

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**INTERAÇÕES DE AGENTES ANTIFÚNGICOS E  
ANTIBACTERIANOS FRENTE À *Cryptococcus*  
*neoformans* ANTES E APÓS INDUÇÃO CAPSULAR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Luana Rossato**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**INTERAÇÕES DE AGENTES ANTIFÚNGICOS E  
ANTIBACTERIAIS FRENTE À *Cryptococcus neoformans*  
ANTES E APÓS INDUÇÃO CAPSULAR**

**por**

**Luana Rossato**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Orientador: Prof. Sydney Hartz Alves**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**INTERAÇÕES DE AGENTES ANTIFÚNGICOS E ANTIBACTERIANOS  
FRENTE A *Cryptococcus neoformans* ANTES E APÓS INDUÇÃO  
CAPSULAR**

elaborada por  
**Luana Rossato**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Sydney Hartz Alves, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Cecília Bittencourt Severo, Dr. (ISCOMPA)**

**Janio Moraes Santurio, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 18 de julho de 2013.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais,

**Valdir Antonio Barbieri Rossato**

**Leonalda Ana Bataglin Rossato**

Pelo exemplo de amor, fé e humildade,

compartilho esta conquista com vocês.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado, que nas horas mais difíceis me iluminou e me deu forças para seguir em frente, que quando pensei em desistir, me mostrou que o caminho a seguir era esse, obrigada!

Aos meus pais, pelo exemplo de humildade e honestidade sempre me ensinando a lutar pelos meus objetivos, ter paciência e confiança, pelo incentivo, ajuda e compreensão. Não existem palavras que possam expressar todo o meu amor e gratidão por vocês.

Aos meus irmãos, Alexandre, Mauricio e principalmente a minha irmã Andréia e ao Dinho que durante todos esses anos me ajudaram sendo meus segundos pais, estando ao meu lado nos momentos mais difíceis; a vocês meu muito obrigada!

Aos meus lindos sobrinhos, Pedro, Laura, Maria Antonia e Manuela; vocês são minha alegria e eu amo muito vocês!

Ao meu orientador, Prof. Sydney Hartz Alves, um exemplo de profissional, que conheci em 2007, me acolhendo em seu laboratório de pesquisa, possibilitando que eu vivesse grandes momentos. A você Professor Sydney não tenho palavras para expressar minha gratidão; levarei seus ensinamentos sempre comigo. Muito obrigada pelas oportunidades e por acreditar em mim!

Ao Prof. Janio Morais Santurio, um grande mestre e amigo nesse anos, que me incentivou, e me acolheu por esse período; Muito obrigada professor!

Ao LAPEMI, primeiramente as gurias da Farmácia, desde a Tatiana, Débora, Bebel, Carol, Laura, Laíssa, Vanessa, Fernanda, que me proporcionaram bons momentos, especialmente minha amiga Tarci com quem eu aprendi a ser uma pessoa melhor e a quem tenho profunda admiração pela honestidade e integridade; a Fran Chassot, que nos últimos tempos tive a honra de conhecer e conviver, um exemplo de profissional e pessoa. Muito obrigada!

As minhas amigas veterinárias e biomédicas, orientadas do professor Janio; adoro todas vocês, especialmente a Fran Kunz, que é um exemplo de ser humano e profissional. Fran te adoro e admiro muito, muito obrigada por tudo!

Aos meus amigos de Nova Palma e colegas de faculdade, especialmente minha amiga querida, Camila Donato Mahl, que sempre estiveram ao meu lado durante este período me dando força, carinho e incentivo. Obrigada!

A Sandra, nossa técnica do laboratório, pelo exemplo de pessoa que é, pela força e sabedoria frente às dificuldades que a vida lhe impôs, quero expressar a minha admiração, meu carinho e agradecimento pela convivência!

Ao Érico, pelas horas que dispôs em discutir meu trabalho e enriquecê-lo com suas idéias, muito obrigada!

