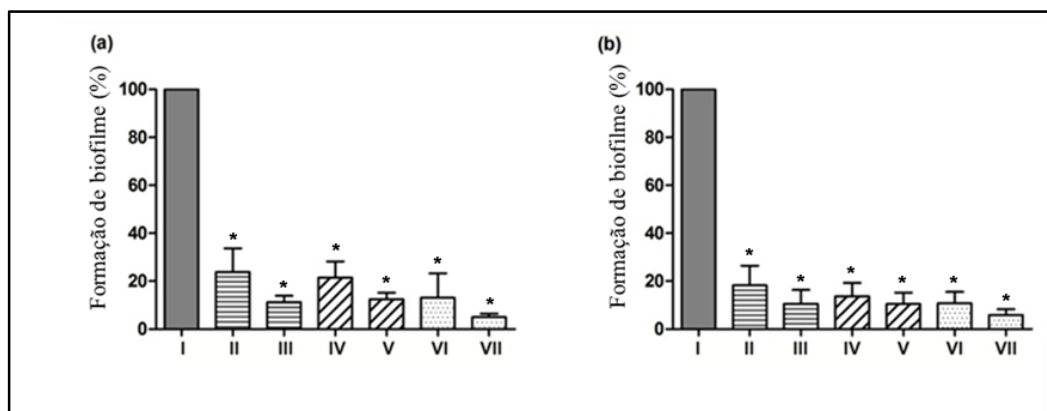


Figura 17. Inibição da formação de biofilme de *Cryptococcus* sp. por SMX-TMP, SDZ-PIR e anfotericina B. (a) Formação de biofilme por *C. gattii* (n=7) e (b) *C. neoformans* (n=7) após pré-exposição a SMX-TMP, SDZ-PIR e AMB. Resultados da ação das drogas são estatisticamente diferentes dos controles ($p < 0.05$). (I) Controle. (II) SMX-TMP 2000 $\mu\text{g/mL}$ -400 $\mu\text{g/mL}$. (III) SMX-TMP 5000 $\mu\text{g/mL}$ -1000 $\mu\text{g/mL}$. (IV) SDZ-PIR 2000 $\mu\text{g/mL}$ -100 $\mu\text{g/mL}$. (V) SDZ-PIR 2000 $\mu\text{g/mL}$ -250 $\mu\text{g/mL}$. (VI) AMB 64 $\mu\text{g/mL}$. (VII) AMB 150 $\mu\text{g/mL}$.

6 DISCUSSÃO

A criptococose é uma doença fúngica que tem cada vez mais despertado o interesse dos pesquisadores, principalmente pela sua associação com pacientes imunocomprometidos, principalmente aos que apresentam aids, aumentando suas taxas de mortalidade. De acordo com dados das Nações Unidas (<http://www.unaids.org/en/>), cerca de três milhões de pacientes morrem anualmente vítimas de aids, sendo a meningite por *Cryptococcus* considerada um dos fatores um dos critérios para o estabelecimento do diagnóstico da doença – principalmente em países pobres ou com acesso restrito à terapia antiretroviral – uma vez que 5 a 10% dos pacientes são acometidos pela micose antes de diagnosticada a síndrome.

Um dos objetivos desse trabalho foi verificar a existência de isolados de *Cryptococcus* sp. em fontes ambientais da cidade de Fortaleza. O fato é que, determinando as reservarias do fungo na natureza, é possível traçar dados acerca de sua epidemiologia, contribuindo para o conhecimento da patogênese da criptococose em pacientes que tem contato com essas fontes. Nesse estudo foram coletadas 529 amostras ambientais de possíveis reservarias de *Cryptococcus* conforme descrito na literatura (LAZÉRA et al., 1998; COSTA et al., 2010; SPRINGER; CHATURVEDI, 2010). Desse total, obtivemos positividade de quatro amostras em fontes vegetais e três de fontes relacionadas a animais (*Columba livia*).

Apesar do baixo índice de isolamento (0,81% para amostras vegetais), nossos dados estão correlacionados com os da literatura mundial, que relatam baixos índices de isolamento principalmente em madeira em decomposição (LAZERA et al., 1996; 2000; REOLON et al., 2004; DUNCAN et al., 2006; CAMPOS; BARONI, 2010). Além disso, as espécies vegetais investigadas apresentam relação com o microrganismo, sendo descritos relatos da associação de *Cryptococcus* com *M. indica* e *Eucalyptus* sp. (LAZERA et al., 1996; 2000; REOLON et al., 2004; GROVER et al., 2007). Em alguns destes relatos, entretanto, a taxa de isolamento de *Cryptococcus* é maior do que os nossos resultados, mesmo com um menor número de amostras investigadas. Grover et al. (2007) isolaram *Cryptococcus* em aproximadamente 15% das amostras coletadas de *M. indica*, e em 20% das amostras de *T. indica*. Em trabalho anterior, Nawange et al. (2006) também relata a positividade de *Cryptococcus* em aproximadamente 13% e 21% para *M. indica* e *T. indica*, respectivamente. Esses resultados nos sugerem que a técnica de maceração da amostra parece facilitar o isolamento do fungo em porções maiores de epiderme do vegetal (NAWANGE et al., 2006; GROVER et al., 2007). Entretanto, apesar da técnica empregada por Granados e Castañeda (2005) ser

satisfatória, são esperados menores índices de positividade, uma vez que a área de tecido vegetal investigada é menor.

Relativo aos nichos ecológicos e epidemiologia de *Cryptococcus*, apesar da literatura citar prevalência de *C. gattii* nas espécies vegetais investigadas, nossos dados apontaram a existência de *C. neoformans* nesses sítios após identificação laboratorial por meio CGB. Diante disso, faz-se necessário expandir o número de amostras a fim de determinar qual a espécie prevalente de *Cryptococcus* em amostras vegetais, uma vez que o número de isolados foi reduzido. Em relação às amostras de excrementos de pombos, o índice de positividade foi superior (7,5%) quando comparado às amostras vegetais, o que pôde demonstrar uma maior predileção do fungo a solos e matérias orgânicas ricas em compostos nitrogenados. Do mesmo modo, nossos resultados condizem com os descritos na literatura, havendo prevalência de *C. neoformans* nessas amostras (DUNCAN et al., 2006; CAMPOS; BARONI, 2010). Não observamos ainda relação direta entre a região de coleta e a positividade da amostra, devido ao número reduzido de isolados e coletas. Assim, fazem-se necessários estudos mais ampliados no número de amostras e locais de coleta visando traçar um possível mapa de existência de *Cryptococcus* na cidade de Fortaleza e sua Região Metropolitana.

A determinação das espécies isoladas a partir das coletas deste trabalho, bem como das cepas estocadas na Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM / UFC) foi realizada por identificação fenotípica, como cultivo em meio CGB. Tradicionalmente, a diferenciação das espécies *C. gattii* e *C. neoformans* por esse método é considerada como “padrão-ouro”, uma vez que apenas a espécie *C. gattii* é resistente à L-canavanina e capaz de assimilar glicina como única fonte de carbono e nitrogênio, alcalinizando o meio e promovendo mudança de cor de amarelo para azul (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Assim, o método de identificação por cultivo em meio CGB demonstrou-se uma técnica válida, uma vez que confirmou os dados de identificação moleculares feitas anteriormente nas cepas estocadas na micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica. Na presente pesquisa, a correlação positiva entre a identificação fenotípica e molecular foi de 100%, corroborando com os achados de Matsumoto et al. (2007), ao contrário de Leal et al. (2008) que obtiveram discordância em aproximadamente 5% das amostras identificadas fenotipicamente e molecularmente. Entretanto, faz-se ainda necessário a identificação molecular das amostras ambientais isoladas, visando determinar o sorotipo das mesmas, ampliando os dados epidemiológicos deste estudo.

Em relação aos testes de sensibilidade, nossos resultados demonstraram que as combinações de sulfametoxazol-trimetoprim e sulfadiazina-pirimetamina foram capazes de inibir o crescimento de *Cryptococcus* de ambas as espécies. Hanafy et al. (2007) encontraram dados semelhantes ao testar sulfametoxazol e outros inibidores de folato frente à espécies de *Cryptococcus*. Em relação ao sulfametoxazol, os valores encontrados pelos autores para *C. neoformans* foi em média 31,3 µg/mL e para *C. gattii* foi de 250 µg/mL. Neste estudo, a CIM média de sulfametoxazol para *C. neoformans* foi de 23,68 µg/mL e 119,4 µg/mL para *C. gattii*. Verificamos também que para todas as outras drogas testadas, *C. gattii* apresentou maiores valores de CIM, sendo necessárias concentrações de drogas maiores para inibir seu crescimento, o que foi encontrado também por Hanafy e colaboradores. (2007).

Uma hipótese levantada por alguns autores é a de que cepas clínicas estão sujeitas a pressões seletivas mais frequentemente do que as ambientais, e com isso poderiam apresentar uma maior resistência às drogas (SOARES et al. 2005; PEDROSO et al., 2006; SOARES et al., 2008; PEDROSO et al., 2009; COSTA et al., 2010). Tal fato não pôde ser completamente verificado no nosso estudo devido à ausência de cepas de *C. gattii* de origem ambiental. Entretanto, para *C. neoformans*, foi verificado que as cepas isoladas de pacientes apresentaram menores valores de CIM das sulfonamidas testadas do que as isoladas do ambiente. As concentrações inibitórias médias obtidas para *C. neoformans* de origem clínica foi de 12,04 µg/mL para sulfametoxazol, enquanto que para cepas de origem ambiental foi de 21,26 µg/mL, tendo esse padrão se repetido para todas as outras drogas testadas.

O perfil de sensibilidade de *Cryptococcus* frente às drogas antifúngicas de uso clínico foi amplamente explorado neste trabalho. O efeito das drogas antifúngicas anfotericina B, caspofungina, fluconazol e itraconazol isoladas foi investigado, bem como seus efeitos sinérgicos ou antagônicos (exceto para itraconazol) com os inibidores de folato foram testados. Parte dos dados referentes aos testes de sensibilidade antifúngica que constam nesta pesquisa foi retirada do trabalho realizado por Costa e colaboradores (2010) em nosso laboratório, os quais foram confirmados e expandidos. A utilização desses dados se deve ao fato de haver semelhança entre os resultados obtidos, bem como por se tratar das mesmas cepas do presente estudo.

De maneira geral, a maioria das cepas mostrou-se sensível a pelo menos uma droga antifúngica. Os resultados obtidos nesta pesquisa estão de acordo com dados presentes na literatura internacional (BORGHI et al., 2010; CHOWDHARY et al., 2011; GOMEZ-LOPEZ

et al., 2011; MATOS et al., 2012). Foi evidenciada ainda a ocorrência de cepas consideradas resistentes (n=14) a pelo menos uma das drogas antifúngicas testadas.

Não foi possível inferir nesta pesquisa se a resistência das cepas possuía alguma relação com suas respectivas origens. Entretanto, diferentes pesquisas tem evidenciado o aparecimento de isolados clínicos resistentes *in vitro* aos derivados azólicos e anfotericina B (PERKINS et al., 2005; SOUZA et al., 2005; SILVA et al., 2008; MDODO et al., 2011; SILVA et al., 2011), o que nos leva a suspeitar que, apesar dos casos pontuais até o presente momento, os fungos do Complexo *Cryptococcus neoformans* possam vir a apresentar nas próximas décadas, resistência aos antifúngicos utilizados rotineiramente na atualidade.

