



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**WILKER JOSE PEREZ GOTAY**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PROMETAZINA E CLORPROMAZINA CONTRA  
CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE ESPÉCIES DO COMPLEXO  
*Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii***

**FORTALEZA**

**2020**

**WILKER JOSE PEREZ GOTAY**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PROMETAZINA E CLORPROMAZINA CONTRA  
CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE ESPÉCIES DO COMPLEXO**

*Cryptococcus neoformans / Cryptococcus gattii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

Área de concentração: Ciências biológicas III

Linha de pesquisa: Resistência à antimicrobianos.

**FORTALEZA**

**2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

Gotay, Wilker Jose Perez.

Atividade antifúngica da prometazina e clorpromazina contra células planctônicas e biofilmes de espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* / Wilker Jose Perez Gotay. – 2020. 85 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Coorientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

1. *Cryptococcus* spp. 2. Planctônico. 3. Biofilme. 4. Prometazina. 5. Clorpromazina. I. Título.

CDD 616.9

---

**WILKER JOSE PEREZ GOTAY**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA PROMETAZINA E CLORPROMAZINA CONTRA  
CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE ESPÉCIES DO COMPLEXO**

*Cryptococcus neoformans / Cryptococcus gattii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

Área de concentração: Ciências biológicas III.

Linha de pesquisa: Resistência à antimicrobianos.

Aprovada em: 28/01/2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Morgana de Melo Guedes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois creio que Ele é o arquiteto e mentor por trás das obras-primas que são a vida e todo o universo e que, por esse simples e maravilhoso motivo, merece minha gratidão. A minha mãe, Marcely Gotay, e meu Padrasto, Luís Nunes, que nunca mediram esforços pela minha educação. A Universidade Federal do Ceará e a Organização dos Estados Americanos (OEA) pela oportunidade de continuar com minha formação profissional

Agradeço a minha orientadora, Prof.<sup>a</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, que me auxiliou na elaboração dessa pesquisa, além de ter sido fundamental para minha formação acadêmica pela dedicação e imenso carinho dispensado a mim em todos esses anos.

Prof. Marcos Fábio Gadelha Rocha pelos ensinamentos para a realização desse trabalho. Obrigado por me auxiliar quando precisei e por acreditar no meu potencial. Mesmo quando eu mesmo duvidava de mim, o senhor era um farol que irradiava conhecimento e conseguia dissipar a névoa que encobria meu pensar, me mostrando que eu era capaz. Aos demais professores que compõem o CEMM/UFC, meu muito obrigado.

A meus amigos de trabalhos Vandbergue Santos Pereira, Jonathas Sales de Oliveira e Alexander Telmo pelo fundamental apoio em todas as atividades do mestrado desde os experimentos à apresentação da dissertação. Pela convivência diária no laboratório, pela grandiosa ajuda e incentivo na realização desse sonho. Minha gratidão a tudo que fizeram por mim, esse trabalho é nosso.

Aos amigos que pude conhecer durante a pós-graduação, em especial Lívia Maria Galdino Pereira pela disponibilidade de estar sempre contribuindo e auxiliando sempre que precisávamos, bem como Gerlane Luizana de Maria, Gessica dos Santos Araújo, Xhulla M<sup>a</sup> Quariguasi Fonseca, Fernando Monteiro, Raquel de Andrade, Anderson Costa, Gleiciane Rocha, Ane Teles e Jaime Acosta Espana .

Aos funcionários dessa Instituição, Terezinha Rodrigues (Tetê), Carolina de Oliveira, secretária do PPGMM, e Glauca Guedes, obrigado por ser o suporte técnico e psicológico dos alunos, por ser nossa bússola nesse mar bravio que decidimos enfrentar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento dessa pesquisa.

A todos vocês, muito obrigado.

O êxito é composto de cinco por  
cento de inspiração e noventa e  
cinco por cento de suor.  
Ralph Waldo Emerson.

## RESUMO

*Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* são patógenos fúngicos oportunistas que acometem o sistema nervoso central principalmente de indivíduos imunocomprometidos. A resistência em *Cryptococcus* spp. tem sido relatado em alguns estudos, apontando a necessidade de buscar novos produtos com potencial antimicrobiano. Dessa forma o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito inibitório das fenotiazinas (prometazina e clorpromazina) sobre as células planctônicas e biofilmes de *C. neoformans/ C. gattii* (n=20). A sensibilidade planctônica *in vitro*, foi realizada de acordo com o documento M27-A3 do CLSI. As leituras para prometazina e clorpromazina foram avaliadas para 100% de inibição. Os biofilmes foram analisados durante a etapa de adesão, formação e a etapa de maturação. Foram avaliadas, ainda a atividade metabólica e a biomassa, bem como a morfologia e a ultraestrutura do biofilme, por microscopia eletrônica de varredura. A prometazina e clorpromazina mostraram atividade antifúngica contra células planctônicas com CIMs de 8-32 µg/ml e 4-16 µg/ml, respectivamente. A adesão celular foi reduzida em até 70% para a prometazina e 75% para a clorpromazina nas concentrações de 64µg/mL. Nas etapas de formação do biofilme, as fenotiazinas reduziram em 60% a biomassa e em 90% a atividade metabólica dos biofilmes na concentração 64 µg/mL, enquanto que em biofilmes formados essa redução passou para 80% e 90% da biomassa e atividade metabólica, na concentração 1024µg/mL. Ademais os biofilmes pré-expostos com as fenotiazinas, a capacidade de formar biofilme foi prejudicada. As fenotiazinas reduziram em 80% a atividade metabólica do biofilme melanizado de *Cryptococcus* spp., com concentrações de 512 e 1024µg/mL. Observou-se também que prometazina e clorpromazina foram capazes de desestruturar e fragmentar os biofilmes. Em conclusão, a prometazina e clorpromazina apresentam propriedades antifúngicas frente às células planctônicas e nas diferentes etapas de desenvolvimento do biofilme de *Cryptococcus* spp. Estes dados mostram o potencial das fenotiazinas prometazina e clorpromazina como fármacos antibiofilme.

**Palavras Chave:** *Cryptococcus* spp. Planctônico, Biofilme; Prometazina; Clorpromazina.

## ABSTRACT

*Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* are opportunistic fungal pathogens that affect the central nervous system, mainly of immunocompromised individuals. Resistance in *Cryptococcus spp.* has been reported in some studies, pointing out the need to search for new products with antimicrobial potential. Thus, the work aimed to evaluate the inhibitory effect of phenothiazines (promethazine and chlorpromazine) on planktonic cells and biofilms of *C. neoformans* / *C. gattii* (n = 20). Planktonic sensitivity in vitro was performed according to CLSI document M27-A3. The readings for promethazine and chlorpromazine were evaluated for 100% inhibition. Biofilms were analyzed during the formation stage and the maturation stage. Metabolic activity and biomass, as well as biofilm morphology and ultrastructure, were also evaluated by scanning electron microscopy. Promethazine and chlorpromazine showed antifungal activity against planktonic cells with MICs of 8-32 µg/mL and 4-16 µg/mL, respectively. Cell adhesion was reduced by up to 70% for promethazine and 75% for chlorpromazine at concentrations of 64 µg/mL. In the stages of biofilm formation, phenothiazines reduced biomass by 60% and biofilm metabolic activity by 64 µg/mL, while in biofilms formed this reduction increased to 80% and 90% of biomass and metabolic activity, at a concentration of 1024 µg/mL. In addition to biofilms pre-exposed to phenothiazines, the ability to form biofilm has been impaired. Phenothiazines reduced the metabolic activity of *Cryptococcus spp.* Melanized biofilm by 80%, with concentrations of 512 and 1024 µg/mL. It was also observed that promethazine and chlorpromazine were able to break down and fragment biofilms. In conclusion, promethazine and chlorpromazine have antifungal properties against planktonic cells and in the different stages of development of the *Cryptococcus spp.* These data show the potential of phenothiazines promethazine and chlorpromazine as antibiofilm drugs.

**Keywords:** *Cryptococcus spp.* Planktonic, biofilm; Promethazine; Chlorpromazine.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Composição atual do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> dividido em espécies, variedades, sorotipos e genótipos .....	22
<b>Figura 2 -</b> Aspectos morfofisiológicos.....	24
<b>Figura 3 -</b> Representação esquemática do ciclo de vida do Complexo <i>Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	27
<b>Figura 4 -</b> Ciclo biológico de <i>Cryptococcus</i> spp. penetração e disseminação no organismo.....	29
<b>Figura 5 -</b> Epidemiologia global da neurocriptococose no mundo.....	31
<b>Figura 6 -</b> Distribuição temporal dos casos analisados e casos diagnosticados de criptococose Hospital São José, Fortaleza –Ceará, 2005 a 2016.....	32
<b>Figura 7 -</b> Estrutura dos polissacarídeos componentes da cápsula de <i>Cryptococcus</i> spp.....	35
<b>Figura 8 -</b> Imagem de microscopia eletrônica de varredura de um biofilme produzido por <i>Cryptococcus gattii</i> .....	40
<b>Figura 9 -</b> Etapas de formação do biofilme de <i>Cryptococcus</i> spp.....	41
<b>Figura 10 -</b> Estrutura do biofilme de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	42
<b>Figura 11 -</b> Estruturas químicas das fenotiazinas.....	47
<b>Figura 12 -</b> Organograma das principais etapas experimentais do estudo.....	52
<b>Figura 13 -</b> Capacidade de formação de biofilme do complexo <i>C. neoformans/gattii</i> .....	60
<b>Figura 14-</b> Efeito das fenotiazinas sobre células não aderidas.....	61
<b>Figura 15 -</b> Efeito da prometazina e clorpromazina sobre a formação de biofilme de <i>Cryptococcus</i> spp.....	62
<b>Figura 16 -</b> Efeito da prometazina e clorpromazina sobre os biofilmes formados de <i>Cryptococcus</i> spp.....	63
<b>Figura 17 -</b> Efeito da anfotericina B e fluconazol no biofilme formado por <i>Cryptococcus</i> spp.....	64
<b>Figura 18 -</b> Biomassa e atividade metabólica dos biofilmes de <i>Cryptococcus</i> spp.....	65
<b>Figura 19 -</b> Efeito das fenotiazinas no biofilme maduro melanizados de <i>Cryptococcus</i> spp.....	66
<b>Figura 20-</b> Análise das imagens de biofilme de <i>Cryptococcus</i> spp. (MEV).....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Classificação Taxonômica do gênero <i>Cryptococcus</i> .....	20
<b>Tabela 2-</b> Principais fatores de virulência de <i>Cryptococcus</i> spp. relacionados ao hospedeiro e ao meio ambiente. ....	33
<b>Tabela 3-</b> Identificação, espécie, genótipo, fenótipo e origem de isolamento das cepas de <i>Cryptococcus</i> spp. utilizadas neste estudo.....	51
<b>Tabela 4-</b> Concentrações das drogas utilizadas no teste de sensibilidade planctônica e no biofilme frente à <i>Cryptococcus</i> spp.....	53
<b>Tabela 5-</b> Concentração inibitória mínima da anfotericina B, fluconazol, prometazina e clorpromazina frente a espécies de <i>Cryptococcus</i> spp.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB – Anfotericina B  
ATCC – American Type Culture Collection  
CCP–Criptococose primária  
CCS–Criptococose secundária  
CDNA – Complementary deoxyribonucleic acid  
CDR – *Cryptococcus* drug resistance  
CEMM – Centro Especializado em Micologia Médica  
CIM – Concentração inibitória mínima  
CIM<sub>50</sub> – Concentração antifúngica que inibe 50%  
CIMS – Concentração inibitória mínima de células sésseis  
CLOR–Clorpromazina  
CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute  
DO – Densidade óptica  
FLC – Fluconazol  
GXM – Glucuroxilomanano  
HIV – Human immunodeficiency virus  
ITC – Itraconazol  
KOH – Hidróxido de potássio  
MDR – Multiple drug resistance  
MEV – Microscopia eletrônica de varredura  
MOPS – Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico  
NADPH – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
PBS – Phosphate-buffered saline  
PCR – Polymerase chain reaction  
PRM – Prometazina  
PSF – Pouco sensível ao fluconazol  
RPMI – Roswell Park Memorial Institute

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	PANORAMA HISTÓRICO.....	18
2.2	<i>O complexo Cryptococcus neoformans/C. gattii</i> .....	19
2.2.1	<i>Taxonomia e distribuição dos sorotipos</i> .....	20
2.3	<b>Aspectos morfofisiológicos</b> .....	23
2.3.1	<b>Diagnostico</b> .....	25
2.4	Ciclo de reprodução das espécies do complexo Cryptococcus neoformans.....	26
2.5	Criptococose: patogenia, principais formas clínicas e epidemiologia...	28
2.5.1	<b>Epidemiologia da criptococose no Ceará</b> .....	32
2.6	<b>Fatores de virulência</b> .....	33
2.6.1	<i>Cápsula</i> .....	34
2.6.2	<i>Melanina e lacase</i> .....	36
2.6.3	<i>Termotolerância a 37 °C</i> .....	37
2.6.4	<i>Produção de enzimas</i> .....	38
2.6.5	<i>Biofilme</i> .....	38
2.7	<i>Resposta imunológica do hospedeiro frente a Cryptococcus spp.</i> .....	43
2.8	Tratamento e resistência aos antifúngicos.....	43
2.9	<b>Drogas fenotiazinas com atividade antifúngica</b> .....	45
3	<b>HIPÓTESES</b> .....	48
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	49
4.1	Objetivo geral .....	49
4.2	Objetivos específicos.....	49
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
5.1	Local de estudo .....	50
5.2	Microrganismos utilizados.....	50

5.3	Desenho do estudo.....	51
5.4	<b>Efeito das fenotiazinas frente à forma planctônica e ao biofilme de <i>Cryptococcus</i> spp.</b> .....	53
5.4.1	<i>Células planctônicas</i> .....	53
5.4.2	<i>Células associadas em biofilme</i> .....	54
5.4.2.1	<i>Efeito das fenotiazinas sobre células não aderidas</i> .....	54
5.4.2.2	<i>Efeito das fenotiazinas prometazina e clorpromazina frente à formação do biofilme de <i>Cryptococcus</i> spp.</i> .....	54
5.4.2.3	<i>Efeito das fenotiazinas clorpromazina e prometazina frente ao biofilme formado de <i>Cryptococcus</i> spp.</i> .....	56
5.4.2.4	Formação de biofilme de <i>Cryptococcus</i> spp. pré-expostos com as fenotiazinas .....	56
5.4.2.5	<i>Efeito das fenotiazinas clorpromazina e prometazina frente ao biofilme melanizado de <i>Cryptococcus</i> spp.</i> .....	56
5.4.2.6	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i> .....	57
5.5	Análise estatística.....	58
6	<b>RESULTADOS</b> .....	59
6.1	<b>Atividade antifúngica da prometazina e clorpromazina contra células planctônicas e biofilmes de espécies do complexo <i>Cryptococcus neoformans</i> / <i>Cryptococcus gattii</i></b> .....	59
6.1.1	<i>Sensibilidade das células planctônicas</i> .....	59
6.1.2	<i>Células associadas em biofilme</i> .....	60
6.1.2.1	<i>Formação de biofilme</i> .....	60
6.1.2.2	<i>Efeito das fenotiazinas sobre células não aderidas</i> .....	60
6.1.2.3	<i>Efeito da prometazina e clorpromazina sobre a formação de biofilme de <i>Cryptococcus</i> spp.</i> .....	61
6.1.2.4	<i>Efeito da prometazina e clorpromazina sobre os biofilmes formados de <i>Cryptococcus</i> spp.</i> .....	62
6.1.2.5	<i>Efeito dos antifúngicos clássicos sobre os biofilmes formados de <i>Cryptococcus</i> spp.</i> .....	63
6.1.2.6	<i>Biofilmes formados do <i>Cryptococcus</i> spp. pré expostos às fenotiazinas prometazina e clorpromazina</i> .....	64
6.1.2.7	<i>Efeito das fenotiazinas sobre os biofilmes melanizados de <i>Cryptococcus</i> spp.</i> .....	64

<b>6.1.2.8</b>	<i>Efeito das fenotiazinas na estrutura do biofilme.....</i>	66
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	68
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	72
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	73

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptococcus* engloba 38 espécies, entre elas, as espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que são leveduras patogênicas que podem causar criptococose tanto em pacientes imunocompetentes como em imunocomprometidos (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006).

Estas leveduras apresentam diferenças importantes na sua ecologia epidemiológica. *C. neoformans* está encontrado em todo o mundo e tem preferência por regiões temperadas e solos contaminado com fezes de aves. *C. gattii* se associa a regiões tropicais e subtropicais e é isolado de diferentes espécies de árvores de eucalipto (KWON-CHUNG et al., 2002; LAGROU et al., 2005). Os fatores de virulência apresentados por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são importantes na patogenicidade deste microrganismo, tais fatores de virulência incluem a cápsula de polissacarídeo assim como tolerância térmica a 37°C (CASADEVALL; PERFECT, 1998; PESSOA; SILVA; GOMES, 2012). A capsula é constituída pelos polissacarídeos glucuronoxilomanano (GXM) 90% e galactoxilomanano GalGXM 8% (DOERING, 2009; MA; MAY, 2009). Que facilitam a adesão a superfícies bióticas e abióticas e assim formar biofilme (MARTINEZ; CASADEVALL, 2015). Acredita-se que aproximadamente 65% das infecções nosocomiais e 80% de todas as infecções microbianas são causadas por biofilmes (RÖMLING; BALSALOBRE, 2012). Estudos relatam que a formação de biofilme de dispositivos médicos por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* confere resiliência, conferindo tolerância ao sistema imunológico do hospedeiro e a ação de agentes antifúngicos (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2004; MARTINEZ; CASADEVALL, 2015b; RAMAGE et al., 2012).

A criptococose, causada por o complexo *Cryptococcus neoformans/gattii* ocorre principalmente em indivíduos com imunossupressão, acometendo pulmões e sistema nervoso central (SNC) simultaneamente (PERFECT et al., 2010). Ainda, podem ser observadas lesões cutâneas, formação de criptococomas e sequelas neurológicas (BALLESTERO et al., 2004; LACOMIS et al., 2001).

O tratamento das formas clínicas invasivas da criptococose geralmente ocorre com uso de anfotericina B e fluconazol ou combinações de anfotericina B com 5-fluorocitosina, esta última para o tratamento da neurocriptococose (BOYER-CHAMMARD et al., 2019; GRANADOS; CASTAÑEDA, 2005; PERFECT et al., 2010). Diante dos graves problemas

causados pela criptococose, a virulência fúngica e a resistência aos antifúngicos têm sido alvo de pesquisas para a produção de novas medidas eficazes de tratamento (ORSI et al., 2009).

As fenotiazinas prometazina e clorpromazina são aminas aromáticas, estes compostos são capazes de inibir efetivamente a dopamina, histamina, serotonina, acetilcolina e receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. Além de sua atividade antipsicótica, as fenotiazinas também têm um efeito antimicrobiano significativo e podem inibir as bombas de efluxo. (OHLOW; MOOSMANN, 2011; VARGA et al., 2017). A escassez de estudos com o Complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii* acerca desse assunto, fundamenta a necessidade de mais pesquisas para uma melhor compreensão do papel dos mecanismos de inibição microbiana das fenotiazinas. Dessa forma, o presente estudo objetivou investigar o efeito das fenotiazinas prometazina e clorpromazina sobre a sensibilidade planctônica e biofilme *in vitro*, de cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* na forma planctônicas e biofilme.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Panorama histórico

A primeira descrição da criptococose foi feita por Otto Busse e Abraham Buschke, quando em 1894, na cidade de Greifswald na Alemanha, acompanhavam uma paciente de 31 anos com lesão na tíbia, denominando a doença de *saccharomycosis hominis* e o agente etiológico de *Saccharomyces hominis*. Quase que simultaneamente, na Itália, Francesco Sanfelice isolou uma levedura a partir de um suco de pêssigo e a denominou de *S. neoformans*, demonstrando, no ano seguinte, a patogenicidade da levedura isolada através de inoculação experimental em coelhos (PERFECT; CASADEVALL, 2011).

Um ano após o isolamento da levedura, Ferdinand Curtis, na França, isolou de uma lesão de quadril uma levedura denominando-a de *S. subcutaneous tumefaciens*. Ainda no mesmo ano, Curtis isolou uma levedura de um paciente com meningite, a qual chamou de *Megelococcus myxoides*, o que viria a ser o primeiro relato de meningite causada por *Cryptococcus* spp. No entanto, àquela época, os termos *Cryptococcus* e criptococose ainda não estavam consolidados, o que causava divergência na denominação do fungo e da doença provocada (DÍAZ PAÚL; CARDONA CASTRO, 2008; RODRIGUES; ALVIANO; TRAVASSOS, 1999).

No início do século em 1901, Jean Paul Vuillemin estudou as leveduras isoladas por Busse e Sanfelice. Ele não foi capaz de observar os ascósporos típicos que são formados por o gênero *Saccharomyces*. Portanto, ele classificou estas leveduras no gênero *Cryptococcus*, denominando-as respectivamente como *Cryptococcus hominis* e *Cryptococcus neoformans* (BARNETT, 2010).

A partir de 1901, o pesquisador Jean-Paul Vuillemin relatou casos de criptococose em animais, isolando leveduras esféricas e encapsuladas de lesões pulmonares de suínos bem como de leite bovino e, reconhecendo que se tratava do mesmo gênero das leveduras isoladas pelos demais pesquisadores, o gênero fúngico foi renomeado como *Cryptococcus*. O gênero foi então dividido em duas espécies (*C. hominis* e *C. neoformans*), baseado na incapacidade da levedura fermentar carboidratos e não produzir ascósporos, o que diferenciava do gênero *Saccharomyces* (BARNETT, 2010).

No ano de 1955, Emmons foi o primeiro a isolar *Cryptococcus* spp. das fezes de pombos e determinou que elas são o principal reservatório desse fungo (ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008). A heterogeneidade antigênica de *Cryptococcus* foi confirmada no ano de 1956 por Evans, que identificou três sorotipos: A, B e C (KWON-CHUNG et al., 2014).

Em 1970, Gattii e Eeckels descreveram um caso de meningoencefalite em uma criança de sete anos no Zaire, atual República Democrática do Congo, na África. Na ocasião, os pesquisadores relataram que o isolado se assemelhava com *C. neoformans*, no entanto tinha morfologia atípica, apresentando-se como leveduras alongadas, sendo considerada uma nova variedade denominada de *C. neoformans* variedade *gattii* (RIMEK et al., 2004).

A partir de 1980, ocorreu um aumento considerável dos casos de criptococose em todo o mundo. Esse fato se deu em decorrência do surgimento e pandemia da aids, uma das principais condições predisponentes para o estabelecimento da infecção. Com isso, *Cryptococcus* spp. emergiu como um importante agente infeccioso acometendo 10% dos indivíduos com aids. Os próximos anos foram marcados pela rápida expansão nas pesquisas acerca do assunto (ABERG; MUNDY; POWDERLY, 1999).

Em 2005, Kwon-Chung KJ classificou as duas espécies patogênicas. *C. neoformans* e *C. gattii* como espécies separadas (KWON-CHUNG et al., 2014).

## **2.2 O complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii***

De acordo com a classificação taxonômica do Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos Estados Unidos, o gênero *Cryptococcus* faz parte do Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Tremellomycetes, Ordem Tremallales, Família Cryptococcaceae. As leveduras pertencentes ao complexo *Cryptococcus neoformans/gattii* vivem como saprófitos no meio ambiente e dispõem de numerosos fatores de virulência, como a presença da cápsula de polissacarídeo, a habilidade de produzir melanina, a capacidade de crescimento a 37° C, além de outros fatores, como a produção de exoenzimas, podendo contribuir para virulência do microrganismo (CASADEVALL, 2006).

*Cryptococcus neoformans/gattii* pode estar presente até dois anos em amostras fecais de pombo e outras aves, sendo o principal reservatório deste fungo. A sobrevivência do microrganismo ocorre devido a altas concentrações de sais e nitrogênio (ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008). O gênero *Cryptococcus* pertencente ao Filo Basidiomycota é

caracterizado por leveduras, ovais e encapsuladas. Pertencem a este gênero pertencem as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, definidas como patógenos humanos, que foram caracterizados por fenótipos fisiológicos e morfológicos (LIN, 2009).