Ao Régis, que auxiliou nas análises estatísticas, dispondo de seu tempo, para me auxiliar, muito obrigada!

A Louise que realizou a identificação molecular dos fungos, sempre atenciosa e querida, muito obrigada!

As meninas da Biologia Molecular, especialmente minhas amigas queridas, Bel, Dani e Carla que sempre ouviam minhas lamentações e tinham um mate para me desestressar. Gurias, muito obrigada!

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento da minha pesquisa, que torceram por mim e acreditaram na minha capacidade.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### INTERAÇÕES DE AGENTES ANTIFÚNGICOS E ANTIBACTERIANOS FRENTE A *Cryptococcus neoformans* ANTES E APÓS INDUÇÃO CAPSULAR.

Autora: Luana Rossato

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de julho de 2013.

O gênero *Cryptococcus* é constituído por fungos leveduriformes encapsulados que causam principalmente meningoencefalite criptocócica em pacientes imunocomprometidos. Esta micose evidencia elevados percentuais de morbidade e mortalidade. As falhas às terapêuticas recomendadas não está convenientemente esclarecidas e, no tocante a suscetibilidade do fungo aos antimicóticos, a resistência detectada *in vitro* é menos freqüente do que as falhas terapêuticas. Nesta conjuntura, abordaremos dois aspectos: a) considerou-se a presença da cápsula nos ensaios de suscetibilidade e, b) avaliou-se combinações entre antifúngicos convencionais (anfotericina B, fluconazol e flucitosina) bem como associações de anfotericina B com antibacterianos (azitromicina, daptomicina, linezolida, minociclina, tigeciclina e trimetropim) frente a 30 isolados de *Cryptococcus neoformans*. Os testes de suscetibilidade a cada um dos agentes antimicrobianos bem como às combinações foram realizadas com base no protocolo M27-A3 (CLSI, 2008), com adaptações para garantir o crescimento da cápsula. As combinações foram avaliadas pelo modelo “checkerboard”. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antimicóticos foram mais elevadas frente ao grupo com cápsula (Grupo II) do que no grupo sem indução capsular (grupo I); isoladamente, os antibacterianos não evidenciaram atividade antifúngica aos grupos estudados. Entre as combinações de antifúngicos, observou-se que a anfotericina B+flucitosina foi a que evidenciou maior percentual de sinergismos frente aos isolados encapsulados (grupo II), o que confirma ao observado na clínica. Nas combinações de anfotericina B com antibacterianos observou-se diferenças de atividade: no grupo sem indução capsular (grupo I) anfotericina B+minociclina e anfotericina B+ tigeciclina evidenciaram maiores percentuais de sinergismo; no grupo II os melhores resultados de sinergismo foram observados pelas combinações anfotericina B+linezolida e anfotericina B+tigeciclina.

Palavras chaves: *Cryptococcus* spp.; susceptibilidade; cápsula; associações; antifúngicos; antibacterianos

## ABSTRACT

### INTERACTIONS OF ANTIFUNGAL AGENTS ANTIBACTERIALS FRONT AND A *Cryptococcus neoformans* BEFORE AND AFTER INDUCTION CAPSULAR.

Autora: Luana Rossato

Orientador: Sydney Hartz Alves

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de julho de 2013.