No presente trabalho, as cepas consideradas resistentes ou com sensibilidade reduzida às drogas antifúngicas (n=14) foram submetidas à pré-exposição aos inibidores de folato por 24 horas. Em seguida, novo teste de sensibilidade antifúngica foi realizado, e pôde-se comprovar que a pré-incubação com as sulfas causou efeitos deletérios capazes de favorecer o efeito inibitório dos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol.

De uma maneira geral, o fenômeno de resistência a drogas antifúngicas pode acontecer em duas variantes: resistência clínica, que está relacionada com fatores fisiológicos e imunológicos do hospedeiro, bem como a farmacocinética da(s) droga(s) em questão; e a resistência *in vitro*, que por sua vez se divide em resistência primária (ou intrínseca) e resistência secundária (ou adquirida) (SANGLARD; ODDS, 2002; PFALLER; DIEKEMA, 2007). O problema do aparecimento de resistência antifúngica de fúngica de *Cryptococcus* às drogas usuais deve ser considerado, uma vez que, apesar do desenvolvimento e utilização de novas drogas, como albaconazol, posaconazol e ravuconazol, o número de drogas antifúngicas existentes ainda é bastante reduzido (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008).

Acreditamos que o efeito deletério causado pela pré-incubação das cepas com doses sub-inibitórias das duas sulfas testadas neste trabalho deve-se aos danos causados pelas drogas à membrana celular fúngica, uma vez que, apesar de não completamente desvendado, um dos alvos metabólicos dessas drogas parece ser a biossíntese do ergosterol, um dos seus principais componentes (NAVARRO-MARTINEZ et al., 2006). Desse modo, são necessários maiores estudos para comprovar que o mecanismo de ação das sulfonamidas em *Cryptococcus* é baseado na redução da concentração de ergosterol fúngico, bem como na inibição da biossíntese dos ácidos nucleicos.

Outro objetivo deste trabalho foi investigar se os inibidores de folato eram capazes de causar danos estruturais e químicos à membrana fúngica e, por conseguinte afetar a produção de ergosterol celular. Conforme citado em nossa revisão de literatura, os inibidores de folato parecem estar envolvidos na síntese do ergosterol fúngico, por meio da inibição de S-adenosilmetionina (SAM) (NAVARRO-MARTINEZ et al., 2006). De fato, pôde-se perceber que doses subinibitórias de sulfonamidas foram capazes de reduzir a produção de ergosterol em *Cryptococcus*. Trabalho semelhante realizado por Navarro-Martinez et al. (2006) com *Candida* spp. corrobora esse achado. Quando comparadas ao itraconazol, droga sabidamente efetiva na redução de ergosterol celular, as sulfonamidas testadas apresentaram efeito semelhante aos azólicos.

Em relação ao efeito das drogas testadas sobre a produção de protease e fosfolipase, os resultados desse estudo não foram conclusivos. A exposição a concentrações inibitórias e subinibitórias de sulfametoxazol-trimetoprim e sulfadiazina-pirimetamina não alteraram de modo significativo ($p > 0,05$) a atividade proteásica e fosfolipásica das cepas de *Cryptococcus* testadas. Sabe-se que a produção e expressão dessas exoenzimas é um fenômeno cepa-dependente, podendo variar tanto em frequência como em intensidade, fenômeno este visto tanto em isolados de *C. neoformans* como em *C. gattii* (MA; MAY, 2009). De maneira geral, *Cryptococcus* apresenta uma baixa atividade proteolítica e fosfolipásica em condições viáveis de crescimento (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Nossos resultados, utilizando a mesma metodologia, foram semelhantes aos resultados obtidos por Teixeira (2010) e Nogueira (2011), que testaram os efeitos do farnesol sobre a produção de exoenzimas frente a *Candida* spp. e *Cryptococcus* sp., respectivamente, sem entretanto obterem dados com significância estatística.

Outro item investigado nesta pesquisa foi a produção de biofilme por cepas de *Cryptococcus* e como as sulfonamidas testadas agiriam sobre a formação e deleção de biofilme maduro. A capacidade de *Cryptococcus* formar e manter biofilme tem sido progressivamente estudada por diversos autores nos últimos anos (MORANOVA; KAWAMOTO; RACLAVSKY; 2009; RAMAGE et al., 2009; RAVI et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010), e parece ser fator importante na manutenção do fungo em infecções crônicas e para proteção frente à drogas antifúngicas (MARTINEZ et al., 2010).

Dois ensaios foram realizados nessa pesquisa visando investigar a ação das sulfonamidas sobre o biofilme de *Cryptococcus*. Inicialmente, foi investigada a ação das

drogas sobre a capacidade do fungo formar biofilme. A pré-incubação com doses inibitórias e subinibitórias de ambas as drogas, em ensaios diferentes, permitiu-nos concluir que há redução na capacidade de *Cryptococcus* de ambas as espécies de formar biofilme em relação ao experimento controle. Houve redução de aproximadamente 80% da superfície formada quando comparada ao método controle, e observou-se ainda eficácia das drogas quando comparadas à ação causada por anfotericina B, droga que vem sendo testada por diversos autores como redutora de biofilme (RAMAGE et al., 2009; RAVI et al., 2009). Nossos resultados foram corroborados com os da literatura para a mesma metodologia testada com anfotericina B, mostrando a eficácia do método e comprovando a ação deletéria da droga em questão (RAVI et al., 2009). Entretanto, apesar dos estudos realizados até o momento, não há na literatura relatos de como o biofilme é combatido a partir de drogas antifúngicas. Uma vez que as células estão envolvidas por uma densa matriz polissacarídica rica em glucuronoxilomanana – cuja presença dificulta a ação de diversas drogas – pode-se inferir que possivelmente a anfotericina B interfira na montagem do exopolissacarídeo ou na estrutura da exopolissacarídeo (MARTINEZ; FRIES, 2010).

Em um segundo momento, foi testada a capacidade das sulfonamidas de reduzir biofilme de *Cryptococcus* já formado, em estágio maduro. A ação das drogas se mostrou mais efetiva neste ensaio, uma vez que se obteve redução de até 92% do biofilme quantitativamente formado quando comparado ao controle. Ademais, as drogas antifolato testadas não apresentaram diferenças estatísticas entre si nem quando comparadas à anfotericina B. Até o presente momento, não há na literatura estudos que investiguem a ação de sulfonamidas ou outros inibidores de folato sobre biofilmes de *Cryptococcus*. Sabe-se, entretanto, que os biofilmes constituem-se numa barreira que impede a penetração de diversas drogas antifúngicas. Alguns estudos mostram que, na forma de biofilme, *Cryptococcus* pode ser até dez vezes mais resistente à ação de anfotericina do que na fase planctônica, provavelmente pela incapacidade da droga se difundir para dentro do biofilme (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; MARTINEZ; FRIES, 2010). Apesar disso, neste estudo, ambas as sulfonamidas testadas provocaram redução considerável no biofilme formado, o que pode indicar uma futura aplicação desses compostos em materiais prostéticos invasivos, como cateteres de derivação ventriculoatrial.

7 CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que não foi possível definir, baseado no número de isolados de origem ambiental, os possíveis habitats preferenciais de *Cryptococcus* no Estado do Ceará. Desse modo, propõem-se expandir o número de coletas e ampliando a área de busca em trabalhos futuros.

Referente aos diversos ensaios de sensibilidade executados neste trabalho, conclui-se que as sulfonamidas foram eficientes, *in vitro*, contra os isolados de *Cryptococcus* de ambas as espécies na forma planctônica, tendo *C. neoformans* se mostrado mais sensível à ação da combinação de Sulfametoxazol-Trimetoprim e Sulfadiazina-Pirimetamina do que *C. gattii*.

Ademais, a pré-incubação de *Cryptococcus* em concentrações subinibitórias de Sulfametoxazol-Trimetoprim e Sulfadiazina-Pirimetamina foi capaz de aumentar a sensibilidade antifúngica, *in vitro*, das cepas testadas frente à anfotericina B e derivados azólicos.

As sulfonamidas testadas também foram capazes de reduzir a produção de ergosterol celular em cepas do Complexo *C. neoformans* na forma planctônica, entretanto sem alterar a expressão de protease e fosfolipase nas condições testadas. Concentrações subinibitórias de Sulfametoxazol-Trimetoprim e Sulfadiazina-Pirimetamina também foram capazes de reduzir a capacidade de formação e manutenção de biofilme de cepas do Complexo *C. neoformans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEGG, M.A.; CELLA, F.L.; FAGANELLO, J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of *Psittaciformes* in a southern Brazilian Zoological Garden. *Mycopathol*, v. 161, p. 83-91, 2006.
- AFELTRA, J.; DANNAOUI, E.; JACQUES, F.G.M. et al. *In Vitro* synergistic interaction between amphotericin B and pentamidine against *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother*, v.46, p. 3323-6, 2002.
- AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, L.J. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. v.48, p. 3291-7, 2004.
- ALMEIDA, A. M. F. et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. *FEMS Yeast Res*, 7:152–164, 2007.
- AMARO, M. C. O. Caracterização de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* quanto à susceptibilidade a fluconazol. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- BADDLEY, J. W.; SANKARA, I. R., RODRIQUEZ, J. M., et al. Histoplasmosis in HIV-infected patients in a southern regional medical center: poor prognosis in the era of highly active antiretroviral therapy. *Diagn. Microb. Infect. Dis*. v. 62, p. 151-156, 2008.
- BARNETT, J.A. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. *Yeast*, v. 27, p. 875-904, 2010.
- BARQUIST, E.; FEIN, E.; SHADICK, D.; et al. Randomized prospective trial of amphotericin B lipid emulsion versus dextrose colloidal solution in critically ill patients. *J. Trauma*., v.47, p.336-340, 1999.
- BARTLETT, K.H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; et al. *Cryptococcus gattii*, temporary visitor or landed immigrant? *Can J Plant Path*, v. 27, 2004.
- BICANIC, T.; HARRINSON, T. S. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin*.v.72, n.1, p.99-118, 2004.
- BOEKHOUT, T. et al. Hibrid genotypes in pathogenic yeast *C. neoformans*. *Microbiology*, v.147, p. 891-907, 2001.
- BORGHI, E.; IATTA, R.; SCIOTA, R. et al. Comparative evaluation of the Vitek 2 yeast susceptibility test and CLSI broth microdilution reference method for testing antifungal susceptibility of invasive fungal isolates in Italy: the GISIA3 study. *J Clin Microbiol.*, v. 48, p.3153-7, 2010.
- BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans-C.gattii* Species Complex. *Rev Iberoam Micol*, v. 25, p. 4–12, 2008.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; KURAMAE, E.E; BOEKHOUT, T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet Biol*, v. 45, p. 400–421, 2008.

BRILHANTE, R.S.N. et al. *In vitro* effect of sulfamethoxazole-trimethoprim against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Antimicrob Agents Chemother*.v.54, p. 3978-9, 2010.

BRILHANTE, R. S.; PAIVA, M.A.; SAMPAIO, C.M. et al. Yeasts from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. *FEMS Microbiol Ecol*. V. 76(2), p.268-77, 2011.

BROUWER, A.E.; RAJANUWONG, A.; CHIERAKUL, W.; et al. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized trial. *Lancet* 363:1764-1767, 2004.