A Família Cryptococcaceae e o gênero *Cryptococcus* passaram por uma atualização taxonômica no ano de 2015, com base na classificação filogenética. Dentro do gênero *Cryptococcus* foi descrito o complexo *C. neoformans/C. gattii*, mas, atualmente, diferenças consideráveis foram documentadas entre o complexo de *C. neoformans* e o complexo *C. gattii* (HAGEN et al., 2016).

*C. neoformans* é um dos principais patógenos causador de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos com aids, também causa infecções frequentes em pacientes com câncer. Contrário à isto, *C. gattii* afeta principalmente a indivíduos imunocompetentes (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2008; VOELZ; MAY, 2010).

### 2.2.1 Taxonomia e distribuição dos sorotipos

Segundo Taxonomy Browser, do Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos Estados Unidos, o gênero *Cryptococcus* forma parte do Reino Fungi, Filo Basidiomycota. A tabela 1 ilustra a classificação taxonômica do gênero *Cryptococcus*. Recentemente o gênero *Cryptococcus* passou por uma revisão em sua taxonomia, na qual os foram sugeridas novas espécies aos Complexos de espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (HAGEN et al., 2016).

**Tabela 1** – Classificação Taxonômica do gênero *Cryptococcus*

Domínio	Eukarya
Reino	Fungi
Filo	Basidiomycota;
Subfilo	Agaricomycotina
Ordem	Tremellales
Família	Cryptococcaceae
Gênero	<i>Cryptococcus</i>

**FONTE:** Adaptado por (Gotay) de Taxonomy Browser NCBI USA, (2019).

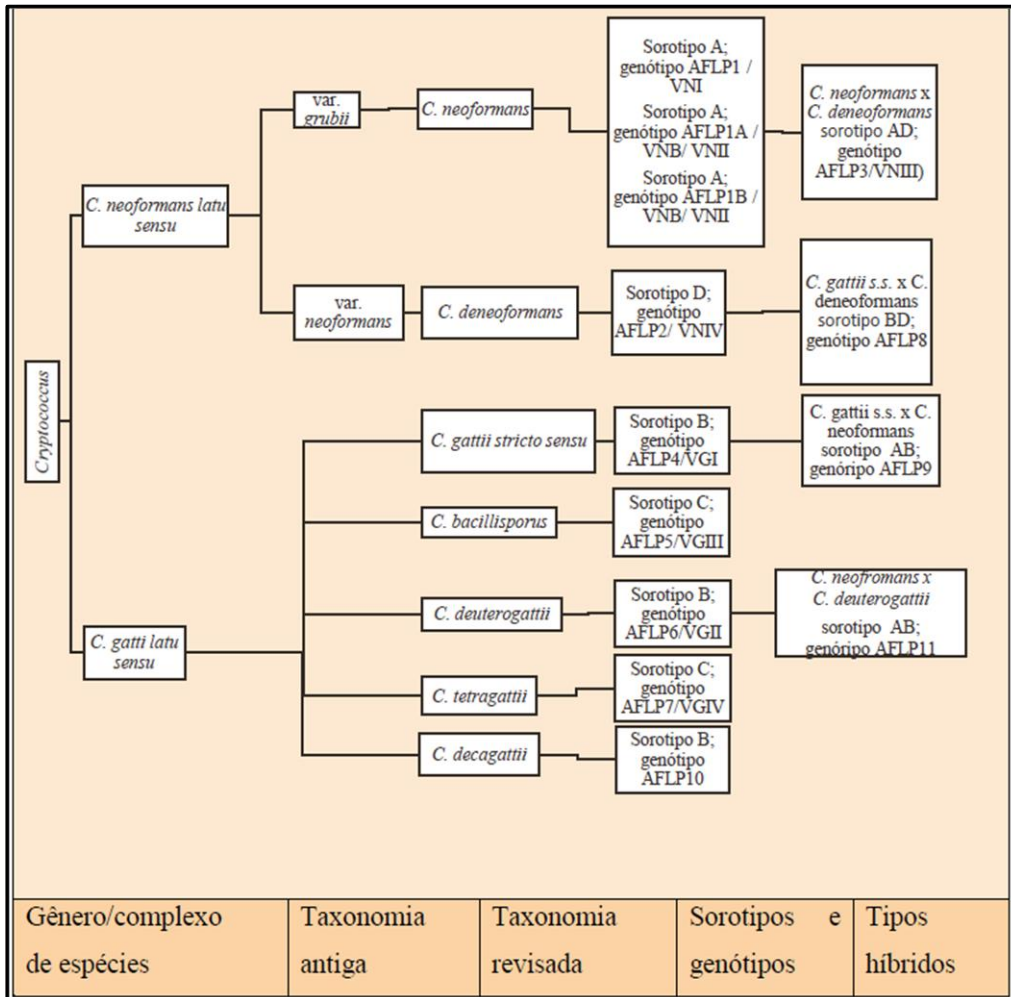
No entanto, nos últimos anos, a taxonomia de *C. neoformans* sofreu grandes mudanças devido ao rápido desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, que mostraram que esta espécie é, de fato, um "complexo de espécies crípticas" (BOEKHOUT et al., 2001). Características epidemiológica, ecológica, fenotípica, fisiológica e genética mostraram divergências significativas entre os sorotipos, agrupando-se em variedades (BARCHIESI et al., 2005; XU; MITCHELL, 2003).

Dentro do gênero *Cryptococcus*, foi descrito o complexo *C. neoformans/C. gattii*, mas, atualmente, diferenças consideráveis foram documentadas entre o complexo de *C. neoformans* e o complexo *C. gattii* (HAGEN et al., 2015). Com base na diversidade fenotípica e genotípica entre *C. gattii/C. neoformans*, o complexo foi dividido em sete genótipos haploides e quatro híbridos. Dessa forma, o *Cryptococcus gattii lato sensu* foi separado em cinco espécies; *C. gattii stricto sensu* (sorotipo B, genótipo AFLP4 / VGI), *C. bacillisporus* (sorotipo C, genótipo AFLP5 / VGIII), *C. deuterogattii* (sorotipo B, genótipo AFLP6 / VGII), *C. tetragattii* (sorotipo C, genótipo AFLP7 / VGIV) e *C. decagattii* (sorotipo B, genótipo AFLP10). *Cryptococcus neoformans lato sensu*, por sua vez, atualmente compreende as espécies *C. neoformans stricto sensu* (antiga var. *grubii*; AFLP1 / VNI, AFLP1A/VNB / VNII) e *C. deneoformans* (antiga var. *neoformans*; AFLP2 / VNIV) (KWON-CHUNG et al., 2017).

Baseando-se em polimorfismos em sequências de DNA detectados por técnicas de PCR *fingerprinting*, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e MLST (*Multilocus Sequence Typing*) o complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* é classificado em nove genótipos (HAGEN et al., 2016; KWON-CHUNG et al., 2017).

A taxonomia das espécies *C. gattii* e *C. neoformans* complexas foi revisada devido às diferenças entre as duas espécies em termos de genética, fisiologia, patogenicidade e ecologia. As variedades de *C. neoformans* foram convertidas para as espécies (HAGEN et al., 2016). A representação esquemática das características do complexo está presente na Figura 1

**Figura 1** - Reconhecimento de sete espécies no complexo *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans*.



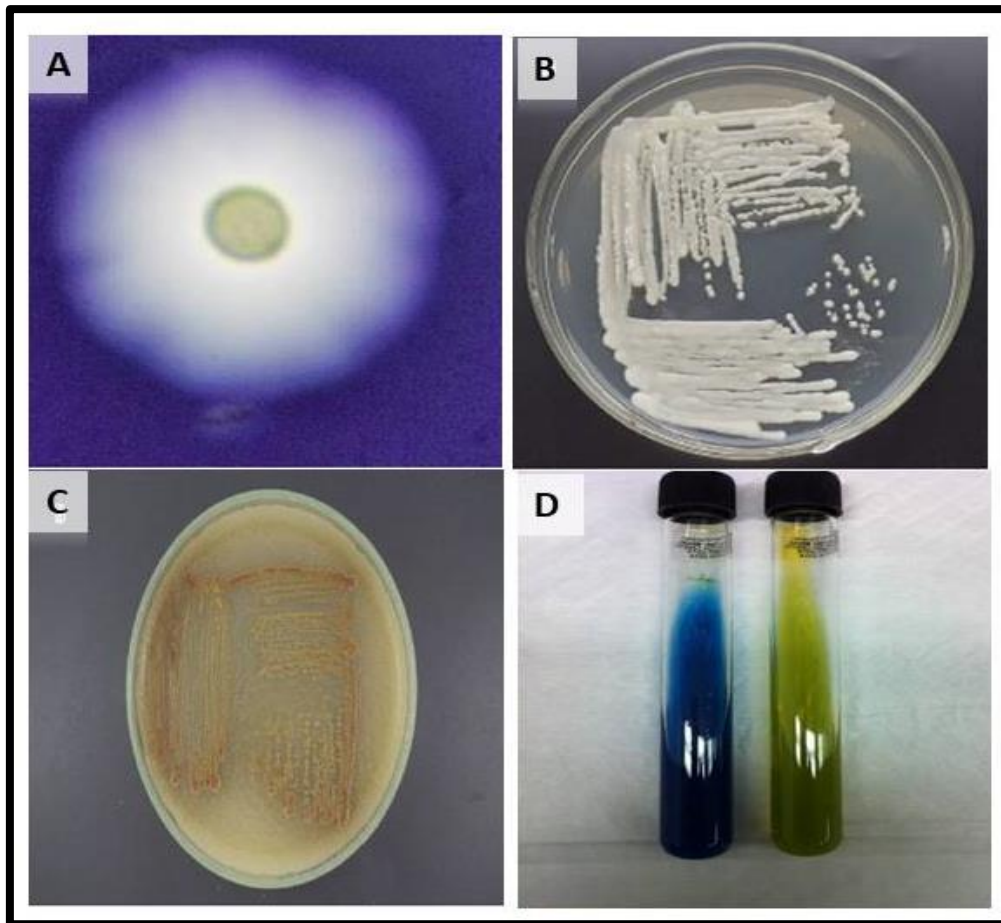
**Fonte:** Adaptado de Hagen et al, (2016). Composição atual do Complexo *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* dividido em espécies, variedades, sorotipos e genótipos.

### 2.3 Aspectos morfofisiológicos

O Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* compreende predominantemente leveduras esféricas ou ovaladas, encapsuladas (Fig. 2A), medindo cerca de 4 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro – podendo chegar até 80  $\mu\text{m}$  de diâmetro com a cápsula. Produzem urease, assimilam inositol e não fermentam carboidratos. As células são haplóides, se reproduzem por brotamento simples (CASADEVALL; PERFECT, 1998; MA; MAY, 2009). Quanto às características macroscópicas, micro-organismos do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* formam colônias claras, variando de branco a creme, de aspecto brilhante e textura mucóide (Fig. 2B) em meios rotineiramente usados em laboratório de micologia, como Ágar Batata e Ágar Sabouraud Dextrose. O ágar l-DOPA e ágar cafeico são muito importantes na identificação do gênero *Cryptococcus*, já que, em base aos compostos fenólicos presentes nestes meios, se criam as condições ideais para a produção de melanina a partir da enzima lacase. As cepas de *Cryptococcus* spp., semeadas em NSA, têm aspecto mucoide, de cor castanho, dado pela produção de melanina (Figura 2C). Essa mudança de tonalidade ocorre devido a produção de melanina, em decorrência da ação de uma enzima lacase que oxida compostos difenólicos presentes no meio.

O meio l-canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) existe, além dos meios para estimular a produção de melanina, com a finalidade de ajudar na diferenciação entre *Cryptococcus gatti* *latu sensu*, que usa a glicina como única fonte de carbono, e nitrogênio. Enquanto que l-canavanina atua como um fármaco inibindo o crescimento de *C. neoformans*. Destes, 60% das cepas de *C. neoformans* sorotipo A são resistentes a L-canavanina, mas não conseguem assimilar glicina presente no meio (KWON-CHUNG et al., 2017). Assim, o crescimento de 100% das cepas pertencentes ao *C. neoformans* é inibida e, finalmente, as cepas de *Cryptococcus gattii* apresentam cor azul no meio CGB (Figura 2D).

**Figura 2-** Aspectos morfofisiológicos do gênero *Cryptococcus*



**FONTE:** Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM/UFC (2019). (A) Célula de *Cryptococcus* spp. encapsulada observada por microscopia óptica com utilização de Tinta da China em aumento de 400 vezes. (B) Cultivo de 48 horas a 35°C em Ágar Batata evidenciando cultura de coloração branca/creme, de aspecto brilhante e textura mucóide de *Cryptococcus* spp. (C) Produção de melanina por *Cryptococcus* spp. em meio Ágar Semente de Níger apresentando coloração marrom após 48 horas de incubação a 35°C. (D) Diferenciação das espécies *C. neoformans* à esquerda e *C. gattii* à direita, em meio Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol-CGB após 48 horas de crescimento a 35°C.

### 2.3.1 Diagnóstico da criptococose

O diagnóstico da Criptococose é feito a partir de um estudo do quadro do paciente, no qual são realizados exames em amostras de material suspeito, como em exsudatos de lesões, sangue, liquor, aspirado de medula óssea, lavado broncoalveolar, aspirados teciduais, além de fragmentos obtidos através de biópsia. O aspecto macroscópico das colônias cultivadas em Ágar Batata e Sabouraud incubado em torno de 35°C apresenta uma coloração de esbranquiçada a creme, porém, podem atingir uma coloração marrom claro, até mesmo acastanhada (BAVA et al., 2010).

O padrão ouro para o diagnóstico da neurocriptococose é a cultura fúngica que geralmente é positiva em 89% dos pacientes não infectados pelo HIV e de 95 a 100% dos pacientes com AIDS. Os testes sorológicos são sensíveis, específicos, rápidos e seguros. O teste por aglutinação das partículas do látex através da detecção do antígeno capsular é o mais empregado. Aglutinação positiva em titulações de 1:4 são altamente sugestivas de infecção criptocócica. Títulos maiores ou iguais a 8 sugerem doença em atividade. Altos títulos de antígeno são geralmente encontrados em pacientes com aids (KON et al., 2008).

No caso de possível criptococose do SNC, especialmente em pacientes que apresentam deficits neurológicos focais ou história compatível com meningite lentamente progressiva, considere a obtenção de uma tomografia computadorizada ou ressonância magnética do cérebro antes de realizar uma punção lombar. Se uma lesão em massa é identificada, não realize uma punção lombar para obter fluido espinhal. Neste caso, é recomendável consultar um neurocirurgião para um procedimento alternativo por conta da pressão intracraniana muito elevada e o risco de hérnia cerebral. Na criptococose pulmonar, os achados radiográficos em pacientes assintomáticos e imunocompetentes podem incluir o seguinte: pneumonia com lesões focalizadas e granulomas variando de 2cm a 7cm, muito semelhantes à tuberculose (BAVA; ZULIANI, 2009). A detecção do antígeno capsular é realizada por meio de técnicas sorológicas de aglutinação e elas têm uma sensibilidade de 90% (CASTILLA; GILER, 2016).

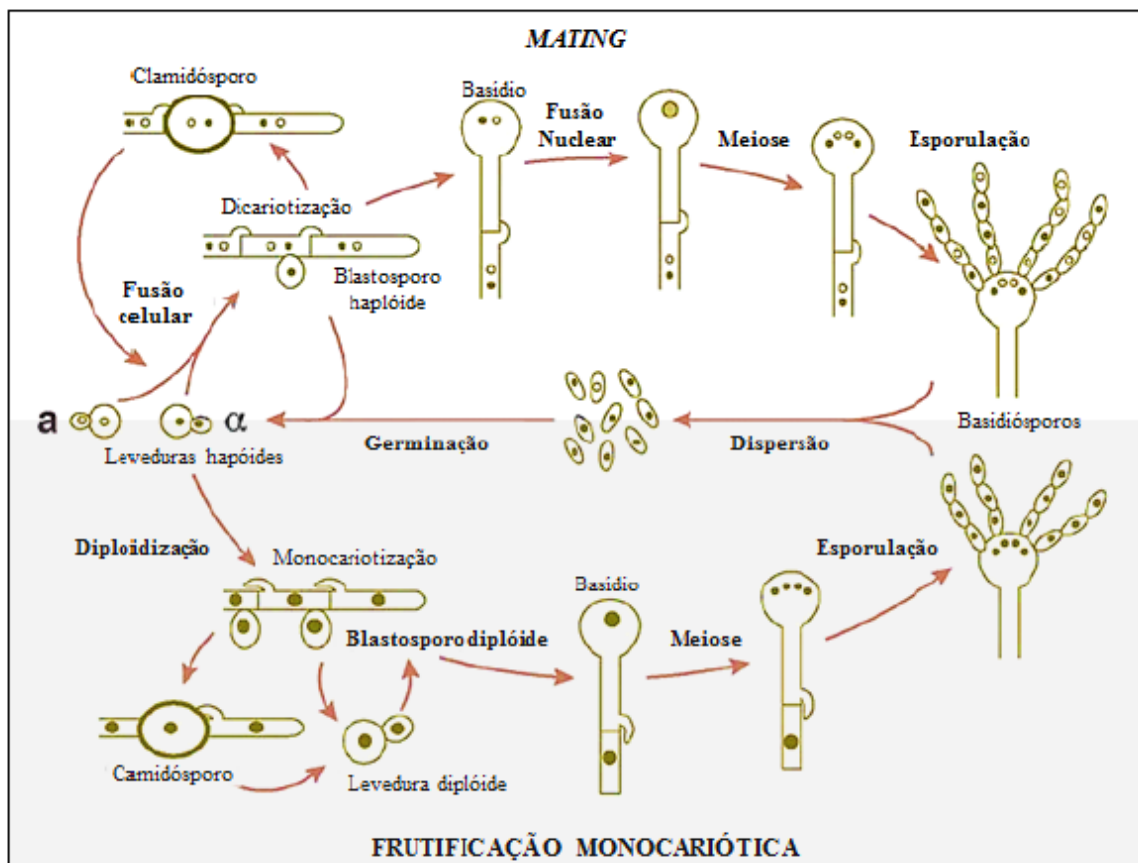


#### 2.4 Ciclo de reprodução das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*

O ciclo biológico do *Cryptococcus* é constituído pela reprodução assexuada ou anamórfica, realizada através de brotamento produzindo leveduras haploides, representando a maioria dos isolados ambientais (LIN; HULL; HEITMAN, 2005), e pela reprodução sexuada ou teleomórfica, formando basidiósporos a partir do qual a espécie *C. neoformans* é denominada *Filobasidiella neoformans* e *C. gattii* recebe a denominação *F. bacillispora* (LIN, 2009). O estágio sexual (perfeito ou teleomórfico) é caracterizado pela presença de basidiósporo e é observado somente durante o cruzamento (*Mating*). Existem dois *mating types* para *Cryptococcus neoformans*  $\alpha$  e  $a$ , determinado por um único *locus*, sendo *mating type*  $\alpha$  prevalente em isolados dos ambientes subtropicais (BOVERS et al., 2007).

O processo de reprodução *mating type*  $a$  e  $\alpha$  e a produção de esporos são observados em todos os sorotipos das espécies do complexo, apresentando um importante papel na epidemiologia e virulência do fungo, sendo que *Cryptococcus mating type*  $\alpha$  mostra-se mais virulento do que as cepas *mating type* do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* (KWON-CHUNG et al., 2014). Na ausência de *mating* e baixas condições com redução de fontes de nitrogênio, as células haploides de *Cryptococcus neoformans* podem sofrer uma modificação morfológica e produzir hifas com bases terminais. Este fenômeno é produzido com frutificação monocariótica haploide (LIN et al., 2006 B). A Figura 3 ilustra o esquema do Ciclo de reprodução sexual de *Cryptococcus* spp.

Estudos realizados com PCR demonstraram que os genes *CNA1*, *CLA4* e *GPA1* estão presentes no tipo moléculas de AD híbrido de *Cryptococcus neoformans* e são heterozigotas para o acasalamento *MAT a* ou *MAT  $\alpha$*  (LENGELER; COX; HEITMAN, 2001).



FONTE: adaptada de Lin et al., (2006 B).

**Figura 3** - Representação esquemática do ciclo de vida do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Na parte superior, a fusão de leveduras *MAT $\alpha$*  e *MAT $a$*  resulta no crescimento filamentosso, podendo formar clamidósporo ou novos blastosporos. Depois da dicarionização, dois núcleos parentais migram coordenadamente nas hifas para formação do basídio. Em seguida, ocorre a fusão nuclear entre os blastosporos haploides, posteriormente quatro produtos meióticos são produzidos em decorrência de meiose, esses esporulam em cadeia, por mitose e brotamento, a partir da base do basídio. Na parte inferior, durante a frutificação monocariótica, as células de um mesmo tipo *MAT*, por exemplo, células  $\alpha$  originam células  $\alpha/\alpha$  diploides, por duplicação ou fusão nuclear entre duas células  $\alpha$ . A célula diploide forma hifas monocarióticas, podendo também formar clamidósporo ou leveduras diploides. Em seguida, ocorre a formação do basídio, meiose e esporulação em cadeia. Em ambos os casos, após o crescimento filamentosso, os esporos são dispersos e germinam dando origem a fase leveduriforme.

## 2.5 Criptococose: patogenia, principais formas clínicas e epidemiologia

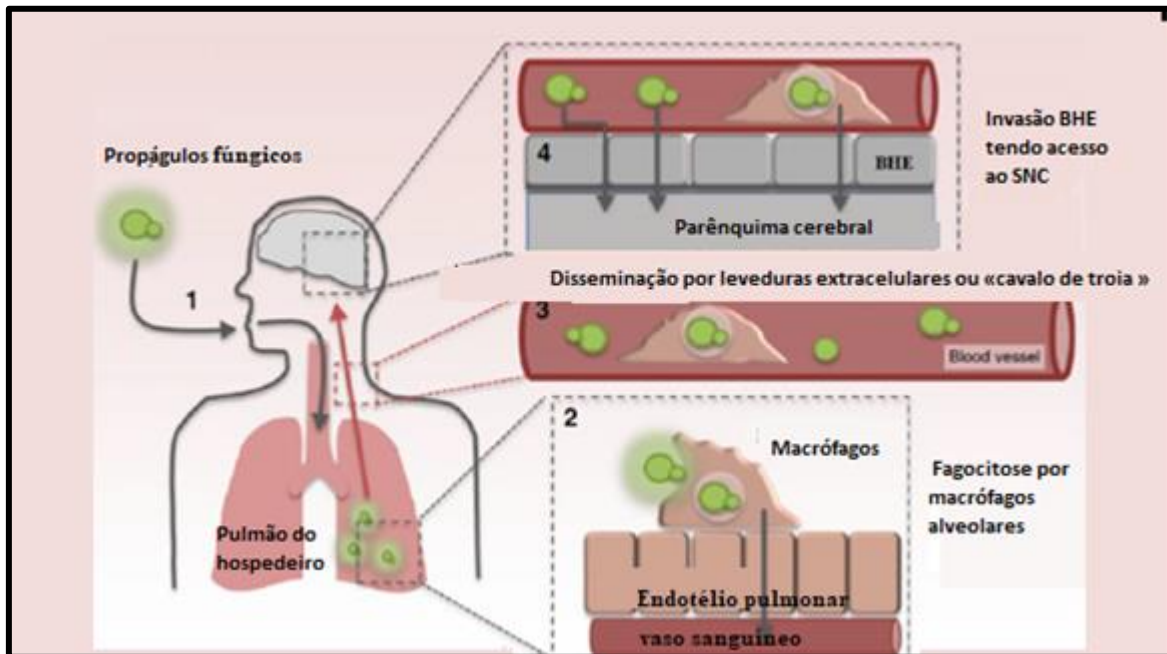
De forma geral, a criptococose inicia-se pela inalação de leveduras dessecadas ou de basidiósporos, os quais atingem os pulmões do hospedeiro. Os propágulos são pequenos, contendo de 1,5 a 3,5  $\mu\text{m}$  de tamanho, facilitando sua chegada aos alvéolos pulmonares. Uma vez nos pulmões, as células da levedura entram em contato com macrófagos alveolares, podendo ser fagocitados por estas células, conforme ilustrado na Figura 4.(LIN; HEITMAN, 2006; PERFECT et al., 2010). De forma geral, a criptococose inicia-se pela inalação de leveduras dessecadas ou de propágulos fúngicos, os quais atingem os pulmões do hospedeiro. Os propágulos são pequenos, contendo de 1,5 a 3,5  $\mu\text{m}$  de tamanho, facilitando sua chegada aos alvéolos pulmonares. Uma vez nos pulmões, as células da levedura entram em contato com macrófagos alveolares, podendo ser fagocitados por estas células (LIN; HEITMAN, 2006; PERFECT et al., 2010).

