

## RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 06/06/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

GABRIEL REZENDE PIMENTA

Investigação de genes que codificam as bombas de efluxo em biofilmes e células  
*persisters* de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

Araraquara

2024

**GABRIEL REZENDE PIMENTA**

**Investigação de genes que codificam as bombas de efluxo em biofilmes e células  
*persisters* de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Maria José Soares Mendes Giannini

**Araraquara**

**2024**

---

**P644i** Pimenta, Gabriel Rezende.  
Investigação de genes que codificam as bombas de efluxo em biofilmes e células persisters de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* / Gabriel Rezende Pimenta. – Araraquara, 2024. 122 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.  
Coorientadora: Maria José Soares Mendes Giannini.

1. *Cryptococcus*. 2. Resistência. 3. Bombas de efluxo. 4. Biofilmes. 5. Células *persisters*. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Giannini, Maria José Soares Mendes, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Investigação de genes que codificam as bombas de efluxo em biofilmes e células persisters de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*

**AUTOR:** GABRIEL REZENDE PIMENTA

**ORIENTADORA:** ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área de conhecimento: Micologia pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA (Participação Virtual)  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. ÁNGEL AUGUSTO GONZÁLEZ MARÍN (Participação Virtual)  
Escuela de Microbiología / Universidad de Antioquia (UdeA) - Colômbia

Prof. Dr. THIAGO APARECIDO DA SILVA (Participação Virtual)  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 06 de dezembro de 2024

*“Como está escrito: nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam... Ora, àquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo quanto pedimos ou pensamos, conforme o seu poder que opera em nós, a ele seja a glória, na igreja e em Cristo Jesus, por todas as gerações, para todo o sempre. Amém!”*

**1 Coríntios 2:9**

**Efésios 3:20-21**

## AGRADECIMENTOS

A **Jesus Cristo**, meu Deus, que me salvou, guardou e me tem dado vida, sabedoria e sustento em todos os momentos, sejam bons ou ruins.

À minha amada esposa **Amanda**, que está sempre me apoiando, aconselhando e incentivando em todo o tempo que estamos juntos.

Aos meus pais, **Mauro e Fábria**, que cuidaram de mim e me proporcionaram grande parte do futuro que se chama hoje, e também à minha querida irmã, **Rachel**.

À coordenadora da minha graduação, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Renata Pires**, que me deu todo o suporte, atenção e incentivo para ingressar a este mestrado.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Ana Marisa** e à minha co-orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Maria José**, que me guiaram e me aconselharam com toda diligência, cuidado e carinho durante toda a minha jornada na pós-graduação.

Ao meu grande tutor, parceiro e conselheiro de pesquisa, **Will**.

Às minhas amigas e conselheiras **Ana Karla, Samanta e Laís**.

Aos meus queridos alunos **Enrico e Maria Júlia**.

Ao meu parceiro de almoço, piadas, histórias e metodologias *freestyle*, **Marquinho**.

Aos meus ternos companheiros de laboratório, que me ajudaram em diversos momentos e experimentos: **Carolina Echeverri, Sol (João Paulo), Larissa, Giovana, Lívia, Isa (s), Kaila, Rafa, Kelvin, Débora, Henrique, Bruno, Matheus, Bia, Júlia (s), Luana, Nathan, Nati e Daniel**.

Ao técnico e cruzeirense **Paulo**, que me ajudou em muitas metodologias e situações no laboratório, além de ótimas resenhas sobre futebol, atualidades e Minas Gerais.

À técnica **Cláudia**, que sempre me auxiliou em muitas atividades no laboratório, com toda diligência e proatividade.

À **sessão de pós-graduação da FCF**, que sempre me auxiliou em todas as atividades e trâmites.

Aos **professores do BBAF**, por terem me transmitido múltiplos e valiosos conhecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 – e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo 2023/11855-9).

## RESUMO

A criptococose é uma doença fúngica sistêmica caracterizada clinicamente por acometer indivíduos imunocomprometidos (principalmente *C. neoformans*) e imunocompetentes (principalmente *C. gattii*), afetando o trato respiratório inferior e em muitos casos o sistema nervoso central. A resistência aos antifúngicos dificulta o tratamento dessas infecções. Dentre os mecanismos de resistência dos fungos destacam-se a expressão de bombas de efluxo, mutações na enzima-alvo de azóis, a formação de biofilmes e a presença de células *persisters*. O objetivo foi avaliar a expressão de genes de bomba de efluxo e seus efeitos nos biofilmes e células *persisters* de *C. neoformans* e *C. gattii*, para o delineamento de novos alvos específicos. Foram realizadas: microscopias; caracterização dos biofilmes na cinética de formação, comparando as duas espécies; o tratamento dos biofilmes; a recuperação, a indução e a avaliação da concentração inibitória mínima e fungicida das células *persisters*; a quantificação relativa dos genes-alvo (genes de bomba de efluxo – AFR1, AFR2, AFR3 e MDR1) nas condições planctônica, biofilme e *persisters*. Os compostos selecionados para os tratamentos foram: anfotericina B; fluconazol; o inibidor de calcineurina e bombas de efluxo FK506; um derivado do ácido protocatecuico, octila. Os biofilmes das duas espécies formaram estruturas complexas, robustas e bem estabelecidas, mostrando níveis crescentes dos componentes da biomassa e da heterogênea e densa matriz extracelular, mediados pela superexpressão de bombas de efluxo. Os tratamentos destacaram a eficácia das combinações de fluconazol com FK506 e octila, danificando os biofilmes. Esses resultados implicaram numa notável relação das bombas de efluxo com o auxílio no transporte dos principais componentes extracelulares. Nossos resultados e a literatura nos mostraram que as bombas de efluxo possuem papéis multifacetados e variados, não somente participando ativamente da resistência, mas também no desenvolvimento estrutural e fisiologia dos biofilmes. As células *persisters* de ambas as espécies de *Cryptococcus* apresentaram baixa atividade metabólica durante o isolamento pelo tratamento com 100 µg/mL de anfotericina B nos biofilmes e cresceram posteriormente de maneira lenta e gradual. As combinações de fluconazol com FK506 e principalmente octila reduziram significativamente a concentração inibitória mínima das células *persisters*. A proliferação dessas células, os tratamentos com fluconazol e a quantificação dos genes-alvo indicaram a reativação das bombas de efluxo. Nossos resultados ajudaram a identificar mecanismos de resistência de biofilmes, a existência de células *persisters* das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* e novas alternativas terapêuticas no contexto da criptococose.

**Palavras-chave:** *Cryptococcus*; resistência; bombas de efluxo; biofilmes; células *persisters*.

## ABSTRACT

Cryptococcosis is a systemic fungal disease clinically characterized by affecting immunocompromised individuals (mainly *C. neoformans*) and immunocompetent individuals (mainly *C. gattii*), involving the lower respiratory tract and, in many cases, the central nervous system. Antifungal resistance complicates the treatment of these infections. Among the fungal resistance mechanisms, notable features include the expression of efflux pumps, mutations in the azole-target enzyme, biofilm formation, and the presence of persister cells. The aim was to evaluate the expression of efflux pump genes and their effects on biofilms and persister cells of *C. neoformans* and *C. gattii* to outline new specific targets. The following were conducted: microscopy analyses; biofilm characterization in the kinetics of formation, comparing both species; biofilm treatments; recovery, induction, and evaluation of the minimum inhibitory and fungicidal concentrations of persister cells; and relative quantification of target genes (efflux pump genes – AFR1, AFR2, AFR3, and MDR1) in planktonic, biofilm, and persister conditions. The selected compounds for the treatments included amphotericin B, fluconazole, the calcineurin and efflux pump inhibitor FK506, and an octyl derivative of protocatechuic acid. The biofilms of both species formed complex, robust, and well-established structures, exhibiting increasing levels of biomass components and a heterogeneous, dense extracellular matrix, mediated by the overexpression of efflux pumps. The treatments highlighted the effectiveness of fluconazole combined with FK506 and octyl, which damaged the biofilms. These results indicated a notable relationship between efflux pumps and their role in transporting major extracellular components. Our results and the literature showed that efflux pumps have multifaceted and diverse roles, actively participating not only in resistance but also in the structural development and physiology of biofilms. Persister cells of both *Cryptococcus* species exhibited low metabolic activity during isolation via treatment with 100 µg/mL amphotericin B in biofilms and later grew slowly and gradually. The combinations of fluconazole with FK506, and especially octyl, significantly reduced the minimum inhibitory concentration of persister cells. The proliferation of these cells, treatments with fluconazole, and quantification of target genes indicated the reactivation of efflux pumps. Our findings helped identify biofilm resistance mechanisms, the existence of persister cells in *C. neoformans* and *C. gattii* species, and new therapeutic alternatives in the context of cryptococcosis.

**Keywords:** *Cryptococcus*; resistance; efflux pumps; biofilms; persister cells.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Lista de *primers* para cada gene a ser avaliado. Fonte: autoria própria.....48

**Figura 2-** Microscopia óptica de luz do biofilme de *C. neoformans* ATCC 90112: A) Pré-adesão em aumento de 400x. B) Adesão inicial em aumento de 400x. C) Adesão intermediária em aumento de 400x. D) Maturação/adesão completa em aumento de 400x. Fonte: autoria própria.....51

**Figura 3-** Microscopia óptica de luz do biofilme de *C. gattii* ATCC 56990: A) Pré-adesão em aumento de 100x. B) Adesão inicial em aumento de 100x. C) Adesão intermediária em aumento de 100x. D) Maturação/adesão completa em aumento de 100x. Fonte: autoria própria.....52

**Figura 4** - Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *C. neoformans* ATCC 90112: A1) 2h - Pré-adesão em aumento de 500x. A2) 2h - Pré-adesão em aumento de 1000x. A3) 2h - Pré-adesão em aumento de 10000x. B1) 12h - Adesão inicial em aumento de 1000x. B2) 12h - Adesão inicial em aumento de 2500x. B3) 12h - Adesão inicial em aumento de 10000x. C1) 24h - Adesão intermediária em aumento de 1000x. C2) 24h - Adesão intermediária em aumento de 2500x. C3) 24h - Adesão intermediária em aumento de 10000x. D1) 48h Maturação/adesão completa em aumento de 1000x. D2) 48h Maturação/adesão completa em aumento de 2500x. D3) 48h Maturação/adesão completa em aumento de 10000x. Fonte: autoria própria.....53

**Figura 5** - Microscopia eletrônica de varredura do biofilme de *C. gattii* ATCC 56990: A1) 2h - Pré-adesão em aumento de 1000x. A2) 2h - Pré-adesão em aumento de 2500x. A3) 2h - Pré-adesão em aumento de 5000x. B1) 12h - Adesão inicial em aumento de 1000x. B2) 12h - Adesão inicial em aumento de 2500x. B3) 12h - Adesão inicial em aumento de 10000x. C1) 24h - Adesão intermediária em aumento de 1000x. C2) 24h - Adesão intermediária em aumento de 2500x. C3) 24h - Adesão intermediária em aumento de 10000x. D1) 48h Maturação/adesão completa em aumento de 1000x. D2) 48h Maturação/adesão completa em aumento de 2500x. D3) 48h Maturação/adesão completa em aumento de 10000x. Fonte: autoria própria.....54

**Figura 6** – Representação gráfica da determinação dos níveis de biomassa na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990. Comparando os dados entre as cepas, os resultados foram estatisticamente significantes ( $P < 0,0192^*$ ). Controle: amostras somente com o meio de crescimento (sem inóculo do fungo). Fonte: autoria própria.....55