BUCHANAN, K.L.; MURPHY, J.W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg Infect Dis*, v. 4, p. 71–83, 1998.

BYRNES, E.J. 3RD; LI, W.; LEWIT, Y. et al. Emergence and pathogenicity of highly virulent *C. gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS Pathog*, v. 6(4), 2010.

CAMPOS, F. L.; BARONI, F. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. *Revista de Patologia Tropical*. v. 39, p. 83- 89. 2010.

CASADEVALL, A.; MUKHERJEE, J.; SCHARFF, D. et al. Monoclonal antibody based ELISAs for *Cryptococcus polysaccharide*. *J Im. Methods*, v. 154, p. 27-35, 1992.

CASADEVALL, A.; ROSAS, A.L.; NOSANCHUCK, J.D. et al. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, v.3, p. 354-358, 2000.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*. ASM Press, Washington DC, 1998.

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

CENCI, E.; BISTONI, F.; MENCACCI, A. et al. A synthetic peptide as a novel anticryptococcal agent. *Cell Microbiol*, v. 6, p. 953-961, 2008

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *C. neoformans* restores its virulence. *Mol Cell Biol*, v. 14, p. 4912-9. 1994.

CHAPMAN, SW; SULLIVAN, DC; CLEARY, JD. In search of the holy grail of antifungal therapy. *Transactions of The American Clinical and Climatological Association*, v. 119, p. 197-216, 2008.

CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; et al. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *C. neoformans*. *Infect Immun.* v. 77, p. 120-7, 2008.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J.biol. Chem.*, v.171, p. 501-5, 1947.

CHERNIAK, R.; MORRIS, L.C.; BELAY, T.; et al. Variation in the structure of glucuronoxylomannan in isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis. *Infect Immun.* v. 63, p.1899–1905, 1995.

CHERNIAK, R.; O'NEILL, E. B.; SHENG, S. Assimilation of xylose, mannose, and mannitol for synthesis of glucuronoxylomannan of *C. neoformans* determined by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Infect. Immun.*, v.66, n.6, p. 2996-2996, 1998.

CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; SUNDAR, G. et al. *In vitro* antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. *J Med Microbiol.*, v. 60, p.961-7, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3.NCCLS, Wayne, Pa, USA, 2008.

CORDEIRO, R.A.; COSTA, A.K.; BRILHANTE, R.S.et al. PCR-REA as an important tool for the identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from human and veterinary sources. *Veterinary microbiology*, v. 154, p.180-4, 2011.

COSTA, A.K.; SIDRIM, J.J.; CORDEIRO, R.A.et al. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia*, v. 169, p. 207-13, 2010.

COSTA, A. K. F. Análise fenotípica e molecular de cepas de *Cryptococcus* spp. obtidas de fontes ambientais e clínicas. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) Universidade Estadual do Ceará, 2009.

COX, G. M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 166-75, 2001.

COX, G. M. HARRISON, T. S.; MCDADE, H. C. et al. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infection and Immunity*, p. 173-180, Vol. 71, No. 1, 2003.

DAMBRÓS, B. P. Variabilidade genética de *Cryptococcus neoformans* isolado de pacientes HIV positivos atendidos no Hospital Nereu Ramos de Florianópolis, Santa Catarina. Dissertação (Mestrado-Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

DATTA, K.; BARTLETT, K.H.; BAER, R. et al. Spread of *Cryptococcus gattii* into pacific northwest region of the United States. *Emerg Infect Dis*, v. 1, p.1185–1191, 2009.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.et al. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmiscultures; 2000.

- DISMUKES, W.E.; CLOUD, G.; GALLIS, H.A. et al. Treatment of cryptococcal meningitis with combination of amphotericin B and flucytosine for four as compared with six weeks. *New England of Medicine*, v. 317, p. 334-341, 1987.
- DUNCAN, C. et al. *Cryptococcus gattii* in wildlife of Vancouver Island, British Columbia, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 42, p. 175-178, 2006.
- EISENMAN, H.C.; FRASES, S.; NICOLA, A. M. et al. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. v. 155, p. 3860–3867, 2009.
- ELLIS, D.H.; PFEIFFER, T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal Clinical Microbiology*, v. 28, p. 1642-1644, 1990.
- ELLIS D.H.; PFEIFFER, T.J. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. *Lancet*, v. 336, p. 923-925, 1990.
- ENACHE-ANGOULVANT, A.; CHANDENIER, J.; SYMOENS, F. et al. Molecular identification of *C. neoformans* serotypes. *J Clin Microbiol*, v. 45, p. 1261–5, 2005.
- EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am. J. Hyg*, v. 62, p. 227- 232, 1955.
- ESCANDÓN, P. et al. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *C. neoformans* species complex reveal a high genetic diversity and presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *Yeast Res*, v. 6, p. 625-35, 2006.
- ESPINEL-INGROFF, A.; CHOWDHARY, A.; CUENCA-ESTRELLA, M. et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: An international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012.
- FAVALESSA, O. C. et al. First description of phenotypic profile and in vitro drug susceptibility of *Cryptococcus* spp. Yeast isolated from HIV-positive and HIV-negative patients in State of Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42:661–665, 2009.
- FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; CASADEVALL, A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology*. v. 147, p. 2355-65, 2004.
- FENG, X.; YAO, Z.; LING, B. et al. *Perilla frutescens* seed agar, a new medium for identification of the *Cryptococcus* species complex: evaluation for all major molecular types. *J Microbiol Methods*, v.84, p.359-61, 2011.
- FRANZOT, S.P.; SALKIN, I.F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 838-840, 1999.
- FROMTLING, R.A.; SHADOMY, H.J.; JACOBSON, E.S. Decreased virulence in stable, acapsular mutants of *C. neoformans*. *Mycopathologia*, v. 79, p. 23-9, 1982.

- GAGO, S.; ZARAGOZA, O.; CUESTA, I. et al. High-resolution melting analysis for identification of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* complex. J. Clin. Microbiol., v. 49, 2011.
- GARCIA-RIVERA, J.; EISENMAN, H.C.; NOSANCHUK, J.D. et al. Comparative analysis of *C. neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different laccase substrates. Fungal Genet Biol. V. 42(12), p. 989-98. 2005.
- GATES, M. A.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. Molecular Microbiology, v. 52, n.1, p.13-24, 2004.
- GOMEZ-LOPEZ, A.; BUITRAGO, M. J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. et al. *In vitro* antifungal susceptibility pattern and ergosterol content in clinical yeast strains. Rev Iberoam Micol., v. 28, p. 100-103, 2011.
- GRAHAM, K. J.; PHILIP H BRAIN, P. H.; SPIELMAN, D. et al. Concurrent infection with *Cryptococcus Neoformans/Gattii* species complex and *Mycobacterium avium* affecting the subcutis and bone of a pelvic limb in a cat. Journal of Feline Medicine and Surgery, vol. 13, 2011.
- GRANADOS, D. P.; CASTAÑEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. Microb Ecol. 2005, v. 49 ,p. 282-90, 2005.
- GRAYBILL, J.R.; MONTALBO, E.; KIRKPATRICK, W.R. et al. Fluconazole versus *Candida albicans*: a complex relationship. Antimicrob. Agents Chemother., v. 42, p. 2938-2942, 1998.
- GRISEO, G.; BOLIGNANO, M.S.; DE LEO, F.; STAIB, F. Evidence of canary droppings as an important reservoir *Cryptococcus neoformans* .Zentralbl. Bakteriol.,v. 282, p. 244-254, 1995.
- GROVER, N.; NAWANGE, S.R.; NAIDU, J. et al. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. Mycopathologia, v. 164, p.159-70, 2007.
- GUIMARAES, A.J.; FRASES, S.; CORDERO, R.J. et al. *Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size *In Vitro* and *in vivo*. Cell Microbiol., v. 12, p. 740-753, 2010.
- HAHN, R.C.; MORATO, C.Y.T.; SANTOS, N.L. et al. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. Mycoses, v. 46, p. 342-347, 2003.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol, v.2, p. 95-108.2004;
- HANAFY, A.; UNO, J.; MITANI, H.; et al. *In-vitro* antifungal activities of sulfa drugs against clinical isolates of *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. Jpn J Med Mycol, n.48, p.47-50, 2007.

- HATA, D. J. et al. Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. *J. Clin. Microbiol.* vol. 45 no. 4 1087-1092, 2007.
- HIDA, S.; YOSHIDA, M.; NAKABAYASHI, I., et al. Anti-fungal activity of sulfamethoxazole toward *Aspergillus* species. *Biol Pharm Bull.* v. 28, p. 773-8, 2005.
- HUGHES, W. T. Effects of pentamidine isethionate on *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Ver Med.* v. 42, p. 287-295, 1991.
- IKEDA, R., SUGITA, T., JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* , v.40, p. 1214-1218, 2002.
- IKEDA, R. et al. T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. *Microbiology and Immunology.* v. 47, p.271-277, 2003.
- IQBAL, N.; DEBESS, E. E.; RON WOHRLE, R.; et al. Correlation of genotype and *in vitro* susceptibilities of *Cryptococcus gattii* strains from the pacific northwest of the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, p. 539-544, 2010.
- JARVIS, J.N.; HARRISON, T.S. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS*, v. 21, p. 2119–2129, 2007.
- JUNGERMAN, P.F.; SCHWARTZMAN, R.M. *Veterinary medical mycology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1972. 200p.
- KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol.* v. 56, p.211-24, 2009.
- KAWAKAMI, K. Regulation by innate immune T lymphocytes in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Jpn J Infect Dis Aug.* v. 57, n. 4, p. 137-45, 2004.
- KWON-CHUNG, K.J. A new genus, *filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia.* v.67(6), p.1197-200, 1975.
- KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Epidemiologic differences between the two varieties of *C. neoformans*. *American Journal of Epidemiology*, v. 120, p. 123-130, 1984.
- KWON-CHUNG, K.J. The discovery of creatinine assimilation in *Cryptococcus neoformans* and subsequent work on the characterization of the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Zentralbl. Bakteriol.*, v. 275, p. 390-393, 1991.
- KWON-CHUNG, K.J. et al. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. basillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*, v. 51, p. 804-806, 2002.

KWON-CHUNG, K.J.; VARMA, S.A. Do major species concepts support one, two or more species within *C. neoformans*? FEMS Yeast Res, v. 6, p. 574-587, 2006.

LACAZ, C.S. et al. T. Tratado de Micologia Médica. 9. Ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

LACAZ, C.S.; NEGRO, G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. Micologia médica fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo : Savier, 1991. Cap.38. p.616-651.

LAZÉRA, M.S.; CAVALCANTI, M.A.; TRILLES, L. et al. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. Medical Mycology, v. 36, p. 119 -122, 1998.

LAZERA, M.S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. et al. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. J. Med. Vet. Mycol., v. 31, p. 449-454, 1993.

LAZERA, M. S. et al. Natural habitat of *C. neoformans* var. *neoformans* indecaying wood forming hollows in living trees. J Med Vet Mycol, v. 34, p. 127-131, 1996.

LAZÉRA, M.S.; SALMITO CAVALCANTI, M.A.; LONDERO, A.T. et al. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. Medical Mycology, v. 38, p. 379 -383, 2000.

LAZÉRA, M.S.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; CAVALCANTI, M.A.S; et al.2005. Criptococose. In: JR Coura (ed.), Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1223-1236, 2005.

LAZÉRA, M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. Criptococose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA M. F. G. Micologia Médica a luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 89-101, 2004.