No interior do macrófago, o fungo é capaz de proliferar, sendo esta capacidade diretamente correlacionada à virulência deste. Após atingir a via hematogênica, as leveduras podem, então, invadir o sistema nervoso central (TAYLOR-SMITH; MAY, 2016).

Trabalhos pioneiros de Emmo, em 1955, já faziam referência à relação saprofítica do fungo com fezes secas de pombos, bem como solos contaminados com excrementos em ambientes urbanos (ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008). No entanto, a micose sistêmica é mais comum em gatos e cães. *C. neoformans* é o agente etiológico mais frequentemente isolado nesses casos animais (CABAÑES, 2008; LIN; HEITMAN, 2006).

É descrito que a infecção pulmonar por *C. gattii* é mais comum do que por *C. neoformans* e que ambas as espécies possuem capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, entretanto, *C. neoformans* consegue se desenvolver cerca de 10-100 vezes mais rápido que *C. gattii* no sangue de camundongos e soro. Tal fato sugere que, apesar da significativa similaridade de genomas e características de virulência, existe diferença na especificidade de órgão alvo entre as espécies, apesar de não estarem bem elucidados ainda os mecanismos que governam estas diferenças (KWON-CHUNG et al., 2014; LEOPOLD WAGER et al., 2016). A figura 4 ilustra de forma esquemática as principais etapas da patogênese da criptococose.

**Figura 4** - Ciclo biológico de *Cryptococcus* spp. penetração e disseminação no organismo



**FONTE:** Adaptado por GOTAY, 2019, baseado em Taylor-smith; MAY ( 2016).

**Patogênese da infecção por *Cryptococcus* spp.** 1) Propágulos fúngicos ou leveduras dessecadas são inaladas pelo hospedeiro e atingem os pulmões. 2) A levedura sofre fagocitose por macrófagos alveolares e pode se disseminar pelo organismo hospedeiro quando no interior das células fagocíticas. 3) A levedura se dissemina pela corrente sanguínea do hospedeiro tanto como células isoladas como no interior de macrófagos, mecanismo conhecido como “cavalo de Tróia”. 4) Invasão do SNC ocorre quando a levedura atravessa a BHE (Barreira hematoencefálica).

A forma de vida saprófito e ubíqua do *Cryptococcus* spp. intriga os pesquisadores a respeito de como esse patógeno humano se associa a plantas e de que forma o ambiente influencia no seu ciclo de vida. Acredita-se que o fungo, principalmente o *C. gattii*, estabeleça esse tipo de relação para completar seu ciclo biológico pelo processo de *mating type*, pois foi observado que componentes como inositol e ácido indol-acético, existentes em plantas do gênero *Arabidopsis* e *Eucalyptus*, estimulam a reprodução sexuada do fungo (XUE et al., 2007).

A criptococose é uma micose sistêmica de distribuição global, causada por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Atualmente, o paradigma de infecção,

unicamente oportunista, tem sido modificado pela ocorrência da doença em pacientes imunocompetentes (FISHER; VALENCIA-REY; DAVIS, 2016; SAIJO et al., 2014; TELLO et al., 2013). Normalmente a porta de entrada é por via respiratória e depois se espalha para outras regiões do corpo, principalmente o sistema nervoso central. A criptococose pode ter várias formas clínicas: criptococose pulmonar, SNC e cutânea (MA; MAY, 2009; TELLO et al., 2013).

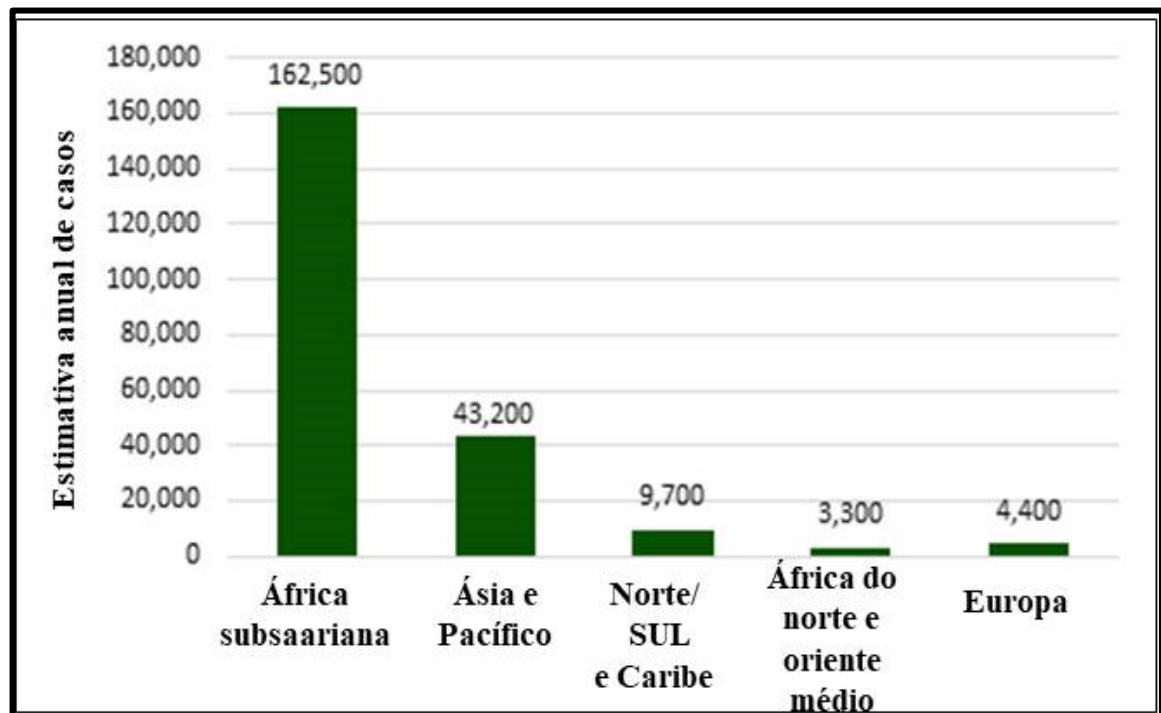
Em 80% dos casos sintomáticos, a meningoencefalite é a forma clínica mais diagnosticada dos casos de criptococose independentemente se há concomitantemente acometimento pulmonar ou apenas a forma isolada. Pode apresentar-se sob a forma de lesões focais únicas ou múltiplas no sistema nervoso central, acarretando em meningite ou meningoencefalite aguda ou subaguda. Os sinais clínicos mais frequentes são cefaleia (76% dos casos) e febre (65% dos casos), seguidos de náuseas, vômitos, rigidez de nuca para comprometimento meníngeo e alteração de consciência, déficit de memória, linguagem e cognição para os casos de meningoencefalite. (LIN; HEITMAN, 2006). No que se refere a criptococose do sistema nervoso central, estudos feitos em camundongos mostram que o *Cryptococcus neoformans* atravessa a barreira hematoencefálica pela migração transecular através do endotélio do cérebro e, subsequentemente, prolifera no espaço subaracnóideo (CHANG et al., 2004; MA; MAY, 2009). Os pacientes podem ter meningite ou neurocriptococose, que pode ocorrer de forma aguda, subaguda ou crônica (ECEVIT et al., 2006).

Na criptococose pulmonar, o trato respiratório é a porta de entrada mais comum e as manifestações pulmonares cobrem um amplo espectro que vai desde os achados radiográficos assintomático até distúrbios respiratórios agudos. As manifestações radiográficas da criptococose pulmonar têm sido descritas em três grandes padrões: nódulo ou massa pulmonar solitária, consolidação segmentar ou lobar e pequeno padrão nodular. A forma pulmonar localizada pode afetar pessoas incompetentes ou imunossuprimidas (LACOMIS et al., 2001; TELLO et al., 2013).

A criptococose cutânea pode ser primária ou secundária, a criptococose cutânea primária (CCP) foi definida na literatura como a identificação do *Cryptococcus* na biópsia ou cultivo da pele (BALLESTERO et al., 2004; FORRESTEL et al., 2016; TELLO et al., 2013). A criptococose cutânea secundária (CCS) ocorre por disseminação hematogênica do fungo para a pele, que ocorre entre 10-20% dos casos (PASA; CHANG; HANS-FILHO, 2012).

Estudo realizado no Brasil também comprovou que, na maior porcentagem de pacientes com CCP, a espécie mais isolada foi *C. gattii* (MARQUES et al., 2012).

A letalidade da neurocriptococose é estimada em 10% em países desenvolvidos chegando até 43% em países em desenvolvimento em um tempo médio de sobrevivência de 14 dias (KON et al., 2008). Uma pesquisa desenvolvida por Rajasingham et al. (2017) teve o intuito de realizar a primeira estimativa mundial de casos de meningite criptocócica, a forma mais grave da doença, associada com pacientes HIV positivo. Estimou-se que ocorrem anualmente cerca de 242.200 casos de neurocriptococose em todo o mundo – desses, 162.500 encontram-se na África Subsaariana – com aproximadamente 624.700 mortes. A figura 5 ilustra a estimativa anual de casos de meningite criptocócica ao redor do mundo.

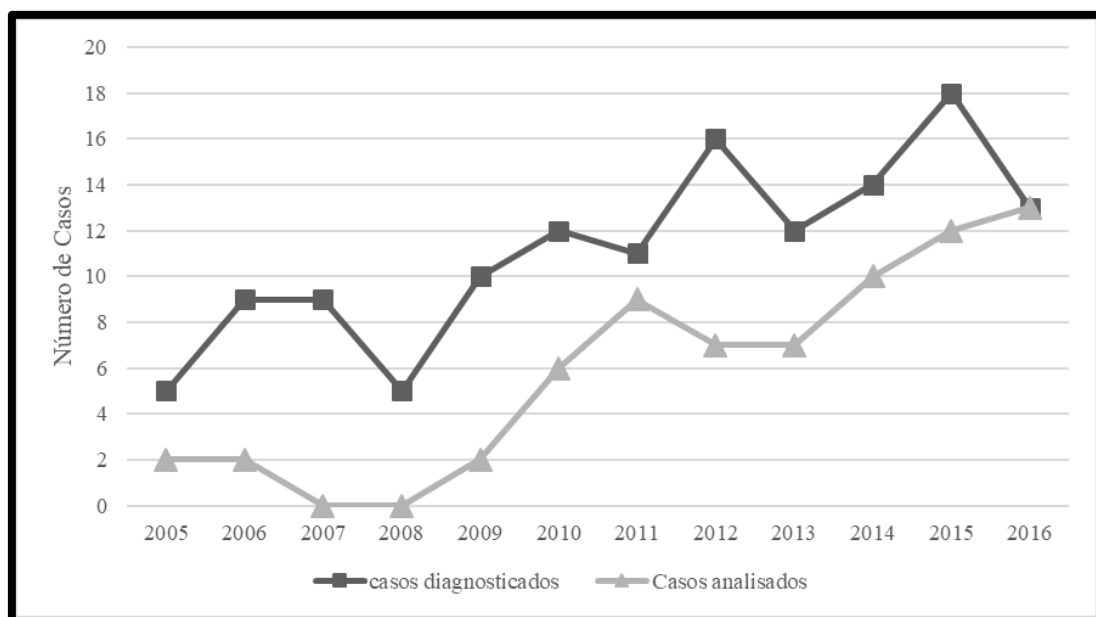


**Figura 5** - Epidemiologia global da neurocriptococose em indivíduos HIV positivos no mundo. Adaptado por GOTAY, 2019, Rajasingham et al.(2017).

### 2.5.1 Epidemiologia da criptococose no Ceará

No Brasil, a criptococose não é uma doença de notificação compulsória, o que dificulta o conhecimento da real magnitude da morbidade e da mortalidade da doença no país. O conhecimento existente é obtido principalmente a partir de estudos de séries de caso, realizados em sua maioria nas regiões Sul e Sudeste, sendo poucos estudos realizados no Nordeste do país, inclusive no estado do Ceará (MORA et al., 2012).

As regiões Norte e Nordeste do Brasil se configuram como áreas endêmicas para criptococose. Neste cenário, a doença é caracterizada por infecção primária de hospedeiros imunocompetentes, afetando sobretudo crianças e adultos jovens. Há predomínio de infecções causadas pelo complexo de espécies *C. gattii* e tipo molecular VGII, comumente observadas nos estados do Amazonas, Roraima, Pernambuco, Piauí e Bahia. A figura 6 mostra a distribuição temporal dos casos de criptococose diagnosticados no período de estudo. É possível observar que os diagnósticos duplicaram de 2008 a 2009, sendo verificada uma tendência de crescimento durante todo o período ( OLIVEIRA, 2018).



**Figura 6-** Distribuição temporal dos casos analisados e casos diagnosticados de criptococose.

Hospital São José, Fortaleza –Ceará, 2005 a 2016.

## 2.6 Fatores de virulência

A capacidade das espécies do Complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii* em infectar humanos e animais está intimamente relacionada com a sensibilidade do hospedeiro e a produção de fatores de virulência, que são mecanismos que possibilitam ao fungo resistência à imunidade do hospedeiro, facilitando a proliferação e sobrevivência, danificando órgãos e tecidos, ocasionando a criptococose. São vários os fatores de virulência produzidos pelo Complexo, sendo os principais a expressão de cápsula, síntese de melanina, formação de biofilme, termotolerância a 37°C, produção de enzimas (protease, urease e fosfolipase), sobrevivência intracelular, aquisição de nutrientes e biofilme que contribui para, resistência aos antifúngicos de uso terapêutico (CAMPOS; BARONI, 2010; PESSOA; SILVA; GOMES, 2012).

Estudos realizados por Perfect, et al., (2005) sobre a produção de cápsulas, síntese de melanina, crescimento a altas temperaturas levaram ao entendimento de que estes são os principais fatores de virulência. A tabela 2 ilustra os diferentes fatores de patogenicidade do complexo *Cryptococcus neoformans*.

**Tabela 2** - Mecanismos de patogenicidade do *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii*

Fator de virulência	Hospedeiro	Meio ambiente
Cápsula	Antifagocítica	Proteção à dessecação
Melanina Temperatura 37°C	Resistência aos antifúngicos Infecção	Proteção contra radiação UV Sobrevivência em condições hostis
Enzimas 1. Uréase 2. Fosfolipase 3. Proteinase	Sobrevivência no hospedeiro Invasão tecidual Crescimento intracelular	Função nutricional Proteção contra predadores
Formação de biofilme	Resistência aos antifúngicos	Remoção de matéria orgânica carbonácea e nitrogenada

**Fonte:** Adaptado por GOTAY, 2019, baseado em Ma and May et al., (2009). Principais fatores de virulência de *C. neoformans* relacionados ao hospedeiro e ao meio ambiente.



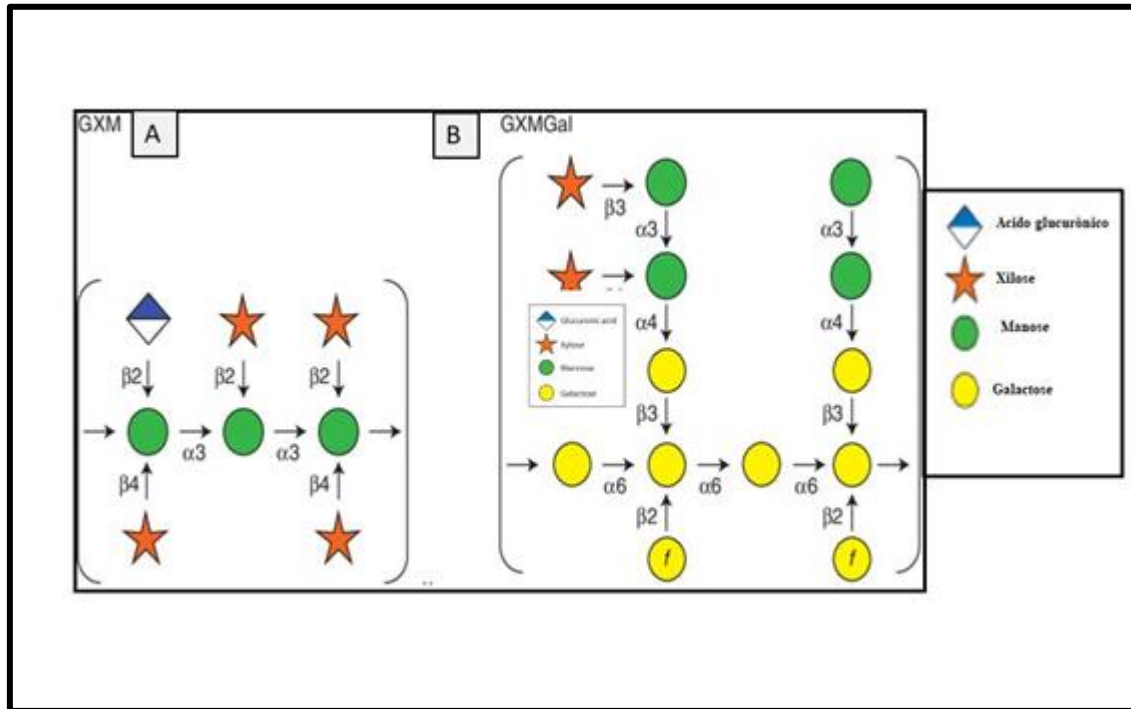
### 2.6.1. Cápsula

Dentre todos os fungos patogênicos, *Cryptococcus* spp. é o único que possui uma cápsula polissacarídica. Essa cápsula é composta primariamente por dois polissacarídeos, sendo a glucuronoxilomanana (GXM) o fator de virulência mais estudado (DOERING, 2009; TURNER; CHERNIAK; REISS, 1984). A cápsula se compõe em 90-95% de glucuronoxilomanano (GXM), 5-8% de galactoxilomanano (GalXM) e mananoproteínas (<1%). (DOERING, 2009; MA; MAY, 2009).

O sequenciamento genético de *Cryptococcus* spp. através de PCR. identificou quatro genes: *CAP59*, *CAP60*, *CAP64* e *CAP10* responsáveis pelas sínteses da cápsula (CHANG; KWON-CHUNG, 1998). Componentes de superfície de *C. neoformans*, incluindo a cápsula, seriam sintetizados no citoplasma e exportados para o exterior da célula por vesículas secretoras que atravessariam a parede celular (RODRIGUES; ALVIANO; TRAVASSOS, 1999).

Há um consenso entre a comunidade científica de que a cápsula é o principal fator de virulência de *Cryptococcus* spp. com base no fato de que cepas mutantes não-encapsuladas são avirulentas (MARTINEZ; CASADEVALL, 2005; ROSSATO et al., 2016). Ao serem inalados, os propágulos fúngicos de maneira geral não apresentam cápsula, mas ao serem depositados nos alvéolos, ocorre rapidamente a síntese capsular (VELAGAPUDI et al., 2009). A figura 7 ilustra os açúcares que compõem a cápsula de *Cryptococcus* spp.

**Figura 7**– Principais polissacarídeos da cápsula de *Cryptococcus* spp.



**FONTE:** Adaptado por GOTAY, 2019, baseado em (DOERING, 2009). Estrutura dos polissacarídeos componentes da cápsula, (A) GXM (B) GalXMGal, compostas por açúcares simples, manose, glucose, ácido glucurônico, xilose.

A expressão da cápsula por *Cryptococcus* spp. pode variar dependendo da cepa e das condições de crescimento em meios de cultura. O tamanho da cápsula é normalmente pequeno, embora possa ser estimulado por diversos fatores que incluem altas concentrações de  $\text{CO}_2$  e baixas concentrações de ferro (ZARAGOZA; CASADEVALL, 2004). Estudos realizados demonstram que o  $\text{CO}_2$  é transformado em  $\text{NAHCO}_3$  e favorece a biossíntese da cápsula e o crescimento de *Cryptococcus* spp. no pulmão do hospedeiro através de duas enzimas denominadas anidrases carbônicas Can1 e Can2. (GRANGER; PERFECT; DURACK, 1985; MOGENSEN et al., 2006). Ao mesmo tempo, a cápsula também possui funções importantes, como dar ao fungo a capacidade de escapar das defesas do hospedeiro, reduzindo a capacidade fagocítica das células do sistema imune (MCFADDEN; ZARAGOZA; CASADEVALL, 2006; RODRIGUES; ALVIANO; TRAVASSOS, 1999).

### 2.6.2 Melanina e lacase

A melanina é um pigmento carregado negativamente, hidrofóbico, de alto peso molecular que é formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos (MA; MAY, 2009). A lacase, que é codificada por dois genes, *LAC1* e *LAC2*, é um importante fator de virulência para *C. neoformans* /*C.gattii* no entanto, a *LAC1* é a responsável pela virulência (QIU et al., 2012). *Cryptococcus* spp. é capaz de produzir melanina a partir de substratos como LDOPA, Ágar Semente de Girassol, Ágar Cenoura, Ágar Ácido Cafeico ou dopamina em decorrência da oxidação destes substratos pela lacase. A enzima fenoloxidase pode ainda atuar em diferentes substratos dopaminérgicos, como as catecolaminas, que estão presentes no cérebro dos mamíferos (DOS SANTOS PEDROSO et al., 2007; QIU et al., 2012).

A melanina é um importante fator de virulência para *Cryptococcus* spp, colaborando para a proteção do fungo contra danos oxidativos causados pelos fagócitos e radiações ionizantes (IKEDA et al., 2003; VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). Além disso, as células melanizadas são menos sensíveis aos efeitos de determinados antifúngicos, como os azólicos e caspofungina (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). Qiu et al. (2012) realizaram estudos experimentais com camundongos investigando se a presença ou ausência de lacase modificava a resposta imune local no pulmão nas cepas altamente virulentas, H99 (expressando lacase) e a cepa mutante de H99 deficiente do gene produtor de melanina. O experimento com as cepas com ausência da enzima o sistema imune reduziu a carga fúngica pulmonar e aboliu a disseminação do SNC.

Embora a estrutura molecular da melanina produzida por *Cryptococcus* spp. ainda seja desconhecida, sabe-se que a molécula possui um radical livre estável, desenvolvendo um papel antioxidativo eficiente (EISENMAN et al., 2005; MANDAL et al., 2007). Dessa forma, o pigmento possui capacidade de absorver radiação eletromagnética proveniente da luz ultravioleta ou até mesmo de reatores nucleares, conferindo radioproteção para o fungo no meio ambiente (DOS SANTOS PEDROSO et al., 2007; URÁN; CANO, 2011). A melanina pode ainda atuar na interferência da fagocitose, defesa contra radicais livres tóxicos produzidos pelo hospedeiro durante o processo infeccioso, e na capacidade de difusão do fungo para outros tecidos a partir dos alvéolos pulmonares, o que caracteriza importante papel na disseminação sistêmica para o sistema nervoso central. Por estar inserida na parede

fúngica, contribuindo para uma melhor estruturação da parede celular conferindo rigidez. (MA; MAY, 2009; URÁN; CANO, 2011).

A síntese de melanina de *Cryptococcus* spp. ocorre apenas na presença de compostos fenólicos, tais como L-3, 4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), metildopa, epinefrina e norepinefrina, catalisada por uma fenoloxidase. O fungo capta precursores dopamínicos do ambiente extracelular que podem ocorrer tanto no meio ambiente como durante a infecção (URÁN; CANO, 2011; VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). A enzima fenoloxidase ou lacase, presente na levedura, atua sobre esses substratos, gerando quinonas como produtos, que sofrem um processo de autopolimerização, transformando-se em melanina. (CASADEVALL; ROSAS; NOSANCHUK, 2000; DOS SANTOS PEDROSO et al., 2007).