**Figura 7** – Representação gráfica da determinação dos níveis de matriz extracelular na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990. Comparando os dados entre as cepas, os resultados foram estatisticamente significantes ( $P < 0,0098^{**}$ ). Controle: amostras somente com o meio de crescimento (sem inóculo do fungo). Fonte: autoria própria.....56

**Figura 8** – Representação gráfica da avaliação da atividade metabólica mitocondrial na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990. Comparando os dados entre as cepas, os resultados foram estatisticamente significantes ( $P < 0,0101^*$ ). Controle: amostras somente com o meio de crescimento (sem inóculo do fungo). Fonte: autoria própria.....56

**Figura 9** – Representação gráfica da quantificação de polissacarídeos extracelulares na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990. Comparando os dados entre as cepas, os resultados foram estatisticamente significantes ( $P < 0,0199^*$ ). Controle: amostras somente com o meio de crescimento (sem inóculo do fungo). Fonte: autoria própria.....57

**Figura 10** – Representação gráfica da quantificação de proteínas extracelulares na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990. Comparando os dados entre as cepas, os resultados foram estatisticamente significantes ( $P < 0,0193^*$ ). Controle: amostras somente com o meio de crescimento (sem inóculo do fungo). Fonte: autoria própria.....58

**Figura 11** – Representação gráfica da quantificação de ergosterol extracelular na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990. Comparando os dados entre as cepas, os resultados foram estatisticamente significantes ( $P < 0,0259^*$ ). Controle: amostras somente com o meio de crescimento (sem inóculo do fungo). Fonte: autoria própria.....59

**Figura 12** – Representação gráfica da quantificação de DNA extracelular na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990. Comparando os dados entre as cepas, os resultados foram estatisticamente significantes ( $P < 0,0437^*$ ). Controle: amostras somente com o meio de crescimento (sem inóculo do fungo). Fonte: autoria própria.....59

**Figura 13** – Representação gráfica da quantificação de RNA extracelular na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990. Comparando os dados entre as cepas, os resultados foram estatisticamente significantes ( $P < 0,0337^*$ ). Controle: amostras somente com o meio de crescimento (sem inóculo do fungo). Fonte: autoria própria.....60

**Figura 14** - Representação gráfica da expressão das bombas de efluxo na forma planctônica de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990. Controle de expressão gênica da forma planctônica: amostras planctônicas “tempo 0” (sem a incubação de 24h após repique). Fonte: autoria própria.....61

**Figura 15** - Representação gráfica da expressão das bombas de efluxo na forma biofilme de *C. neoformans* ATCC 90112. AFR1 (verde); AFR2 (azul escuro); AFR3 (roxo); MDR1 (azul claro). Controle de expressão gênica dos biofilmes sem tratamento: amostras planctônicas. Fonte: autoria própria.....62

**Figura 16** - Representação gráfica da expressão das bombas de efluxo na forma biofilme de *C. gattii* ATCC 56990. AFR1 (verde); AFR2 (azul escuro); AFR3 (roxo); MDR1 (azul claro).

Controle de expressão gênica dos biofilmes sem tratamento: amostras planctônicas. Fonte: autoria própria.....63

**Figura 17** – Microscopia óptica de luz dos biofilmes maduros (48h) de *C. neoformans* ATCC 90112 tratados com a CIM da combinação de fluconazol + octila para comparação com as outras condições na figura. A) Controle de crescimento do biofilme maduro em aumento de 400x. B) Tratamento com 3,37 µg/mL de fluconazol em aumento de 400x. C) Tratamento com 3,37 µg/mL de fluconazol+FK506 em aumento de 400x. D) Tratamento com 3,37 µg/mL de fluconazol+octila em aumento de 400x. Fonte: autoria própria.....68

**Figura 18** – Microscopia óptica de luz dos biofilmes maduros (48h) de *C. gattii* ATCC 56990 tratados com a CIM da combinação de fluconazol + octila para comparação com as outras condições na figura. A) Controle de crescimento do biofilme maduro em aumento de 400x. B) Tratamento com 6,75 µg/mL de fluconazol em aumento de 400x. C) Tratamento com 6,75 µg/mL de fluconazol+FK506 em aumento de 400x. D) Tratamento com 6,75 µg/mL de fluconazol+octila em aumento de 400x. Fonte: autoria própria.....68

**Figura 19** - Microscopia multifotônica dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112: Biofilmes maduros foram tratados com a CIM da combinação de fluconazol + octila para comparação com as outras condições na figura. A1) Controle de crescimento do biofilme maduro. B1) Tratamento com 3,37 µg/mL de fluconazol. C1) Tratamento com 3,37 µg/mL de fluconazol+FK506. D1) Tratamento com 3,37 µg/mL de fluconazol+octila. A2-D2) Gráfico de superfície. Calcofluor White (azul) para corar a parede celular fúngica e Diacetato de Fluoresceína (verde) para corar as células viáveis. Fonte: autoria própria.....70

**Figura 20** - Microscopia multifotônica dos biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990: Biofilmes maduros foram tratados com a CIM da combinação de fluconazol + octila para comparação com as outras condições na figura. A1) Controle de crescimento do biofilme maduro. B1) Tratamento com 6,75 µg/mL de fluconazol. C1) Tratamento com 6,75 µg/mL de fluconazol+FK506. D1) Tratamento com 6,75 µg/mL de fluconazol+octila. A2-D2) Gráfico de

superfície. Calcofluor White (azul) para corar a parede celular fúngica e Diacetato de Fluoresceína (verde) para corar as células viáveis. Fonte: autoria própria.....71

**Figura 21** – Representação gráfica da determinação dos níveis de biomassa na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC:  $P < 0,0078^{**}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0002^{***}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0002^{***}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,0003^{***}$ . Controle – FLC+OCT:  $P < 0,0005^{***}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....72

**Figura 22** – Representação gráfica da determinação dos níveis de biomassa na cinética de formação dos biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC:  $P < 0,0091^{**}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0016^{**}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0005^{***}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,0010^{***}$ . Controle – FLC+OCT:  $P < 0,0006^{***}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....73

**Figura 23** – Representação gráfica da determinação dos níveis de matriz extracelular na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC:  $P < 0,0119^{*}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0105^{**}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0076^{**}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,0062^{**}$ . Controle – FLC+OCT:  $P < 0,0046^{**}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....74

**Figura 24** – Representação gráfica da determinação dos níveis de matriz extracelular na cinética de formação dos biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC:  $P < 0,0321^{*}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0046^{**}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0046^{**}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,0047^{**}$ . Controle – FLC+OCT:  $P < 0,0009^{***}$ . Os resultados foram estatisticamente

significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....74

**Figura 25** – Representação gráfica da determinação da atividade metabólica na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC:  $P < 0,0019^{**}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0006^{***}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0004^{***}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,0005^{***}$ . Controle – FLC+OCT:  $P < 0,0005^{***}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....75

**Figura 26** – Representação gráfica da determinação da atividade metabólica na cinética de formação dos biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC:  $P < 0,0146^{*}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0006^{***}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0003^{***}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,0011^{**}$ . Controle – FLC+OCT:  $P < 0,0002^{***}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....76

**Figura 27** – Representação gráfica da quantificação dos polissacarídeos extracelulares na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC:  $P < 0,0133^{*}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0037^{**}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0009^{***}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,0015^{**}$ . Controle – FLC+OCT:  $P < 0,0009^{***}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....76

**Figura 28** – Representação gráfica da quantificação de polissacarídeos extracelulares na cinética de formação dos biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC:  $P < 0,0046^{**}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0009^{***}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0007^{***}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,0004^{***}$ . Controle – FLC+OCT:  $P < 0,0003^{***}$ . Os resultados foram estatisticamente

significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....77

**Figura 29** – Representação gráfica da quantificação de proteínas extracelulares na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC:  $P < 0,0022^{**}$ . Controle - FK506:  $P < 0,00009^{****}$ . Controle - OCT:  $P < 0,00006^{****}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,00005^{****}$ . Controle – FLC+OCT:  $P < 0,00002^{****}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....78

**Figura 30** – Representação gráfica da quantificação de proteínas extracelulares na cinética de formação dos biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC:  $P < 0,0119^{*}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0013^{**}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0013^{**}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,0015^{**}$ . Controle – FLC+OCT:  $P < 0,0012^{**}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....78

**Figura 31** – Representação gráfica da quantificação de ergosterol extracelular na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC:  $P < 0,0150^{*}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0156^{*}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0066^{**}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,0060^{**}$ . Controle – FLC+OCT:  $P < 0,0050^{**}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....79

**Figura 32** – Representação gráfica da quantificação de ergosterol extracelular na cinética de formação dos biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC:  $P < 0,0007^{**}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0012^{**}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0003^{***}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,0007^{***}$ . Controle – FLC+OCT:  $P < 0,0004^{***}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes.

Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....80

**Figura 33** - Representação gráfica da quantificação de DNA extracelular na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC: P < 0,0500\*. Controle - FK506: P < 0,0084\*\*. Controle - OCT: P < 0,0026\*\*. Controle - FLC+FK506: P < 0,0021\*\*. Controle - FLC+OCT: P < 0,0017\*\*. Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....80

**Figura 34** - Representação gráfica da quantificação de DNA extracelular na cinética de formação dos biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC: P < 0,0224\*. Controle - FK506: P < 0,0013\*\*. Controle - OCT: P < 0,0016\*\*. Controle - FLC+FK506: P < 0,0013\*\*. Controle - FLC+OCT: P < 0,0012\*\*. Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....81

**Figura 35** - Representação gráfica da quantificação de RNA extracelular na cinética de formação dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC: P < 0,0175\*. Controle - FK506: P < 0,0048\*\*. Controle - OCT: P < 0,0024\*\*. Controle - FLC+FK506: P < 0,0016\*\*. Controle - FLC+OCT: P < 0,0017\*\*. Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....82

**Figura 36** - Representação gráfica da quantificação de RNA extracelular na cinética de formação dos biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990 após o tratamento com os compostos isolados e combinados para comparação da eficácia. Controle - FLC: P < 0,0081\*\*. Controle - FK506: P < 0,0019\*\*. Controle - OCT: P < 0,0009\*\*\*. Controle - FLC+FK506: P < 0,0007\*\*\*. Controle - FLC+OCT: P < 0,0007\*\*\*. Os resultados foram estatisticamente significantes.