LEAL, A.L.; FAGANELLO, J.; BASSANESI, M.C.; VAINSTEIN, M.H. *Cryptococcus* species identification by multiplex PCR. Medical Mycology, v. 46, p. 377-383, 2008.

LEE, H.; CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. TUP1 disruption reveals biological differences between MATa and MAT α strains of *Cryptococcus neoformans*. Molecular Microbiology, v. 55, p. 1222–1232, 2004.

LICEA, B.A.; GARZA, D.G.; ZÚÑIGA, M.T. et al. Aislamento de *C. neoformans* var. *gattii* de *Eucalyptus tereticornis*. Rev Iberoam Micol, v. 13, p. 27-28, 1996.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. Infection, Genetics and Evolution, v. 9, p. 401-416, 2009.

LIN, X.; HEITMAN, J. - The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. Ann. Rev. Microbiol., v.60, p. 69-105, 2006.

LOPES-MARTINEZ, R.; CASTANON-OLIVARES, L.R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico City. Mycopathologia, v. 129, p. 25-28. 1995.

LORTHOLARY, O.; FONTANET, A.; MEMAIN, N. et al. French cryptococcosis study group. Incidence and risk factors of immune reconstitution inflammatory syndrome complicating HIV-associated cryptococcosis in France. *AIDS*, v. 19, p. 1043-1049, 2005.

LORTHOLARY, O. Management of cryptococcal meningitis in AIDS. The need for specific studies in developing countries. *Clin Infect Diseases*, v. 45, p. 81-83, 2007.

MA, H.; MAY, R.C. Virulence in *Cryptococcus* species. *Adv Appl Microbiol*, v. 67, p. 131-90, 2009.

MA, L. L.; MODY, C.H. When there is a fungus among us, what makes it virulent? *Am J Respir Cell mol Biol*. v.26, p.273-276, 2002.

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

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. *Infect. Immun*, v.73, p. 6350-6362, 2005.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. *Infect Immun*, v. 74, p. 6118-23, 2006.

MARTINEZ, L.R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *C. neoformans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 50, p. 1021-33, 2006.

MARTINEZ, L.R.; FRIES, B.C. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Curr Fungal Infect Rep*, v.4, p. 266-275, 2010.

MARTINEZ, L. R.; MIHU, M. R.; HAN, G. et al. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Biomaterials*, v. 31, p. 669-79, 2010.

MATOS, C. S.; DE SOUZA ANDRADE, A.; OLIVEIRA, N. S. et al. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 2012. Aguardando versão impressa.

MATSUMOTO, M.T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; BAEZA, L.C. et al. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *C. neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. v.49, n.1; p.41-47, 2007.

MAXSON, M.E.; COOK, E.; CASADEVALL, A. et al. The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *Fungal Genet Biol*. 2007

MAZUELOS, E.M., GARCÍA, A.I. Microbiological aspects of the cryptococcosis in the post-HAART era. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. v. 1, p.40-5, 2010.

- MDODO, R.; MOSER, S. A.; JAOKO, W. et al. Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus neoformans* cerebrospinal fluid isolates from AIDS patients in Kenya. *Mycoses*, v. 54, p. 438-442, 2011.
- 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, p.515-48, 1995.
- MORA, D. J.; PEDROSA, A. L.; RODRIGUES, V.; et al. Genotype and mating type distribution within clinical *C. neoformans* and *C.gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Minas Gerais, Brazil. *Med. Myc*,v. 48, p. 561– 569, 2010.
- MORAN, G.P.; PINJON, E.; COLEMAN, D.C.et al. Analysis of drugs resistance in pathogenic fungi. In: Kavanagh, K. *Medical Mycology: Cellular and Molecular Techniques*. USA: John Wiley & Sons, Ltd, p. 93-113, 2007.
- MORANOVA, Z.; KAWAMOTO, S.; RACLAVSKY, V. Hypoxia sensing in cryptococcus neoformans: biofilm-like adaptation for dormancy? *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, v. 153, p. 189-93, 2009.
- NAKAMURA, Y., KANO, R., SATO, H., et al. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D developed on canavanine-glycine- bromthymol blue medium. *Mycoses*, v. 41, p. 35-40, 1998.
- NAVARRO-MARTÍNEZ, M.D.; CABEZAS-HERRERA, J.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N. Antifolates as antimycotics? Connection between the folic acid cycle and the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents*, v. 28, p. 560-7. 2006.
- NAWANGE, S.R.; SHAKYA, K.; NAIDU, J. et al. Decayed wood inside trunk hollows of living trees of *T. indica*, *S. cumini* and *M. indica* as natural habitat of *Cryptococcus neoformans* and their serotypes in Jabalpur city of Central India. *J Mycol Med.*, p. 63-71, 2006.
- NGUYEN, M.H.; YU, C.Y. *In vitro* comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, p. 471-472, 1998.
- NIELSEN, K.; DE OBALDIA, A. L.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryot Cell*, p. 949-59, 2007.
- NOBRE, M.O. et al .Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 1, 2002.
- NOGUEIRA, G. C. Avaliação do farnesol sobre o crescimento e fatores de virulência em cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans in vitro*. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV). Universidade Estadual do Ceará, 2011.
- NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Ant Agents Chemother*, v. 50, p. 3519-28, 2006.

- OHKUSU, M.; TANGONAN, N.; TAKEO, K. Serotyping, mating type and ploidy Of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 44, p. 299-302, 2002.
- OLSZEWSKI, M. A.; ZHANG, Y.; HUFFNAGLE, G. B. Mechanisms of cryptococcal virulence and persistence. Future Microbiology. v. 5, p. 1269-1288, 2010.
- PAPPALARDO, M.C.; PASCHOAL, R.C.; MELHEM, M.S.; et al. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. AIDS. v.21, n.14, p.1971-2, 2007.
- PARK, B. J; WANNEMUEHLER, K. A; MARSTON, B.J. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. AIDS. V.20 (4), p. 525-30, 2009.
- PASSONI, L.F.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M.M. et al. *C. neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. Med Myc, v. 36, p. 305-311, 1998.
- PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. *In vitro* susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, p. 239-243, 2006.
- PEDROSO, R. S.; COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C. et al. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.40, n.5, p. 566-568, 2007.
- PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Microbiological Research , v. 164, p. 221-227, 2009.
- PEETERS, E.; NELIS, H.J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods, v.72, p. 157-65, 2008.
- PERFECT, J.R.;DISMUKES, W.E.;DROMER, F.et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: update by the infectious diseases society of america. Clin Infect Dis .v. 50:291-322, 2010.
- PERKINS, A., GOMEZ-LOPEZ, A., MELLADO, E. et al. Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. J. Antimicrob. Chemother. v.56, p. 1144-7, 2005.
- PFALLER, M.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J. et al. *In vitro* susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. Journal of Clinical Microbiology, v. 43, p. 3807-3810, 2005.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clinical Microbiology Reviews, v. 20, p. 133-163,2007.

- PFEIFFER, T.J.; ELLIS, D. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tireticornis*. J. Med. Vet. Mycol., v. 30, p. 407- 408, 1992.
- POLAK, A. The past, present and future of antimycotic combination therapy. Mycoses, v.42, p.335-370, 1999.
- RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; WICKES, B.L. et al. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. Appl Environ Microbiol. v.68(11), p. 459-63, 2002.
- RAMAGE, G.; WICKES, B. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Inhibition on *Candida albicans* biofilm formation using divalent cation chelators (EDTA). Mycopathologia. 2007 v.164(6),p.301-6, 2007.
- RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B. et al. Our current understanding of fungal biofilms. Crit Rev Microbiol., v. 35, p. 340-55, 2009.
- RANDHAWA, H.S.; MUSSA, A.Y.; KHAN, Z.U. Decaying wood in tree trunk hollows as a natural substrate for *Cryptococcus neoformans* and other yeast-like fungi of clinical interest. Mycopathologia, v. 151, p. 63-69, 2001.
- RAVI, S.; PIERCE, C.; WITT, C. et al. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* under distinct environmental conditions. Mycopathologia, v. 167, p. 307-14, 2009.
- REOLON, A.; MEZZARI, A.; PEREZ, L.R.R. Prevalência de *C. neoformans* nos Pombos da Cidade de Porto Alegre. J. Bras. Med. Lab., v. 40, p. 293-298, 2004.
- REX, J. H.; CHESTER, R.; COOPER, C. R.; MERZ W. G.; GALGINARI, J.; ANAISSIE E. J. Detection of amphotericin B- resistant *Candida* isolates in a broth-based system. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 39(4), p. 906-909, 1995.
- RIBEIRO, M. A.; NGAMSKULRUNGROJ, P. Molecular characterization of environmental *C. neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil, Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo v. 50 no.6, 2008.
- RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. Fungal infection: Diagnosis and management. London : Blackwell, 1993. Cap.3: Antifungal drugs: 17-43.
- SANGLARD, D.; ODDS, F. C.; Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. The Lancet Infectious Diseases, v. 2, p. 79-83, 2002.
- SANTANGELO, R. T., NOURI-SORKHABI, M. H., SORREL, T. C. et al. Biochemical and functional characterization of secreted phospholipase activities from *C. neoformans* in their naturally occurring state. J Med Microbiol 48, 731-740, 1999.
- SANTOS, W. R.; MEYER, W.; WANKE, B.; et al. Primary endemic Cryptococcosis gattii by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. Mem do Inst O Cruz, v. 103, p. 813-818. 2008.

SAU, K.; MAMBULA, S.S.; LATZ, E. et al. The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 37561-37568, 2003.

SCAVONE, R.;BURGER, E. Paracoccidioidomycosis: reduction in fungal load and abrogation of delayed-type hypersensitivity anergy in susceptible inbred mice submitted to therapy with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Med Microbiol Immunol*, v. 193, p.53-9, 2004.

SIDRIM, J. J.; COSTA, A. K.; CORDEIRO, R. A. et al. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Can J Microbiol.* v.56, p. 445-58, 2010.

SILVA, P.R. et al. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *C. neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 41, n. 2, 2008.

SILVA, E. G.; PAULA, C. R.; DIAS, A.L. et al. Combination efficacy of voriconazole and amphotericin B in the experimental disease in immunodeficient mice caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, v. 171, p. 261-6, 2011.

SOARES, M. C. B.; PAULA, C. R.; DIAS, A. L. T. et al. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 47, p. 31-36, 2005.

SOARES, B. M.; SANTOS, D. A.; KOHLER, L. M. et al. Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 25, p. 242-245, 2008.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Medical Mycology.* v. 39, n. 2 .p. 155-168, 2001.

SOUZA, L.K.H.; FERNANDES, O.F.L.; KOBAYASHI, C.C.B.A. et al. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *C. neoformans* in Goiânia City, Goiás, Brazil. *Rev do Inst de Med Trop de São Paulo*, v. 47, p. 253-256, 2005.

SOUZA, L. K. H. ; SOUZA JUNIOR, A. H.; COSTA, C. R. et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiânia, Brazil. *Mycoses*, v.53, p. 62-67, 2009.

SPRINGER, D.J.; CHATURVEDI, V. Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerging Infectious Diseases.* v.16, p. 14-20, 2010

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H.A.; CASADEVALL, A. *C.neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.18, p. 15245-50, 2001.