### 2.6.3 Termotolerância a 37 °C

A capacidade do *Cryptococcus* spp. de sobreviver e proliferar a 37 ° C dentro do hospedeiro é um atributo da virulência essencial dos microrganismos patogênicos (CASADEVALL; PERFECT, 1998). Durante o crescimento a 37° C, em resposta ao estresse causado pela temperatura, *Cryptococcus neoformans* expressa genes como *Mga2* a 37° C, considerado importante para o crescimento a alta temperatura. O gene *Mga2* regula genes que codificam as enzimas Biosintética da membrana celular e ácidos graxos para adaptação a altas temperaturas de crescimento (KRAUS et al., 2004; MA; MAY, 2009). Da mesma forma, estudos realizados através da utilização do método alternativo análise de diferenças representacionais (RDA) revelaram 100 genes no complexo *Cryptococcus neoformans* que são regulados quando o fungo cresce a 37 ° C (E SILVA et al., 2008).

Assim, as enzimas requeridas para a manutenção da termotolerância – como as proteínas do choque térmico (Hsp) – são também consideradas fatores de virulência. Nesta perspectiva, destaca-se a Hsp90, proteína que está relacionada com a capacidade de crescimento a 37°C. A termotolerância apresentada pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* pode destacar-se como relativamente mais importante frente aos demais fatores de virulência (CORDEIRO et al., 2016).

#### 2.6.4 Produção de enzimas

A produção de enzimas por cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* também é considerada um importante fator de virulência. As principais enzimas produzidas pelo Complexo são proteases, fosfolipase e urease. Proteases são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas resultando na digestão de proteínas, possibilitando uma maior aquisição de nutrientes. Também contribuem para a invasão de tecidos do hospedeiro, colonização e, por conseguinte, estabelecimento da infecção (CAMPOS; BARONI, 2010; MA; MAY, 2009).

As proteases participam na virulência dos microrganismos degradando proteínas, como colágeno, elastina e fibrinogênio, e outras proteínas imunologicamente importantes, como imunoglobulinas e fatores do complemento, levando ao comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro. A degradação destas proteínas causa danos teciduais ou vasodilatação, fazendo com que ocorra a invasão e disseminação dos fungos nos tecidos do hospedeiro (CASADEVALL; STEENBERGEN; NOSANCHUK, 2003; MA; MAY, 2009).

A Fosfolipase B é conhecida por seu papel na patogenicidade do fungo, aumentando a sobrevivência e disseminação intracelular da levedura e disseminação desta no pulmão e no cérebro (KWON-CHUNG et al., 2014). Cepas de *Cryptococcus* spp. produtoras de fosfolipase possuem normalmente uma maior capacidade de aderência ao tecido do hospedeiro (CAMPOS; BARONI, 2010). Outras enzimas, como a urease, possuem papel importante na propagação do fungo por causar acúmulo de células dendríticas imaturas e uma resposta Th2 não protetora (OSTERHOLZER et al., 2009). A urease catalisa a hidrólise da ureia em amônia NH<sub>3</sub> e ácido carbônico CO<sub>2</sub> (MA; MAY, 2009).

#### 2.6.5 Biofilme

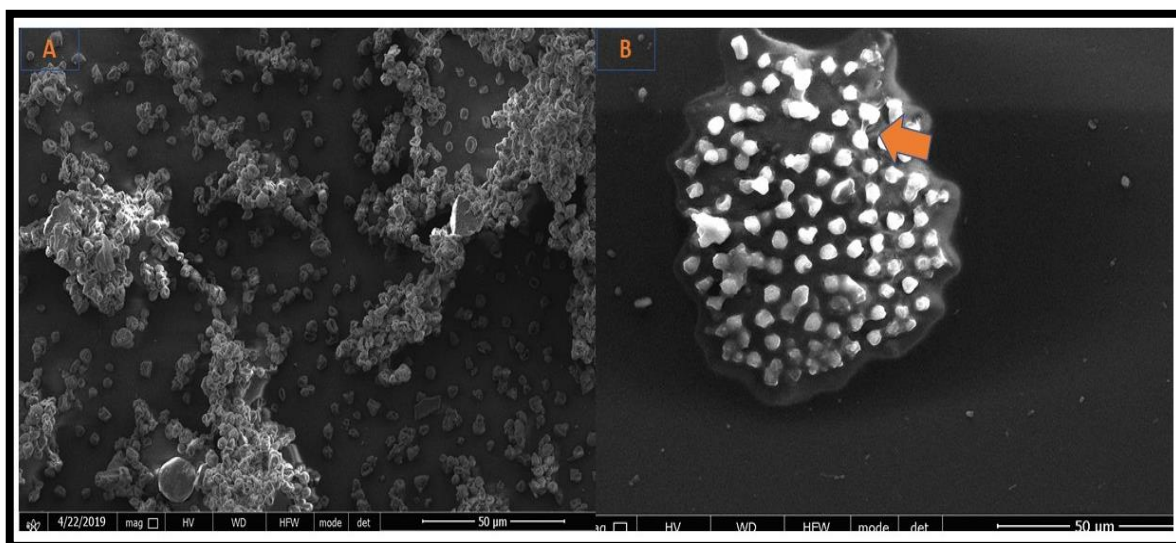
Biofilmes são comunidades microbianas complexas dinâmicas, de estrutura tridimensional aderida a uma superfície biótica ou abiótica, cujas células encontram-se circundadas por uma matriz extracelular polimérica (BRAUNSDORF; LEIBUNDGUT-LANDMANN, 2018; REICHHARDT; STEVENS; CEGELSKI, 2016). *Cryptococcus neoformans/gattii* exibe predileção por superfícies artificiais e forma biofilmes em dispositivos médicos, como derivações do líquido cefalorraquidiano, cateteres vasculares e

fístulas de diálise protética (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007). A Figura 8A mostra comunidades agregadas envolvidas em uma matriz extracelular protetora.

A capacidade que os microrganismos têm para formação de biofilme pode ser considerada como um fator de virulência essencial para a sobrevivência microbiana em praticamente todos os ambientes (DONLAN; COSTERTON, 2002; MARSH, 2004). Estima-se que infecções por biofilme compreendem de 65% a 80% das infecções que afetam os seres humanos no mundo desenvolvido (COSTERTON, 2004; KERNIEN et al., 2018). As infecções causadas por *Cryptococcus* spp. podem estar associadas a formação de biofilme em válvulas cerebrais e dispositivos médicos (LOPES, 2015; MARTINEZ; CHRISTAKI; CASADEVALL, 2006). Além da atividade imunomoduladora da matriz extracelular, os biofilmes de *Cryptococcus* spp. também resistem ao sistema fagossoma do hospedeiro (RAMAGE et al., 2012). A Figura 8B mostra a matriz de exopolissacarídeos do biofilme de *Cryptococcus gattii*. Os biofilmes são capazes de tolerar altas concentrações de antimicrobianos (Lopes et al., 2015). Além das defesas do hospedeiro, PG-1,  $\beta$ -defensina-1 e  $\beta$ -defensina-3 (MARTINEZ; CHRISTAKI; CASADEVALL, 2006).

O fungo *C. neoformans* já foi relatado como um patógeno capaz de formar biofilme ativamente em diversos dispositivos protéticos, inclusive em válvulas e derivações cardíacas e fístulas de diálise (WALSH et al., 1986). A capacidade que têm *Cryptococcus* spp. de aderir a cateteres e produzir fungemia foi demonstrada por (TAKEMURA et al., 2015). Existem genes transcricionais que regulam a formação de biofilme em *Cryptococcus neoformans*, como *CRZI* e *SPI*, que estão envolvidos na formação de biofilmes (MORANOVA et al., 2014). Gyawali et al., (2017), demonstrou que a proteína Cfl1 é uma adesina que permite a adesão célula-célula e regula a formação de biofilme.

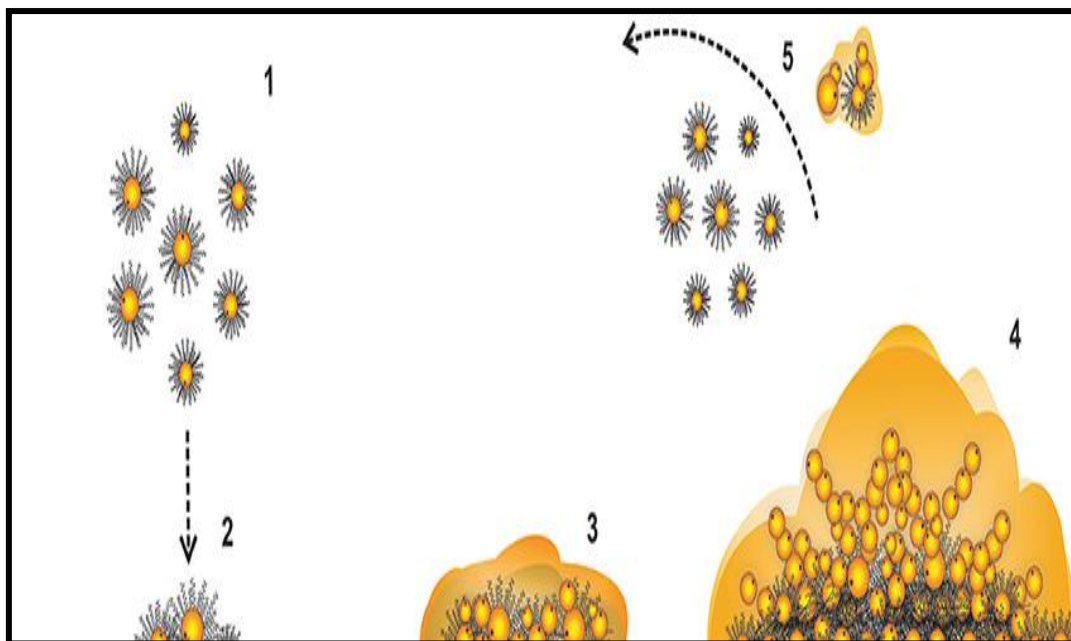
**Figura 8**– Biofilme maduro de *Cryptococcus gattii*.



**Figura 8**- Imagem de microscopia eletrônica de varredura de um biofilme produzido por *Cryptococcus gattii*. Aumento de 2,500 vezes. A seta laranja evidencia a matriz extracelular. Fonte: próprio autor – CEMM/UFC (2019).

*C. neoformans* e *Cryptococcus gattii* têm uma cápsula de polissacarídeo (GXM) glucuronoxilomanana, um importante fator de virulência, necessário para a adesão ao suporte sólido e formação de biofilme (CAMACHO; CASADEVALL, 2018; MARTINEZ; CASADEVALL, 2007). Martinez e Casadevall (2006) identificaram GXM como o principal polissacarídeo da matriz de biofilme de *C. neoformans*. Esse polissacarídeo tem recebido mais atenção devido às suas propriedades imunomoduladoras e alta abundância na matriz do biofilme (CAMACHO e CASADEVALL, 2018). Os mecanismos moleculares que conferem resistência às drogas em biofilmes fúngicos não foram completamente elucidados. Todavia, de maneira geral, os mecanismos envolvidos no fenômeno de resistência aos antifúngicos em biofilme são: aumento da densidade celular; estado fisiológico em que as células se encontram; a presença de células persistentes; a matriz exopolimérica; aumento da expressão de genes relacionados aos alvos das drogas e a resistência mediada por bomba de efluxo. Esses mecanismos têm sido cada vez mais investigados principalmente em espécies do gênero *Candida*, sobretudo *C. albicans*. No entanto, pesquisas com a mesma temática em biofilmes do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* são escassas (RAMAGE et al., 2012; RÖMLING; BALSALOBRE, 2012). A figura 9 ilustra de forma esquemática as principais etapas de formação do biofilme.

**Figura 9** –Etapas de formação de biofilme de *Cryptococcus* spp.



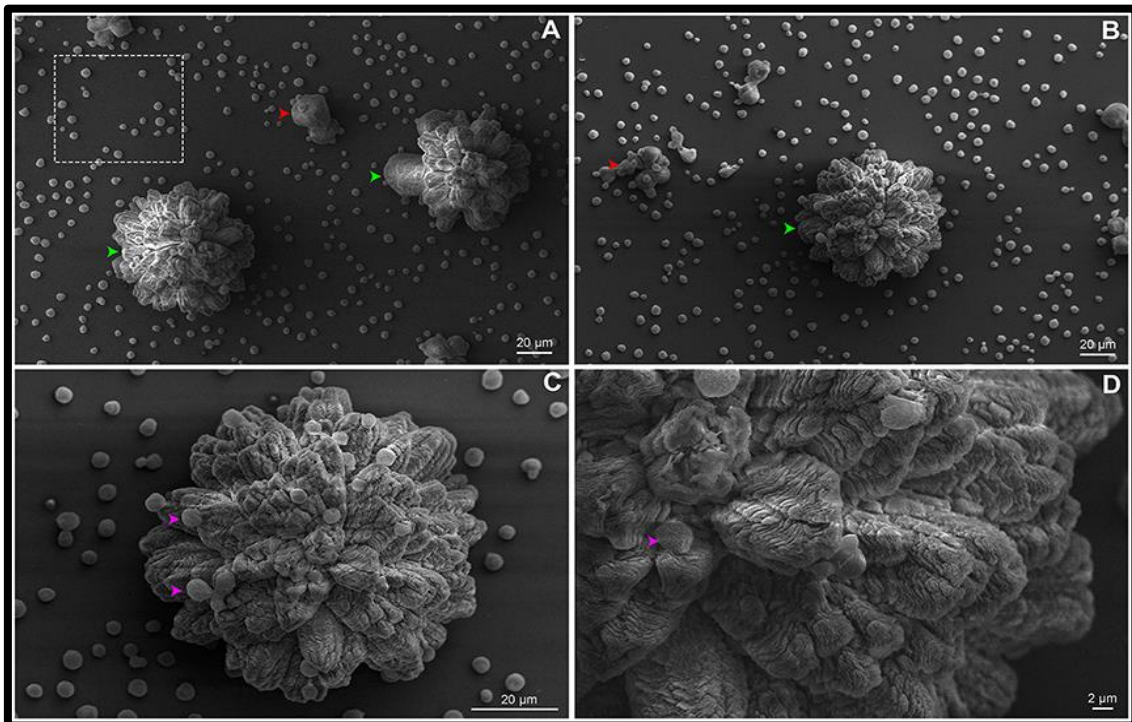
**FONTE:** Baseado em LOPES et al., (2017). (1,2) Adesão de células planctônicas (3) Quórum sensing. (4) Biofilme formado. (5) Dispersão

Estudos relatam que a formação de biofilme por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* oferta resiliência, conferindo tolerância ao sistema imunológico do hospedeiro e à ação de agentes antifúngicos (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2004; MARTINEZ; CASADEVALL, 2015b; RAMAGE et al., 2012). A representação gráfica dos diferentes mecanismos de resistência do biofilme está presente na Figura 10. Uma das características definidoras dos biofilmes é o aumento da resistência a agentes antimicrobianos. Os fungos têm até 1000 vezes mais resistência a agentes antifúngicos do que as células planctônicas livres (RAMAGE et al., 2012; RIVERA; RAMOS; DESGARENNES, 2013). A composição da MEC desses biofilmes em *Cryptococcus* spp. é complexa, compreendendo proteínas, hexosamina, fósforo, ácido urônico e carboidrato (MARTINEZ; CASADEVALL, 2015b). Estudos realizados por Martinez et al., (2015) relataram que os biofilmes de *Cryptococcus neoformans* melanizados mostram menor sensibilidade aos diferentes azólicos que os biofilmes não melanizados.



Moranova et al., (2014) relataram que existem genes transcricionais que regulam a formação de biofilme, como *CRZI* e *SPI*, que estão envolvidos na formação de biofilmes em *Cryptococcus neoformans*. Gyawali et al., (2017) demonstraram que a proteína Cfl1 é uma adesina que regula morfologia, formação de biofilme e comunicação intercelular. A figura 10 ilustra o biofilme maduro de *Cryptococcus neoformans*.

**Figura 10**– Estrutura do biofilme de *Cryptococcus neoformans*.



**FONTE:** Baseado em LOPES et al., (2017). Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. (A) O quadrado pontilhado indica células criptocócicas ligadas à superfície. (B) Biofilmes com estrutura amorfa e assimétrica (setas vermelhas) (C, D) Biofilme maduro em forma de flor (setas rosas).

Acredita-se que os constituintes da matriz atuem também como quelantes das drogas, fazendo com que sejam necessárias concentrações mais elevadas dos fármacos para exercer efeito. Compreender os mecanismos envolvidos na síntese da matriz dos biofilmes é o ponto chave para o desenvolvimento de estratégias antifúngicas (RAMAGE et al., 2012).

A utilização de substâncias e drogas não convencionais antifúngicas, como medida de controle *in vitro* de biofilmes produzido pelo Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, tem sido proposta por alguns autores. Rossato et al., (2016) demonstraram que as drogas

fenotiazinas Clorpromazina inibidora da bomba de efluxo inibiu o crescimento de células planctônicas de *Cryptococcus* spp. Cordeiro et al. (2016) demonstraram que as combinações das drogas inibidoras fármaco radicicol (RAD) inibiram o crescimento de células planctônicas, bem como biofilmes formados por *Cryptococcus* spp.

## 2.7 Resposta imunológica do hospedeiro frente a *Cryptococcus* spp.

A defesa do hospedeiro contra *Cryptococcus* spp. é criticamente regulada por mediação celular, especialmente linfócitos T, macrófagos que desempenham um papel central na erradicação desta infecção (OSTERHOLZER et al., 2009). Em geral, pensa-se que a eliminação de *Cryptococcus* spp. é através da produção de citocinas e efeito antifúngico dos macrófagos ativadas. Quando uma resposta imune é mediada pelas células T, a maioria das leveduras de *Cryptococcus* intracelulares são erradicadas durante a infecção pelas células Th1 / Th2 ativadas (GARRO et al., 2011; LINDELL et al., 2005).

Os macrófagos têm uma variedade de mecanismos microbicidas que são potencialmente ativos contra *C. neoformans*, incluindo mecanismos oxidativos e não oxidativos. Assim como a formação de granuloma, a produção de radicais hidroxilo é gerada como resultado da redução incompleta de oxigênio (GARRO et al., 2011).

## 2.8 Tratamento e resistência aos antifúngicos

O tratamento consiste em 3 fases: indução, consolidação e manutenção ou profilaxia secundária (CASTAÑEDA; LIZARAZO, 2012). A meningite por *Cryptococcus* spp. não tratado sempre é fatal. Todos os pacientes com meningite devem receber tratamento antifúngico. Nas formas leves de criptococose sem comprometimento do SNC, geralmente é utilizado fluconazol, por via oral, 400 mg por dia, durante 6 a 12 semanas. Nos casos mais graves da doença com Comprometimento do SNC é indicado uma primeira Fase de indução com anfotericina B intravenosa (IV) em doses de 0,7 mg / kg diárias, combinadas com 5-fluocitosina ou fluconazol (PERFECT et al., 2010; TELLO et al., 2013).

Atualmente, a terapia anticriptococócica recomendada inclui anfotericina B desoxicolato isolada ou combinada com 5-flucitosina, seguida de fluconazol para manutenção da terapia. (PODZAMCZER; SIDA, 2008). Para a maioria dos pacientes, as preparações lisossômicas de anfotericina B são preferidas para minimizar o risco de toxicidade renal e

melhorar a capacidade de dar um período ininterrupto de indução do tratamento (TELLO et al., 2013). Normalmente, cepas humanas e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii* são sensíveis, *in vitro*, a Anfotericina B (KOBAYASHI et al., 2005; TAY et al., 2006). Pappalardo et al. (2003) relataram sensibilidade reduzida de *Cryptococcus* spp. à AMB *in vitro* em cepas de origens clínicas e ambientais. Sanglard et al. (2002) descreveram a resistência de *Cryptococcus* spp. ao fluconazol de cepas de origens clínicas e ambientais. Estudos mostraram que a regulação positiva do gene *AFRI*, que codifica para o transportador de tipo ABC em *Cryptococcus neoformans*, está envolvida na resistência *in vitro* ao fluconazol. (POSTERARO et al., 2003; SANGUINETTI et al., 2006).

A 5-FC é um fungicida para leveduras pertencentes à classe de pirimidinas e não é usado para infecções fúngicas pelos fungos filamentosos. Uma alta variabilidade das CIMs é observada da 5-FC contra o gênero *Candida* spp. e *C. neoformans*. Devido ao surgimento de resistência intrínseca, 5-FC geralmente não é administrada como monoterapia, já que oferece resistência rapidamente, de modo que é geralmente combinada com outros agentes, em particular com AMB (RUIZ-CAMPS; CUENCA-ESTRELLA, 2009; SANGLARD, 2002b). Investigações detalhadas dos mecanismos moleculares de resistência a 5-FC mostraram que a resistência intrínseca dos fungos a este fármaco pode ser devido a um defeito na citosina permease observada na *C. albicans* (PONTÓN; QUINDÓS, 2006).

Estudos realizados na América do Sul relataram a resistência a fluconazol em cepas clínicas de *Cryptococcus* spp., (CATTANA et al., 2013). Dentre os métodos mais utilizados, *in vitro*, para avaliar a sensibilidade de *Cryptococcus* spp. ante os diferentes antifúngicos, destacam-se o teste de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A3 CLSI (2008). Bosco-borgeat et al. (2016) relataram duas mutações envolvidas na resistência de *Cryptococcus neoformans* ao fluconazol por sequenciamento do gene *ERG11* em isolados clínicos. Revelaram também que a mutação *Y145F*, que resulta da substituição dos aminoácidos G484S (G1855A), aumenta a síntese das enzimas 14- $\alpha$ -desmetilase de lanosterol.

Sionov et al. (2011) caracterizaram cepas de *C. neoformans* sorotipo A resistentes a altas concentrações de fluconazol (FLC) de isolados clínicos. Eles fizeram sequenciamento do gene *ERG11* pela técnica de PCR que revelou a mutação do aminoácido tirosina pela fenilalanina no aminoácido 145. É importante notar que esta nova mutação pontual identificada no gene *ERG11* de *C. neoformans* também está associada a resistência ao

Voriconazol (VRC). As metodologias utilizadas para a sensibilidade *in vitro* incluem disco-difusão, macro e microdiluição em caldo. Recomenda-se o uso da microdiluição em caldo porque essa técnica ajuda a obter a concentração mínima inibitória de crescimento (CIM), sendo a concentração mínima de droga que consegue inibir o crescimento do microrganismo em condições padronizadas de meio, temperatura, tempo, entre outros CLSI (2008).

## 2.9 Drogas fenotiazinas com atividade antifúngica

Existem compostos medicinais que são utilizados para a terapia de patologia não infecciosa e que possuem propriedades antifúngicas. As fenotiazinas como a Clorpromazina e Prometazina são aminas tricíclicas que têm atividade fungicida e podem inibir os transportadores da bomba de efluxo de tipo ABC de algumas leveduras do gênero *Cândida* spp. e *Cryptococcus* (ELLS et al., 2013; VARGA et al., 2017). As fenotiazinas foram sintetizadas pela primeira vez por Bernthsen, em 1883. O uso clássico delas pode ser na forma de anti-histamínicos, sedativos e antipsicóticos (OHLOW; MOOSMANN, 2011; VARGA et al., 2017). As substâncias fenotiazina prometazina e clorpromazina têm a capacidade de inibir o substrato competitivo, evitando a ligação de ATP na célula, causando assim uma perturbação no gradiente de próton (BRILHANTE et al., 2018; CHAN; ONG; CHUA, 2007). Alguns derivados de fenotiazina também mostraram atividade inseticida, antibacteriana, anti-helmíntica, antipriônica, antitumoral, antiviral, anti-inflamatória e antimalárica (OHLOW; MOOSMANN, 2011; VARGA et al., 2017).