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

The genus *Cryptococcus* consists of encapsulated yeasts that cause mainly cryptococcal meningoencephalitis in immunocompromised patients. This mycosis shows high percentage of morbidity and mortality. The fault is not the recommended therapeutic conveniently clarified and, concerning the susceptibility of the fungus to the antifungal, resistance detected in vitro is less frequent than the therapeutic failures. At this juncture, we discuss two aspects: a) considered the presence of the capsule in susceptibility testing, and b) evaluated combinations of conventional antifungal agents (amphotericin B, fluconazole and flucytosine) as well as associations of amphotericin B with antibacterial (azithromycin, daptomycin, linezolid, minocycline, tigecycline and trimethoprim) against 30 isolates of *Cryptococcus neoformans*. Susceptibility tests to each of the antimicrobial agents and the combinations were performed based on the protocol M27-A3 (CLSI, 2008), with adaptations to ensure the growth of the capsule. Combinations evaluated outside the model "checkerboard". The minimum inhibitory concentrations (MICs) of antifungal agents were higher outside the capsule group (Group II) than in the group without inducing capsular (group I); alone, antibacterials showed no antifungal activity groups studied. Among the combinations of antifungal drugs, showed that amphotericin B + flucytosine has been demonstrated that the highest percentage of synergism against encapsulated isolates (group II), which confirms what is observed in clinic. In the combinations of amphotericin B with antibacterial observed differences in activity: the group without inducing capsular (group I) amphotericin B +minocycline and amphotericin B + tigecycline showed higher percentages of synergism, in group II the best results of synergism were observed for combinations anfhotericin B+linezolid, and anfhotericin B+tigecycline.

Keywords: *Cryptococcus* spp.; Susceptibility; capsule; associations; antifungal, antibacterial.



**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1.....54  
TABELA 2.....54

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) para os antifúngicos testados em cepas antes e após indução capsular (C).....	77
APÊNDICE B – Atividades combinadas de anfotericina B e fluconazol frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> antes da indução capsular.....	78
APÊNDICE C– Atividades combinadas de anfotericina B e flucitosina frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> antes da indução capsular.....	80
APÊNDICE D– Atividades combinadas de fluconazol e flucitosina frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> antes da indução capsular.....	82
APÊNDICE E – Atividades combinadas de anfotericina B e fluconazol frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> após indução capsular.....	84
APÊNDICE F Atividades combinadas de anfotericina B e flucitosina frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> após indução capsular.....	86
APÊNDICE G–Atividades combinadas de fluconazol e flucitosina frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> após indução capsular.....	88
APÊNDICE H – Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) para fármacos antibacterianos antes e após indução capsular frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	90
APÊNDICE I -Atividades combinadas de anfotericina B e minociclina frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> sem indução capsular.....	91
APÊNDICE J – Atividades combinadas de anfotericina B e linezolida frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> sem indução capsular.....	93
APÊNDICE K - Atividades combinadas de anfotericina B e tigeciclina frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> sem indução capsular.....	95
APÊNDICE L – Atividades combinadas de anfotericina B e daptomicina frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> sem indução capsular.....	97
APÊNDICE M – Atividades combinadas de anfotericina B e trimetropim frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> sem indução capsular.....	99
APÊNDICE N– Atividades combinadas de anfotericina B e azitromicina contra <i>Cryptococcus neoformans</i> sem indução capsular.....	101
APÊNDICE O - Atividades combinadas de anfotericina B e minociclina frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> após indução capsular.....	103
APÊNDICE P – Atividades combinadas de anfotericina B e linezolida frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> após indução capsular.....	105

APÊNDICE Q – Atividades combinadas de anfotericina B e tigeciclina frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> após indução capsular.....	107
APÊNDICE R – Atividades combinadas de anfotericina B e daptomicina frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> após indução capsular.....	109
APÊNDICE S– Atividades combinadas de anfotericina B e trimetropim frente ao <i>Cryptococcus neoformans</i> após indução capsular.....	111
APÊNDICE T– Atividades combinadas de anfotericina B e azitromicina contra <i>Cryptococcus neoformans</i> após indução capsular.....	113