Controle: amostra de biofilme sem tratamento. Fonte: autoria própria.....82

**Figura 37** - Representação gráfica da expressão das bombas de efluxo na forma planctônica de *C. neoformans* ATCC 90112. AFR1: Controle - FLC:  $P < 0,0097^*$ . Controle - FK506:  $P < 0,042^*$ . Controle - OCT:  $P < 0,037^*$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,030^*$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,024^*$ . AFR2: Controle - FK506:  $P < 0,040^*$ . Controle - OCT:  $P < 0,032^*$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,027^*$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,021^*$ . AFR3: Controle - FLC:  $P < 0,019^*$ . Controle - FK506:  $P < 0,036^*$ . Controle - OCT:  $P < 0,030^*$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,024^*$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,020^*$ . MDR1: Controle - FLC:  $P < 0,039^*$ . Controle - FK506:  $P < 0,032^*$ . Controle - OCT:  $P < 0,029^*$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,023^*$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,021^*$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle de expressão gênica da forma planctônica com tratamento: amostras respectivas sem tratamento (consideradas como ponto “zero” da expressão). Fonte: autoria própria.....84

**Figura 38** - Representação gráfica da expressão das bombas de efluxo na forma planctônica de *C. gattii* ATCC 56990. AFR1: Controle - FLC:  $P < 0,0057^{**}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,032^*$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,084^*$ . AFR2: Controle - FLC:  $P < 0,048^*$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,031^*$ . AFR3: Controle - FLC:  $P < 0,0059^{**}$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,025^*$ . MDR1: Controle - FLC:  $P < 0,0075^{**}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,022^*$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,020^*$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle de expressão gênica da forma planctônica com tratamento: amostras respectivas sem tratamento (consideradas como ponto “zero” da expressão). Fonte: autoria própria.....85

**Figura 39** - Representação gráfica da expressão das bombas de efluxo AFR1 e AFR2 na forma biofilme de *C. neoformans* ATCC 90112. AFR1: Controle - FLC:  $P < 0,00008^{****}$ . Controle - FK506:  $P < 0,00075^{***}$ . Controle - OCT:  $P < 0,000061^{****}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,000052^{****}$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,000049^{****}$ . AFR2: Controle - FLC:  $P < 0,0021^{**}$ . Controle - FK506:  $P < 0,046^*$ . Controle - OCT:  $P < 0,0086^{**}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,00077^{***}$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,0049^{***}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle de expressão gênica dos biofilmes com tratamento:

amostras respectivas sem tratamento (consideradas como ponto “zero” da expressão). Fonte: autoria própria.....86

**Figura 40** - Representação gráfica da expressão das bombas de efluxo AFR3 e MDR1 na forma biofilme de *C. neoformans* ATCC 90112. AFR3: Controle - FLC:  $P < 0,00008^{****}$ . Controle - FK506:  $P < 0,00075^{***}$ . Controle - OCT:  $P < 0,000061^{****}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,000052^{****}$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,000049^{****}$ . MDR1: Controle - FLC:  $P < 0,0021^{**}$ . Controle - FK506:  $P < 0,046^{*}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0086^{**}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,00077^{***}$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,0049^{***}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle de expressão gênica dos biofilmes com tratamento: amostras respectivas sem tratamento (consideradas como ponto “zero” da expressão). Fonte: autoria própria.....87

**Figura 41** - Representação gráfica da expressão das bombas de efluxo AFR1 e AFR2 na forma biofilme de *C. gattii* ATCC 56990. AFR1: Controle - FLC:  $P < 0,018^{*}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0070^{***}$ . Controle - OCT:  $P < 0,000065^{****}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,000042^{****}$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,000034^{****}$ . AFR2: Controle - FLC:  $P < 0,021^{*}$ . Controle - FK506:  $P < 0,019^{*}$ . Controle - OCT:  $P < 0,014^{*}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,0077^{**}$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,00040^{***}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle de expressão gênica dos biofilmes com tratamento: amostras respectivas sem tratamento (consideradas como ponto “zero” da expressão). Fonte: autoria própria.....88

**Figura 42** - Representação gráfica da expressão das bombas de efluxo AFR3 e MDR1 na forma biofilme de *C. gattii* ATCC 56990. AFR3: Controle - FLC:  $P < 0,028^{*}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0055^{**}$ . Controle - OCT:  $P < 0,0080^{**}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,00041^{***}$ . Controle - FLC+OCT:  $P < 0,00035^{***}$ . MDR1: Controle - FLC:  $P < 0,029^{*}$ . Controle - FK506:  $P < 0,0042^{**}$ . Controle - OCT:  $P < 0,000092^{****}$ . Controle - FLC+FK506:  $P < 0,000081$  Controle - FLC+OCT:  $P < 0,000056^{****}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Controle de expressão gênica dos biofilmes com tratamento: amostras respectivas sem tratamento

(consideradas como ponto “zero” da expressão). Fonte: autoria própria.....89

**Figura 43** – A) A) Representação gráfica da determinação da atividade metabólica dos biofilmes de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990 tratados com 100 µg/mL de anfotericina B por 48 horas para exercer pressão seletiva sobre as populações celulares destes biofilmes com o objetivo de isolar as células *persisters*. Controle (de crescimento) – *Cn* 90112:  $P < 0,0008^{***}$ . Controle (de crescimento) – *Cg* 56990:  $P < 0,0006^{***}$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. B) Representação gráfica da determinação de unidades formadoras de colônia após o tratamento dos biofilmes e a ressuspensão destes em meio ágar Sabouraud Dextrose para observar se houve crescimento das células *persisters*. Controle (do meio) – *Cn* 90112:  $P < 0,0008^{***}$ . Controle (do meio) – *Cg* 56990:  $P < 0,00009^{****}$ . *Cn* 90112 - *Cg* 56990:  $P < 0,0486^*$ . Os resultados foram estatisticamente significantes. Fonte: autoria própria.....90

**Figura 44** - Representação gráfica da expressão das bombas de efluxo das células *persisters* de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990 pós-recuperação. Controles de expressão gênica: amostras planctônicas. Fonte: autoria própria.....93

**Figura 45** - Representação gráfica da expressão das bombas de efluxo das células *persisters* de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990 tratadas com 100 µg/mL de AMB após a fase de recuperação. Controles de expressão gênica: amostras respectivas (*persisters*) sem tratamento. Fonte: autoria própria.....94

**Figura 46** - Representação gráfica da expressão das bombas de efluxo das células *persisters* de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. gattii* ATCC 56990 no tratamento (pós-recuperação) com a concentração inibitória mínima de fluconazol dos biofilmes maduros (*Cn* = 432 µg/mL e *Cg* = 864 µg/mL) mediante o perfil de resistência a este antifúngico. Comparando os dados entre as cepas: AFR1 *Cn-Cg*: ( $P < 0,0015^{**}$ ); AFR2 *Cn-Cg*: ( $P < 0,020^*$ ); AFR3 *Cn-Cg*: ( $P < 0,0015^{**}$ ); MDR1 *Cn-Cg*: ( $P < 0,0029^{**}$ ). Os resultados foram estatisticamente significantes. Controles de expressão dos gênica: amostras respectivas (*persisters*) sem tratamento. Fonte:

autoria  
própria.....95

**Figura 47** - Microscopia multifotônica do biofilme de *C. neoformans* ATCC 90112: A) Células de biofilme maduro tratado com 100 µg/mL de AMB por 48h e corados com Calcofluor White (azul) para corar a parede celular fúngica e Diacetato de Fluoresceína (verde) para corar as células viáveis. B) Gráfico de superfície. Fonte: autoria própria.....96

**Figura 48** - Microscopia multifotônica do biofilme de *C. gattii* ATCC 56990: A) Células de biofilme maduro tratado com 100 µg/mL de AMB por 48h e corados com Calcofluor White (azul) para corar a parede celular fúngica e Diacetato de Fluoresceína (verde) para corar as células viáveis. B) Gráfico de superfície. Fonte: autoria própria.....96

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentração inibitória mínima para inibir o crescimento fúngico na forma planctônica. As cepas tratadas foram incubadas durante 48 horas, para fluconazol, FK506, e octila nas concentrações de 0,125 a 512  $\mu\text{g/mL}$ .....64
- Tabela 2.** Índice de concentração inibitória fracionária para verificar se houve atividade sinérgica entre os compostos combinados. As cepas tratadas foram incubadas durante 48 horas (fluconazol, FK506, e octila nas concentrações de 0,125 a 512  $\mu\text{g/mL}$ ). A interação foi definida como: sinérgica se  $\text{ICIF} < 0,5$ ; indiferente se  $\text{ICIF} 0,5 \cup 4,0$  e antagônica se  $\text{ICIF} > 4,0$ .....64
- Tabela 3.** Concentração inibitória mínima para inibir o crescimento fúngico nas fases de 2 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas dos biofilmes. As cepas tratadas foram incubadas durante 48 horas, para fluconazol, FK506, e octila nas concentrações de 0,421 a 1728  $\mu\text{g/mL}$ .....65
- Tabela 4.** Índice de concentração inibitória fracionária para verificar se houve atividade sinérgica entre os compostos combinados. As cepas tratadas foram incubadas durante 48 horas (fluconazol, FK506, e octila nas concentrações de 0,421 a 1728  $\mu\text{g/mL}$ ). A interação foi definida como: sinérgica se  $\text{ICIF} < 0,5$ ; indiferente se  $\text{ICIF} 0,5 \cup 4,0$  e antagônica se  $\text{ICIF} > 4,0$ .....66
- Tabela 5.** Concentração inibitória mínima para inibir o crescimento fúngico das células *persisters*. As cepas tratadas foram incubadas durante 48 horas, para fluconazol, FK506, e octila nas concentrações de 2 a 4096  $\mu\text{g/mL}$ .....91
- Tabela 6.** Concentração fungicida mínima das células *persisters*. As células planctônicas foram utilizadas como controle de comparação. As cepas tratadas foram incubadas durante 48 horas, para anfotericina B nas concentrações de 100 a 800  $\mu\text{g/mL}$ .....91

**Tabela 7.** Índice de concentração inibitória fracionária para verificar se houve atividade sinérgica entre os compostos combinados. As células *persisters* tratadas foram incubadas durante 48 horas (fluconazol, FK506, e octila nas concentrações de 2 a 4096 µg/mL). A interação foi definida como: sinérgica se ICIF < 0,5; indiferente se ICIF 0,5 U 4,0 e antagônica se ICIF > 4,0.....92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP- Binding Cassette</i>
AFR1/Afr1	Gene/proteína - <i>Antifungal Resistance 1</i>
AFR2/Afr2	Gene/proteína - <i>Antifungal Resistance 2</i>
AFR3/Afr3	Gene/proteína - <i>Antifungal Resistance 3</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
Als1	<i>Agglutinin-Like Sequence 1</i>
Als2	<i>Agglutinin-Like Sequence 2</i>
AMB	Anfotericina B
ATP	Adenosina Trifosfato
BHE	Barreira Hematoencefálica
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CAT	Ciclo de Ácido Tricarboxílico
CDR1/Cdr1p	Gene/proteína - <i>Candida drug resistance 1</i>
CDR2/Cdr2p	Gene/proteína - <i>Candida drug resistance 2</i>
CIF	Concentração Inibitória Fracionária
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cqs1	<i>Cryptococcus quorum sensing 2</i>
CK2	<i>Cycle Kinase 2</i>
Crz1	<i>Calcineurin-responsive zinc finger 1</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
eDNA	<i>extracelular Deoxyribonucleic Acid/ DNA extracelular</i>
eRNA	<i>extracelular Ribonucleic Acid/ DNA extracelular</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ERG11	Gene codificante da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FLC	Fluconazol
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucuronoxilomanana

HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HCl	Ácido clorídrico
Hsp70	<i>Heat shock protein 70</i>
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
KOH	Hidóxido de Potássio
MAT	<i>Mating Type locus</i>
MDR1/Mdr1	Gene/proteína - <i>Multidrug resistance</i>
MEP	Matriz extracelular autoproduzida
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MM	Microscopia Multifotônica
MOPS	3-(N-Morfolino)propanossulfonato
Mp	Manoproteínas
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
OCT	Octila – um derivado do ácido protocatecuico
OMS	Organização Mundial da Saúde
Opt1	<i>Oligopeptide Transporter 1</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> ou Solução Salina Tamponada com Fosfato
Pdr5	Proteína - <i>Pleiotropic drug resistance 5</i>
PDR6	Gene - <i>Pleiotropic drug resistance 6</i>
Pg-p	<i>Glicoprotein – P</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI-1640	Meio de cultura - Roswell Park Memorial Institute 1640
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
Snq2	Proteína - <i>Sensitivity to 4-Nitroquinoline oxide</i>
Tris-HCl	(Tris(hidroximetil)aminometano) + ácido clorídrico
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
VCZ	Voriconazol
VG’s	Variedade <i>gattii</i>
VN’s	Variedade <i>neoformans</i>
XIX	Século 19
XTT	(2,3-bis-(2methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5 carboxanilide)
XX	Século 20
5-FC	5-Fluoricitosina

## LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA E SÍMBOLOS

% – Percentual

h – Horas

min – Minutos

mM – Milimolar

M - Molar

ng/mL – Nanogramas por mililitro

nm – Nanômetros

°C – Graus Celsius

rpm – Rotações Por Minuto

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  – Delta: Fórmula de cálculo de expressão gênica

µg/mL – Microgramas por mililitro

µL – Microlitros

µm – Micrômetros

× g – Multiplicação pela força da gravidade terrestre

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>30</b>
1.1. Contexto global atual.....	30
1.2. Um breve histórico.....	30
1.3. Classificação.....	31
1.4. Reprodução.....	31
1.5. Nicho ecológico e epidemiologia.....	32
1.6. Patogênese e infecção.....	33
1.7. Virulência: fatores.....	35
1.8. Terapêutica.....	35
1.9. Resistência.....	36
1.9.1. Alterações na permeabilidade da membrana.....	36
1.9.2. Implementação de vias metabólicas alternativas.....	37
1.9.3. Mudanças na estrutura e na genética dos alvos.....	37
1.9.4. Bombas de efluxo.....	38
1.9.5. Biofilmes e células <i>persisters</i> .....	39
1.10. Alternativas terapêuticas.....	40
1.11. Hipótese.....	40
<b>2. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>42</b>
2.1. Objetivos específicos.....	42
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1. Cultura de microrganismos.....	43
3.2. Formação dos biofilmes.....	43
3.2.1. Análise topográfica dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	43
3.2.2. Microscopia multifotônica (MM).....	44
3.3. Extração da matriz extracelular dos biofilmes.....	44
3.4. Caracterização dos biofilmes.....	44
3.4.1. Determinação da biomassa.....	44
3.4.2. Determinação da matriz extracelular.....	45
3.4.3. Avaliação da atividade metabólica.....	45
3.4.4. Quantificação de polissacarídeos extracelulares.....	45

3.4.5. Extração e quantificação de proteínas extracelulares.....	45
3.4.6. Quantificação de ergosterol extracelular.....	46
3.4.7. Quantificação de DNA extracelular.....	46
3.4.8. Quantificação de RNA extracelular.....	47
3.5. Quantificação da expressão de genes-alvo das condições planctônicas, biofilmes e células <i>persisters</i> de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> com e sem os compostos selecionados (fluconazol, FK506 e octila).....	47
3.6. Tratamento nas condições planctônica e biofilme de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> com os compostos selecionados (fluconazol, FK506 e octila).....	48
3.7. Recuperação e indução das células <i>persisters</i> .....	49
3.8. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das células <i>persisters</i> frente aos compostos selecionados.....	49
3.9. Análise dos resultados.....	50
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1. Formação dos biofilmes (pré-tratamento).....	51
4.1.1. Microscopia óptica de luz.....	51
4.1.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	52
4.2. Caracterização dos biofilmes (pré-tratamento).....	54
4.3. Quantificação da expressão de genes-alvo das condições planctônicas e biofilmes de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> (pré-tratamento).....	60
4.3.1. Condição planctônica.....	60
4.3.2. Condição biofilme.....	62
4.4. Tratamento nas condições planctônica e biofilme de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> com os compostos selecionados (fluconazol, FK506 e octila).....	63
4.4.1. Condição planctônica.....	63
4.4.2. Condição biofilme.....	65
4.5. Formação dos biofilmes (pós-tratamento).....	67
4.5.1. Microscopia óptica de luz dos biofilmes maduros.....	67
4.5.2. Microscopia multifotônica dos biofilmes.....	69
4.6. Caracterização dos biofilmes (pós-tratamento).....	72

4.7. Quantificação da expressão de genes-alvo das condições planctônicas e biofilmes de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> (pós-tratamento).....	83
4.7.1. Condição planctônica.....	83
4.7.2. Condição biofilme.....	85
4.8. Recuperação e indução das células <i>persisters</i> .....	89
4.9. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) das células <i>persisters</i> frente aos compostos selecionados.....	91
4.10. Quantificação da expressão de genes-alvo células <i>persisters</i> de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	92
4.10.1. Pós-recuperação.....	92
4.10.2. Tratamento com 100 µg/mL de anfotericina B pós-recuperação.....	92
4.10.3. Tratamento com a concentração inibitória mínima de fluconazol dos biofilmes maduros.....	94
4.11. Microscopia multifotônica das células <i>persisters</i> de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	95
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>98</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>112</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>113</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Contexto global atual

Em meio às ameaças globais à saúde, as doenças fúngicas invasivas estão aumentando cada vez mais, em especial nas populações imunocomprometidas. O diagnóstico e o tratamento dessas doenças são dificultados pelo acesso limitado a acompanhamentos de qualidade e pela resistência clínica e laboratorial aos antifúngicos. A OMS (Organização Mundial da Saúde), a partir de um estudo multicêntrico, desenvolveu uma lista atualizada de 20 patógenos fúngicos de maior importância na saúde pública global, na qual consta que *C. neoformans* está no grupo crítico em primeiro lugar entre as infecções fúngicas humanas e *C. gattii* no grupo de prioridade média. A priorização se concentrou em fungos que podem causar infecções sistêmicas agudas e subagudas invasivas para as quais existem resistência a medicamentos ou outros desafios no manejo (WHO, 2022). Rajasingham e colaboradores, 2022, relataram que houve 152.000 mortes por meningite criptocócica no mundo em 2020, sendo na América Latina 23% do total global. Ademais, com o advento da COVID-19, consequências como debilidade pulmonar, deficiência relativa na imunidade celular, terapias imunomoduladoras e uso de corticoides aumentaram os riscos de criptococose (Chan *et al.*, 2022).

### 1.2. Um breve histórico

O agente causador da criptococose, uma levedura encapsulada do gênero *Cryptococcus*, classe *Blastomycetes* e da família *Cryptococcaceae*, possui uma cápsula polissacarídica composta por glucuronoxilomanana (GXM) (90%), galactoxilomanana (GalXM) (7%) e manoproteínas (Mp) (3%), como característica principal. A palavra *Cryptococcus* origina-se da palavra grega *Kryptos* que significa secreto, escondido. Esta nomenclatura foi criada por Kutzing, em 1833. Em 1861, Zenker descreveu pela primeira vez a criptococose, mas, sua validação foi questionada por não haver evidências suficientes do cultivo deste fungo (Heitman *et al.*, 2011). O gênero *Cryptococcus* foi descoberto no final do século XIX. O primeiro relato científico de uma infecção por *Cryptococcus* foi feito por Otto Busse, um patologista alemão, em 1894. Ele descreveu um caso de uma mulher com uma infecção grave que resultou na formação de nódulos em diversos órgãos, incluindo os ossos e pulmões (Busse, 1894). Quatro anos depois, em 1895, o dermatologista italiano Francesco Sanfelice isolou um organismo semelhante ao descrito por Busse a partir de sucos de frutas, identificando-o como um fungo encapsulado e esférico, que ele chamou de *Saccharomyces neoformans* (Sanfelice, 1894).

Inicialmente, o papel do *Cryptococcus* como patógeno humano não foi amplamente reconhecido. Somente no século XX, com o avanço das técnicas microbiológicas, os cientistas começaram a compreender a relevância clínica deste fungo. Em 1950, o nome do fungo foi oficialmente alterado para *Cryptococcus neoformans*, refletindo sua natureza distinta de outros organismos similares (Mitchell; Perfect, 1995). *Cryptococcus gattii*, inicialmente considerada uma variedade de *C. neoformans*, foi posteriormente reconhecida como uma espécie distinta devido às suas diferenças genéticas e epidemiológicas. (Kwon-Chung e Bennett, 1992).

### 1.3. Classificação

A classificação do complexo das espécies é feita pela diferenciação dos antígenos capsulares, assim as 2 espécies consideradas patogênicas foram classificadas em: *C. neoformans*, subdividido em 2 variedades e 3 sorotipos, sendo eles *C. neoformans* variedade (var.) *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e o híbrido AD; a espécie *C. gattii* foi subdividida em 2 sorotipos, B e C (Kwon-Chung; Polacheck; Bennett, 1982; Hagen *et al.*, 2017). No entanto, baseado na análise molecular, as 2 espécies foram divididas em 10 tipos moleculares: *C. neoformans* VNI, VNII, VNIII, VNIV e VNB, e *C. gattii* VGI, VGII, VGIII, VGIV, VGIV/VGIIIc, embora não haja pleno consenso na comunidade científica a respeito das nomenclaturas (Firacative; Meyer; Castañeda, 2021). O tipo molecular VGII possui os subtipos VGIIa, VGIIb e VGIIc, segundo diferenças polimórficas e na sensibilidade à antifúngicos (Barcellos *et al.*, 2018).

### 1.4. Reprodução

Estes microrganismos apresentam mecanismos reprodutivos complexos que incluem reprodução assexuada (mitótica) e sexuada (meiótica). A reprodução assexuada em *Cryptococcus* ocorre por brotamento, onde uma célula-mãe forma uma célula-filha. Durante este processo, uma protrusão (ou broto) se desenvolve na célula-mãe, cresce e eventualmente se separa para formar uma nova célula. Esta forma de reprodução permite uma rápida multiplicação em ambientes favoráveis, contribuindo para a colonização e patogênese. *Cryptococcus* pode formar estruturas chamadas "blastoconídios", que são esporos formados por brotamento. *Cryptococcus* pertence ao filo *Basidiomycota*, o que significa que pode se reproduzir sexualmente formando basidiósporos. Este processo é mais complexo e envolve várias etapas (Perfect, 2006). Ademais, a reprodução heterotálica (um tipo de reprodução sexuada) envolve a fusão de dois tipos de células compatíveis de diferentes tipos de

acasalamento (tipos  $\alpha$  e a). Os dois tipos de acasalamento são regulados por genes no locus MAT (mating type locus). A fusão celular leva à formação de um filamento dicariótico, no qual dois núcleos coexistem (Heitman *et al.*, 2011). Curiosamente, algumas linhagens de *Cryptococcus* podem se reproduzir sexualmente sem a necessidade de uma outra célula, em um processo conhecido como homotalismo. Este processo envolve a formação de filamentos monocarióticos que podem se autodiferenciar em basídios, onde ocorre meiose e formação de basidiósporos (Idnurm; Lin, 2015).