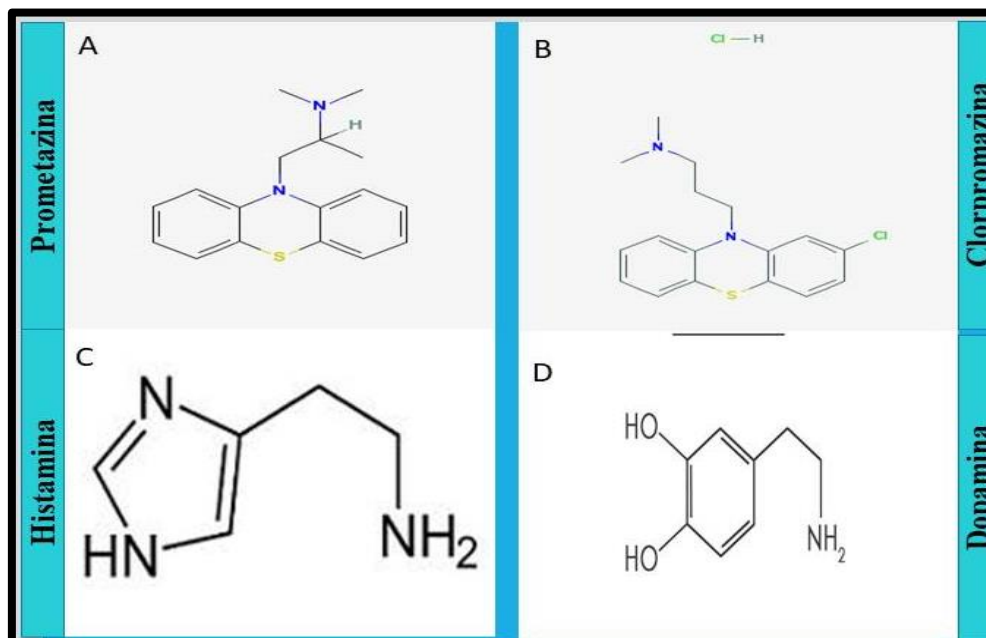
Varga et al. (2017) relataram a capacidade das fenotiazinas prometazina e clorpromazina de inibir a calmodulina, proteína essencial para o transporte de cálcio na célula fúngica e bacteriana, alterando o ciclo celular da levedura e de fungos filamentosos. O Ca<sup>2+</sup> está envolvido em várias funções e pode desempenhar um papel importante na regulação do crescimento e metabolismo celular. É elemento essencial para o crescimento de vários fungos (ELLS et al., 2013).

Afeltra et al (2003) e Galgóczy et al. (2011) realizaram estudos com cepas de *Candida* spp., com o objetivo de investigar os efeitos de interação das fenotiazinas clorpromazina e terbinafina com agentes antifúngicos clássicos (AMB), clinicamente usado contra infecções invasivas e formas graves da doença, demonstrando em seu estudo que têm sinergismo. Estudos realizados por Brilhante et al. (2017) com cepas de *Candida tropicalis* encontraram a ação antifúngica da prometazina alterando a membrana plasmática ou também inibindo

aspectos do metabolismo das células fúngicas (AFELTRA; VERWEIJ, 2003; VITALE et al., 2007). Aneke et al. (2020) realizaram estudos com o objetivo de reverter o mecanismos de resistência em cepas de *Microsporium canis* mediados por bomba de efluxo, demonstrando que a prometazina foi capaz de alterar o fenótipo resistência aos antifúngicos, sobretudo aos azólicos. A prometazina é um derivado da fenotiazina, portanto, é classificada como antagonista dos receptores H1 de primeira geração e atuam bloqueando competitivamente a histamina, além da atividade bloqueadora dos receptores  $\alpha$ , que pode causar hipotensão ortostática nos indivíduos suscetíveis (OHLOW; MOOSMANN, 2011; VARGA et al., 2017).

O efeito psicótico da clorpromazina está relacionado com a sua capacidade de inibir a fosforilação oxidativa e a excitabilidade das membranas neuronais. Por outro lado, bloqueia os receptores de dopamina D1, D2 alfa adrenérgicos, histaminérgicos (H1), serotoninérgicos (5-HT2) (KURAUCHI et al., 2018; VARGA et al., 2017; VENEGAS; MILLÁN; MIRANDA, 2003). Diante deste fato, pensou-se nas fenotiazinas, as quais alteram fenótipo de resistência de cepas fúngicas e que têm em sua estrutura o triplo anel de benzeno junto a um átomo de nitrogênio. Este átomo é responsável por suas propriedades específicas e sua eficiência (OHLOW; MOOSMANN, 2011; VARGA et al., 2017). A figura 11 mostra a estrutura química das fenotiazinas e suas moléculas antagônicas.

**Figura 11**– Estrutura química das fenotiazinas e suas moléculas antagonistas.



**FONTE:** Adaptado de OHLOW; MOOSMANN, 2011. (A) Estrutura química da prometazina. (B) Molécula da clorpromazina. (C) Histamina. (D) Estrutura química da dopamina.

Dentre as fenotiazinas, a prometazina é quem possui a estrutura semelhante à da histamina, portanto, seu efeito antagonista da histamina pode ser derivado dela, uma vez que inibe os receptores H1 da histamina. A estrutura da clorpromazina é muito semelhante à da dopamina, desse modo, é capaz de efetivamente inibir os receptores de dopamina e exerce efeitos antipsicóticos (CANTISANI et al., 2013; VARGA et al., 2017). Dados na literatura demonstram o efeito antimicrobiano da prometazina, tendo efeito inibitório para *Burkholderia pseudomallei*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (CASTELO-BRANCO et al., 2013; SIDRIM, et al., 2016; BRILHANTE et al., 2017). Essa atividade se deve ao efeito inibitório na bomba de efluxo, importante fator de virulência presente nos microrganismos que ocasionam maior tolerância aos fármacos (RAMAGE et al., 2012).

A prometazina também foi capaz de ocasionar perda a função mitocondrial e dano a integralidade da membrana celular fúngica. Ademais, também foi constatado sua atividade inibitória nos biofilmes de *Burkholderia pseudomallei* e *Candida tropicalis* (SIDRIM, et al., 2016; BRILHANTE et al., 2017).

### 3 HIPÓTESES

- 1) A prometazina e clorpromazina apresentam ação inibitória frente ao crescimento planctônico de *Cryptococcus* spp.
- 2) *Cryptococcus neoformans/gattii*, seja de origem humana ou animal, apresenta o mesmo perfil de produção de biofilme como fator de virulência e resistência *in vitro*.
- 3) A prometazina e clorpromazina apresentam ação inibitória na formação e no biofilme maduro de *Cryptococcus* spp.
- 4) A prometazina e clorpromazina são capazes de reduzir a biomassa e a atividade metabólica dos biofilmes de *Cryptococcus* spp.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito das fenotiazinas prometazina e clorpromazina sobre células planctônicas e biofilmes de *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* de origem humana e animal.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a sensibilidade das células planctônicas e dos biofilmes de *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* frente à prometazina e clorpromazina.
- 2) Investigar o efeito da prometazina e clorpromazina sobre a formação e maturação dos biofilmes de *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*.
- 3) Avaliar a estrutura do biofilme maduro de *Cryptococcus neoformans* após o uso de prometazina e clorpromazina em diferentes concentrações.



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Local do estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), pertencente ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). A análise morfológica dos biofilmes por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada na Central Analítica, pertencente ao Departamento de Física da UFC.

### 5.2 Micro-organismos

Neste estudo foram utilizados isolados clínicos e animais de *C. neoformans latu sensu* (n=14) e *C. gattii latu sensu* (n=6). Todas as cepas pertencem à micoteca do CEMM, onde estão mantidas a 4 °C em solução salina a 0,9%. Foram repicadas em Ágar Batata e armazenadas em estufa por 48 horas a 35°C para verificação da ausência de contaminação. Uma cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle nos experimentos de sensibilidade antifúngica. Para a produção de biofilme foi utilizada como controle *C. albicans* ATCC 10231. A manutenção das cepas foi realizada com repiques em tubos de ensaio contendo Ágar Batata (Himedia®). As cepas eram incubadas por 48 horas a 35°C antes de cada experimentação. As cepas empregadas na pesquisa, bem como suas características de identificação e origem de isolamento, estão expostas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Identificação, espécie, genótipo e origem de isolamento das cepas de *Cryptococcus* spp. utilizadas neste estudo.

Cód. CEMM	Isolamento	Espécie	Genótipo
03-1-104	Humano - LCR	<i>C. deuterogattii</i>	VGI
03-1-105	Humano - LCR	<i>C. neoformans</i>	VNI
03-1-108	Humano - Escarro	<i>C. neoformans</i>	VNI
03-1-109	Humano- Escarro	<i>C. gattii s. s.</i>	VGI
03-1-110	Humano- LCR	<i>C. deuterogattii</i>	VGII
03-1-112	Humano-LCR	<i>C. deuterogattii</i>	VGII
03-1-113	Humano - LCR	<i>C. neoformans</i>	VNI
03-1-114	Humano - LCR	<i>C. neoformans</i>	VNI
03-1-115	Humano - LCR	<i>C. neoformans</i>	VNI
03-1-116	Humano - LCR	<i>C. deuterogattii</i>	VGII
03-1-117	Humano - LCR	<i>C. deuterogattii</i>	VGII
03-1-118	Humano - LCR	<i>C. neoformans</i>	VNI
03-1-119	Humano - Urina	<i>C. neoformans</i>	VNI
03-1-120	Humano - LCR	<i>C. neoformans</i>	VNI
03-1-121	Humano - LCR	<i>C. neoformans</i>	VNI
03-1-123	Humano - LCR	<i>C. neoformans</i>	VNI
04-6-188	Animal	<i>C. neoformans</i>	Nd / Nd
04-6-189	Animal	<i>C. neoformans</i>	Nd / Nd
04-6-190	Animal	<i>C. neoformans</i>	Nd / Nd
Total: 20			

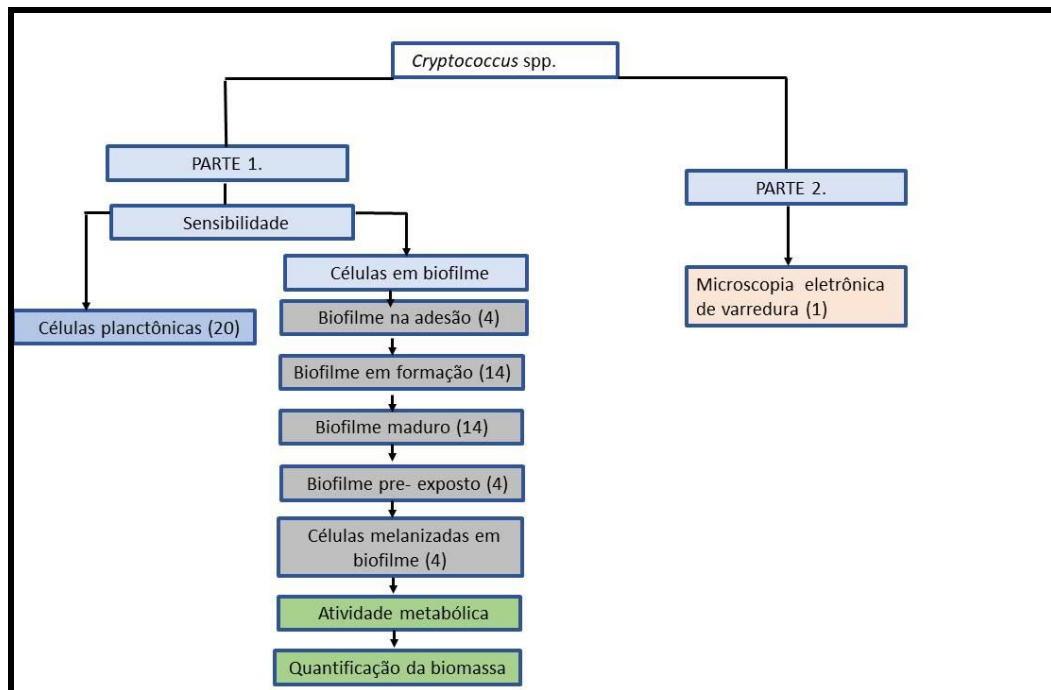
Nd Não determinado; LCR: Líquido cefalorraquidiano.

### 5.3 Desenho experimental

No presente estudo, Foi avaliado o efeito das fenotiazinas prometazina e clorpromazina diante da forma planctônica e do biofilme de *Cryptococcus neoformans/gattii*. Alíquotas da PMZ e CLOR foram estocadas a -20 °C e diluídas no momento de uso em meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Co., EUA), tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS, Sigma Chemical Co., EUA). Até o momento do experimento analisou-se o efeito das fenotiazinas isoladas frente a células planctônicas de *C. neoformans* e *C. gattii*, bem como ante os biofilmes

de ambas as espécies. Para tanto, foram triadas as cepas que mostravam máxima produção de biofilme *in vitro* por meio dos testes do cristal violeta e XTT, descritos no item 5.4.2.2

Finalmente, foi analisado o efeito da prometazina e clorpromazina sobre os biofilmes de *Cryptococcus* spp. pela microscopia eletrônica de varredura. A figura 12 ilustra as principais etapas experimentais empregadas no estudo. A Tabela 4 ilustra as diferentes concentrações das drogas utilizadas na fase experimental (pagina 53).



**Figura 12** - Organograma das principais etapas experimentais do estudo. Os números entre parênteses representam a quantidade de cepas utilizadas em cada experimento na presença das fenotiazinas prometazina e clorpromazina.

Drogas isoladas	Planctônico	Adesão e Biofilme em formação	Biofilme maduro
Prometazina	0.5–256 (µg/mL)	8–64 (µg/mL)	128–1024 (µg/mL)
Clorpromazina	0.125–64 (µg/mL)	8–64 (µg/mL)	128–1024 (µg/mL)
Anfotericina B	0.0322–16 (µg/mL)		8–64 (µg/mL)
Fluconazol	0.125–64 (µg/mL)		32–256 (µg/mL)
5 –Fluorocitosina	0.0625–16 (µg/mL)		

**Tabela 4** – Concentrações das drogas prometazina e clorpromazina (mg/mL) AMB: Anfotericina B. FLC: Fluconazol. 5– FC: Fluorocitosina (µg/mL) testadas frente à forma planctônica e biofilme de *Cryptococcus* spp.

#### 5.4 Efeito das fenotiazinas prometazina e clorpromazina frente à forma planctônica e ao biofilme de *Cryptococcus neoformans/gattii*.

##### 5.4.1 Células planctônicas

O teste de sensibilidade das cepas do Complexo *C. neoformans/C. gattii* em crescimento planctônico foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo, conforme o documento M27-A3 (CLSI, 2008). As drogas utilizadas foram anfotericina B (AMB), fluconazol (FLU) e a 5-fluorocitosina (5 –FC) bem como as fenotiazinas prometazina (PMZ) e clorpromazina (CLOR). Os antifúngicos (ATF) foram testados nas concentrações preconizadas pelo documento citado anteriormente, com intervalos que variaram de 0,125 – 64 µg/mL para FLU e 0,0313 – 16 µg/mL para os demais antifúngicos. A prometazina foi testado em concentrações que variaram de 0,5 – 256µg/mL (Brilhante et al., 2017) e 0,125 – 64 µg/mL para clorpromazina. (ROSATTO et al., 2016). Os isolados foram previamente semeados em Ágar Batata e incubados a 35°C por 48 horas. Foi preparado um inóculo fúngico em solução salina estéril (0,9 % NaCl) ajustando a turbidez da suspensão à escala 0,5 de McFarland. A suspensão fúngica foi submetida à diluição de 1:50 e posteriormente 1:20 em meio RPMI-1640 tamponado com 0,165 M de MOPS a pH 7,0. Aliquotas de 100 µL do inóculo final foram adicionadas às placas já contendo 100 µL de RPMI-1640 suplementado das drogas, distribuídas em diluições seriadas. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. As leituras dos pontos de corte das drogas foram determinadas de acordo com

documento M27-A3. Para a prometazina e clorpromazina, o ponto de corte foi definido como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento visível.

#### **5.4.2 Células associadas em biofilme**

Inicialmente, foi realizada uma triagem por meio de ensaio de viabilidade e de coloração de biomassa a fim de detectar as melhores cepas produtoras de biofilme para serem empregadas nos testes com prometazina e clorpromazina, conforme descrito a seguir no item 5.4.2.2. O efeito das fenotiazinas foi avaliado sobre a adesão, capacidade de formação de biofilme e sobre o biofilme formado pelas cepas de *Cryptococcus* spp.

##### **5.4.2.1 Efeito das fenotiazinas sobre células não aderidas**

Após o contato inicial da PMZ e CLOR na adesão celular de *Cryptococcus* spp., foram utilizadas 4 cepas representativas (03-1-105, 03-1-115, 03-1-118 e 03-1-121) e avaliado o efeito das fenotiazinas nas células não aderidas. Os sobrenadantes foram centrifugados por 1 minuto a 10.000 rpm para obtenção do pellet, as células foram lavadas com 200 µl de PBS para remoção dos resquícios de PMZ e CLOR. Posteriormente, ocorreu uma nova etapa de centrifugação por 1 minuto a 10.000 rpm, o sobrenadante contendo PBS foi desprezado e avaliado a atividade metabólica foi avaliada pelo ensaio de redução do XTT segundo Martinez e Casadevall (2006), com alterações. As células foram ressuspensas em agitador automático e incubadas por 180 minutos a 35 °C. Todo o processo foi realizado ao abrigo da luz direta. Passado o período de incubação, as soluções foram transferidas para placa de 96 cavidades de fundo chato e realizado leitura em espectrofotômetro a 492 nm.

##### **5.4.2.2 Efeito das fenotiazinas prometazina e clorpromazina frente à formação do biofilme de *Cryptococcus* spp.**

Para a avaliação frente à formação e ao biofilme formado de *Cryptococcus* spp. (n=14) adotou-se a metodologia estabelecida por Cordeiro et al. (2016). Inicialmente, foi realizada uma triagem para detecção das melhores cepas a serem utilizadas no teste com prometazina e clorpromazina. Para tanto, as estirpes fúngicas foram cultivadas em Ágar Batata por 48 horas a 35°C. Decorrido esse tempo, as células foram suspensas em meio RPMI-1640 tamponado

com MOPS, previamente ajustado o pH para 7,0, até atingir a turbidez correspondente à escala 4 de McFarland. Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  dos inóculos foram incubadas nos poços das microplacas de 96 poços de fundo chato e incubadas por 72 horas a 35°C. Em seguida, foram feitas análises de viabilidade e produção de biomassa dos biofilmes.

A viabilidade dos biofilmes em formação e formados foi avaliada pela técnica colorimétrica de redução do XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H- hidróxido de tetrazólio), segundo Martinez e Casadevall (2006), com modificações. O XTT (Sigma®) foi previamente preparado em uma solução com concentração final de 1 mg/mL. A solução foi esterilizada por filtração e estocada a - 20°C até o momento do uso. Adicionalmente, foi preparada uma solução de Menadiona (Sigma®) a 1 mM em acetona imediatamente antes de cada ensaio. Depois de 48 horas de incubação a 35°C, as placas contendo os biofilmes foram lavadas por duas vezes com PBS para a remoção de resíduos de células não aderidas. Em seguida, os poços das placas contendo os biofilmes foram preenchidos com uma solução contendo 50  $\mu\text{L}$  de PBS estéril, 75  $\mu\text{L}$  da solução de XTT e 6  $\mu\text{L}$  da solução de Menadiona. Todo o processo foi realizado ao abrigo da luz direta. As placas foram incubadas a 35°C por 3 horas, também ao abrigo da luz. Após o período de incubação, a solução foi transferida para novas placas de microdiluição estéreis e realizada leitura em espectrofotômetro a 492 nm.

Para quantificação da biomassa dos biofilmes produzidos, utilizou-se a técnica colorimétrica com o Cristal Violeta (CV) segundo Peeters, Nelis e Coenye (2008), com adaptações. Decorrido o período de incubação, as placas foram lavadas como mencionado anteriormente, os biofilmes foram desidratados com metanol puro e as placas mantidas em temperatura ambiente. Os poços das placas foram preenchidos com 0,03% de CV por 20 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada e os biofilmes descoloridos pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético a 33%. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 590 nm.

As cepas selecionadas foram analisadas frente à formação dos biofilmes em presença da prometazina e clorpromazina para tanto, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de RPMI contendo a prometazina e clorpromazina em concentrações duplicadas foi adicionado junto a 100  $\mu\text{L}$  dos inóculos, como descrito anteriormente. As placas foram incubadas por 72 horas a 35° C. A capacidade de inibição da formação dos biofilmes frente à prometazina e clorpromazina foi

analisada apenas pelo ensaio do XTT e o resultado expresso em porcentagem de viabilidade em relação aos controles sem nenhum tratamento.

#### 5.4.2.3 Efeito das fenotiazinas clorpromazina e prometazina frente ao biofilme formado de *Cryptococcus* spp.

A avaliação da atividade da fenotiazina prometazina e clorpromazina sobre o biofilme formado também foi avaliada frente às mesmas cepas utilizadas no experimento ante à formação dos biofilmes (Cordeiro et al. 2016). Os biofilmes foram formados a partir de inóculos previamente descritos no item 5.4.2.2. A partir dos inóculos feitos em RPMI-1640, 200 µL desses foram incubados nos poços de microplacas de 96 cavidades de fundo chato e as placas foram incubadas por 72 horas, a 35°C. Depois da incubação, os sobrenadantes foram descartados, as placas foram lavadas por duas vezes com PBS para a remoção de resíduos de células não aderidas e os poços foram novamente preenchidos com 200 µL de RPMI-1640 contendo as fenotiazinas prometazina e clorpromazina, nas mesmas concentrações descritas na tabela 4. Depois de 72 horas de cultivo a 35°C, as placas foram lavadas e analisadas pela técnica de redução do XTT, conforme descrito no item 5.4.2.2

#### 5.4.2.4 Formação de biofilme de *Cryptococcus* spp. pré-expostos com as fenotiazinas

Para verificar a capacidade de formação do biofilme de *Cryptococcus* spp., após contato com as fenotiazinas PMZ e CLOR, foram utilizadas 4 cepas representativas (03-1-105, 03-1-115, 03-1-118 e 03-1-121). Após o período de maturação com PMZ e CLOR, as células foram lavadas com 200 µl de PBS, adicionado 200 µl RPMI1640 e a placa foi incubada por 48 horas a 35 °C. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram removidos e os biofilmes lavados com 200 µl de PBS. A capacidade de formação do biofilme foi avaliada pelo ensaio de redução do XTT, como descrito no item 5.4.2.2 (MARTINEZ e CASADEVALL, 2006).

#### 5.4.2.5 Efeito das fenotiazinas clorpromazina e prometazina frente ao biofilme melanizado de *Cryptococcus* spp.

Inicialmente foi realizada uma triagem para detecção das cepas produtoras de melanina a serem empregadas na sensibilidade no biofilme. As cepas foram repicadas em Ágar Batata por 48 horas a 35°C e em seguida, foi feito repique em meio a Ágar Semente de Níger e as placas incubadas por 72 horas a 30°C. As cepas foram classificadas como produtoras de melanina se fosse evidenciada pigmentação de coloração castanho-marrom após o período de incubação, ou não produtoras, se fosse observado ausência de pigmentação. Controle de crescimento do meio utilizado foi realizado com cepa de *C. albicans*. Posteriormente, as cepas de *Cryptococcus* spp. foram semeadas por 7 dias em meio mínimo quimicamente definido (6.0mM. tiamina, 30 mM de glucose, 13 mM de glicina, 10 mM de MgSO 7H<sub>2</sub>O e 29,8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, l-DOPA: 10 mM). Adotou-se a metodologia estabelecida por Martinez et al., (2010), com adaptações. Os biofilmes formados foram feitos conforme previamente descrito no item 5.4.2.2.

#### 5.4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura

Os biofilmes de *Cryptococcus neoformans*. (n =1) após exposição a PMZ e CLOR foram analisados por MEV, de acordo com protocolo descrito por Brilhante et al.( 2017), os biofilmes foram preparados como descrito no item anterior 5.4.2.2. Após a incubação, o sobrenadante foi retirado e as lamínulas Thermanox<sup>TM</sup> contendo os biofilmes foram lavadas com tampão cacodilato 0,15 M com azul de alcian (0,1%) duas vezes. Biofilmes foram, então, recobertos com glutaraldeído (2,5% em tampão cacodilato 0,15 M) e incubados *overnight* a 4 °C. Posteriormente, os biofilmes foram lavados duas vezes com tampão cocodilato por 5 minutos cada lavagem e as lamínulas foram submetidas à desidratação por lavagens seriadas com álcool em concentrações ascendentes (30% 50%, 70%, 80%, 95% e 100%) duas vezes por 10 minutos cada concentração. As lamínulas foram secadas à temperatura ambiente e, então, recobertas com hexametildisilazano (*Polysciences Europe*, Alemanha) por 30 minutos. Após esse período, o hexametildisilazano foi retirado e as lamínulas foram secas em dessecador por 24 h. As lamínulas foram recobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas em Microscópio Eletrônico FEI.