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>3.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>: aspectos históricos</b> .....	16
<b>3.2 O gênero <i>Cryptococcus</i></b> .....	17
<b>3.3 Taxonomia</b> .....	19
<b>3.4 Ecologia e ciclo biológico de <i>Cryptococcus spp</i></b> .....	19
<b>3.5 Epidemiologia</b> .....	20
<b>3.6 Patogenia e Manifestações Clínicas</b> .....	22
<b>3.7 Fatores de Virulência</b> .....	25
3.7.1 Cápsula .....	26
3.7.2 Melanina.....	27
3.7.3 Crescimento a 37°C.....	29
<b>3.8 Diagnóstico</b> .....	29
<b>3.9 Tratamento</b> .....	31
<b>3.10 Resistência</b> .....	32
<b>3.11 Testes de Susceptibilidade</b> .....	35
3.11.1 Relevância clínica dos testes de susceptibilidade.....	37
3.11.2 Influência dos fatores de virulência nos testes de susceptibilidade.....	38
3.11.3 Utilização da terapia combinada no tratamento da criptococose .....	39
<b>4 ARTIGO</b>	
<b>Title</b> .....	45
<b>Abstract</b> .....	45
<b>Introduction</b> .....	47
<b>Material and methods</b> .....	47
<b>Results and discussion</b> .....	47
<b>Conclusion</b> .....	50
<b>References</b> .....	51
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	58
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	60

<b>8 APÊNDICES .....</b>	<b>77</b>
--------------------------	-----------

# 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptococcus* alberga em torno de 50 espécies fúngicas; destas tem maior relevância médica *C. neoformans* e *C. gattii*, agentes da criptococose (CASADEVALL & PERFECT, 1998). A criptococose é uma micose oportunista com significativo impacto nas taxas de morbi-mortalidade em pacientes imunocomprometidos, sobretudo entre pacientes com a síndrome da imunodeficiência (SIDA), onde acomete 7-15% destes pacientes (LA HOZ & PAPPAS, 2013); na África estes percentuais atingem 40% (SPEED & DUNT, 1995).

A espécie *C. neoformans* encerra duas variedades: *var. neoformans* e *var. grubii*, onde esta última tem distribuição universal e representa a maioria dos casos de criptococose em imunocomprometidos (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

A terapêutica antifúngica está definida em consenso, todavia as falhas terapêuticas ocorrem; de modo geral, os isolados fúngicos de casos de falhas terapêuticas não evidenciam resistência *in vitro* (PERFECT et al, 2010).

Por outro lado é pertinente considerar que nos processos infecciosos, o fungo, via de regra, apresenta-se com cápsula bem desenvolvida. Após isolamento em Agar Sabourand ou outro meio que permita seu crescimento, esta cápsula torna-se muito reduzida. Por ocasião dos testes de suscetibilidade, as técnicas padronizadas (M27-A3; CLSI 2003) não consideraram que a presença/ausência de cápsula possa se constituir num interferente aos ensaios *in vitro*.

Recentemente, Vitale et al (2012) comprovou que a suscetibilidade de um mesmo isolado pode diferir significativamente em decorrência da presença da cápsula (VITALE et al, 2012).

Um outro contexto da importância na antifúngica terapia, é a combinação de fármacos, pois, constatando-se sinergismo, a toxicidade de alguns fármacos como a anfotericina B, pode ser reduzida. A combinação anfotericina B+flucitosina é bem consolidada como opção terapêutica na criptococose; entretanto outras combinações, sejam entre antimicóticos e fármacos de outras classes, merecem avaliações. Considerando-se que os pacientes imunocomprometidos estão, em geral, sob cobertura antibacteriana, elegemos este grupo para compor associações com antifúngicos recomendados para tratamento da criptococose.

## **2OBJETIVOS**

Considerando-se que a cápsula de *C.neoformans* pode se constituir numinterferente da suscetibilidade e que a mesma pode ser induzida *in vitro*, o presente estudo teve como objetivos:

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a suscetibilidade de *C.neoformans* com presença e ausência de cápsula frente a combinações selecionadas de fármacos antifúngicos e/ou antibacterianos.

### **2.2 ObjetivosEspecíficos**

2.2.1 Avaliar através das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) a suscetibilidade de *C. neoformans* com e sem indução de cápsula frente a anfotericina B, flucitosina, fluconazol, azitromicina, daptomicina, linezolida, minociclina, tigeciclina e trimetropim.