TEIXEIRA, C. E. C. Efeito do farnesol sobre o fenótipo de resistência e a produção de fosfolipase e protease em cepas de *Candida* spp. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica. Universidade Federal do Ceará, 2010.

TINTELNOT, K.; LEMMER, K.; LOSERT, H.; SCHÄR, G.; POLAK, A. Follow-up of epidemiological data of cryptococcosis in Austria, Germany and Switzerland with special focus on the characterization of clinical isolates. *Mycoses*, v. 47, 2004.

- TORRES-RODRIGUEZ J. M.; Morera Y.; Baró, T. et al. In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* serotypes to GM 237354 derivative of the sordarin class. *Mycoses*. v.45(8), p. 313-6, 2002.
- TORRES-RODRIGUEZ J. M.; ALVARADO-RAMIREZ E., GUTIERREZ-GALLEGO, R. Urease activity in *C.neoformans* and *C. gattii*. *Rev Iberoam Micol*. v. 25:27–31. 2008.
- TRILLES, L.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; LAZÉRA, M.S. et al. *In vitro* antifungal susceptibility of *C. gattii*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 4815-4817, 2004.
- TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B. et al. Regional pattern of the molecular types of *C. neoformans* and *C.gattii* in Brazil. *Mem do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, p. 455-462, 2008.
- TRILLES, L.; MEYER, W.; WANKE, B. et al. Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *C.neoformans/C. gattii* species complex. *Med Mycol*, 2011;
- UNAIDS. 2006 report on the global AIDS epidemic. 2006; p. 502–540. http://www.unaids.org/en/HIV_data/2006GlobalReport/default.asp. Acesso em 12 de março de 2012.
- UNAIDS. 2007 AIDS epidemic update. 2007; UNAIDS. p. 38–39. <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIV/Data/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2007/default.asp>. Acesso em 12 de março de 2012.
- UNAIDS. 2011 AIDS epidemic update. 2011; UNAIDS. p. 112–49. <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIV/Data/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2011/default.asp>. Acesso em 12 de março de 2012.
- VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Melanization of *C.neoformans* and *H.capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungina. *Antimicrob Agents Chemoter*, v.46, n.11, p.3394-3400, 2002.
- VARMA, A.; KWON-CHUNG, K.J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemoter*, v. 54, p. 2303-11, 2010.
- VIDOTTO, V.; SINICCO, A.; DI FRAIA, D. et al. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. v.137, p.119-23, 1996.
- VIDOTTO, V., MELHEM, M., PUKINSKAS, S., et al. Extracellular enzymatic activity and serotype of *C. neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. *Rev Iberoam Micol*, v. 22, p. 29–33, 2005.
- WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun*. 1995, v. 63, p. 131-6, 1995.
- WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Micb Rev*, v. 11, p. 382-402, 1998.

XUE, C.; TADA, Y.; DONG, X. et al. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe*, v. 1, 2007.

ZARAGOZA, O.; MIHU, C.; CASADEVALL, A. et al. Effect of amphotericin B on capsule and cell size in *C. neoformans* during murine infection. *Antim Ag Chem*, v. 49, p. 4358-61, 2005.

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

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibodies can affect complement deposition on the capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* by both classical pathway activation and steric hindrance. *Cell Microbiol.* v.:8, p.1862-76, 2006.

ZARAGOZA, O. et al. Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog.* v. 17, 2010.

ANEXO A – Artigo científico aceito para publicação

AUTHOR'S PROOF

JmIID 10096_ArtID 1774_Proof# 1 - 08/11/2012

Eur J Clin Microbiol Infect Dis
DOI 10.1007/s10096-012-1774-81
2

ARTICLE

4 **Antifolates inhibit *Cryptococcus* biofilms and enhance**
5 **susceptibility of planktonic cells to amphotericin B**70 **R. de Aguiar Cordeiro · C. I. Mourão · M. F. G. Rocha · F. J. de Farias**
8 **Marques · C. E. C. Teixeira · D. F. de Oliveira Miranda · L. V. P. Neto ·**
9 **R. S. N. Brillhante · T. de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira · J. J. C. Sidrim**
1112 Received: 15 August 2012 / Accepted: 29 October 2012
13 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 201214 **Abstract** The *Cryptococcus neoformans* species complex
15 contains the most important agents of fungal meningoenceph-
16 alitis. Therapeutic choices are limited and issues related to
17 toxicity and resistance to antifungals have been described. The
18 present study evaluated the inhibitory effect of the antifolate
19 combinations sulfamethoxazole–trimethoprim (SMX/TMP)
20 and sulfadiazine–pyrimethamine (SDZ/PYR) against plank-
21 tonic cells and biofilms of *C. neoformans* and *C. gattii*. The
22 influence of the antifolate combinations on the amphotericin
23 minimum inhibitory concentration (MIC) of planktonic cells
24 was also investigated. In addition, the effect of these combi-
25 nations on the cellular ergosterol content of planktonic cells
26 was studied. Strains of *C. neoformans* ($n=15$) and *C. gattii*
27 ($n=15$) obtained from environmental or clinical sources were
28 evaluated by the broth microdilution method. SMX/TMP and
29 SDZ/PYR showed antifungal activity against free living cells
30 and sessile cells of *Cryptococcus* spp. Moreover, planktonic
31cells showed increased susceptibility to amphotericin B after 32
pre-incubation with sub-inhibitory concentrations of SMX/ 33
TMP or SDZ/PYR. The drug combinations SMX/TMP and 34
SDZ/PYR were able to prevent the biofilm formation and 35
showed inhibitory effect against mature biofilms of both spe- 36
cies. Additionally, the study showed that antifolate drugs 37
reduced the ergosterol content in *C. neoformans* and *C. gattii* 38
planktonic cells. Our results highlight the antifungal potential 39
of antifolate drugs. 4042 **Introduction**43 *Cryptococcosis* is a life-threatening disease caused by the 44
Cryptococcus neoformans species complex, which is 45
formed by *C. neoformans* (serotypes A, D, and A/D) and 46
C. gattii (serotypes B and C), commonly acquired by inha- 47
lation of conidia from the air and bird droppings [1]. Prima- 48
ry infection usually results in pneumonia or dissemination to 49
the central nervous system [2]. Cryptococcal meningitis is 50
considered to be one of the most important human immu- 51
nodeficiency virus (HIV)-related opportunistic infections, 52
and it is estimated that around 1 million cases occur globally 53
per year in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) 54
patients [2, 3].55 The treatment of cryptococcal meningoencephalitis relies 56
mainly on amphotericin B, alone or associated with 5- 57
fluorocytosine [2, 4]. However, nephrotoxicity and renal 58
dysfunction have often been reported among patients under 59
therapeutic regimens with this antifungal [4]. In order to 60
overcome these issues, fluconazole is considered as an al- 61
ternative for induction and consolidation, maintenance, or 62
prophylactic therapy [2, 5]. Although antifungal resistance 63
in *Cryptococcus* is not considered to be a main problem 64
worldwide [6], some studies have shown that resistance can 65
be a problem in developing countries [5, 7]. Moreover, theR. de Aguiar Cordeiro (✉) · C. I. Mourão · M. F. G. Rocha ·
F. J. de Farias Marques · C. E. C. Teixeira ·
D. F. de Oliveira Miranda · L. V. P. Neto · R. S. N. Brillhante ·
T. de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira · J. J. C. Sidrim
Department of Pathology and Legal Medicine, School
of Medicine, Postgraduate Program in Medical Microbiology
and Specialized Medical Mycology Center,
Federal University of Ceará,
Fortaleza, CE, Brazil
e-mail: rossanacordeiro@ufc.brR. de Aguiar Cordeiro · C. I. Mourão · R. S. N. Brillhante ·
J. J. C. Sidrim
Department of Clinical Medicine, School of Medicine,
Post-Graduation Program in Medicine Science,
Federal University of Ceará,
Fortaleza, CE, BrazilM. F. G. Rocha
School of Veterinary Medicine, Postgraduate Program
in Veterinary Science, State University of Ceará,
Fortaleza, CE, Brazil

66	heteroresistance to fluconazole and its linkage to virulence	VGI/AFLP4), <i>C. gattii</i> WM 178 (serotype B, VGII/AFLP6),	115
67	among clinical <i>Cryptococcus</i> strains have gained attention	<i>C. gattii</i> WM 175 (serotype B, VGIII/AFLP5), and <i>C. gattii</i>	116
68	in recent years [5, 8]. To address these problems, much	WM 779 (serotype C, VGIV/AFLP7) [23].	117
69	effort has been devoted to searching for new antifungals		
70	against <i>Cryptococcus</i> [9–11].	Antimicrobial drugs	118
71	Additionally, many studies have shown that <i>Cryptococcus</i>		
72	spp. have the ability to colonize and form biofilms in medical	Stock solutions of SMX/TMP and SDZ/PYR were prepared	119
73	devices [12–15]. Fungal biofilms are formed by microbial	in 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) and amphotericin B	120
74	communities associated with an extracellular matrix and their	(AMB) was diluted in 100 % DMSO. Serial two-fold dilu-	121
75	development is controlled by complex molecular events [13].	tions of SMX/TMP and SDZ/PYR were prepared with yeast	122
76	These structures have been associated with infection with high	nitrogen base (YNB) medium [22]. AMB was diluted in	123
77	levels of therapeutic refractoriness—due to their intrinsic	RPMI 1640 medium with L-glutamine and without sodium	124
78	antifungal resistance—as well as being associated with signifi-	bicarbonate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA),	125
79	cant mortality [13]. However, despite the great importance of	buffered to pH7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic	126
80	the topic, few studies have investigated strategies to control	acid (MOPS) (Sigma Chemical Co.).	127
81	and eradicate <i>Cryptococcus</i> biofilms [14–16]. The insertion of		
82	medical devices, such as ventriculoatrial shunt catheters [17,	Inoculum preparation for susceptibility testing	128
83	18], prosthetic valves [19], and prosthesis [20], are related to		
84	<i>Cryptococcus</i> biofilm formation.	Inocula of all tested isolates were prepared from 48-h-old	129
85	The present study aimed to evaluate the inhibitory effect of	cultures previously grown on potato dextrose agar at 35 °C.	130
86	the antimicrobial combinations sulfamethoxazole–trimetho-	The colonies were suspended in 5 mL of sterile 0.9 % saline	131
87	prim (SMX/TMP) and sulfadiazine–pyrimethamine (SDZ/	and the turbidity was adjusted to 0.5 on the McFarland	132
88	PYR) against planktonic cells and biofilms of <i>C. neoformans</i>	scale. Afterwards, the suspension was diluted 1:100 and	133
89	and <i>C. gattii</i> . The effect of these drugs on the cellular ergos-	then 1:20 with YNB medium to obtain an inoculum of	134
90	terol content and on the antifungal susceptibility of planktonic	planktonic cells containing $0.5\text{--}2.5 \times 10^3$ cells/mL [24].	135
91	cells to amphotericin B was also investigated.		
92	Materials and methods	Antifungal susceptibility of <i>Cryptococcus</i> planktonic cells	136
93	Microorganisms	<i>Effect of SMX/TMP and SDZ/PYR on Cryptococcus growth</i>	137
94	Strains of <i>C. neoformans</i> ($n=15$) and <i>C. gattii</i> ($n=15$) were		
95	obtained from environmental or clinical sources. The use of	The effect of the combinations of SMX/TMP and SDZ/PYR	138
96	clinical strains was approved by the Ethics Committee of	against <i>C. neoformans</i> and <i>C. gattii</i> strains was investigated	139
97	São José Hospital of Infectious Diseases (Fortaleza, Ceará,	by broth microdilution, according to the Clinical and Labo-	140
98	Brazil; Process 007-2009). The identification of <i>C. neoformans</i>	ratory Standards Institute (CLSI) document M27-A3 [25],	141
99	and <i>C. gattii</i> was based on the following phenotypical	except for the substitution of RPMI 1640 medium for YNB	142
100	characteristics: urease test on Christensen's urea agar (Difco	without PABA in this composition, because this component	143
101	Laboratories, England); phenoloxidase activity on birdseed	can interfere with the antifungal activity of sulphadiazine	144
102	agar (<i>Guizotia abyssinica</i>) supplemented with biphenyl	[24]. The final concentrations of each antimicrobial combi-	145
103	(0.1 %); and chemotyping on CGB medium (L-canavanine,	nation ranged as follows: 1.953 to 1,000 µg/mL for SMX	146
104	glycine, bromothymol blue), as previously described [21].	and SDZ; 0.39 to 200 µg/mL for TMP; 0.098 to 50 µg/mL	147
105	In addition, molecular characterization of each serotype was	for PYR; and 0.015 to 8 µg/mL for AMB.	148
106	performed as described by Enache-Angoulvant et al. [22],	Susceptibility testing for planktonic cells was performed	149
107	through enzymatic restriction of the <i>CAP59</i> gene. Eight	in 96-well microdilution plates at 37 °C for 48 h. All the	150
108	reference strains, obtained from Evandro Chagas Clinical	isolates were tested in duplicate. For SMX/TMP and SDZ/	151
109	Research Institute, Brazil (IPEC/FIOCRUZ), were used as	PYR, the minimum inhibitory concentrations (MICs) were	152
110	controls: <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> WM 148 (serotype A,	defined as the lowest drug concentration inhibiting growth	153
111	VNI/AFLP1), <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> WM 626 (serotype	by 80 % when compared to the control well [24, 26].	154
112	A, VNII/AFLP1A), <i>C. neoformans</i> WM 628 (serotype AD,	<i>Effect of sub-inhibitory concentrations of SMX/TMP</i>	155
113	VNIII/AFLP2), <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> WM 629	<i>and SDZ/PYR on susceptibility to amphotericin B</i>	156
114	(serotype D, VNIV/AFLP3), <i>C. gattii</i> WM 179 (serotype B,	The effect of SMX/TMP and SDZ/PYR on the susceptibility	157
		of <i>Cryptococcus</i> to AMB was also investigated. For this	158