## 5.5 Análises estatísticas

Os resultados da primeira parte experimental foram analisados através de ANOVA e as médias foram comparadas utilizando o teste *post hoc* de Tukey. Para comparar as CIMs das drogas antifúngicas frente a células planctônicas e biofilme. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Atividade antifúngica da prometazina e clorpromazina contra células planctônicas e biofilmes de espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii*.

#### 6.1.1 Sensibilidade das células planctônicas

A sensibilidade das células planctônicas do Complexo *Cryptococcus neoformans*/C. *gattii* frente a PRM, CLOR à AMB, FLUC E 5- FC está descrita na Tabela 5.

No estudo realizado todas as cepas foram sensíveis às fenotiazinas. Para PRM, os CIMs obtidos variaram de 8–32 µg/mL, enquanto para CLOR os CIMs de sensibilidade variaram de 4-16 µg/mL Para os antifúngicos testados, AMB, FLC e 5– FC os CIMs variam de 0,25-2 µg/mL, 1- 32 µg/mL e de 0,25-4 µg/mL, respectivamente.

**Tabela 5** – Concentração inibitória mínima de anfotericina B, fluconazol, prometazina e clorpromazina frente espécies de *Cryptococcus* spp.

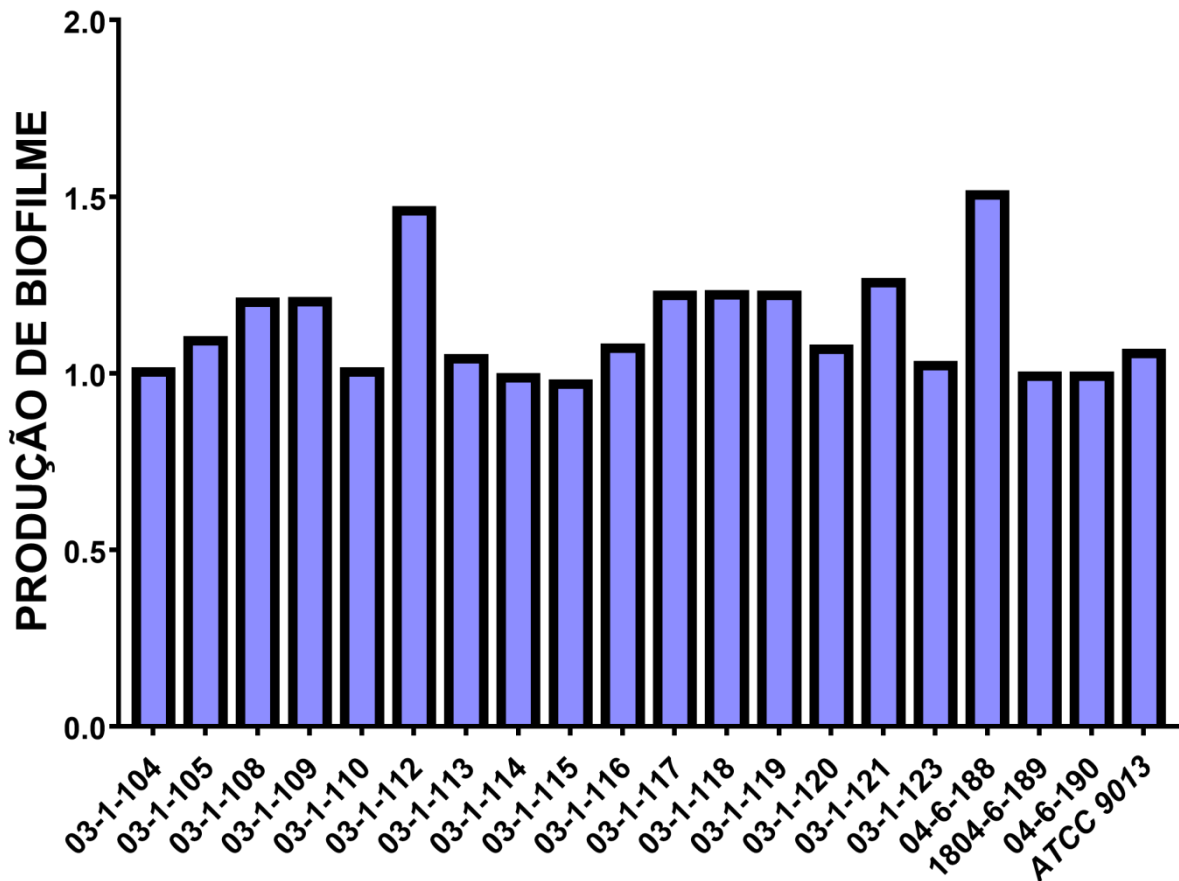
Espécies	Cepas	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)				
		AMB	FLC	5-FC	PRM	CLOR
<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	CEMM 03-1-104	2	2	4	32	8
	CEMM 03-1-112	0.5	4	2	32	16
	CEMM 03-1-116	1	16	2	32	4
	CEMM 03-1-110	0.5	8	4	16	8
	CEMM 03-1-117	0.5	4	2	32	8
<i>Cryptococcus gattii stricto sensu</i>	CEMM 03-1-109	0.25	1	0.25	32	8
<i>Cryptococcus neoformans stricto sensu</i>	CEMM 03-1-105	2	2	4	16	16
	CEMM 03-1-115	1	16	4	16	8
	CEMM 03-1-118	0.5	4	4	32	16
	CEMM 03-1-121	1	16	4	32	8
	CEMM 03-1-123	0.5	32	4	32	16
	CEMM 03-1-113	0.5	32	4	32	16
	CEMM 03-1-114	2	2	1	32	16
	CEMM 03-1-119	0.5	16	4	16	8
	CEMM 03-1-120	1	2	2	32	16
	CEMM 03-1-108	0.5	8	4	32	16
	CEMM 04-6-188	0.5	4	2	8	8
	CEMM 04-6-189	0.25	2	2	8	8
	CEMM 04-6-190	0.5	8	2	16	8
ATCC 90113	0.5	2	2	32	16	

**Notas:** AMB: Anfotericina B. FLC: Fluconazol. 5– FC: Flurocitosina. PRM: Prometazina. CLOR: Clorpromazina. CIM<sub>50%</sub>: concentração inibitória mínima referente a 50%; CIM<sub>100%</sub>: concentração inibitória mínima referente a 100%. As CIMs são expressas em µg/mL.

### 6.1.2 Células associadas em biofilme

#### 6.1.2.1 Formação de biofilme

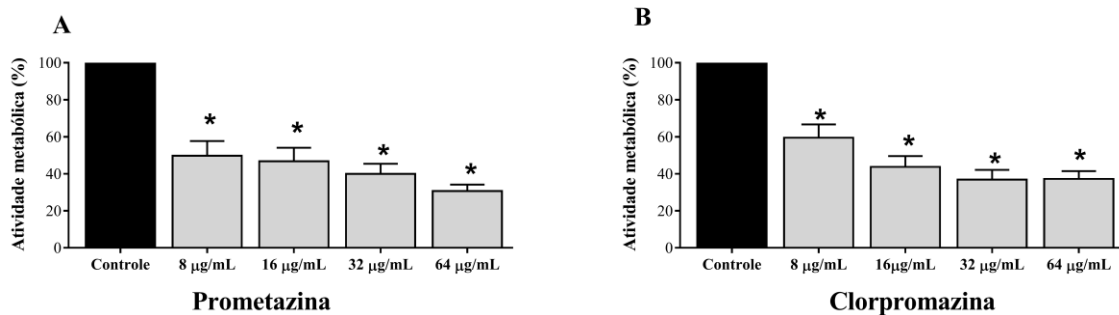
Todas as cepas foram capazes de formar biofilme, *in vitro*, em placas de poliestireno, sendo classificados como fortes produtoras de biofilme, com densidade óptica (DO) maior que quatro vezes o ponto de corte (DOc), segundo Stepanovic et al. (2000). Os resultados sobre a formação de biofilme estão descritos na (Figura 13).



**Figura 13** – Capacidade de formação de biofilme do complexo *Cryptococcus neoformans/gattii*. Metodologia de quantificação de biomassa por cristal violeta, dados expressos em absorbância a 540 nm.

### 6.1.2.2 Efeito das fenotiazinas sobre células não aderidas

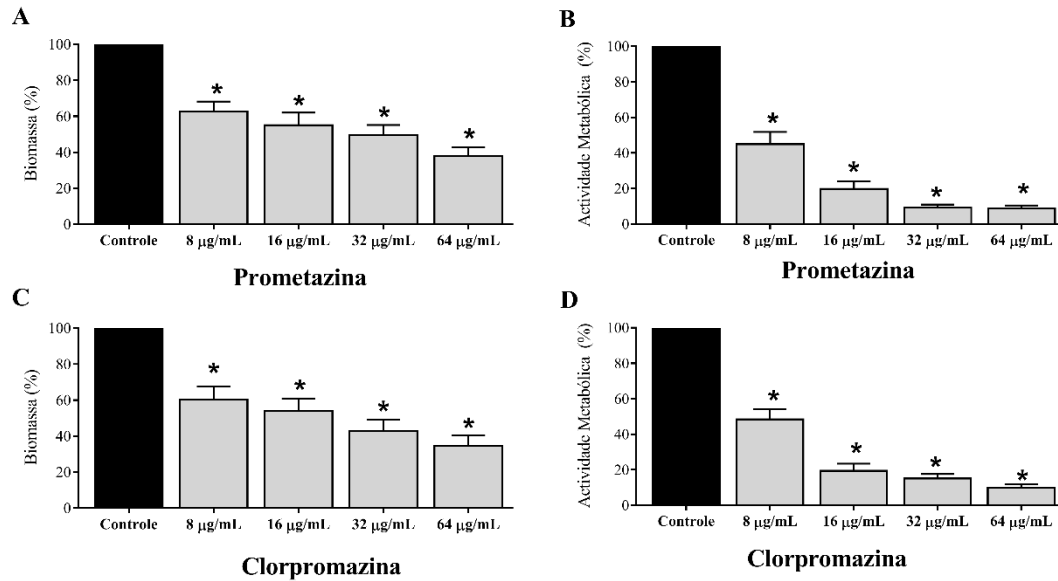
O efeito da PMZ e CLOR nas células não aderidas de *Cryptococcus* spp., foi descrito na (Figura 14). As cepas evidenciaram uma redução na atividade metabólica referente a 50%, 70% respectivamente, nas concentrações de 16 e 64  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 14** – Efeito das fenotiazinas prometazina e clorpromazina sobre as células não aderidas durante a formação do biofilme de *Cryptococcus* spp. (n = 4). Após 180 minutos de adesão celular na presença das fenotiazinas em diferentes concentrações, as células não aderidas foram coletadas e a viabilidade avaliada por XTT. O controle de crescimento livre de droga está mostrado nas barras pretas. Resultados expressos em percentual (média  $\pm$  desvio padrão). Asteriscos representam diferença estatística significativa quando comparadas ao controle livre de drogas ( $p < 0,05$ ).

### 6.1.2.3 Efeito da prometazina e clorpromazina sobre a formação de biofilme de *Cryptococcus* spp.

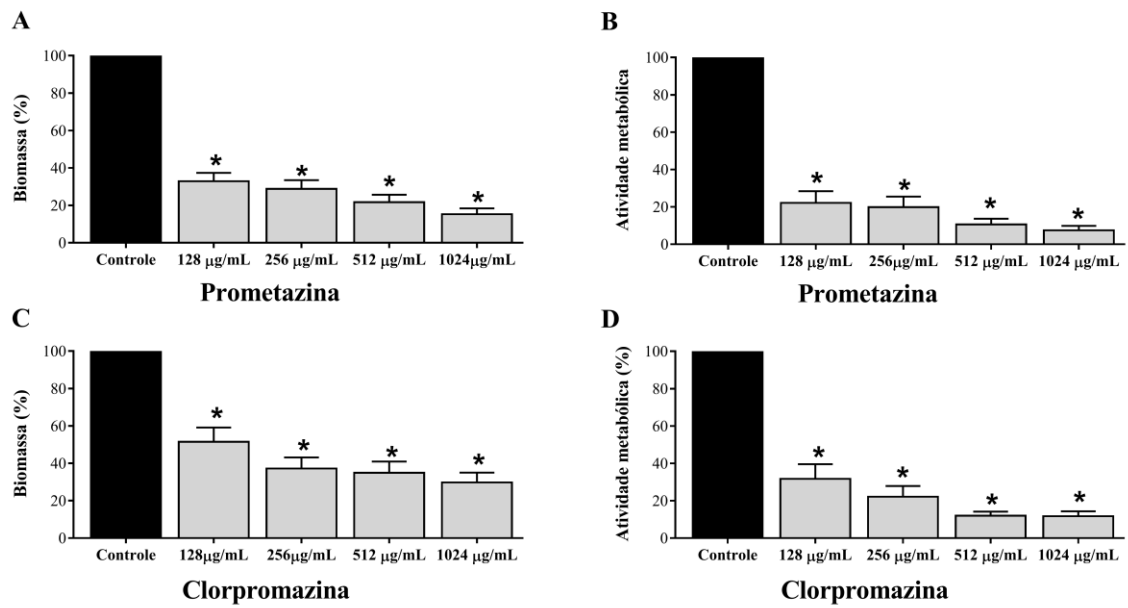
Os biofilmes de *Cryptococcus* spp. formados na presença das fenotiazinas prometazina e clorpromazina apresentaram reduções gradativas na biomassa e na atividade metabólica. A biomassa foi reduzida em 60% na concentração de 64  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto a atividade metabólica foi reduzida em 90%. Como não houve diferenças entre *C. neoformans* e *C. gattii*, os resultados de ambas as espécies foram expressos juntos (Figura 15).



**Figura 15** – Efeito da prometazina e clorpromazina na formação de biofilme de *Cryptococcus* spp. (n = 14). A e C: Biomassa. B e D: Atividade metabólica. Barras pretas representam controle de crescimento livre de drogas; Barras cinzas representam células expostas a fenotiazinas. Asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao controle de crescimento sem drogas ( $p < 0,05$ ).

#### 6.1.2.4 Efeito da prometazina e clorpromazina sobre os biofilmes formados de *Cryptococcus* spp.

A exposição dos biofilmes formados de *Cryptococcus* spp. às fenotiazinas gerou uma redução significativa da biomassa e da atividade metabólica. As reduções de biomassa chegaram a 65% para prometazina e 80% para clorpromazina, enquanto as reduções de atividade metabólica atingiram até 90% na concentração 1024 µg/mL com relação ao controle não tratado ( $p < 0.05$ ) (Figura 16).

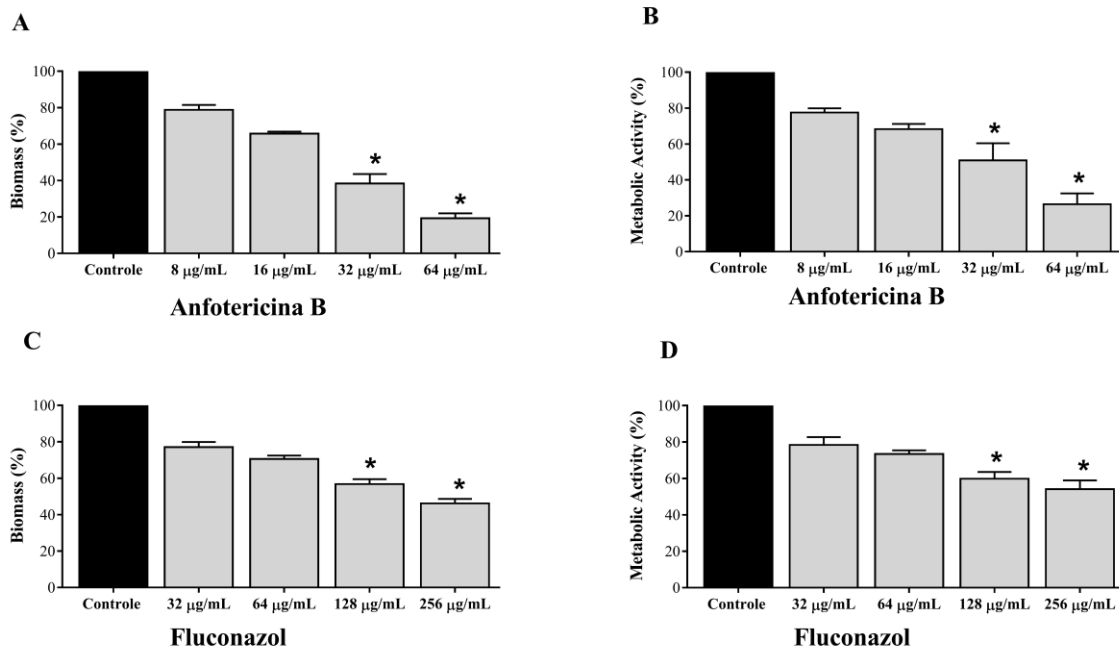


**Figura 16** – Efeito da prometazina e clorpromazina no biofilme formado por *Cryptococcus* spp. (n = 14).

A e C: Biomassa. B e D: Atividade metabólica. Barras pretas representam controle de crescimento livre de drogas; Barras cinzentas representam células expostas a fenotiazinas. Asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao controle de crescimento sem drogas ( $p < 0,05$ ).

#### 6.1.2.5 Efeito dos antifúngicos clássicos sobre os biofilmes formados de *Cryptococcus* spp.

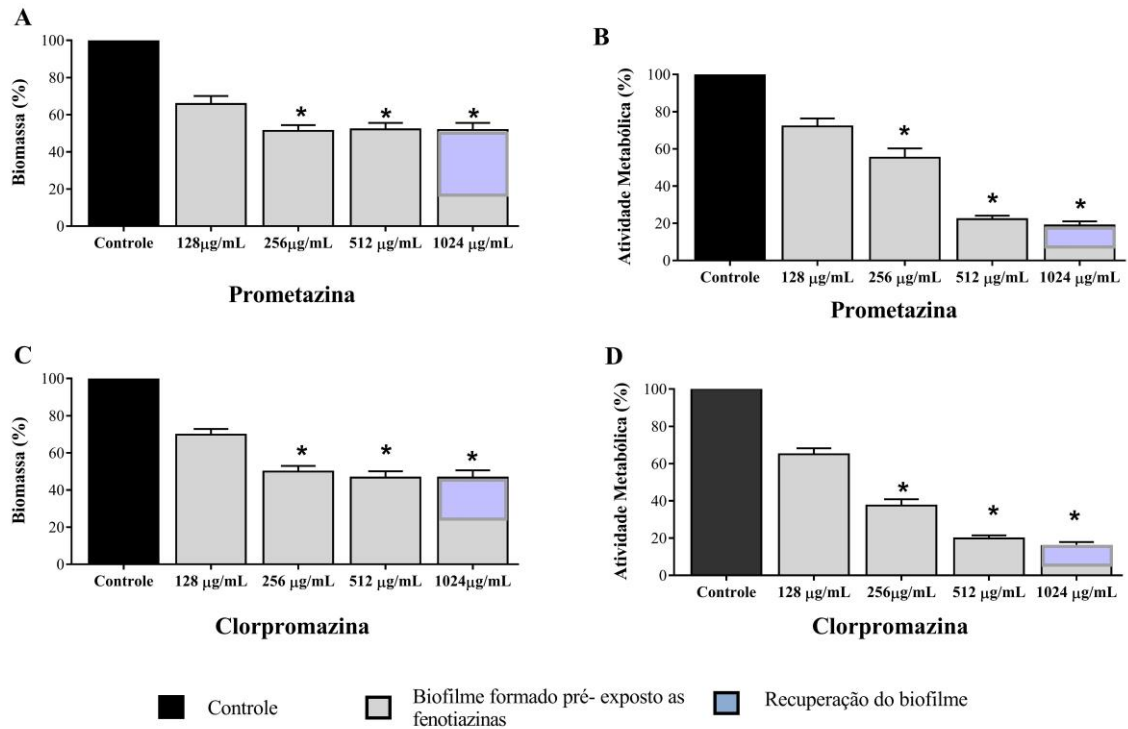
Os biofilmes de *Cryptococcus* spp. expostos a anfotericina B e fluconazol apresentaram reduções na biomassa em 80% para a anfotericina B e 60% para o Fluconazol, enquanto a atividade metabólica foi reduzida em torno de 70% e 50% nas concentrações 64 µg/mL e 256 µg/mL, respectivamente, quando comparados ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ) (Figura 17).



**Figura 17** – Efeito da anfotericina B e fluconazol no biofilme formado por *Cryptococcus* spp. (n = 14). A e C: Biomassa. B e D: Atividade metabólica. Barras pretas representam controle de crescimento livre de drogas; Barras cinzentas representam células expostas a fenotiazinas. Asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao controle de crescimento sem drogas ( $p < 0,05$ ).

#### 6.1.2.6 Biofilme formados do *Cryptococcus* spp. pré expostos com as fenotiazinas prometazina e Clorpromazina.

A formação do biofilme de *Cryptococcus* spp. pré - exposto as fenotiazinas prometazina e clorpromazina apresentou recuperação na biomassa de 35% nos biofilmes tratados com PMZ e de 20% nos biofilmes tratados com CLOR em relação ao biofilme maduro na concentração 1024 µg/mL. Já a atividade metabólica aumentou em 10% em relação ao biofilme maduro ( $p < 0,05$ ) (Figura 18).

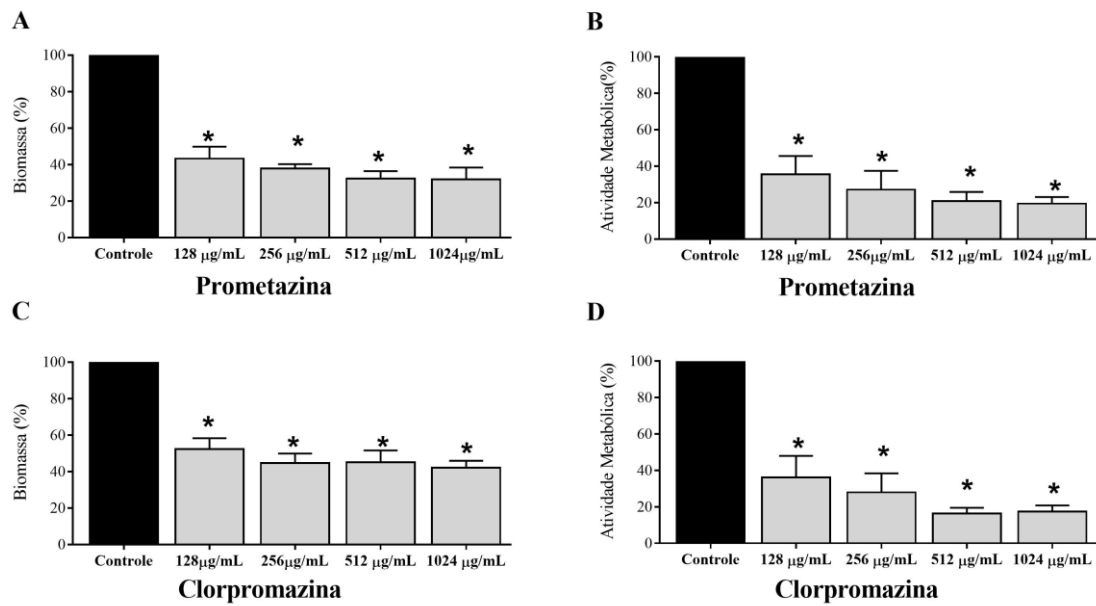


**Figura 18** – Biomassa e atividade metabólica dos biofilmes de *Cryptococcus* spp. (n=4). Biofilme formado pré-exposto as fenotiazinas. A e C: Biomassa B e D: Atividade metabólica. As barras pretas representam o controle do crescimento livre de drogas; As barras cinza representam células expostas a prometazina e clorpromazina. Asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes quando comparadas ao controle de crescimento sem drogas ( $p < 0,05$ ).