2.2.2 Avaliar através do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) a suscetibilidade de *C.neoformans* com e sem indução de cápsula frente a combinações entre antifúngicos: anfotericina B+ fluconazol, anfotericina B+flucitosina e fluconazol+ flucitosina.

2.2.3 Avaliar através do ICIF a suscetibilidade de *C.neoformans* com e sem indução com capsular frente a combinações de anfotericina B com: azitromicina, daptomicina, linezolida, minociclina, tigeciclina e trimetropim.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 *Cryptococcus neoformans*: aspectos históricos

O *Cryptococcus neoformans* foi primeiramente identificado como patógeno humano em 1894 na Alemanha, por Busse e Buschke que observaram a presença de leveduras em lesões ósseas, e as nomearam como *Saccharomyces hominis*. Nesse mesmo ano, na Itália, Sanfelice isolou leveduras encapsuladas de sucos de frutas e as denominou de *Sacharomyces neoformans* (KNOKE, 1994).

Curtis(1896), isolou o fungo de uma lesão tumoral em humano e o denominou *Saccharomyces subcutaneus tumefaciens*. Por outro lado, Vuilleminet al (1901) considerou mais adequado enquadrar esta levedura no gênero *Cryptococcus* já que não observaram fermentação nem formação de ascospóros como estruturas de reprodução que caracterizariam o gênero *Saccharomyces* (LACAZ et al, 2002; LAZERA et al, 2004).

Benham (1935) revisou os gêneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus* e *Torula*, concluiu que se tratava de um único gênero e em 1950 esta autora propôs a designação *Cryptococcus neoformans* para o agente, e o termo criptococose para a denominação da doença, iniciando uma nova fase de estudos em relação a este fungo (LAZERA et al, 2004).

Em 1949, Evans em estudos sorológicos encontrou diferenças entre isolados clínicos de *C. neoformans* e identificou propondo uma divisão em sorotipos A, B e C (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

Emmons(1955) evidenciou o habitat natural do fungo, mostrando a relação saprobiótica do *C. neoformans* com matéria orgânica rica em excretas de aves, principalmente fezes secas de pombos, ninhos e solos contaminados (LAZÉRA et al,2004).

Em 1962, Staib acrescentando extrato de fezes de aves em meios de cultura, observou que *C. neoformans* produzia colônias de coloração marrom com produção de melanina que provavelmente, ocorria devido à presença das sementes de *Guizotia abyssinica* que estes pássaros utilizavam em sua alimentação (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).

O ciclo de vida completo do *C. neoformans* foi descrito por Kwon-Chung (1975). Esta autora observou que o fungo apresentava dois *mating types*, *ae a*, e que quando cruzados reproduziam a fase teleomorfa basidiomicética. Nesta fase, o fungo foi classificado como sendo pertencente ao gênero *Filobasidiella* (KWON-CHUNG e BENNETT, 1992).



### 3.2 O gênero *Cryptococcus*

*Cryptococcus* é um gênero que inclui mais de 50 espécies. *C. neoformans* e *C. gattii* são considerados as únicas espécies de *Cryptococcus* patogênicas para os seres humanos, devido a sua capacidade em crescer a 37° C. No entanto, outras espécies, como o *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. curvatus*, tem sido relatados ocasionalmente como causas de infecção (KRAJDEN et al, 1991; DROMER et al, 1995; KORDOSSIS et al, 1998).

Além disso, *C. adeliensis*, é uma nova espécie isolada de algas na Antártida, que pode ser confundida com *C. albidus*, e foi relatada como causa de meningite em um paciente com leucemia mielóide aguda (RIMEK et al, 2004).

*C. neoformans* e *C. gattii* são leveduras heterotáticas encapsuladas que produzem um estado teleomorfo sob condições experimentais. Durante a fase haplóide do seu ciclo de vida, essas leveduras crescem em meios de cultura comumente utilizados na rotina, em 48-72 horas, com coloração branca a creme, sendo de aspecto mucóide de acordo com o tamanho da cápsula das células. Histologicamente, as leveduras são esféricas a ovais, com forma e tamanho variável, apresentando brotamentos únicos ou múltiplos. As células de *C. gattii* podem apresentar algumas células alongadas com tamanho maior (KNOW-CHUNG & VARMA, 2006).