### 1.5. Nicho ecológico e epidemiologia

O nicho ecológico de *C. neoformans* prevalece em solo enriquecido com excrementos, principalmente de pombos. Esse fungo é capaz de crescer em ambientes ricos em nitrogênio (a enzima urease contribui para esta capacidade), como as fezes de aves, que proporcionam um pH alcalino favorável e nutrientes suficientes para sua proliferação. *C. neoformans* é encontrado em todo o mundo, sendo mais comum em regiões temperadas e tropicais. No Brasil, estudos têm mostrado que esta espécie está amplamente presente em várias regiões, principalmente as regiões do centro-oeste, sudeste e o nordeste do país, e essencialmente em áreas urbanizadas. A variedade *C. neoformans var. grubii* (sorotipo A, genótipos VNI e VNII) é a mais encontrada. Já *C. gattii* é originalmente encontrado em regiões tropicais e subtropicais, como Austrália, Papua Nova Guiné, partes da África e Índia. Nos últimos anos, houve relatos de surtos em regiões temperadas, como a costa noroeste do Pacífico da América do Norte. No Brasil, *C. gattii* é encontrado mais nas regiões Norte e Nordeste. O nicho de *C. gattii* está relacionado principalmente às árvores (a enzima lacase, que degrada a lignina da madeira, auxilia neste nicho) como eucaliptos, por exemplo, mas também às outras árvores como, *Acacia visco*, *Cassia grandis*, *Ficus*, *Moquilea tomentosa*, e *Grevillea robusta* (Trilles *et al.*, 2008; Ferreira-Paim *et al.*, 2017; Firacative; Meyer; Castañeda, 2021; Serna-Espinosa *et al.*, 2021; De Holanda Fonseca *et al.*, 2024). Estudos já demonstraram que *C. gattii* está associado também ao guano de pombos e morcegos (assim como *C. neoformans*) (Dongmo *et al.*, 2016), e em fezes frescas de insetos da família *Oecophoridae* (Kidd *et al.*, 2003). A principal variedade molecular de *C. gattii* encontrada no Brasil é VGII. A linhagem VGII, particularmente o subtipo VGIIa, é frequentemente associada às infecções humanas e foi identificada em surtos na região amazônica (De Holanda Fonseca *et al.*, 2024).

A criptococose se destaca clinicamente por acometer indivíduos imunocomprometidos (*C. neoformans*) e saudáveis (*C. gattii*) (Kwon-Chung *et al.*, 2014). A gravidade dos casos dessa

doença relaciona-se à AIDS, ao uso de quimioterápicos e de imunossupressores em pacientes transplantados, além de problemas de toxicidade e resistência. Dados recentes mostraram que cerca de 147.000 mortes por meningite criptocócica são registradas anualmente, de um total de 194.000 casos. A mortalidade global da criptococose permanece alta, com taxas variando entre 75,8% e 80% dependendo da região e do acesso ao tratamento (Rajasingham *et al.*, 2022; Denning, 2024). Infecções por *C. gattii* é menos comum, mas é responsável por acometer pacientes imunocompetentes, principalmente em áreas como a região Amazônica e o Norte do Brasil. A mortalidade associada à criptococose no Brasil é em torno de 45-60%, refletindo desafios no diagnóstico precoce e tratamento adequado (Soares *et al.*, 2019; De Holanda Fonseca *et al.*, 2024).

### 1.6. Patogênese e infecção

A infecção por *Cryptococcus* se inicia pela inalação de leveduras ou por esporos (basidiósporos de *Filobasidiella neoformans* - a forma teleomórfica de *Cryptococcus neoformans* – ou de *Filobasidiella bacillispora* - a forma teleomórfica de *Cryptococcus gattii*) (Kwon-Chung; Bennett, 1992). Após a inalação, estes fungos aderem ao epitélio pulmonar, especificamente nas regiões alveolares, e todos os esporos assumem a forma de levedura. A infecção pode desencadear uma resposta inflamatória local. Macrófagos e neutrófilos alveolares fagocitam as leveduras, tentando eliminar o patógeno. No entanto, *Cryptococcus* têm várias estratégias para evadir a resposta imune, incluindo a produção da cápsula polissacarídica, a melanina e enzimas antioxidantes (Zaragoza, 2019). No ambiente pulmonar, as células criptocócicas podem multiplicar-se dentro das células do sistema imunológico ou no espaço extracelular (Zaragoza; Nielsen, 2013). Após sobreviverem e se replicarem dentro dessas células, estas leveduras podem disseminar-se pelo hospedeiro humano atingindo a corrente sanguínea, principalmente por enzimas como ureases, fosfolipases B e proteases que degradam componentes da barreira alveolar e endotélio pulmonar. Após entrar na corrente sanguínea, *Cryptococcus* comumente se direciona ao sistema nervoso central (SNC) e atravessa a barreira hematoencefálica (BHE), disseminando-se através do líquido cefalorraquidiano, podendo causar meningite, encefalite ou meningoencefalite (Yang *et al.*, 2022). Os mecanismos de invasão pela BHE são: 1) Interação com células endoteliais: *Cryptococcus* pode aderir às células endoteliais que compõem a BHE. Essa interação é mediada por moléculas de adesão e fatores de virulência expressos pelo fungo; 2) Transmigração paracelular: o fungo pode atravessar a BHE entre as células endoteliais (via paracelular) ou através das células endoteliais

(via transcelular) (Jong *et al.*, 2018); 3) Uso de macrófagos como vetores (mecanismo “Cavalo de Tróia”): macrófagos fagocitam o fungo e, posteriormente, transmigram através da BHE, levando as células fúngicas para o SNC (Santiago-Tirado; Doering, 2017). 4) Degradação enzimática da BHE: As leveduras criptocócicas secretam enzimas como ureases, fosfolipases e proteases que podem degradar componentes da BHE, facilitando a passagem destas células fúngicas (Vu; Casadevall, 2018).

Quanto à cinética da infecção, a fase aguda da criptococose pode ser assintomática ou causar sintomas respiratórios inespecíficos, como tosse e febre. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção pode ser contida pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Já nos indivíduos imunocomprometidos, a disseminação hematogênica pode ocorrer rapidamente, levando à infecção sistêmica. Quanto à fase subaguda e crônica, a meningite é a manifestação mais grave e comum, especialmente em pacientes com HIV/AIDS, apresentando sintomas como cefaleia, febre, náuseas, vômitos, rigidez de nuca, alterações mentais e sinais internos como criptococomas (granulomas contendo leveduras viáveis, podendo levar a uma infecção latente). Pacientes imunocomprometidos são suscetíveis a recorrências mesmo após o tratamento inicial (Serna-Espinosa *et al.*, 2021; Rajasingham *et al.*, 2022).

Existem outros tipos de manifestações clínicas da criptococose. São elas: criptococose cutânea - geralmente ocorre como resultado da disseminação hematogênica em pacientes imunocomprometidos, especialmente aqueles com AIDS (Perfect; Bicanic, 2015); endocardite - a endocardite por *Cryptococcus* é rara, mas foi relatada em pacientes imunocomprometidos (Colombo; Nucci, 2018); comprometimento dos gânglios linfáticos - o envolvimento dos gânglios linfáticos pode ocorrer como parte da disseminação hematogênica da criptococose (Bhuyan *et al.*, 2013); acometimento de mucosas - a criptococose pode afetar várias mucosas, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Kwon- Chung; Polacheck; Bennet, 1982); infecções nos ossos e articulações - A criptococose osteoarticular é rara, mas pode ocorrer através de disseminação hematogênica (Perfect; Bicanic, 2015); Infecções na próstata - a próstata pode ser acometida em casos disseminados de criptococose, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Abassi; Boulware; Rhein, 2015); lesões oculares – a infecção ocular por *Cryptococcus* pode levar a uveíte, endoftalmite e outras manifestações oculares graves (Chai; Teoh, 2012).

### **1.7. Virulência: fatores**

Diversos fatores de virulência estão envolvidos na complexa e agressiva patogenicidade de *C. neoformans* e *C. gattii*, bem como na capacidade de disseminação para diferentes tecidos.

Entre eles estão: a cápsula polissacarídica (inibe a fagocitose e outras respostas imunológicas como a produção de citocinas para recrutamento de outras células de defesa), as células titãs (não podem ser fagocitadas, são mais resistentes a fatores de estresse, induzem alterações na resposta imune do hospedeiro e originam células filhas de tamanho regular que podem se disseminar para outro órgão), a melanina (confere resistência a múltiplos fatores como radicais livres, radiação ionizante, atividade antifúngica e fagocitose), a fosfolipase B1 (regula a integridade da parede celular da fungo; hidrolisam ligações éster em glicerofosfolipídios e deste modo, desestabilizam membranas, promovendo a lise celular), a urease (permite evasão das células hospedeiras e a difusão para o SNC), a lacase (media a formação de melanina); a protease (inicia a invasão criptocócica nos tecidos do hospedeiro e a degradação das proteínas imunológicas), o crescimento à temperatura corporal de mamíferos (37 °C) (através de múltiplos rearranjos metabólicos e ativação de vias de sinalização), a dormência (latência e baixa atividade metabólica - inativa as fases G1 e G2 do ciclo celular; causa infecção fatal no SNC após reativação quando há declínio da resposta imune) e os biofilmes (barreira contra agentes químicos e físicos, contra fagocitose e antifúngicos; protege genes e funções metabólicas) (Zaragoza, 2019; Yang *et al.*, 2022).

### **1.8. Terapêutica**

É preocupante o aumento de micoses invasivas e o desenvolvimento de resistência de algumas espécies de fungos à terapêutica. O tratamento antifúngico é agressivo, tóxico e pode ser ineficiente. A resistência aos antifúngicos dificulta o tratamento dessas infecções, o que é agravado pelo longo uso desses fármacos, principalmente em imunocomprometidos (Firacative; Trilles; Meyer, 2021). O aumento no número de casos de criptococose é associado não só à alta exposição de indivíduos imunossuprimidos às fontes de contaminação, mas também pela precariedade do diagnóstico e prognóstico da doença. Ademais, muitas vezes a sintomatologia é confundida com outras infecções, como por exemplo, meningite bacteriana e outras infecções pulmonares. O tratamento da criptococose se dá por terapia de ataque com a associação de anfotericina B (AMB) e 5-fluorocitosina, seguido da terapia de manutenção e consolidação com fluconazol (FLC) (Ministério Da Saúde, 2021; WHO, 2022). Os polienos têm como alvo o ergosterol lipídico da membrana fúngica, causando abertura de poros e consequentemente um desequilíbrio iônico e morte celular. Apesar de a AMB ligar-se com maior avidéz em membranas fúngicas do que a de mamíferos, há algumas semelhanças entre o ergosterol da membrana fúngica e o colesterol da membrana de mamíferos o que causa graves

quadros de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade quando administrado por longo período (Mesa-Arango *et al.*, 2014). Enquanto os azóis bloqueiam diretamente a função da lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase (sendo esta enzima responsável pela conversão de lanosterol em lanosterol em 4,4-dimetilcolesta-8,14,24-trien-3 $\beta$ -ol - intermediário do ergosterol - na membrana fúngica e uma vez inibida), torna-se comprometida a biossíntese de ergosterol, o que compromete o crescimento fúngico. Como alternativa ao fluconazol, em casos de meningite, é administrado o voriconazol (VCZ), que apresenta eficiência no combate a proliferação fúngica e atinge o nível terapêutico adequado no líquido cefalorraquidiano (De Almeida Campos *et al.*, 2023; Gullo *et al.*, 2013). Finalmente, o análogo de pirimidina flucitosina (também conhecido como 5-fluorocitosina ou 5-FC) funciona como um antimetabólito que bloqueia a síntese de DNA, mas o desenvolvimento frequente de resistência e hepatotoxicidade impede o uso como monoterapia. Infelizmente, o uso generalizado de antifúngicos sustenta o rápido surgimento de resistência dessas classes de agentes antifúngicos. Portanto, entende-se que há limitações para o tratamento com esses antifúngicos, visto que AMB causa nefrotoxicidade, 5-FC causa hepatotoxicidade, enquanto tem-se observado isolados clínicos resistentes ao uso de FLC, contribuindo para falhas terapêuticas. Mediante este contexto, a busca por novos antifúngicos tem se destacado (Perfect *et al.*, 2010; De Alcântara Corrêa, 2019; Sah *et al.*, 2022).