#### 6.1.2.7 Efeito das fenotiazinas sobre os biofilmes melanizados de *Cryptococcus* spp.

A exposição dos biofilmes melanizados de *Cryptococcus* spp. às fenotiazinas gerou uma redução significativa da biomassa e da atividade metabólica. As reduções de biomassa chegaram a 65% para prometazina e 60% para clorpromazina, enquanto as reduções de atividade metabólica atingiram até 80% nas concentrações 512 µg/mL e 1024 µg/mL com relação ao controle não tratado ( $p < 0,05$ ) (Figura 19).

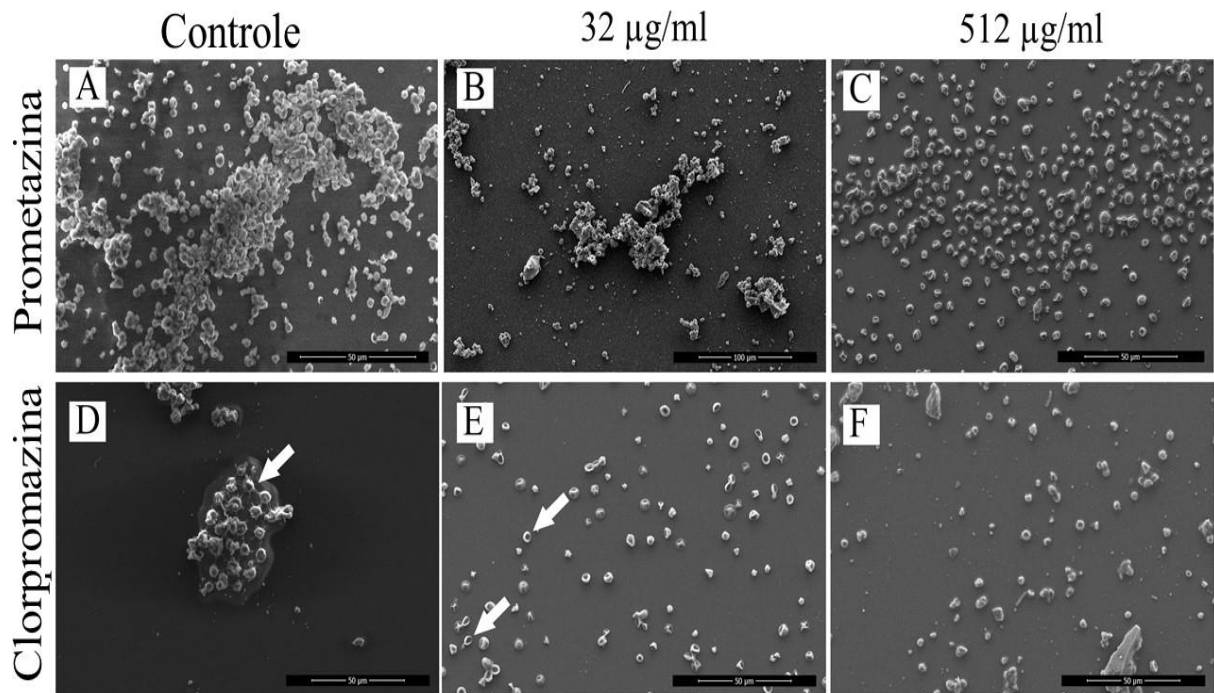




**Figura 19** – Efeito da prometazina e clorpromazina no biofilme maduro melanizados de *Cryptococcus* spp. (n = 4). A e C: Biomassa. B e D: Atividade metabólica. Barras pretas representam controle de crescimento livre de drogas; as barras cinza representam células expostas à fenotiazinas. Asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes quando comparadas ao controle de crescimento sem drogas (p < 0,05).

#### 6.1.2.8 Efeito das fenotiazinas na estrutura do biofilme

Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a estrutura do biofilme de *C. neoformans* CEMM 03-1-113. O biofilme maduro livre de drogas revelou um biofilme de microarquitetura, consistindo em aglomerados de células compactas, conectadas por matriz extracelular de polissacarídeo (Figura 20 A, D). Os biofilmes tratados com 32 µg/mL de prometazina e clorpromazina (Figura 20 B, E) mostraram uma depleção no número de células e uma diminuição no material extracelular. Biofilmes tratados com 512 µg/mL (Figura 20 C, F) apresentaram perda de organização estrutural e redução no número de células quando comparados ao controle não tratado, além de alterações morfológicas nas células que foram colapsadas.



**Figura 20**– Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de *Cryptococcus* sp. após 72h de incubação com diferentes concentrações de prometazina e clorpromazina. (A) Biofilme maduro não tratado (controle). (B) Observe a alteração na estrutura do biofilme e a diminuição no número de células. (C) Redução do número de células, perda da estrutura do biofilme. (D) Blastoconídios de biofilme maduros embebidos e conectados pela matriz extracelular de polissacarídeo (setas) (controle). (E) Observe a ruptura completa da estrutura do biofilme, onde são observadas células morfologicamente alteradas (setas). (F) Observe a estrutura desorganizada e fragmentada do biofilme. Ampliação: 2500x. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

## 7 DISCUSSÃO

A criptococose é um sério problema de saúde pública mundial, acometendo, sobretudo, os indivíduos imunocomprometidos. Estima-se que ocorrem quase um milhão de casos anuais de meningite por *Cryptococcus* spp. associados à aids em todo o mundo. Desses, mais de 900.000 pessoas vêm à óbito em decorrência dessa doença (PONZIO et al., 2018; SPEC; POWDERLY, 2018). Apesar do fato de que as drogas utilizadas para o tratamento da criptococose têm uma boa atividade e a maioria das cepas de *Cryptococcus* spp. é sensível aos antifúngicos de uso terapêutico, diversos estudos têm reportado isolados resistentes *in vitro*, além de falhas terapêuticas entre os pacientes com as formas graves da criptococose (ORSI et al., 2009; SANGUINETTI et al., 2006). Essa resistência associada à ação terapêutica limitada estimula a busca de compostos com antifúngicos, estudos realizados com prometazina e clorpromazina demonstraram atividade do efeito antifúngico destas drogas em outros fungos, como *Candida* spp. (CASTELO-BRANCO et al., 2013; GALGÓCZY et al., 2011). Assim, a busca de novas alternativas de tratamento faz-se necessária. Nessa perspectiva, esse é o primeiro estudo que investigou o efeito das fenotiazinas prometazina e clorpromazina frente à sensibilidade no biofilme *in vitro* em cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*.

A primeira etapa desse estudo foi investigar a influência das fenotiazinas prometazina e clorpromazina sobre a sensibilidade *in vitro* de células planctônicas de *Cryptococcus* spp. Para tanto, foi determinada a CIM das fenotiazinas frente à *Cryptococcus* spp. constatando-se que as fenotiazinas inibiram em 100% o crescimento visível de *Cryptococcus* spp. Ambas, fenotiazinas prometazina e clorpromazina, apresentaram efeito inibitório contra as células planctônicas do complexo *Cryptococcus neoformans /Cryptococcus gattii*, a clorpromazina apresentou CIMs mais baixos em comparação à prometazina. Os CIMs obtidos na sensibilidade planctônica para prometazina neste trabalho foram de 8 a 32 µg/mL, vale destacar que em outros trabalhos realizados por nosso grupo foi observado que a prometazina foi capaz de inibir *Candida tropicalis*, inclusive alterar o perfil de resistência destas leveduras (BRILHANTE et al., 2018). A clorpromazina, por sua vez, apresentou CIMs de 4-16 µg/ml, frente a *Cryptococcus* spp. Esses resultados corroboram com os obtidos por Rossato et al. (2016) para *C. neoformans stricto sensu*, e com os obtidos por Galgóczy et al. (2011) para o gênero *Candida* spp., que também encontraram CIMs para a clorpromazina de 2-16 µg/mL.

No presente estudo, foi demonstrado que as fenotiazinas prometazina e clorpromazina possuem atividade antifúngica frente a células planctônicas de *Cryptococcus* spp. A alta

eficiência das fenotiazinas indica uma possível alteração na integridade da membrana citoplasmática e função mitocondrial da célula de levedura (BRILHANTE et al., 2018). Vale ressaltar que a prometazina e clorpromazina possuem estruturas químicas semelhantes, com átomos de nitrogênio que dão estabilidade à molécula, o qual é responsável pela sua ação antimicrobiana, alterando o gradiente de prótons e inibindo as sínteses de ATP (VARGAS et al., 2017). Diante disso, além de avaliar as fenotiazinas, nosso estudo de sensibilidade foi conduzido com AMB e FLUC. Os testes planctônicos mostraram CIM para AMB condizente com a literatura, com concentrações variando entre 0,5 a 2 µg/mL (Cordeiro et al., 2016).

Embora não existam estudos sobre a atividade antifúngica das fenotiazinas prometazina e clorpromazina frente à sensibilidade no biofilme de *Cryptococcus* spp., sabe-se que esse fármaco possui ampla atividade antifúngica na forma planctônica frente a diversos fungos. Os pesquisadores Rosato et al., (2016), Galgóczy et al. (2011), Brilhante et al., (2018), Al-fattani et al.,(2004) demonstraram seu efeito frente aos seguintes fungos: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Pythium debaryanum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Coniophora puteana*. Assim como em células planctônicas, as fenotiazinas também desempenham papel fundamental em biofilmes fúngicos e biofilmes microbianos são uma das principais causas de persistência em infecções humanas, pois são menos sensíveis à maioria dos medicamentos atualmente disponíveis (Ramage et al., 2012). Nessa perspectiva, a etapa subsequente do presente estudo foi investigar a influência das fenotiazinas frente à sensibilidade *in vitro* de biofilmes produzidos por cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*. Poucos trabalhos investigaram estratégias de controle de biofilmes produzidos por *Cryptococcus* spp. de amostras clínicas e animais. Nosso grupo investigou o papel da combinação das drogas inibidoras da síntese de proteínas Hsp90 frente às células planctônicas e biofilmes de estirpes do Complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, com resultados promissores (CORDEIRO et al., 2016).

Quanto à produção de biofilme, todas as cepas do complexo *Cryptococcus neoformans/gattii* foram capazes de aderir firmemente em placas de poliestireno e formar biofilmes fortes. Esse atributo pode representar um fator agravante nas infecções por *Cryptococcus* spp., uma vez que as células sésseis no biofilme podem apresentar baixa sensibilidade aos antifúngicos (RAMAGE et al., 2012). A princípio, foi analisada a capacidade das fenotiazinas em inibir a adesão celular de *Cryptococcus* spp., principal etapa considerada como pré-

requisito para formação de biofilmes (RAMAGE et al., 2012). Os resultados observados mostraram que as fenotiazinas reduziram significativamente o processo de adesão celular, com inibição de até 70% na atividade metabólica com apenas 180 minutos em contato com PMZ e CLOR. Por isso, foi analisado o efeito da PMZ e CLOR sobre as células não aderidas. Os resultados demonstraram uma redução na atividade metabólica, quando comparado ao controle de crescimento, sugerindo que a PMZ e CLOR ocasionou a morte celular com apenas 180 minutos. Esses achados corroboram com o estudo realizado por Brilhante e colaboradores (2017).

As fenotiazinas, prometazina e clorpromazina apresentaram uma potente atividade antibiofilme, reduzindo a biomassa e a atividade metabólica destes, com concentrações variando de 8 - 64µg/mL no biofilme em formação e de 128 - 1024 µg/mL no biofilme maduro. Outros autores observaram essa potente atividade antibiofilme em espécies de bactérias e fungos. Estudo realizado com *klebsiella pneumoniae* mostra que a prometazina, em concentração de 100 µg/mL, inibe a adesão e consequente formação de biofilme (EL-BANNA et al., 2016). Assim como Brilhante et al. (2017) mostraram que a prometazina é capaz de inibir o biofilme maduro de *Candida tropicalis* em concentração de 128 µg/mL. Essa inibição pode ocorrer pela capacidade dessas fenotiazinas perturbarem algumas funções fisiológicas importantes das células sésseis, como o gradiente de concentração de prótons, a produção de ATP e as funções da calmodulina (EL-BANNA et al., 2016; PRASAD; GOFFEAU, 2012).

Além disso, demonstramos que as fenotiazinas foram eficazes contra biofilme melanizado de *Cryptococcus* spp., a produção de melanina não forneceu resistência significativa à atividade antifúngica da prometazina e clorpromazina a CIMB90% foi obtido na concentração de 512 µg/mL e 1024 µg/mL para a prometazina e clorpromazina. Os resultados mostraram-se promissores frente à formação de biofilme e biofilme formado. Diante disso, além de avaliar a PMZ e CLOR, nosso estudo de sensibilidade no biofilme foi conduzido com AMB e FLUC, representando os dois principais fármacos usados no tratamento da criptococose as drogas que mais se mostrou efetiva contra as células sésseis foi a AMB, CIMB50% nas concentrações de 32 µg/mL. Esse resultado mostrou que a AMB foi mais eficiente contra biofilmes de *Cryptococcus* spp. Por outro lado, a anfotericina B apresentou uma melhor inibição da atividade metabólica do biofilme quando comparada aos azólicos semelhante aos resultados encontrados por Tavares et al. (2019).

Todas as condições testadas reduziram significativamente a viabilidade dos biofilmes, os efeitos antibiofilme da prometazina e clorpromazina podem se apresentar como interesse para a terapêutica, uma vez que biofilmes são comumente associados a infecções por *Cryptococcus* spp. e são inerentemente difíceis de tratar (RAMAGE et al., 2012).

Portanto, esses achados ratificam que a prometazina e clorpromazina apresentam propriedades antimicrobianas nas diferentes etapas de desenvolvimento do biofilme.

Análises utilizando MEV dos biofilmes de cepas de *Cryptococcus* spp. apresentaram uma MEC envolvendo as células dentro da estrutura do biofilme. Essa matriz é um importante fator responsável pela resistência do biofilme ao estresse ambiental e à agressão química e física (RAMAGE et al., 2012). A partir das análises das imagens da MEV foi possível observar a estrutura do biofilme de *Cryptococcus* spp. como um conjunto de células compactas, conectadas por matriz extracelular de polissacarídeos (CAMACHO; CASADEVALL, 2018; TAVARES et al., 2019). As fenotiazinas prometazina e clorpromazina foram capazes de fragmentar e desestruturar o biofilme, causando perda da estrutura. Baugh et al. (2012) descreveram que a clorpromazina inibe a matriz do biofilme em bactérias como *Salmonella Typhimurium*, afetando a arquitetura do biofilme, mostrando uma efetiva atividade antibiofilme com consequente desagregação das células. Além de alterar a morfologia do biofilme, foi observada uma redução no tamanho das células de *Cryptococcus* spp. Embora não sejam conhecidos os mecanismos que levam a essa redução, BRILHANTE et al., (2018) também descreveram esse efeito em células sésseis de *C.tropicalis*.

## 8 CONCLUSÕES

- ❖ As fenotiazinas prometazina e clorpromazina inibem o crescimento planctônico *in vitro* de cepas do Complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii*.
- ❖ As fenotiazinas prometazina e clorpromazina apresentam efeito antifúngicos frente à formação de biofilmes e biofilmes formados de cepas do complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii*.
- ❖ As fenotiazinas causam destruição e alteração do biofilme, apesar de possuírem a matriz exopolimérica.
- ❖ As fenotiazinas inibem a formação de biofilme e a adesão das células de leveduras.
- ❖ A prometazina e a clorpromazina, mesmo em baixas concentrações, mostram a capacidade de estruturar biofilmes.
- ❖ As fenotiazinas prometazina e clorpromazina são drogas promissoras para o desenvolvimento de estratégias antifúngicas frente o complexo *Cryptococcus neoformans/C.gattii*.

## REFERÊNCIAS

- ABERG, J. A.; MUNDY, L. M.; POWDERLY, W. G. Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection. **Chest**, v. 115, n. 3, p. 734–740, 1999.
- AFELTRA, J.; VERWEIJ, P. E. Antifungal activity of nonantifungal drugs. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, n. 7, p. 397–407, 2003.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 9, p. 3291–3297, 2004.
- ÁLVAREZ LAM, I.; VELÁZQUEZ ACOSTA, J. C.; PONCE BITTAR, J.; GAYA, J. A. Criptococosis infantil: presentación de 3 casos. **Rev. Cubana Pediatr.**, v. 73, n. 1, p. 55–59, 2001.
- ANEKE, Chioma Inyang, et al. Synergistic Effects of Efflux Pump Modulators on the Azole Antifungal Susceptibility of *Microsporium canis*. *Mycopathologia*, 2020, p. 1-10.
- BALLESTERO, M.; GARCÍA, I.; DAUDÉN, E.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J.; ISCAR, T.; FRAGA, J.; GARCÍA-DÍEZ, A. Criptococosis cutánea primaria asociada a oncotaxia en un paciente inmunodeprimido. **Actas Dermosifiliogr.**, v. 95, n. 9, p. 574–577, 2004.
- BARCHIESI, F.; COGLIATI, M.; ESPOSTO, M. C.; SPREGHINI, E.; SCHIMIZZI, A. M.; WICKES, B. L.; SCALISE, G.; VIVIANI, M. A. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. **J. Infect.**, v. 51, n. 1, p. 10–16, 2005.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14: 1 medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 27, n. 11, p. 875–904, 2010.
- BARTLETT, K. H.; CHENG, P.-Y.; DUNCAN, C.; GALANIS, E.; HOANG, L.; KIDD, S.; LEE, M.-K.; LESTER, S.; MACDOUGALL, L.; MAK, S. A decade of experience: *Cryptococcus gattii* in British Columbia. **Mycopathologia**, v. 173, n. 5–6, p. 311–319, 2012.
- BAUGH, S.; EKANAYAKA, A. S.; PIDDOCK, L. J. V; WEBBER, M. A. Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, n. 10, p. 2409–2417, 2012.
- BAVA, A. J.; TROMBETTA, L.; GALACHE, V.; ZULIANI, M. V.; TRONCOSO, A. Diagnóstico de criptococosis a partir de lesiones cutáneas. **Acta bioquímica clínica Latinoam.**, v. 44, n. 1, p. 33–36, 2010.



BAVA, A. J.; ZULIANI, M. V. Desarrollo de *Cryptococcus neoformans* en medios de cultivo empleados para diagnóstico bacteriológico. **Acta bioquímica clínica Latinoam.**, v. 43, n. 2, p. 195–199, 2009.

BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J. W.; HOP, W. C. J.; ABELN, E. C. A.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 891–907, 2001.

BOSCO-BORGEAT, M. E.; MAZZA, M.; TAVERNA, C. G.; CÓRDOBA, S.; MURISENGO, O. A.; VIVOT, W.; DAVEL, G. Sustitución aminoacídica en la enzima lanosterol 14  $\alpha$ -demetilasa de *Cryptococcus neoformans* involucrada en la resistencia al fluconazol de aislamientos clínicos. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 48, n. 2, p. 137–142, 2016.

BOSSCHE, V. Mechanisms of antifungal resistance. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 14, n. 2, p. 44–49, 1997.

BOVERS, M.; DIAZ, M. R.; HAGEN, F.; SPANJAARD, L.; DUIM, B.; VISSER, C. E.; HOOGVELD, H. L.; SCHARRINGA, J.; HOEPELMAN, I. M.; FELL, J. W. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 6, p. 1874–1883, 2007.

BOYER-CHAMMARD, T.; TEMFACK, E.; ALANIO, A.; JARVIS, J. N.; HARRISON, T. S.; LORTHOLARY, O. Recent advances in managing HIV-associated cryptococcal meningitis. **F1000Research**, v. 8, n. 743, p. 1–7, 2019.

BRAUNSDORF, C.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. Modulation of the fungal-host interaction by the intra-species diversity of *C. albicans*. **Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 11, 2018.

BRILHANTE, R. S. N.; DE OLIVEIRA, J. S.; EVANGELISTA, A. J. DE J.; PEREIRA, V. S.; ALENCAR, L. P.; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C.; CÂMARA, L. M. C.; DE LIMA-NETO, R. G.; CORDEIRO, R. DE A.; SIDRIM, J. J. C. In vitro effects of promethazine on cell morphology and structure and mitochondrial activity of azole-resistant *Candida tropicalis*. **Med. Mycol.**, v. 56, n. 8, p. 1012–1022, 2018.

CABAÑES, F. J. Micosis y zoonosis: *Cryptococcus* spp. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, p. S1–S3, 2008.

CAMACHO, E.; CASADEVALL, A. Cryptococcal traits mediating adherence to biotic and abiotic surfaces. **J. Fungi**, v. 4, n. 3, p. 88, 2018.

CAMPOS, F. L.; BARONI, F. D. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Rev. Patol. Trop.**, v. 39, n. 2, p. 83–90, 2010.

CANTISANI, C.; RICCI, S.; GRIECO, T.; PAOLINO, G.; FAINA, V.; SILVESTRI, E.; CALVIERI, S. Topical promethazine side effects: our experience and review of the literature. **Biomed Res. Int.**, v. 2013, 2013.

CASADEVALL, A. Cards of virulence and the global virulome for humans. **MICROBE-AMERICAN Soc. Microbiol.**, v. 1, n. 8, p. 359, 2006.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. [s.l.] Citeseer, 1998. v. 595

CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, n. 4, p. 354–358, 2000.

CASADEVALL, A.; STEENBERGEN, J. N.; NOSANCHUK, J. D. ‘Ready made’virulence and ‘dual use’virulence factors in pathogenic environmental fungi—the *Cryptococcus neoformans* paradigm. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, n. 4, p. 332–337, 2003.

CASTAÑEDA, E.; LIZARAZO, J. Protocolo de estudio y manejo de los pacientes con criptococosis. **Infectio**, v. 16, n. 3S, 2012.

CASTELO-BRANCO, D.; BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; CAETANO, E. P.; RIBEIRO, J. F.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? **Med. Mycol.**, v. 51, n. 5, p. 555–560, 2013.

CASTILLA, V. B.; GILER, S. E. S. Utilidad de la prueba de tinta china como tamizaje para meningitis por *Cryptococcus* spp/Utility of indian ink as screening for meningitis by *Cryptococcus* spp. **Rev. Cienc. UNEMI**, v. 9, n. 20, p. 63–67, 2016.

CATTANA, M. E.; TRACOGNA, M. F.; FERNÁNDEZ, M. S.; REY, C.; MARIANA, C.; SOSA, M. A.; GIUSIANO, G. E. Genotipificación de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* obtenidos en el Hospital «Dr. Julio C. Perrando», de la ciudad de Resistencia (Chaco, Argentina). **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 45, n. 2, p. 89–92, 2013.

CHAN, Y. Y.; ONG, Y. M.; CHUA, K. L. Synergistic interaction between phenothiazines and antimicrobial agents against *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 2, p. 623–630, 2007.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation of the third capsule-associated gene, CAP60, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 5, p. 2230–2236, 1998.

CHANG, Y. C.; STINS, M. F.; MCCAFFERY, M. J.; MILLER, G. F.; PARE, D. R.; DAM, T.; PAUL-SATYASEE, M.; KIM, K. S.; KWON-CHUNG, K. J. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 9, p. 4985–4995, 2004.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. In: **Diagnosis and treatment of human mycoses**. [s.l.] Springer, 2008. p. 255–276.

CHEN, S. C.-A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.

CORDEIRO, R. DE A.; DE JESUS EVANGELISTA, A. J.; SERPA, R.; DE FARIAS MARQUES, F. J.; DE MELO, C. V. S.; DE OLIVEIRA, J. S.; DA SILVA FRANCO, J.; DE ALENCAR, L. P.; BANDEIRA, T. DE J. P. G.; BRILHANTE, R. S. N. Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex. **Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 309–317, 2016.

COSTERTON, B. Microbial ecology comes of age and joins the general ecology community. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, n. 49, p. 16983–16984, 2004.

DÍAZ PAÚL, S. C.; CARDONA CASTRO, N. Criptococosis en pacientes con SIDA: manifestaciones cutáneas y sistémicas, diagnóstico y terapéutica. **CES Med.**, v. 22, n. 1, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Approved Standard, 3rd ed. M27-A3. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

DOERING, T. L. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 63, p. 223–247, 2009.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.

DOS SANTOS PEDROSO, R.; DA COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. Avaliação da produção de melanina por espécies de *Cryptococcus* em quatro diferentes meios de cultura. 2007.