- 159 purpose, strains of *C. neoformans* ($n=7$) and *C. gattii* ($n=7$) 208
 160 with previously known susceptibility patterns to AMB [27] 209
 161 were chosen. 210
 162 A standardized inocula prepared as described above was 211
 163 incubated in YNB medium supplemented with SMX/TMP 212
 164 or SDZ/PYR at sub-inhibitory MIC (MIC/2) for 24 h at 213
 165 37 °C in an orbital shaker at 150 rpm. Controls were grown 214
 166 in YNB medium without antimicrobials. After incubation, 215
 167 cultures were centrifuged at 2,000 rpm for 5 min. From the 216
 168 resulting pellet, an inoculum of $0.5\text{--}2.5 \times 10^3$ cells/mL was 217
 169 prepared in 5 mL of sterile 0.9 % saline and AMB MIC was 218
 170 determined by the CLSI M27-A3 broth microdilution
 171 method, using RPMI 1640 medium buffered to pH7.0 with
 172 0.165 M MOPS [25]. The MIC for AMB was defined as the
 173 lowest concentration at which no growth was observed [25].
 174 *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6528
 175 were used as quality control strains.
- 176 *Effect of SMX/TMP and SDZ/PYR on ergosterol content* 219
 177 *of planktonic cells* 220
- 178 Total sterols were extracted as described by Moran et al.
 179 [28], with modifications. Strains of *C. neoformans* ($n=7$)
 180 and *C. gattii* ($n=7$) were grown in potato dextrose agar for
 181 48 h at 37 °C and, after this period, a loopful of inoculum
 182 was transferred to YNB supplemented with SMX/TMP or
 183 SDZ/PYR at sub-MIC (MIC/2) for each drug combination.
 184 The tubes were incubated for 48 h at 37 °C and then
 185 centrifuged at 12,000 rpm for 3 min. Cellular pellets were
 186 suspended in 0.5 mL of alcoholic KOH (3.945 g of KOH
 187 and 40 ml of sterile distilled water, brought to 100 ml with
 188 100 % ethanol) and incubated for 1 h at 95 °C. Following
 189 incubation, the tubes were allowed to cool and total sterols
 190 were extracted by the addition of 600 µL of n-hexane and
 191 vigorous vortexing for 5 min. The tubes were centrifuged at
 192 10,443 rpm for 1 min and the entire organic top layer was
 193 transferred to a new tube and mixed with 1 mL of n-hexane.
 194 Absorbance readings were performed at 295 nm. Ergosterol
 195 quantification was performed by comparison to the standard
 196 curve with ergosterol P.A. (Sigma-Aldrich, Germany). The
 197 experiments were performed in duplicate. The results were
 198 compared with the ergosterol content of cells grown in YNB
 199 without antifolate drugs; itraconazole (MIC/2) was used as a
 200 positive control.
- 201 Biofilm formation
- 202 For biofilm testing, inocula were prepared as described by
 203 Martinez et al. [9]. In brief, strains of *C. neoformans* ($n=7$)
 204 and *C. gattii* ($n=7$), randomly chosen from the set of clinical
 205 and environmental isolates, were grown in Sabouraud dex-
 206 trose broth for 24 h at 30 °C in a rotary shaker at 150 rpm.
 207 After this period, the cells were collected by centrifugation
 and the pellet was washed two times with PBS. Suspensions
 were adjusted to 10^7 cells/mL in chemical medium (20 mg/
 mL thiamine, 30 mM glucose, 26 mM glycine, 20 mM
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 58.8 mM KH_2PO_4) and then 100-µl inocu-
 lum aliquots were transferred to flat wells of 96-well poly-
 styrene plates. The plates were incubated at 37 °C for 48 h
 and then the wells were washed three times with 0.05 %
 Tween 20 in Tris-buffered solution to remove non-adhered
 cells. Biofilm viability was monitored by the color change
 of resazurin solution (0.1 mg/mL in RPMI) after incubation
 at 37 °C for at least 6 h [29].
- Effect of SMX/TMP and SDZ/PYR against mature* 219
Cryptococcus biofilms 220
- The inhibitory activity of SMX/TMP and SDZ/PYR against
Cryptococcus biofilms was evaluated according to Martinez et
 al. [9], with slight modifications. Aliquots of 200 µL of each
 antimicrobial combination at two different concentrations
 were added to viable 48-h biofilms as follows: SMX/SDZ at
 5,000 mg/L–1,000 mg/L and 2,000 mg/L–400 mg/L; SDZ/
 TMP at 5,000 mg/L–250 mg/L and 2,000 mg/L–100 mg/L.
 Following incubation at 37 °C for 48 h, the supernatant
 was aspirated and an aliquot of 100 µL of 0.3 % crystal
 violet was added to each well. After 5 min at 25 °C, the dye
 solution was aspirated and the wells were washed twice with
 sterile distilled water. The wells were filled with 200 µL of
 100 % ethanol and, after 5 min at 25 °C, the mixture was
 aspirated and read in a spectrophotometer at 550 nm [29].
 The tests were conducted in duplicate; controls were grown
 in medium without antimicrobials. The effect of antifolate
 drugs was compared with AMB, which is considered to be a
 strong inhibitor of *Cryptococcus* biofilms [14].
- Effect of SMX/TMP and SDZ/PYR in preventing C.* 239
neoformans biofilm formation 240
- In addition, the biofilm inhibition ability of SMX/TMP and
 SDZ/PYR were evaluated. Biofilm formation was con-
 ducted as previously described except for the addition of
 antifolates to the chemical medium at the following drug
 combinations: SMX/TMP at 5,000 mg/L–1,000 mg/L and
 2,000 mg/L–400 mg/L; SDZ/PYR at 5,000 mg/L–250 mg/L
 and 2,000 mg/L–100 mg/L. Controls were grown in mini-
 mum medium without antimicrobials. Biofilm viability was
 monitored by resazurin metabolism and crystal violet dying
 [29], as described above.
- Statistical analysis 251
- The antimicrobial susceptibilities were compared using one-
 way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple
 comparison post-test. Differences between treatments were

255 evaluated for significance using the Wilcoxon signed-rank
 256 test. A p -value < 0.05 was considered to be significant. The
 257 statistical analyses were performed with GraphPad Prism
 258 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

259 Results

260 Effect of antifolate drug combinations on *Cryptococcus*
 261 planktonic cells

262 The susceptibility profile of *Cryptococcus* planktonic cells
 263 to antifolate drugs are shown in Table 1. For *C. neoformans*,
 264 the MIC values ranged from 7.81 to 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for SMX
 265 and 1.56 to 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for TMP; 15.63 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for
 266 SDZ and 0.781 to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for PYR. For *C. gattii*, the MIC
 267 values were higher ($p < 0.001$) and ranged as follows: 62.5 to
 268 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for SMX and 12.5 to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for TMP; 125 to
 269 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for SDZ and 6.25 to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for PYR.

270 After pre-exposure to sub-MIC concentrations of SMX/
 271 TMP and SDZ/PYR, strains of *C. neoformans* and *C. gattii*
 272 showed a decrease in MIC values of AMB ($p < 0.05$)
 273 (Table 2).

274 Effect of antifolate drug combinations on ergosterol content
 275 of planktonic cells

276 Sub-inhibitory concentrations of SMX/TMP and SDZ/PYR
 277 were also able to decrease the ergosterol content of *Crypto-*
 278 *coccus* isolates ($p < 0.05$) (Fig. 1). No significant differences
 279 in the mean amount of total ergosterol between *C. neoformans*
 280 and *C. gattii* grown in SMX/TMP or SDZ/PYR were
 281 observed.

282 Effect of antifolate drug combinations against *Cryptococcus*
 283 biofilms

284 The antifolate drugs were able to inhibit mature *Cryptococ-*
 285 *cus* biofilms by up to 90 % (Fig. 2). In addition, SMX/TMP
 286 and SDZ/PYR caused a reduction of approximately 80 % in
 287 the biofilm formation (Fig. 3) of both *C. neoformans* and *C.*
 288 *gattii*. There were no further statistically significant differ-
 289 ences between antifolate drugs and AMB at any concentra-
 290 tion ($p > 0.05$) in both experiments.