## **1.9. Resistência**

A resistência é definida como a capacidade de um fungo sobreviver e se proliferar na presença de um agente antifúngico em concentrações que normalmente seriam inibitórias ou fungicidas (White; Marr; Bowden, 1998). Dentre os mecanismos de resistência dos fungos, destaca-se as alterações na permeabilidade da membrana (Martinez; Casadevall, 2006), a implementação de vias metabólicas alternativas (Robbins *et al.*, 2015), as modificações estruturais e genéticas no alvo da droga, as bombas de efluxo e os biofilmes (Sanglard *et al.*, 2009; Lee; Robbins; Cowen, 2023).

### **1.9.1. Alterações na permeabilidade da membrana**

As alterações na permeabilidade da membrana são um dos principais mecanismos de resistência aos antifúngicos. A membrana celular do fungo é a barreira inicial contra agentes antifúngicos, como os polienos e os azóis. Modificações na composição de lipídios e proteínas da membrana podem dificultar a entrada desses medicamentos. Alterações específicas incluem a redução na quantidade de ergosterol, o principal esteroide da membrana, que é o alvo de muitos antifúngicos (Martel *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2020). A alteração da fluidez da membrana e

a reorganização de microdomínios lipídicos também contribuem para essa resistência. Essas mudanças na membrana não apenas impedem a entrada de drogas, mas também podem ativar mecanismos de efluxo e outras respostas adaptativas celulares (Cowen *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2020).

### **1.9.2. Implementação de vias metabólicas alternativas**

A implementação de vias metabólicas alternativas é um mecanismo crucial de resistência às drogas antifúngicas. O fungo pode ajustar seu metabolismo para contornar os pontos de ataque dos medicamentos. Por exemplo, pode ocorrer a ativação da via do glioxilato, que permite ao fungo derivar energia de fontes de carbono diferentes das usadas normalmente, podendo gerar produtos como trealose e glicogênio. Além disso, o fungo pode modificar seu ciclo de ácido tricarboxílico (CAT) para aumentar a produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e adenosina trifosfato (ATP) por fosforilação em nível de substrato, compensando a inibição da cadeia de transporte de elétrons pela droga. Essas adaptações permitem ao fungo manter suas funções vitais mesmo sob estresse antifúngico (Chang *et al.* 2020; Lee; Robbins; Cowen, 2023).

### **1.9.3. Mudanças na estrutura e na genética dos alvos**

Os mecanismos de resistência de *Cryptococcus* aos antifúngicos são variados e envolvem mudanças complexas tanto na estrutura quanto na genética dos alvos das drogas. Os azóis, uma classe importante de antifúngicos, atuam inibindo a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase, codificada pelo gene ERG11. Esta enzima é crucial para a síntese de ergosterol, o principal componente da membrana celular fúngica. Mutações no gene ERG11 podem alterar a estrutura da enzima, diminuindo sua afinidade pelos azóis e, assim, conferindo resistência à droga. Além disso, uma aneuploidia pode resultar na duplicação de genes envolvidos na biossíntese de esteróis, incluindo ERG11, podendo favorecer a superexpressão desse gene (Francesconi *et al.*, 2021). Modificações na sequência de aminoácidos da lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase podem impactar a interação da enzima com os azóis. Estas inserções/deleções podem ocorrer naturalmente ou serem selecionadas sob pressão de tratamento antifúngico, resultando em uma enzima funcionalmente ativa, mas menos suscetível à inibição pelos azóis (Lee; Robbins; Cowen, 2023).

### **1.9.4. Bombas de efluxo**

As bombas de efluxo são proteínas de transporte transmembrana que expõem substâncias nocivas para fora das células, contribuindo para a resistência aos antifúngicos e à sobrevivência em ambientes hostis. Existem 2 famílias de proteínas envolvidas no efluxo de substâncias nos

fungos: os transportadores da família ABC (ATP- Binding Cassette) e os transportadores MFS (Major Facilitator Superfamily) (Tavares *et al.*, 2019). Transportadores ABC: Estes utilizam a energia derivada da hidrólise de ATP para transportar substratos através da membrana plasmática. Eles são altamente específicos e têm um papel crucial na resistência a medicamentos antifúngicos, como os azóis. Exemplos incluem os transportadores Cdr1p e Cdr2p em *Candida albicans*. Transportadores MFS: Estes utilizam o gradiente eletroquímico de íons para mover substratos através da membrana. São menos específicos que os transportadores ABC e incluem exemplos como Mdr1p em *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*. Os transportadores ABC e MFS são encontrados universalmente em todas as células de todos os organismos e são capazes de expulsar uma ampla gama de substâncias, incluindo drogas antifúngicas, toxinas metabólicas e até quimioterápicos (MDR/Pg-p nas células humanas em tratamento contra neoplasias) (Prasad; Rawal, 2014; Lawrence *et al.*, 2019). Esses transportadores são importantes para a excreção de diferentes substratos, incluindo medicamentos e nutrientes (Reddy *et al.*, 2012). *C. neoformans* e *C. gattii* não possui um número definido de transportadores ABC e MFS encontrados em seus genomas. Estes números podem variar de acordo com a cepa do fungo e o ambiente em questão (Santi *et al.*, 2014; Farrer *et al.*, 2015).

A superexpressão dos genes CDR1 e CDR2, homólogos aos transportadores ABC de *Cryptococcus* em *C. albicans*, são responsáveis pela resistência em alguns isolados clínicos, recuperados de pacientes submetidos a longas terapias (Sanglard *et al.*, 2009). Isolados clínicos de *C. albicans* se mostram resistentes ao fluconazol quando há uma superexpressão do gene MDR1 (Lohberger; Coste; Sanglard, 2014). Winski *et al.* (2022), descobriram que o transportador ABC PDR6 (AFR3), em estudos fenotípicos de uma cepa com este gene deletado, revelaram um perfil alterado de suscetibilidade antifúngica, incluindo hipersensibilidade ao fluconazol, diminuição de ergosterol, redução no material capsular do polissacarídeo secretado. Estudos em camundongos mostraram que a função desse gene era necessária para a progressão normal da infecção. Os transportadores ABC de *C. neoformans*, AFR1 e AFR3 (PDR6), foram reportados em isolados resistentes. (Sanglard *et al.*, 2009; AFR3 – Oliveira *et al.*, 2022). A regulação positiva combinada dos genes AFR1, AFR2 e MDR1 pode contribuir para a heterorresistência ao fluconazol em *C. gattii* (Chang *et al.*, 2018).

Estudos em isolados clínicos de *C. albicans* demonstraram que as bombas de efluxo participam ativamente na formação e na resistência de biofilme, pela regulação positiva acentuada de MDR1, CDR1 e CDR2 (Shi *et al.*, 2019). Tavares e colaboradores, 2019, realizaram um transcriptoma do biofilme de *C. gattii* e verificaram que os transportadores

AFR1, AFR2 e MDR1 podem estar envolvidos também no metabolismo fúngico. Os transportadores ABC e MFS possuem diferentes substratos e funções fisiológicas que contribuem para a aquisição de nutrientes e enfrentamento de diversos estresses como: choque térmico, variação de pH, hipóxia, estresse osmótico, oxidativo e defesas do sistema imunológico. *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de formarem biofilmes e desde então estes foram estudados e caracterizados (Martinez; Casadevall, 2015).

#### **1.9.5. Biofilmes e células *persisters***

Os biofilmes fúngicos, como os formados por *Cryptococcus*, representam um desafio significativo na medicina devido à sua resistência aumentada aos agentes antifúngicos e à sua capacidade de persistir em superfícies bióticas e abióticas. Biofilmes são uma comunidade sésil e organizada, aderida a uma superfície ou não e envolvida por uma matriz extracelular polimérica (MEP) autoproduzida contendo também outros componentes como proteínas, lipídeos, eDNA, eRNA, etc. Essas comunidades possuem fenótipo modificado em relação à expressão gênica e à taxa de crescimento. O crescimento em comunidades traz muitos benefícios para as células, como: aumento da concentração de nutrientes, proteção contra agressões ambientais, troca de material genético, estabelecimento de simbiose e capacidade de colonizar nichos diferentes. Desta forma, os microrganismos que crescem em biofilmes sofrem grandes modificações, diferindo das células planctônicas (Sardi *et al.*, 2013). Nos biofilmes, as bombas de efluxo são muito ativas, sendo alvos atraentes para o desenvolvimento de moléculas com atividade antibiofilme. Um certo número de inibidores de bomba de efluxo de bactérias são conhecidos para reduzir a formação de biofilmes e podem eventualmente levar ao desenvolvimento de melhores terapias. (Almatar *et al.*, 2021). Para inibidores de bombas em biofilmes de fungos, os dados da literatura mostram estudos relacionados principalmente à *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. (Morschhäuser *et al.*, 2010; Prasad; Rawal, 2014).

A formação do biofilme possui fases coordenadas, como: adesão - leveduras ficam metabolicamente ativas e se aderem firmemente; iniciação - população fúngica aumenta significativamente, se espalhando uniformemente pela superfície (a proximidade das células dentro da microcolônia pode apresentar ambiente favorável para obtenção de gradientes de nutrientes, troca genética e detecção de *quorum sensing*); produção de MEP - lipídeos, polissacarídeos, proteínas, eDNA; maturação - aumento da quantidade de material extracelular envolvendo as células e produzindo estruturas compactas, profundas e tenazes; dispersão de células fúngicas do biofilme que podem produzir as chamadas células *persisters* (células ultra

tolerantes), que se apresentam com fenótipos altamente persistentes (Martinez; Casadevall, 2015).

Vários fatores têm sido propostos para a resistência de biofilmes aos agentes antifúngicos, como: sequestro de fármacos por componentes da matriz, regulação positiva das bombas de efluxo de drogas e presença de células *persisters*. Células *persisters* são variantes fenotípicas de células do tipo selvagem e representam parte da população de biofilme que é capaz de sobreviver a altas doses de antifúngicos. As células *persisters* são avaliadas principalmente em *Candida*, onde exibem características de dormência (possuindo baixa atividade metabólica). Esse estado dormente ajuda contra drogas fungicidas, como a anfotericina B (AMB) (Wuyts; Van Dijck; Holtappels, 2018). Ainda não há dados na literatura de células *persisters* em biofilmes de *Cryptococcus*.

### **1.10. Alternativas terapêuticas**

A resistência de *Cryptococcus* aos antifúngicos atualmente disponíveis, junto com a diminuição da oferta de fungicidas sintéticos e as condições econômicas desfavoráveis da população, destaca a urgência de desenvolver novas opções terapêuticas (Perfect, 2017). Diversos estudos indicam novas alternativas terapêuticas para o tratamento da criptococose e para combater a formação de biofilmes, incluindo o uso de produtos naturais e seus derivados. A combinação de novas substâncias antifúngicas com medicamentos convencionais tem mostrado um efeito sinérgico. Dados sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, tanto contra microrganismos sensíveis quanto resistentes, bem como o potencial efeito sinérgico entre antibióticos e extratos vegetais, são significativos. Esses achados sugerem que pesquisas mais detalhadas sobre o uso terapêutico de plantas devem ser ampliadas (De Souza Santos, 2016; Silva *et al.*, 2021). Um exemplo disso é o ácido protocatecuico (ácido 3,4-dihidroxibenzóico), um derivado do ácido benzóico encontrado em frutas, nozes e vegetais, como azeitonas e arroz. Os compostos fenólicos são amplamente estudados devido às suas diversas atividades farmacológicas, incluindo a inibição da proliferação fúngica e da oxidação lipídica. Os ácidos fenólicos são caracterizados por um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila e/ou metoxila em sua estrutura. Esses ácidos fazem parte do grupo dos compostos fenólicos. Estudos mostraram que o ácido protocatecuico possui propriedades anticarcinogênicas, antioxidantes e antifúngicas (Soares *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2014).