O *Cryptococcus neoformans* apresenta-se na forma de uma levedura basidiomicética esférica e encapsulada. Esta cápsula pode medir de 1 a 3 µm de espessura, enquanto o tamanho da levedura como um todo é usualmente 4 a 6 µm de diâmetro (KWON-CHUNG, 1975). Apresenta-se como um fungo de distribuição mundial, vida livre, que habita uma grande variedade de nichos ecológicos, sendo principalmente isolado do solo e fezes de pombos. Causa uma doença denominada criptococose que tem ocorrência esporádica, havendo grande desproporção entre o número de pessoas expostas e as que adoecem. A infecção é causada comumente por duas espécies, *C. neoformans* e *Cryptococcus gattii*, sendo que o *C. neoformans* apresenta duas variedades, *var. neoformans* e *var. grubii* (CASADEVALL & PERFECT, 1998).

As células estão envoltas por uma cápsula polissacarídica, cujo tamanho está relacionado com a genética e condições de crescimento tais como: fatores nutricionais,

tensão de CO<sub>2</sub> e temperatura. A cápsula pode ser visualizada em preparação com tinta Nanquim. Aparece como um halo claro em torno da levedura em um campo de fundo negro, pois a tinta não penetra na cápsula. Na natureza e em meios de cultura, a maioria das cepas possuem pequenas cápsulas, enquanto nos tecidos, geralmente mostram cápsula bem desenvolvida. Através de microscopia eletrônica de varredura observa-se uma rede de fibrilas ligadas a parede celular (KNOW-CHUNG & VARMA, 2006). As diferenças na estrutura capsular e reatividade capsular frente a diferentes soros policlonais de coelho, permite identificar cinco sorotipos diferentes, nomeados: A, B, C, D e AD. Estes sorotipos correspondem a *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipos B e C) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipos D e AD). Recentemente, os sorotipos B e C foram classificados como pertencentes a uma espécie diferente, o *Cryptococcus gattii*, pois apresentam significativas diferenças genéticas e biológicas, quando comparado com os sorotipos A e D (KNOW-CHUNG & VARMA, 2006).

A parede celular tem como funções dar forma a célula e proteger contra as variações de osmolaridade, sendo claramente visível com microscopia óptica, como uma estrutura dupla e com contornos refráteis. A glicose é o principal componente da parede celular, que contém também hexosamina, nitrogênio e fosfato. A fração solúvel em água da parede da célula contém um polissacarídeo composto principalmente de  $\beta$ -D (1,6)-glucopiranas e o componente insolúvel em água contém essencialmente,  $\alpha$ -D(1,3)-glucano (OSTROSKY-ZEICHNER et al, 2005). O citoplasma mostra estruturas celulares eucarióticas típicas, tais como núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático e ribossomos. Além disso, vários vacúolos podem ser vistos através da microscopia óptica e se presume que contenham lípidos de armazenamento. O *Cryptococcus neoformans* apresenta reprodução sexuada e assexuada. A levedura apresenta forma assexuada ou forma anamórfica de *C. neoformans* e *C. gattii*, que é encontrada tanto em isolados clínicos como em amostras ambientais. Várias diferenças têm sido reconhecidas entre essas duas espécies com relação aos seus ciclos de vida, fisiologia, ecologia, genética e patologia. A forma de reprodução sexuada ou teleomórfica ocorre por basidioconídios. Nesse caso a maioria dos isolados são heterotálicos, sendo o heterotalismo controlado pelo sistema de um *locus* e dois alelos A e  $\alpha$ . Sob tais condições, desenvolvem-se hifas dicarióticas, que dão origem a basidioconídios que diferem em tamanho e forma nas duas espécies, denominadas de *Filobasidiella neoformans* e *F. Bacillispora* (OSTROSKY-ZEICHNER et al, 2005).