291 Discussion

292 In recent years, several studies have shown the potential of
 293 antifungal drugs to inhibit folic acid synthesis in *Candida*
 294 *albicans* [30], *Paracoccidioides brasiliensis* [31], *Histo-*
 295 *plasma capsulatum* [32], *Coccidioides posadasii* [26], and
 296 *Aspergillus* spp. [24]. Additionally, the combination SMX/

Table 1 Susceptibility profile of *Cryptococcus* planktonic cells to antifolate drugs

Strain	Species	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		SMX/TMP	SDZ/PYR	
03-02-062	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	500.0/25.0	t1.4
03-02-069	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	250.0/12.5	t1.5
03-02-070	<i>C. gattii</i>	62.5/12.5	125.0/6.25	t1.6
03-02-071	<i>C. gattii</i>	62.5/12.5	250.0/12.5	t1.7
03-02-073	<i>C. gattii</i>	250.0/50.0	500.0/25.0	t1.8
05-03-028	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	250.0/12.5	t1.9
05-03-029	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	250.0/12.5	t1.10
05-03-030	<i>C. gattii</i>	62.5/12.5	125.0/6.25	t1.11
05-03-031	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	125.0/6.25	t1.12
05-03-032	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	250.0/12.5	t1.13
05-03-033	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	125.0/6.25	t1.14
03-02-074	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	250.0/6.25	t1.15
05-02-080	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	250.0/12.5	t1.16
05-03-037	<i>C. gattii</i>	250.0/25.0	500.0/6.25	t1.17
05-02-082	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	250.0/12.5	t1.18
Geometric mean		119.4/22.79	238.7/10.39	t1.19
03-02-057	<i>C. neoformans</i>	15.625/3.125	62.5/3.125	t1.20
03-02-061	<i>C. neoformans</i>	31.25/6.25	15.625/0.781	t1.21
03-02-068	<i>C. neoformans</i>	62.5/12.5	125.0/6.25	t1.22
03-02-072	<i>C. neoformans</i>	31.25/6.25	15.625/0.781	t1.23
05-01-050	<i>C. neoformans</i>	31.25/6.25	62.5/3.125	t1.24
03-02-060	<i>C. neoformans</i>	31.25/6.25	62.5/3.125	t1.25
03-02-063	<i>C. neoformans</i>	62.5/12.5	125.0/6.25	t1.26
03-02-064	<i>C. neoformans</i>	15.625/3.125	125.0/6.25	t1.27
03-02-065	<i>C. neoformans</i>	31.25/6.25	62.5/3.125	t1.28
03-02-066	<i>C. neoformans</i>	7.81/1.56	500.0/25.0	t1.29
03-02-067	<i>C. neoformans</i>	15.625/3.12	62.5/3.125	t1.30
03-02-075	<i>C. neoformans</i>	15.625/3.12	62.5/3.125	t1.31
03-02-078	<i>C. neoformans</i>	31.25/6.25	125.0/6.25	t1.32
03-02-080	<i>C. neoformans</i>	15.625/3.12	125.0/6.25	t1.33
03-02-084	<i>C. neoformans</i>	15.625/1.56	62.5/3.125	t1.34
Geometric mean		23.68/4.52	75.19/5.96	t1.35
Reference strains				t1.36
WM148	<i>C. neoformans</i>	3.906/0.78	31.25/1.562	t1.37
WM626	<i>C. neoformans</i>	3.906/0.78	31.25/1.562	t1.38
WM628	<i>C. neoformans</i>	3.906/0.78	15.625/0.78	t1.39
WM629	<i>C. neoformans</i>	7.81/1.56	31.25/1.562	t1.40
WM179	<i>C. gattii</i>	250.0/50.0	250.0/12.5	t1.41
WM178	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	250.0/12.5	t1.42
WM161	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	250.0/12.5	t1.43
WM779	<i>C. gattii</i>	125.0/25.0	250.0/12.5	t1.44
Geometric mean		26.28/5.25	81.05/22.78	t1.45

SMX sulfamethoxazole, TMP trimethoprim, SDZ sulfadiazine, PYR pyrimethamine

Table 2 Effect of pre-exposure to folate inhibitors on the antifungal susceptibility of *Cryptococcus* planktonic cells

	Strain	Species	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
			AMB	SMX/TMP AMB ^a	SDZ/PYR AMB ^a
t2.4	03-02-057	<i>C. neoformans</i>	1.25	0.3125	0.625
t2.5	03-02-060	<i>C. neoformans</i>	0.25	0.125	0.125
t2.6	03-02-063	<i>C. neoformans</i>	0.156	0.078	0.078
t2.7	03-02-067	<i>C. neoformans</i>	1.25	0.3125	0.625
t2.8	03-02-068	<i>C. neoformans</i>	1.25	0.156	0.3125
t2.9	03-02-072	<i>C. neoformans</i>	0.5	0.0625	0.125
t2.10	05-02-075	<i>C. neoformans</i>	1.25	0.3125	0.156
t2.11	03-02-062	<i>C. gattii</i>	0.625	0.3125	0.312
t2.12	03-02-069	<i>C. gattii</i>	1.25	0.156	0.3125
t2.13	03-02-073	<i>C. gattii</i>	2.5	0.156	0.625
t2.14	05-03-029	<i>C. gattii</i>	0.5	0.125	0.125
t2.15	05-03-030	<i>C. gattii</i>	1.0	0.125	0.25
t2.16	05-03-031	<i>C. gattii</i>	1.0	0.125	0.125
t2.17	05-03-032	<i>C. gattii</i>	0.5	0.125	0.25

SMX sulfamethoxazole, TMP trimethoprim, SDZ sulfadiazine, PYR pyrimethamine, AMB amphotericin B
^aPre-exposure to folate inhibitors, followed by microdilution test to AMB

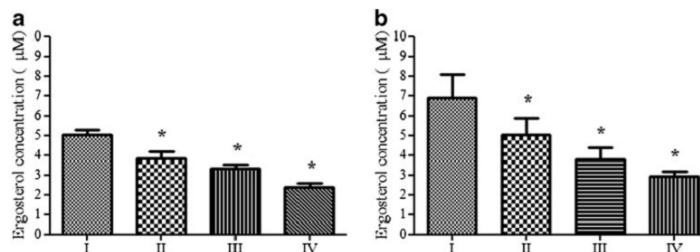
297 TMP has been used for years to treat paracoccidioidomycosis in Latin America [31], as well as for the treatment and prevention of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) in AIDS patients [33].

301 The present study shows that the combinations SMX/TMP and SDZ/PYR—in the same ratio in which they are administered in vivo (1:5)—have antifungal activity against *C. neoformans* and *C. gattii* planktonic cells and are also able to enhance AMB activity. The antifungal activity of sulfa drugs on *Cryptococcus* was previously demonstrated by Hanafy et al. [24], who investigated the inhibitory effect of nine different sulfa drugs against a small number of *Cryptococcus* strains and concluded that SMX showed promising results.

311 In this study, SMX was able to inhibit the growth of *C. neoformans* and *C. gattii* at concentrations of 6.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 119.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, while Hanafy et al. [24] showed MIC values of up to 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. neoformans*

and >250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *C. gattii*. Possibly, this reduction in the MIC value is due to the synergistic effect of the drug with TMP. This study also shows that the SMX/TMP combination was more effective than SDZ/PYR.

319 Although the great majority of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus* are sensitive to antifungals, the past decade has seen the emergence of resistant isolates in vitro to AMB and azoles [5, 6, 27]. In addition, the literature has reported the occurrence of strains of *C. gattii* with moderate resistance to FLC, ITC, and 5-fluorocytosine, as well as strains of *C. neoformans* with primary resistance to AMB, FLC, and voriconazole [5, 6, 34]. Given this scenario, researchers have attempted to find new antifungal drugs and to formulate strategies to increase the microbial sensitivity to antifungal agents for therapeutic use. This study demonstrates that pre-exposure to sub-MIC doses of antifolate drugs was able to increase the sensitivity of *Cryptococcus* to AMB. Discrete reduction (albeit statistically



Q1 Fig. 1 Ergosterol content of *C. neoformans* (a) and *C. gattii* (b). Cells were cultured in YNB medium without antimicrobials as control (I) or supplemented with SMX/TMP MIC/2 (II), SDZ/PYR MIC/2 (III), or

ITC MIC/2 (IV). The experiments were conducted in duplicate and the data are expressed as mean \pm SEM ($n=7$). The asterisks indicate statistically significant differences from controls ($p<0.05$)

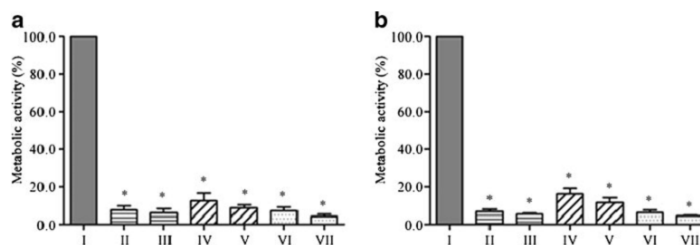


Fig. 2 Metabolic activity of *C. neoformans* (a) and *C. gattii* (b) biofilms when treated with different concentrations of antifolate drugs. Biofilms were grown in defined chemical medium without antimicrobials as controls (I) and, after 48 h, were tested against SMX/TMP at 2,000 mg/L–400 mg/L (II), SMX/TMP at 5,000 mg/L–1,000 mg/L (III), SDZ/PYR at 2,000 mg/L–100 mg/L (IV), SDZ/PYR at 5,000 mg/

L–250 mg/L (V), AMB at 64 mg/L (VI), or AMB at 150 mg/L (VII). The results are represented as the percentage of reduction in comparison with controls. The experiments were conducted in duplicate and the data are expressed as mean \pm SEM ($n=7$). The asterisks indicate statistically significant differences from controls ($p<0.05$)

333 relevant) of itraconazole and fluconazole MICs was also
334 detected after pre-exposure to sub-MIC doses of SMX/
335 TMP and SDZ/PYR (data not shown).

336 The data from this study show that the antifolate drugs
337 cause a reduction in the cellular content of ergosterol in *C.*
338 *neoformans* and *C. gattii* equivalent to that promoted by
339 ITC, a drug that damages the synthesis of ergosterol.
340 Navarro-Martinez et al. [30] suggested that, in *C. albicans*,
341 folate inhibitors can inhibit S-adenosylmethionine (SAM),
342 an enzyme cofactor which depends on sterol-C24-
343 methyltransferase and that acts on the ergosterol biosyn-
344 thetic pathway. It is possible that the reduction of ergosterol
345 content in *Cryptococcus* occurs by a similar mechanism.

346 In this study, two important aspects of the anti-biofilm
347 potential of folate inhibitor drugs were evaluated: the ability
348 to prevent biofilm formation and the action of the mature
349 biofilm. By employing an in vitro model with high reproduc-
350 ibility, as recommended by Martinez et al. [9], it was
351 possible to demonstrate that SMX/TMP and SDZ/PYR have

an anti-biofilm effect, acting on the two mechanisms inves-
352 tigated. Under the conditions tested, SMX/TMP and SDZ/
353 PYR showed inhibitory activity similar to that of AMB at
354 64 mg/L, whose action on *Cryptococcus* biofilms has been
355 previously described [14]. The results presented here are of
356 great importance, given the high resistance of *Cryptococcus*
357 biofilms to antifungal drugs for therapeutic use, such as FLC
358 and voriconazole [14].

360 Although the antifolate combinations had shown a con-
361 siderable anti-biofilm activity, we are aware that the con-
362 centrations tested in this study were above the therapeutic
363 doses of each drug. However, it is possible that these con-
364 centrations may be attainable in catheters by way of intra-
365 luminal lock therapy.