Semelhantemente, os inibidores de bomba de efluxo são compostos promissores em experimentos que atuam na reversão ou diminuição da resistência aos antifúngicos. Ao serem administrados em combinação com antifúngicos convencionais, estes inibidores aumentam a eficácia desses medicamentos ao restaurar a concentração intracelular dos antifúngicos para níveis terapêuticos (Hayama *et al.*, 2012). Inibidores como FK506 (Tacrolimus), Verapemil e Ciclosporina A atuam contra a calcineurina, uma fosfatase serina/treonina dependente de cálcio e calmodulina, que é crucial para a sinalização celular, homeostase iônica e regulação da resposta ao estresse, como por exemplo a atividade de bombas de efluxo na detoxificação celular (Juvvadi; Lamoth; Steinbach, 2014; Holmes *et al* 2016). Estudos têm demonstrado a eficácia desses inibidores de bomba de efluxo contra determinados biofilmes fúngicos. Pesquisas em *Candida sp.* mostraram que combinações com antifúngicos como azólicos podem melhorar significativamente a resposta ao tratamento (Del Poeta *et al.*, 2000; Uppuluri *et al.*, 2008).

### **1.11. Hipótese**

Diante de todo este contexto, o presente estudo teve como proposta a hipótese de que *C. neoformans* e *C. gattii* não somente utilizem as mesmas bombas de efluxo de drogas antifúngicas, mas também o transporte dos principais componentes de matriz extracelular do biofilme em sua formação. Além disso, suspeitamos que estes biofilmes produzam células *persisters* e estes mesmos genes possam estar superexpressos, conferindo resistência aos antifúngicos. Ademais, foi investigada a capacidade de FK506 (Tacrolimus) e um derivado de ácido protocatecuico em reduzir a expressão dessas bombas e aumentar a suscetibilidade do fungo ao fluconazol como potencial alternativa terapêutica.

## 6. CONCLUSÃO

Os biofilmes formados por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* demonstraram complexidade estrutural e heterogeneidade. A caracterização dos biofilmes revelou a presença de uma matriz rica em biomoléculas que desempenham papéis cruciais no desenvolvimento desses biofilmes. A análise da expressão gênica das bombas de efluxo revelou a importância desses transportadores durante toda a formação dos biofilmes.

Os tratamentos realizados demonstraram diferenças marcantes na susceptibilidade entre células planctônicas e as células de biofilme. A combinação de fluconazol com FK506 e octila (principalmente) se destacou entre os tratamentos, sendo mais eficaz em prejudicar a formação e estruturação dos biofilmes. Os tratamentos ajudaram a destrinchar a importância das bombas de efluxo nos biofilmes. Os componentes dos biofilmes terem sido prejudicados implicou numa notável relação dessas bombas com o auxílio no transporte das principais moléculas extracelulares. Uma evidência dessa perspectiva foi a redução da expressão dos genes-alvo após os tratamentos realizados, mostrando que as bombas de efluxo possuem papéis multifacetados.

As células *persisters* de *C. neoformans* e *C. gattii* mostraram capacidade de sobreviver em concentrações muito elevadas de antifúngicos. As células *persisters* representam uma subpopulação distinta, que pode alternar fases de dormência e condições ativas. As bombas de efluxo não estavam envolvidas e não foram importantes na sobrevivência das células *persisters* no período de exposição à AMB. As células *persisters* reativaram a expressão dessas bombas após o período de exposição à AMB. Os testes de susceptibilidade mostraram o quão recalcitrantes são essas células. As combinações de fluconazol+FK506 e fluconazol+octila (principalmente) se mostraram significativamente mais eficazes.

Portanto, nossos resultados ajudaram a identificar mecanismos de resistência de biofilmes, a existência de células *persisters* das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* e novas alternativas terapêuticas no contexto da criptococose.

## REFERÊNCIAS

- ABASSI, M.; BOULWARE, D. R.; RHEIN, J. Cryptococcal disease and the burden of other fungal diseases in Uganda: Where are the knowledge gaps and how can we fill them? **Mycoses**, v. 58, n. S5, p. 85–93, 2015.
- ALMEIDA, A. M. F. *et al.* Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil: Molecular typing and antifungal susceptibility of *C. neoformans*. **FEMS yeast research**, v. 7, n. 1, p. 152–164, 2007.
- ALMATAR, M. *et al.* Efflux pump inhibitors: new updates. **Curr. Pharmacol. Rep**, v. 73, n. 1, p. 1–16, 2021.
- BARCELLOS, V. A. *et al.* Genotypic and phenotypic diversity of *Cryptococcus gattii* VGII clinical isolates and its impact on virulence. **Front. microbiol**, v. 9, p. 132, 2018.
- BASSO, L. R., Jr *et al.* Identification and properties of plasma membrane azole efflux pumps from the pathogenic fungi *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. **The journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 70, n. 5, p. 1396–1407, 2015.
- BENADUCCI, T. *et al.* Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms In Vitro and In Vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 290, 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde incorpora medicamento para meningite criptocócica**. [S. l.]: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/noticias/2021/junho/ministerio-da-saude-incorpora-medicamento-para-meningite-criptococica>. Acesso em: 19 jun. 2024.
- BRUNO, V. M.; MITCHELL, A. P. Regulation of azole drug susceptibility by *Candida albicans* protein kinase CK2. **Molecular microbiology**, v. 56, n. 2, p. 559–573, 2005.
- BHUYAN, D. Cryptococcal lymphadenitis in an immunocompetent individual: A case report. **International Journal of Medical Mycology**, 2013.
- BUSSE, O. Ueber parasitäre Zelleinschlüsse und ihre Züchtung. **Zbl. Bact. O.**, 16: 175–180 1894.
- CHAN, K.-S. *et al.* COVID-19 associated with cryptococcosis: A new challenge during the pandemic. **J. Fungi**, v. 8, n. 10, p. 1111, 2022.
- CHAI, S.-M.; TEOH, S. C. Ocular cryptococcosis as a presenting manifestation of cryptococcal meningitis in a patient with HIV. **International journal of STD & AIDS**, v. 23, n. 5, p. 377–378, 2012.

CHANG, M. *et al.* Roles of Three Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii Efflux Pump-Coding Genes in Response to Drug Treatment. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 62, n. 4, 2018.

CHANG, A. Mitochondrial Morphology, Oxidative Stress Resistance, and Pathogenesis in Cryptococcus neoformans. **Washington University in St. Louis**, 2020.

CHEN, G. *et al.* Hsp90 stress potentiates rapid cellular adaptation through induction of aneuploidy. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 246–250, 2012.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: **CLSI**; 2008.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M. Cryptococcosis: Epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 3, p. 505–519, 2018.

CORDEIRO, R. DE A. *et al.* Trichosporon asahii and Trichosporon inkin Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 645812, 2021.

COSTA-ORLANDI, C. B. *et al.* In vitro characterization of Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719–727, 2014.

COSTA-ORLANDI, C. B. *et al.* Membranolytic activity profile of nonyl 3,4-dihydroxybenzoate: A new anti-biofilm compound for the treatment of dermatophytosis. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 5, p. 1402, 2023.

COWEN, L. E.; LINDQUIST, S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5744, p. 2185–2189, 2005.

COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, drugs, and evolution: The role of cellular signaling in fungal drug resistance. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 5, p. 747–764, 2008.

COWEN, L. E. *et al.* Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 7, p. a019752, 2015.

DAVIES, B. S. J.; RINE, J. A role for sterol levels in oxygen sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 174, n. 1, p. 191–201, 2006.

DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 24, n. 7, p. e428–e438, 2024.

DE ALCÂNTARA CORRÊA, E. Identificação, resistência e sensibilidade de cepas de Cryptococcus neoformans e de Candidas sp., presentes em excretas de pombos no município de Porto Velho, RO–Brasil. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, n. 1, 2019.

CORDEIRO, R. *et al.* Trichosporon inkin biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1277–1286, 2015.

DE HOLANDA FONSECA, D. L.; SILVA, D. M. W. DA; DE ALBUQUERQUE MARANHÃO, F. C. Molecular characterization of clinical and environmental isolates from the *Cryptococcus neoformans/C. Gattii* species complexes of Maceió, Alagoas, Brazil. **Brazilian journal of microbiology**, v. 55, n. 2, p. 1369–1380, 2024.

DE SOUZA SANTOS, P. .; COSTA PIRES (ORIENTADORA), M. de F. Avaliação in vitro da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris* e seus compostos químicos majoritários sobre *Cryptococcus neoformans*. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 15, n. 179, 2022. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/37932>. Acesso em: 13 dez. 2024.

DINIZ-LIMA, I. *et al.* *Cryptococcus*: History, epidemiology and immune evasion. **Appl. Sci.** v. 12, n. 14, p. 7086, 2022.

DONGMO, W. *et al.* In vitro antifungal susceptibility of environmental isolates of *Cryptococcus* spp. From the west region of Cameroon. **Ethiop. J. Health Sci.**, v. 26, n. 6, p. 555–560, 2016.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

FARRER, R. A. *et al.* Genome evolution and innovation across the four major lineages of *Cryptococcus gattii*. **mBio**, v. 6, n. 5, p. e00868-15, 2015.

FERREIRA-PAIM, K; ANDRADE-SILVA, L; FONSECA F.M. *et al.* MLST-Based Population Genetic Analysis in a Global Context Reveals Clonality Amongst *Cryptococcus neoformans* var. *Grubii* VNI Isolates from HIV Patients in Southeastern Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.** 2017.

FIRACATIVE, C.; MEYER, W.; CASTAÑEDA, E. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes in Latin America: A map of molecular types, genotypic diversity, and antifungal susceptibility as reported by the Latin American Cryptococcal Study Group. **J. Fungi**, v. 7, n. 4, p. 282, 2021.

FIRACATIVE, C.; TRILLES, L.; MEYER, W. Recent advances in *Cryptococcus* and cryptococcosis. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 13, 2021.

FRANCESCONI, F. *et al.* Mechanisms of antifungal drug resistance. In: *Overcoming Antimicrobial Resistance of the Skin*. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 133–142.

GULLO, F., ROSSI, S., SARDI, J de C., TEODORO, V.L., MENDES-GIANNINI, M.J., FUSCO-ALMEIDA, A.M. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.32(11), p.1377-91, 2013.

HAGEN, F. *et al.* Importance of resolving fungal nomenclature: The case of multiple pathogenic species in the *Cryptococcus* genus. **mSphere**, v. 2, n. 4, 2017.

HAJIAGHA, M. N.; KAFIL, H. S. Efflux pumps and microbial biofilm formation. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 112, n. 105459, p. 105459, 2023.

HAYAMA, K. *et al.* A d-octapeptide drug efflux pump inhibitor acts synergistically with azoles in a murine oral candidiasis infection model. **FEMS microbiology letters**, v. 328, n. 2, p. 130–137, 2012.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. **British journal of biomedical science**, v. 63, n. 1, p. 5–11, 2006.

HEITMAN, J. *Cryptococcus* from Human Pathogen to Model Yeast. Washington, DC: **ASM Press**, 2011.

HOLMES, A. R. *et al.* Targeting efflux pumps to overcome antifungal drug resistance. **Future medicinal chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1485–1501, 2016.

IDNURM, A.; LIN, X. Overview of the sexual reproduction of *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 55–60, 2015.