E SILVA, L. K. R.; STAATS, C. C.; GOULART, L. S.; MORELLO, L. G.; FUNGARO, M. H. P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. **Res. Microbiol.**, v. 159, n. 3, p. 221–229, 2008.

ECEVIT, I. Z.; CLANCY, C. J.; SCHMALFUSS, I. M.; NGUYEN, M. H. The poor prognosis of central nervous system cryptococcosis among nonimmunosuppressed patients: a call for better disease recognition and evaluation of adjuncts to antifungal therapy. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, n. 10, p. 1443–1447, 2006.

EISENMAN, H. C.; NOSANCHUK, J. D.; WEBBER, J. B. W.; EMERSON, R. J.; CAMESANO, T. A.; CASADEVALL, A. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3683–3693, 2005.

EL-BANNA, T.; SONBOL, F.; EL-AZIZ, A.; AL-FAKHARANY, O. Modulation of antibiotic efficacy against *Klebsiella pneumoniae* by antihistaminic drugs. **J Med Microb Diagn**, v. 5, n. 225, p. 703–2161, 2016.

ELLS, R.; KEMP, G.; ALBERTYN, J.; KOCK, J. L. F.; POHL, C. H. Phenothiazine is a potent inhibitor of prostaglandin E2 production by *Candida albicans* biofilms. **FEMS Yeast Res.**, v. 13, n. 8, p. 849–855, 2013.

FIRACATIVE, C.; LIZARAZO, J.; ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M. T.; CASTAÑEDA, E. The status of cryptococcosis in Latin America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 7, 2018.

FIRACATIVE, C.; ROE, C. C.; MALIK, R.; FERREIRA-PAIM, K.; ESCANDÓN, P.; SYKES, J. E.; CASTAÑÓN-OLIVARES, L. R.; CONTRERAS-PERES, C.; SAMAYOA, B.; SORRELL, T. C. MLST and whole-genome-based population analysis of *Cryptococcus gattii* VGIII links clinical, veterinary and environmental strains, and reveals divergent serotype specific sub-populations and distant ancestors. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 8, p. e0004861, 2016.

FISHER, J. F.; VALENCIA-REY, P. A.; DAVIS, W. B. **Pulmonary Cryptococcosis in the Immunocompetent Patient—Many Questions, Some Answers**. Open forum infectious diseases. **Anais...**Oxford University Press, 2016

FORRESTEL, A. K.; MODI, B. G.; LONGWORTH, S.; WILCK, M. B.; MICHELETTI, R. G. Primary cutaneous *cryptococcus* in a patient with multiple sclerosis treated with fingolimod. **JAMA Neurol.**, v. 73, n. 3, p. 355–356, 2016.

GALANIS, E.; MACDOUGALL, L.; KIDD, S.; MORSHED, M.; GROUP, B. C. C. GATTII W. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 16, n. 2, p. 251, 2010.

GALGÓCZY, L.; BÁCSI, A.; HOMA, M.; VIRÁGH, M.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C. In vitro antifungal activity of phenothiazines and their combination with amphotericin B against

different *Candida* species. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. e737–e743, 2011.

GARRO, A. P.; CHIAPELLO, L. S.; BARONETTI, J. L.; MASIH, D. T. Rat eosinophils stimulate the expansion of *Cryptococcus neoformans*-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells with a T-helper 1 profile. **Immunology**, v. 132, n. 2, p. 174–187, 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.**, v. 49, n. 2, p. 282–290, 2005.

GRANGER, D. L.; PERFECT, J. R.; DURACK, D. Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. **J. Clin. Invest.**, v. 76, n. 2, p. 508–516, 1985.

GYAWALI, R.; UPADHYAY, S.; WAY, J.; LIN, X. A family of secretory proteins is associated with different morphotypes in *Cryptococcus neoformans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 83, n. 5, p. e02967-16, 2017.

HAGEN, F.; HARE JENSEN, R.; MEIS, J. F.; ARENDRUP, M. C. Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility testing of 108 clinical *Cryptococcus neoformans* sensu lato and *Cryptococcus gattii* sensu lato isolates from Denmark. **Mycoses**, v. 59, n. 9, p. 576–584, 2016.

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiol. Immunol.**, v. 47, n. 4, p. 271–277, 2003.

JOHNSTON, S. A.; MAY, R. C. The human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by Arp2/3 complex-mediated actin polymerisation. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 8, p. e1001041, 2010.

KERNIEN, J. F.; SNARR, B. D.; SHEPPARD, D. C.; NETT, J. E. The interface between fungal biofilms and innate immunity. **Front. Immunol.**, v. 8, p. 1968, 2018.

KOBAYASHI, C. C. B. A.; FERNANDES, O. DE F. L.; BRITO, S. C. A. DE; SILVA, A. C.; SOUSA, E. D. DE; SILVA, M. DO R. R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 47, n. 4, p. 203–207, 2005.

KON, A. S.; GRUMACH, A. S.; COLOMBO, A. L.; PENALVA, A. C. O.; WANKE, B.; TELLES, F. D. Q.; SEVERO, L. C.; ARANHA, L. F.; LAZÉRA, M. DOS S.; RESENDE, M. R. Guidelines In Cryptococcosis-2008 [consenso Em Criptococose-2008]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 2008.

KRAUS, P. R.; BOILY, M.-J.; GILES, S. S.; STAJICH, J. E.; ALLEN, A.; COX, G. M.; DIETRICH, F. S.; PERFECT, J. R.; HEITMAN, J. Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray. **Eukaryot. Cell**, v. 3, n. 5, p. 1249–1260, 2004.

KURAUCHI, Y.; YOSHIMARU, Y.; KAJIWARA, Y.; YAMADA, T.; MATSUDA, K.; HISATSUNE, A.; SEKI, T.; KATSUKI, H. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase inhibition causes hyperactivity and impulsivity in mice via dopamine D2 receptor-mediated mechanism. **Neurosci. Res.**, 2018.

KWON-CHUNG, K. J.; FRASER, J. A.; DOERING, T. L.; WANG, Z. A.; JANBON, G.; IDNURM, A.; BAHN, Y.-S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E.; WICKES, B. L.; MEYER, W.; CUOMO, C. A.; WOLLENBURG, K. R.; BICANIC, T. A.; CASTAÑEDA, E.; CHANG, Y. C.; CHEN, J. The case for adopting the “species complex” nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. **MSphere**, v. 2, n. 1, p. e00357-16, 2017.

LACOMIS, J. M.; COSTELLO, P.; VILCHEZ, R.; KUSNE, S. The radiology of pulmonary cryptococcosis in a tertiary medical center. **J. Thorac. Imaging**, v. 16, n. 3, p. 139–148, 2001.

LENGELER, K. B.; COX, G. M.; HEITMAN, J. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 1, p. 115–122, 2001.

LEOPOLD WAGER, C. M.; HOLE, C. R.; WOZNIAK, K. L.; WORMLEY JR, F. L. *Cryptococcus* and phagocytes: complex interactions that influence disease outcome. **Front. Microbiol.**, v. 7, p. 105, 2016.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. **Infect. Genet. Evol.**, v. 9, n. 4, p. 401–416, 2009.

LIN, X.; HUANG, J. C.; MITCHELL, T. G.; HEITMAN, J. Virulence attributes and hyphal growth of *C. neoformans* are quantitative traits and the MAT $\alpha$  allele enhances filamentation. **PLoS Genet.**, v. 2, n. 11, p. e187, 2006.

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

LIN, X.; HULL, C. M.; HEITMAN, J. Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. **Nature**, v. 434, n. 7036, p. 1017, 2005.

LINDELL, D. M.; MOORE, T. A.; MCDONALD, R. A.; TOEWS, G. B.; HUFFNAGLE, G. B. Generation of antifungal effector CD8<sup>+</sup> T cells in the absence of CD4<sup>+</sup> T cells during *Cryptococcus neoformans* infection. **J. Immunol.**, v. 174, n. 12, p. 7920–7928, 2005.

LOPES, W. METABÓLITO PRODUZIDO POR FUNGO *Fusarium oxysporum* INIBE A CÁPSULA E FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Cryptococcus* spp. 2015.

LOPES, W.; VAINSTEIN, M. H.; DE SOUSA ARAUJO, G. R.; FRASES, S.; STAATS, C. C.; DE ALMEIDA, R.; SCHRANK, A.; KMETZSCH, L.; VAINSTEIN, M. H. Geometrical Distribution of *Cryptococcus neoformans* Mediates Flower-Like Biofilm Development. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 2534, 2017.

MA, H.; MAY, R. C. Virulence in *Cryptococcus* species. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 67, p. 131–190, 2009.

MANDAL, P.; ROY, T. S.; DAS, T. K.; BANERJEE, U.; XESS, I.; NOSANCHUK, J. D. Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from India: an electron microscopic study. **Brazilian J. Microbiol.**, v. 38, n. 4, p. 662–666, 2007.

MARQUES, S. A.; BASTAZINI JR, I.; MARTINS, A. L. G. P.; BARRETO, J. A.; BARBIERI D'ELIA, M. P.; LASTÓRIA, J. C.; MARQUES, M. E. A. Primary cutaneous cryptococcosis in Brazil: report of 11 cases in immunocompetent and immunosuppressed patients. **Int. J. Dermatol.**, v. 51, n. 7, p. 780–784, 2012.

MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res.**, v. 38, n. 3, p. 204–211, 2004.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 10, p. 6350–6362, 2005.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 3, p. 1021–1033, 2006.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and caMartinez, Luis R, and Arturo Casadevall. 2007. “*Cryptococcus Neoformans* Biofilm Formation Depends on Surface Support and Carbon Source and Reduces Fungal Cell Susceptibility to Hea. v. 73, n. 14, p. 4592–4601, 2007.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol. Spectr.**, v. 3, n. 3, 2015a.

MARTINEZ,L.R.;CASADEVALL,A.<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2015.8.pdf>Bio film formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol. Spectr.**, v. 3, n. 3, 2015b.

MARTINEZ, L. R.; CHRISTAKI, E.; CASADEVALL, A. Specific antibody to *Cryptococcus neoformans* glucurunoxylomannan antagonizes antifungal drug action against cryptococcal biofilms in vitro. **J. Infect. Dis.**, v. 194, n. 2, p. 261–266, 2006.

MARTINEZ, L. R.; MIHU, M. R.; HAN, G.; FRASES, S.; CORDERO, R. J. B.; CASADEVALL, A.; FRIEDMAN, A. J.; FRIEDMAN, J. M.; NOSANCHUK, J. D. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 669–679, 2010.

MCFADDEN, D.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiol.**, v. 14, n. 11, p. 497–505, 2006.

MEYER, W.; AANENSEN, D. M.; BOEKHOUT, T.; COGLIATI, M.; DIAZ, M. R.; ESPOSTO, M. C.; FISHER, M.; GILGADO, F.; HAGEN, F.; KAOCHAROEN, S. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Med. Mycol.**, v. 47, n. 6, p. 561–570, 2009.

MOGENSEN, E. G.; JANBON, G.; CHALOUPKA, J.; STEEGBORN, C.; FU, M. S.; MOYRAND, F.; KLENGEL, T.; PEARSON, D. S.; GEEVES, M. A.; BUCK, J. *Cryptococcus neoformans* senses CO<sub>2</sub> through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1. **Eukaryot. Cell**, v. 5, n. 1, p. 103–111, 2006.

MORANOVA, Z.; VIRTUDAZO, E.; HRICOVA, K.; OHKUSU, M.; KAWAMOTO, S.; HUSICKOVA, V.; RACLAVSKY, V. The CRZ1/SP1-like gene links survival under limited aeration, cell integrity and biofilm formation in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Biomed. Pap. Med. Fac. Palacky Univ. Olomouc**, v. 158, n. 2, 2014.

MORA DJ, da Cunha Colombo ER, Ferreira-Paim K, Andrade-Silva LE, Nascentes GAN, Silva-Vergara ML. Clinical, Epidemiological and Outcome Features of Patients with Cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*. 2012;173(5–6):321–7.

NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S.; BARBOSA, G. G.; TRILLES, L.; BALASSIANO, B. R.; MACEDO, R. C. L.; BEZERRA, C. C. F.; PÉREZ, M. A.; CARDARELLI, P.; WANKE, B. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and



environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 73–77, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal melanin: what do we know about structure? **Front. Microbiol.**, v. 6, p. 1463, 2015.

OHLOW, M. J.; MOOSMANN, B. Phenothiazine: the seven lives of pharmacology's first lead structure. **Drug Discov. Today**, v. 16, n. 3–4, p. 119–131, 2011.

ORSI, C. F.; COLOMBARI, B.; ARDIZZONI, A.; PEPPOLONI, S.; NEGLIA, R.; POSTERARO, B.; MORACE, G.; FADDA, G.; BLASI, E. The ABC transporter-encoding gene AFR1 affects the resistance of *Cryptococcus neoformans* to microglia-mediated antifungal activity by delaying phagosomal maturation. **FEMS Yeast Res.**, v. 9, n. 2, p. 301–310, 2009.

OLIVEIRA, ALINE SILVA de. "Criptococose: padrões de mortalidade no Brasil e morbimortalidade em hospital de referência do Ceará." (2018).

OSTERHOLZER, J. J.; SURANA, R.; MILAM, J. E.; MONTANO, G. T.; CHEN, G.-H.; SONSTEIN, J.; CURTIS, J. L.; HUFFNAGLE, G. B.; TOEWS, G. B.; OLSZEWSKI, M. A. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. **Am. J. Pathol.**, v. 174, n. 3, p. 932–943, 2009.

PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 45, n. 6, p. 299–305, 2003.

PASA, C. R.; CHANG, M. R.; HANS-FILHO, G. Post-trauma primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent host by *Cryptococcus gattii* VGII. **Mycoses**, v. 55, n. 2, p. e1–e3, 2012.

PATIL, R. T.; SANGWAN, J.; JUYAL, D.; LATHWAL, S. Meningitis due to *Cryptococcus gattii* in an immunocompetent patient. **J. Clin. diagnostic Res. JCDR**, v. 7, n. 10, p. 2274, 2013.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grow in microtiter plates. **J Microbiol Methods**, v. 72, p. 157-165, 2008.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 45, n. 3, p. 395–404, 2005.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. The history of *Cryptococcus* and Cryptococcosis. In: **Cryptococcus**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2011. p. 17–26.

PERFECT, J. R.; DISMUKES, W. E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D. L.; GRAYBILL, J. R.; HAMILL, R. J.; HARRISON, T. S.; LARSEN, R. A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M.-H. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 2010.

PESSOA, C. C. B.; SILVA, S. H. M. DA; GOMES, F. S. Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* de origem clínica em Belém, Estado do Pará, Brasil. **Rev. Pan-Amazônica Saúde**, v. 3, n. 2, p. 59–65, 2012.

PODZAMCZER, D.; SIDA, P. DE EXPERTOS DE G. Y P. N. SOBRE EL. Tratamiento de las infecciones oportunistas en pacientes adultos y adolescentes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana en la era del tratamiento antirretroviral de gran actividad: Recomendaciones del Grupo de Estudio del Sida (GESIDA)/Plan. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 26, n. 6, p. 356–379, 2008.

PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. **Med. Clin. (Barc.)**, v. 126, p. 56–60, 2006.

PONZIO, V.; CAMARGO, L. F.; MEDINA-PESTANA, J.; PERFECT, J. R.; COLOMBO, A. L. Outcomes of cryptococcosis in renal transplant recipients in a less-resourced health care system. **Transpl. Infect. Dis.**, v. 20, n. 4, p. e12910, 2018.

POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; SANGLARD, D.; LA SORDA, M.; BOCCIA, S.; ROMANO, L.; MORACE, G.; FADDA, G. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFRI, involved in the resistance to fluconazole. **Mol. Microbiol.**, v. 47, n. 2, p. 357–371, 2003.

PRADO, M.; SILVA, M. B. DA; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513–521, 2009.

PRASAD, R.; GOFFEAU, A. Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 66, p. 39–63, 2012.

QIU, Y.; DAVIS, M. J.; DAYRIT, J. K.; HADD, Z.; MEISTER, D. L.; OSTERHOLZER, J. J.; WILLIAMSON, P. R.; OLSZEWSKI, M. A. Immune modulation mediated by cryptococcal laccase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47853, 2012.

RAJASINGHAM, R., SMITH, R. M., PARK, B. J., JARVIS, J. N., GOVENDER, N. P., CHILLER, T. M., ... & BOULWARE, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet infectious diseases**, 17(8), 873-881.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Int. J. Microbiol.**, v. 2012, 2012. REICHHARDT, C.; STEVENS, D. A.; CEGELSKI, L. Fungal biofilm composition and opportunities in drug discovery. **Future Med. Chem.**, v. 8, n. 12, p. 1455–1468, 2016.

REOLON, A.; PEREZ, L. R. R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 5, p. 293–298, 2004.

RIMEK, D.; HAASE, G.; LÜCK, A.; CASPER, J.; PODBIELSKI, A. First report of a case of meningitis caused by *Cryptococcus adeliensis* in a patient with acute myeloid leukemia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 1, p. 481–483, 2004.

RIVERA, L. E. C.; RAMOS, A. P.; DESGARENNES, M. DEL C. P. Biopelículas fúngicas. **Dermatol Rev Mex**, v. 57, n. 5, p. 350–361, 2013.

RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes Infect.**, v. 1, n. 4, p. 293–301, 1999.

RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **J. Intern. Med.**, v. 272, n. 6, p. 541–561, 2012.

ROSARIO, I.; ACOSTA, B.; COLOM, F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. **Rev Iberoam Micol**, v. 25, n. 1, p. 13–18, 2008.

ROSSATO, L.; LORETO, É. S.; ZANETTE, R. A.; CHASSOT, F.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. In vitro synergistic effects of chlorpromazine and sertraline in combination with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **Folia Microbiol. (Praha)**, v. 61, n. 5, p. 399–403, 2016.

RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos para uso sistémico. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 27, n. 6, p. 353–362, 2009.

SAIJO, T.; CHEN, J.; CHEN, S. C.-A.; ROSEN, L. B.; YI, J.; SORRELL, T. C.; BENNETT, J. E.; HOLLAND, S. M.; BROWNE, S. K.; KWON-CHUNG, K. J. Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. **MBio**, v. 5, n. 2, p. e00912-14, 2014.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 20, n. 9, p. 462–470, 2002a.

SANGLARD, D. Importancia clínica de los mecanismos de resistencias a los antifúngicos en las levaduras. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 20, n. 5, p. 225–234, 2002b.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LA SORDA, M.; TORELLI, R.; FIORI, B.; SANTANGELO, R.; DELOGU, G.; FADDA, G. Role of AFR1, an ABC transporter-encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 2, p. 1352–1359, 2006.

SIDRIM, J.J.; VASCONCELOS, D.C.; RIELLO, G.B.; GUEDES, G.M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T.J.; MONTEIRO, A.J.; CORDEIRO, R.A.; CASTELO-BRANCO, D.S.; ROCHA, M.F.; BRILHANTE, R.S. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofouling**, v. 33, n. 1, p. 88-97, 2016.

SHEN, C.-C.; CHENG, W.-Y.; YANG, M.-Y. Isolated intramedullary cryptococcal granuloma of the conus medullaris: case report and review of the literature. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 38, n. 6–7, p. 562–565, 2006.

SIONOV, E.; CHANG, Y. C.; GARRAFFO, H. M.; DOLAN, M. A.; GHANNOUM, M. A.; KWON-CHUNG, K. J. Identification of a *Cryptococcus neoformans* cytochrome P450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase (Erg11) residue critical for differential susceptibility between fluconazole/voriconazole and itraconazole/posaconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, p. AAC-05502, 2011.

SOUTO, A. C. P.; BONFIETTI, L. X.; FERREIRA-PAIM, K.; TRILLES, L.; MARTINS, M.; RIBEIRO-ALVES, M.; PHAM, C. D.; MARTINS, L.; DOS SANTOS, W.; CHANG, M. Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the Amazon rainforest to the semi-arid desert in the northeast of Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 8, p. e0004885, 2016.

SOUZA, L. K. H.; SOUZA JUNIOR, A. H.; COSTA, C. R.; FAGANELLO, J.; VAINSTEIN, M. H.; CHAGAS, A. L. B.; SOUZA, A. C. M.; SILVA, M. R. R. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 62–67, 2010.

SPEC, A.; POWDERLY, W. G. Cryptococcal meningitis in AIDS. In: **Handbook of clinical neurology**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 152p. 139–150.

SPRINGER, D. J.; REN, P.; RAINA, R.; DONG, Y.; BEHR, M. J.; MCEWEN, B. F.; BOWSER, S. S.; SAMSONOFF, W. A.; CHATURVEDI, S.; CHATURVEDI, V.

Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e10978, 2010.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

TAKEMURA, H.; OHNO, H.; MIURA, I.; TAKAGI, T.; OHYANAGI, T.; KUNISHIMA, H.; OKAWARA, A.; MIYAZAKI, Y.; NAKASHIMA, H. The first reported case of central venous catheter-related fungemia caused by *Cryptococcus liquefaciens*. **J. Infect. Chemother.**, v. 21, n. 5, p. 392–394, 2015.

TAVARES, E. R.; GIONCO, B.; MORGUETTE, A. E. B.; ANDRIANI, G. M.; MOREY, A. T.; DO CARMO, A. O.; DE PÁDUA PEREIRA, U.; ANDRADE, G.; DE OLIVEIRA, A. G.; PINGE-FILHO, P. Phenotypic characteristics and transcriptome profile of *Cryptococcus gattii* biofilm. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 1, p. 6438, 2019.

TAY, S. T.; TANTY HARYANTY, T.; NG, K. P.; ROHANI, M. Y.; HAMIMAH, H. In vitro susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs. **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 324–330, 2006.

TAYLOR-SMITH, L. M.; MAY, R. C. New weapons in the *Cryptococcus* infection toolkit. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 34, p. 67–74, 2016.

TELLO, M.; GUTIÉRREZ, E.; BÉJAR, V.; GALARZA, C.; RAMOS, W.; ORTEGA-LOAYZA, A. G. Cryptococcosis. **Rev. Médica Risaralda**, v. 19, n. 2, p. 147–153, 2013.

TURNER, S. H.; CHERNIAK, R.; REISS, E. Fractionation and characterization of galactoxylomannan from *Cryptococcus neoformans*. **Carbohydr. Res.**, v. 125, n. 2, p. 343–349, 1984.

URÁN, M. E.; CANO, L. E. **Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero.** [s.l: s.n.]. v. 12

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 11, p. 3394–3400, 2002.

VARGA, B.; CSONKA, Á.; CSONKA, A.; MOLNAR, J.; AMARAL, L.; SPENGLER, G. Possible biological and clinical applications of phenothiazines. **Anticancer Res.**, v. 37, n. 11, p. 5983–5993, 2017.

VELAGAPUDI, R.; HSUEH, Y.-P.; GEUNES-BOYER, S.; WRIGHT, J. R.; HEITMAN, J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 10, p. 4345–4355, 2009.

VENEGAS, P.; MILLÁN, M. E.; MIRANDA, M. Disquinesia tardía. **Rev. Chil. Neuropsiquiatr.**, v. 41, n. 2, p. 131–138, 2003.

VITALE, R. G.; AFELTRA, J.; MEIS, J. F. G. M.; VERWEIJ, P. E. Activity and post antifungal effect of chlorpromazine and trifluoperazine against *Aspergillus*, *Scedosporium* and zygomycetes. **Mycoses**, v. 50, n. 4, p. 270–276, 2007.

VOELZ, K.; MAY, R. C. Cryptococcal interactions with the host immune system. **Eukaryot. Cell**, v. 9, n. 6, p. 835–846, 2010.

WALSH, T. J.; SCHLEGEL, R.; MOODY, M. M.; COSTERTON, J. W.; SALCMAN, M. Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: an ultrastructural and quantitative microbiological study. **Neurosurgery**, v. 18, n. 3, p. 376–382, 1986.

XU, J.; MITCHELL, T. G. Comparative gene genealogical analyses of strains of serotype AD identify recombination in populations of serotypes A and D in the human pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 149, n. 8, p. 2147–2154, 2003.

XUE, C.; TADA, Y.; DONG, X.; HEITMAN, J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. **Cell Host Microbe**, v. 1, n. 4, p. 263–273, 2007.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biol. Proced. Online**, v. 6, n. 1, p. 10, 2004.