366 Our results allow us to conclude that the combinations
367 SMX/TMP and SDZ/PYR inhibit the growth of planktonic
368 cells of *C. neoformans* and *C. gattii*, reduce their content of
369 ergosterol, and increase their susceptibility to AMB. The
370 drugs tested were able to prevent biofilm formation and also

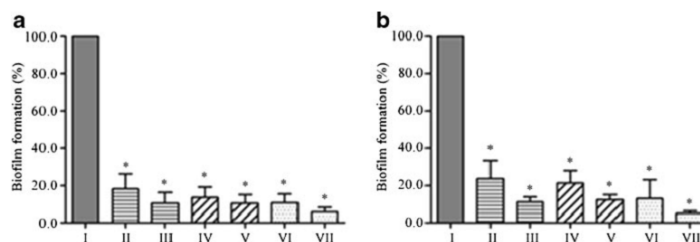


Fig. 3 Inhibition of biofilm formation in *C. neoformans* (a) and *C. gattii* (b). Biofilms were grown in defined chemical medium without antimicrobials as controls (I) or supplemented with SMX/TMP at 2,000 mg/L–400 mg/L (II), SMX/TMP at 5,000 mg/L–1,000 mg/L (III), SDZ/PYR at 2,000 mg/L–100 mg/L (IV), SDZ/PYR at 5,000 mg/

L–250 mg/L (V), AMB at 64 mg/L (VI), or AMB at 150 mg/L (VII). The results are represented as the percentage of reduction in comparison with controls. The experiments were conducted in duplicate and the data are expressed as mean \pm SEM ($n=7$). The asterisks indicate statistically significant differences from controls ($p<0.05$)

AUTHOR'S PROOF

JrnID 10096_ArtID 1774_Proof# 1 - 08/11/2012

Eur J Clin Microbiol Infect Dis

- 371 to significantly reduce the survival of cells in biofilm. Fur- 431
 372 ther studies in vivo are needed to confirm the usefulness of 432
 373 these results. 433
 375 434
- 376 **Funding declaration** This work was supported by grants from the 435
 377 National Council for Scientific and Technological Development 436
 378 (CNPq; Brazil; Processes 302574/2009-3 and 562296/2010-7). We 437
 379 would like to thank the Mycology Laboratory of the Evandro Chagas 438
 380 Clinical Research Institute in Rio de Janeiro (IPEC/FIOCRUZ) for 439
 381 providing the reference strains from its cryptococcal culture collection. 440
 382 441
- 383 **Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of 442
 384 interest. 443
 385 444
- 386 **References** 445
- 388 1. Lin X, Heitman J (2006) The biology of the *Cryptococcus neoformans* 446
 389 species complex. *Annu Rev Microbiol* 60:69–105 447
 - 390 2. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, 448
 391 Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, 449
 392 Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC (2010) 450
 393 Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal 451
 394 disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. 452
 395 *Clin Infect Dis* 50(3):291–322 453
 - 396 3. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas 454
 397 PG, Chiller TM (2009) Estimation of the current global burden of 455
 398 cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. 456
 399 *AIDS* 23(4):525–530 457
 - 400 4. Brouwer AE, Rajanuwong A, Chierakul W, Griffin GE, Larsen 458
 401 RA, White NJ, Harrison TS (2004) Combination antifungal thera- 459
 402 pies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised 460
 403 trial. *Lancet* 363(9423):1764–1767 461
 - 404 5. Yama A, Kwon-Chung KJ (2010) Heteroresistance of *Cryptococcus* 462
 405 *gattii* to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 54 463
 406 (6):2303–2311 464
 - 407 6. Perkins A, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, 465
 408 Cuenca-Estrella M (2005) Rates of antifungal resistance among 466
 409 Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. 467
 410 *J Antimicrob Chemother* 56(6):1144–1147 468
 - 411 7. Bii CC, Makimura K, Abe S, Taguchi H, Mugasia OM, Revathi G, 469
 412 Wamae NC, Kamiya S (2007) Antifungal drug susceptibility of 470
 413 *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. 471
 414 *Mycoses* 50(1):25–30 472
 - 415 8. Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ (2009) 473
 416 Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is 474
 417 intrinsic and associated with virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 53(7):2804–2815 475
 - 418 9. Martinez LR, Mihu MR, Han G, Frases S, Cordero RJ, Casadevall 476
 419 A, Friedman AJ, Friedman JM, Nosanchuk JD (2010) The use of 477
 420 chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Biomaterials* 31(4):669–679 478
 - 421 10. Steverding D, Evans P, Msika L, Riley B, Wallington J, Schelenz S 479
 422 (2012) In vitro antifungal activity of DNA topoisomerase inhibi- 480
 423 tors. *Med Mycol* 50(3):333–336 481
 - 424 11. Verwer PE, Woodle MC, Boekhout T, Hagen F, Bakker- 482
 425 Woudenberg IA, van de Sande WW (2011) *Cryptococcus* and 483
 426 *Trichosporon* spp. are susceptible in vitro to branched histidine- 484
 427 and lysine-rich peptides (BHKPs). *J Antimicrob Chemother* 66 485
 428 (7):1649–1652 486
 - 429 12. Martinez LR, Casadevall A (2007) *Cryptococcus neoformans* bio- 487
 430 film formation depends on surface support and carbon source and 488
 431 reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Appl 489
 Environ Microbiol* 73(14):4592–4601 490
 - 432 13. Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J (2009) 491
 433 Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol* 35(4):340–355 492
 - 434 14. Martinez LR, Casadevall A (2006) *Cryptococcus neoformans* cells 493
 435 in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicro- 494
 436 bial molecules produced by the innate immune system. *Infect 495
 Immun* 74(11):6118–6123 496
 - 437 15. Martinez LR, Casadevall A (2006) Susceptibility of *Cryptococcus* 497
 438 *neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob 498
 Agents Chemother* 50(3):1021–1033 499
 - 439 16. Robertson EJ, Wolf JM, Casadevall A (2012) EDTA inhibits bio- 500
 440 film formation, extracellular vesicular secretion, and shedding of 501
 441 the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan by *Cryptococcus* 502
 442 *neoformans*. *Appl Environ Microbiol* 78(22):7977–7984 503
 - 443 17. Walsh TJ, Schlegel R, Moody MM, Costerton JW, Salzman M 504
 444 (1986) Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neo-* 505
 445 *formans*: an ultrastructural and quantitative microbiological study. 506
 446 *Neurosurgery* 18(3):373–375 507
 - 447 18. Ingram CW, Haywood HB 3rd, Morris VM, Allen RL, Perfect JR 508
 448 (1993) Cryptococcal ventricular-peritoneal shunt infection: clinical 509
 449 and epidemiological evaluation of two closely associated cases. 510
 450 *Infect Control Hosp Epidemiol* 14(12):719–722 511
 - 451 19. Banerjee U, Gupta K, Venugopal P (1997) A case of prosthetic 512
 452 valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neo-* 513
 453 *formans*. *J Med Vet Mycol* 35(2):139–141 514
 - 454 20. Johannsson B, Callaghan JJ (2009) Prosthetic hip infection due to 515
 455 *Cryptococcus neoformans*: case report. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64(1):76–79 516
 - 456 21. Cordeiro RA, Costa AK, Brilhante RS, de Lima RA, Castelo- 517
 457 Branco Dde S, Ribeiro JF, Monteiro AJ, Rocha FA, Sidrim JJ, 518
 458 Rocha MF (2011) PCR-REA as an important tool for the identifi- 519
 459 cation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from 520
 460 human and veterinary sources. *Vet Microbiol* 154(1–2):180–184 521
 - 461 22. Enache-Angoulvant A, Chandenier J, Symoens F, Lacube P, 522
 462 Bolognini J, Douchet C, Poirot JL, Hennequin C (2007) Molecular 523
 463 identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. *J Clin 524
 Microbiol* 45(4):1261–1265 525
 - 464 23. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E; 526
 465 IberoAmerican Cryptococcal Study Group (2003) Molecular typ- 527
 466 ing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg 528
 Infect Dis* 9(2):189–195 529
 - 467 24. Hanafy A, Uno J, Mitani H, Kang Y, Mikami Y (2007) In vitro 530
 468 antifungal activities of sulfa drugs against clinical isolates of 531
 469 *Aspergillus* and *Cryptococcus* species. *Jpn J Med Mycol* 48 532
 470 (1):47–50 533
 - 471 25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008) Refer- 534
 472 ence method for broth dilution antifungal susceptibility testing of 535
 473 yeasts; approved standard—third edition. CLSI document M27- 536
 474 A3. CLSI, Wayne, PA 537
 - 475 26. Cordeiro Rde A, Astete-Medrano DJ, Marques FJ, Andrade HT, 538
 476 Perdigão Neto LV, Tavares JL, de Lima RA, Patoilo KK, 539
 477 Monteiro AJ, Brilhante RS, Rocha MF, de Camargo ZP, Sidrim 540
 478 JJ (2011) Cotrimoxazole enhances the in vitro susceptibility of 541
 479 *Coccidioides posadasii* to antifungals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 542
 480 106(8):1045–1048 543
 - 481 27. Costa AK, Sidrim JJ, Cordeiro RA, Brilhante RS, Monteiro AJ, 544
 482 Rocha MF (2010) Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential 545
 483 source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of 546
 484 *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia* 169 547
 485 (3):207–213 548
 - 486 28. Moran GP, Pinjon E, Coleman DC, Sullivan DJ (2007) Analysis of 549
 487 drug resistance in pathogenic fungi. In: Kavanagh K (ed) *Medical 550
 488 496*

- 497 mycology: cellular and molecular techniques. Wiley, Hoboken, pp 513
 498 93–113 514
- 499 29. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T (2008) Comparison of multiple 515
 500 methods for quantification of microbial biofilms grown in micro- 516
 501 titer plates. *J Microbiol Methods* 72(2):157–165 517
- 502 30. Navarro-Martínez MD, Cabezas-Herrera J, Rodríguez-López JN 518
 503 (2006) Antifolates as antimycotics? Connection between the folic 519
 504 acid cycle and the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida* 520
 505 *albicans*. *Int J Antimicrob Agents* 28(6):560–567 521
- 506 31. Hahn RC, Morato Conceição YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan 522
 507 JS (2003) Disseminated paracoccidiodomycosis: correlation be- 523
 508 tween clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimeth- 524
 509 oprim sulphamethoxazole. *Mycoses* 46(8):342–347 525
- 510 32. Brilhante RS, Fechine MA, Cordeiro Rde A, Rocha MF, Ribeiro 526
 511 JF, Monteiro AJ, de Lima RA, Mesquita JR, de Camargo ZP, 527
 512 Sidrim JJ (2010) In vitro effect of sulfamethoxazole–trimethoprim 528
 against *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Antimicrob*
Agents Chemother 54(9):3978–3979
33. Lim PL, Zhou J, Ditangco RA, Law MG, Sirisanthana T, 515
 Kumarasamy N, Chen YM, Phanuphak P, Lee CK, Saphonn V, 516
 Oka S, Zhang F, Choi JY, Pujari S, Kamarulzaman A, Li PC, Merati 517
 TP, Yunihastuti E, Messerschmidt L, Sungkanuparph S; TREAT Asia 518
 HIV Observational Database (2012) Failure to prescribe pneumo- 519
 cystitis prophylaxis is associated with increased mortality, even in the 520
 cART era: results from the Treat Asia HIV observational database. *J* 521
Int AIDS Soc 15:1 522
34. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema 523
 DJ (2005) In vitro susceptibilities of clinical isolates of *Candida* 524
 species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itra- 525
 conazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and 526
 laboratory standards institute broth microdilution methods. *J Clin* 527
Microbiol 43(8):3807–3810 528