JONG, A.; WU, C. H.; CHEN, H. M. The role of sialic acids in the pathogenesis of neurotropic fungi. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, 2018.

JUVVADI, P. R.; LAMOTH, F.; STEINBACH, W. J. Calcineurin-mediated regulation of hyphal growth, septation, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Mycopathologia**, v. 178, n. 5–6, p. 341–348, 2014.

KARABABA, M. *et al.* CRZ1, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1429–1451, 2006.

KASAI, M. *et al.* Use of Quantitative real-time PCR to study the kinetics of extracellular DNA released from *Candida albicans*, with implications for diagnosis of invasive candidiasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 1, p. 143–150, 2006.

KHUNWEERAPHONG, N.; KUCHLER, K. Multidrug resistance in mammals and fungi—from MDR to PDR: A rocky road from atomic structures to transport mechanisms. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 9, p. 4806, 2021.

KIDD, S. E.; SORRELL, T. C.; MEYER, W. Isolation of two molecular types of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from insect frass. **Medical mycology journal**, v. 41, n. 2, p. 171–176, 2003.

KODEDOVÁ, M.; SYCHROVÁ, H. Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0139306, 2015.

- KUBO, I. Molecular design of multifunctional antibacterial agents against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 11, n. 19, p. 4255–4262, 2003.
- KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **J Clin Microbiol**, v. 15, n. 3, p. 535-7, 1982.
- KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E. Cryptococcosis and its mucosal involvement: A study of 21 patients. **Journal of Clinical Microbiology**, 1982.
- KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Cryptococcosis. **Medical Mycology**, p. 397-446., Philadelphia. 1992.
- KWON-CHUNG, K. J. *et al.* *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harb. Perspect. Med**, v. 4, n. 7, p. a019760–a019760, 2014.
- LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3839–3846, 2006.
- LEE, Y.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. **npj antimicrobials and resistance**, v. 1, n. 1, p. 5, 2023.
- LI, P. *et al.* Delicate metabolic control and coordinated stress response critically determine antifungal tolerance of *Candida albicans* biofilm persisters. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6101–6112, 2015.
- LOHBERGER, A.; COSTE, A. T.; SANGLARD, D. Distinct roles of *Candida albicans* drug resistance transcription factors TAC1, MRR1, and UPC2 in virulence. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 1, p. 127–142, 2014.
- LOWRENCE, R. C. *et al.* Tackling drug resistance with efflux pump inhibitors: from bacteria to cancerous cells. **Critical reviews in microbiology**, v. 45, n. 3, p. 1–20, 2019.
- MAESAKI, S. *et al.* Synergic effects of tactolimus and azole antifungal agents against azole-resistant *Candida albicans* strains. **The journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 747–753, 1998.
- MARCOS-ZAMBRANO, L. J. *et al.* Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 304, n. 8, p. 1192–1198, 2014.
- MARTEL, C. M. *et al.* A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14-demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3578–3583, 2010.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy. **Infection and immunity**, 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* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. **Infection and immunity**, v. 74, n. 11, p. 6118–6123, 2006.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4592–4601, 2007.

MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal biofilms: Relevance in the setting of human disease. **Current fungal infection reports**, v. 4, n. 4, p. 266–275, 2010.

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

MARTINS, M. *et al.* Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 323–331, 2010b.

MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Adição de DNase melhora a atividade in vitro de drogas antifúngicas contra biofilmes de *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 55, p. 80–85, 2012.

MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current genetics**, v. 59, n. 4, p. 251–264, 2013.

MEDINA-ALARCÓN, K. P. *et al.* Alkyl Protocatechuate-Loaded Nanostructured Lipid Systems as a Treatment Strategy for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* In Vitro. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

MERKL, R. *et al.* Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 28, n. 4, p. 275–279, 2010.

MESA-ARANGO, A. C. *et al.* The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 2014.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 515–548, 1995.

MITCHELL, K. F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D. R. The extracellular matrix of fungal biofilms. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 21–35.

MORSCHHÄUSER, J. *et al.* The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in candida albicans. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 11, p. e164, 2007.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal genetics and biology**: FG & B, v. 47, n. 2, p. 94–106, 2010.

MUGUNTHAN, S. *et al.* RNA is a key component of extracellular DNA networks in Pseudomonas aeruginosa biofilms. **Nature communications**, v. 14, n. 1, 2023.

ONYEWU, C. *et al.* Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against Candida albicans, Candida glabrata, and Candida krusei. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 956–964, 2003.

OLIVEIRA, N. K. *et al.* Novel ABC transporter associated with fluconazole resistance in aging of Cryptococcus neoformans. **J. Fungi**. v. 8, n. 7, p. 677, 2022.

PERFECT, J. R. Cryptococcus neoformans: the yeast that likes it hot. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 4, p. 463–468, 2006.

PERFECT, John R. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 3, p. 291–322, 2010.

PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. **Fungal genetics and biology**: FG & B, v. 78, p. 49–54, 2015.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, 2017.

PINHEIRO, C. G. *et al.* A method for evaluating ergosterol content in wood-decay fungi. **Revista Árvore**, v. 44, 2020.

PRASAD, R.; RAWAL, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. **Frontiers in pharmacology**, v. 5, p. 202, 2014.

QIU, P. *et al.* Antifungal effects of protocatechuic acid on Candida albicans biofilm. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 207–211, 2012.

RAJASINGHAM, R. *et al.* The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. **The Lancet infectious diseases**, 2022.

RAMAGE, G. *et al.* Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in Candida albicans biofilms. **JAC**, v. 49, n. 6, p. 973–980, 2002.

RAMAGE, G. *et al.* Fungal biofilm resistance. **International journal of microbiology**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

RAMAGE, G.; WILLIAMS, C. The clinical importance of fungal biofilms. **Adv Appl Microbiol**, v. 84, p. 27-83, 2013.

REDDY, V. S. *et al.* The major facilitator superfamily (MFS) revisited: The major facilitator family revisited. **The FEBS journal**, v. 279, n. 11, p. 2022–2035, 2012.

REICHERT-LIMA, F. *et al.* Evaluation of antifungal combination against *Cryptococcus* spp. **Mycoses**, v. 59, n. 9, p. 585–593, 2016.

ROSSATO, L. *et al.* In vitro activity of immunosuppressive agents against *Cryptococcus neoformans*. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed)**, v. 40, n. 2, p. 86–88, 2022.

ROBBINS, N. *et al.* Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002257, 2011.

ROSSI, S. A. Estudo dos mecanismos de resistência e virulência de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* e quantificação de genes de bomba de efluxo pós-tratamento com Galatos de Alquila. 2014. 96 f. Tese (doutorado) - **Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, 2014.

ROBBINS, N. *et al.* An antifungal combination matrix identifies a rich pool of adjuvant molecules that enhance drug activity against diverse fungal pathogens. **Cell reports**, v. 13, n. 7, p. 1481–1492, 2015.

RODERO, L. *et al.* G484S amino acid substitution in lanosterol 14- $\alpha$  demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 11, p. 3653-6, 2003.

ROSSATO, L. *et al.* In vitro activity of immunosuppressive agents against *Cryptococcus neoformans*. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed)**, v. 40, n. 2, p. 86–88, 2022.

SAH, Sujit Kumar *et al.* Antifungal therapy in the management of fungal secondary infections in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v.5617, n. 7, p. e0271795, 2022.

SANGLARD D, COSTE A, FERRARI S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. **FEMS Yeast Res.** v. 9(7), p. 1029-50, 2009.

SANTI, L. *et al.* Proteomic profile of *Cryptococcus neoformans* biofilm reveals changes in metabolic processes. **Journal of proteome research**, v. 13, n. 3, p. 1545–1559, 2014.

SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. False friends: Phagocytes as Trojan horses in microbial brain infections. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 12, p. e1006680, 2017.

SARDI, J. C. O. *et al.* Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J. Med. Microbiol.**, v. 62, n. Pt 1, p. 10–24, 2013.

SARDI, J. D. C. O. *et al.* Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 31, n. 1, p. 22–29, 2014.

SERNA-ESPINOSA, B.-N. *et al.* Environmental Status of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii in Colombia. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 6, p. 410, 2021.

SHI, C. *et al.* Expression of fluconazole resistance-associated genes in biofilm from 23 clinical isolates of Candida albicans. **Braz. J. Microbiol.**, v. 50, n. 1, p. 157–163, 2019.

SILVA, S. P. DA *et al.* Resistance mechanisms of Cryptococcus spp. and plant compounds as tools to combat them. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e57810212819, 2021.

SIONOV, E. *et al.* Cryptococcus neoformans overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000848, 2010.

SINGULANI, J. DE L. *et al.* The antimicrobial peptide MK58911-NH<sub>2</sub> acts on planktonic, biofilm, and intramacrophage cells of Cryptococcus neoformans. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 12, 2021.

SOARES, L. A. Estudo da atividade antidermatofítica de Protocatecuatos contra T. rubrum e T. **interdigitale**. 2011.

SOARES, L. A. *et al.* Anti-*Trichophyton* activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

SOARES, A. *et al.* Mortalidade por criptococose no Brasil de 2000 a 2012: Um estudo epidemiológico descritivo. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 7, 2019.

SUN, J. *et al.* Candida albicans Amphotericin B-Tolerant Persister Formation is Closely Related to Surface Adhesion. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1–2, p. 41–49, 2016.

STONE, N. R. H. *et al.* Dynamic ploidy changes drive fluconazole resistance in human cryptococcal meningitis. **The journal of clinical investigation**, v. 129, n. 3, p. 999–1014, 3 2019.

TAVARES, E. R. *et al.* Phenotypic characteristics and transcriptome profile of Cryptococcus gattii biofilm. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 6438, 2019.

TAFF, H. T. *et al.* Mechanisms of *candida* biofilm drug resistance. **Future microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325–1337, 2013.

TRILLES, L. *et al.* Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 455–462, 2008.

VÁCHOVÁ, L. *et al.* Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. **The journal of cell biology**, v. 194, n. 5, p. 679–687, 2011.

VERSTREPEN, K. J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular microbiology**, v. 60, n. 1, p. 5–15, 2006.

VU, K.; CASADEVALL, A. Cryptococcal meningitis: Mechanisms of fungal traversal through the blood-brain barrier. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 5, n. 4, p. 195–202, 2018.

UPPULURI, P. *et al.* Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 3, p. 1127–1132, 2008.

WINSKI, C. J., QIAN, Y., MOBASHERY, S., & SANTIAGO-TIRADO, F. H. (2022). An atypical ABC transporter is involved in antifungal resistance and host interactions in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 13, n. 4, e0153922.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n. 2, p. 382–402, 1998.

**WHO.** *Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.* Geneva: WHO, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>. Acesso em: 13 dez. 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WUYTS, J.; VAN DIJCK, P.; HOLTAPPELS, M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? **PLoS pathogens**, v. 14, n. 10, p. e1007301, 2018.

YANG, C. *et al.* *Cryptococcus* escapes host immunity: What do we know? **Front. cell. Infect.** v. 12, p. 1041036, 2022.

YUAN, C. *et al.* Procatechuic acid and protocatechuic aldehyde increase survival of *Caenorhabditis elegans* after fungal infection and inhibit fungal virulence. **Frontiers in pharmacology**, v. 15, 2024.

ZARAGOZA, O.; NIELSEN, K. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 4, p. 409–413, 2013.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490-501, 2019.

ZHANG, S.; WANG, J.; AHN, J. Advances in the discovery of efflux pump inhibitors as novel potentiators to control antimicrobial-resistant pathogens. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 1417, 2023.