### 3.3 Taxonomia

Desde os primeiros isolamentos de *Cryptococcus*, sua taxonomia vem sendo revisada. Com base em diferenças genéticas, o sorotipo A de *Cryptococcus neoformans* foi considerado como variedade distinta (*Cryptococcus neoformans* var. *grubii*) do sorotipo D (*C. neoformans* var. *neoformans*) (FRANZOT et al, 1999). Esta designação tem sido utilizada por diversos autores. Em uma revisão filogenética, diferentes genes (*URA5*, *CNLAC1*, *CAP59*, *CAP64*, *IGS* e *ITS rRNA*, *mtLrRNA*) de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* e de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* foram analisados (KATSU et al, 2004). Independente do marcador utilizado, a variedade *gattii* constitui-se em grupo monofilético distinto e divergente da variedade *neoformans*. De fato, são reconhecidas pelo menos duas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans*: *Cryptococcus gattii* (*Cryptococcus neoformans* var. *gattii*) e *Cryptococcus neoformans* (*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*) (KWON-CHUNG, 1975). Recentemente, Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), estabeleceram que no estado teleomórfico, o complexo *C. neoformans* e *C. gattii* é classificado em: Reino Fungi, filo Basidiomycota, ordem Tremellales, família Tremellaceae, gênero *Filobasidiella*, espécies *Filobasidiella neoformans* variedade *neoformans* (Sorotipo A e D) e *Filobasidiella neoformans* variedade *bacillispora* (Sorotipo B e C). No estado anamorfo as espécies correspondentes são: *Cryptococcus neoformans* (Sorotipo A e D) e *Cryptococcus gattii* (Sorotipo B e C).

### 3.4 Ecologia e ciclo biológico de *Cryptococcus* spp.

A espécie *C. neoformans* apresenta distribuição cosmopolita e está associada a diversos habitats, principalmente excretas de pombos, que são ricos em compostos nitrogenados, que favorecem o desenvolvimento desse micro-organismo. É encontrada, ainda, em árvores, como eucaliptos e madeira em decomposição (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

*C. neoformans* var. *neoformans* é encontrado principalmente em fezes de pombos, e também de outras aves, tais como periquitos, papagaios e canários. É isolado do meio ambiente, do solo e vegetais em decomposição. Nos pombos encontramos pequenas concentrações em amostras do bico, pés e swabs retais (LITTMAN & BOROK, 1968).

A espécie *C. neoformans* var. *grubii*, possui distribuição universal, ocorrendo em uma variedade de nichos ecológicos, como substratos orgânicos e habitats relacionados, entre os quais se destacam: construções antigas, torres de igreja, estábulos, porões, barracões, cavernas, além de excretas de aves, fezes de morcegos e baratas, ninhos de vespa, suco de frutas, leite, recintos de coelhos, buracos de tatus, solo e várias espécies vegetais (LAZÉRA et al, 1998; 2000). O *Cryptococcus* var. *grubii*, é observado, também, em excretas acumuladas de pombos urbanos, material vegetal em decomposição e material proveniente de ocos de árvores vivas (LAZÉRA et al, 2000; COSTA et al, 2009).

O *C. gattii* até então possuía distribuição restrita a países de clima tropical e subtropical, quando foi relatada uma epidemia numa região de clima temperado em Vancouver no Canadá (KWON-CHUNG & BENNETT 1984; ELLIS & PFEIFFER 1990; KIDD et al, 2004), estando relacionado a espécies de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) presente nessa região. Concentrações elevadas do organismo (até 1000 UFC/g) são encontradas em árvores envelhecidas, onde os micro-organismos ficam protegidos da luz solar. O *C. gattii* pode utilizar o material lenhoso, que é rico em compostos fenólicos, como substrato para o crescimento, devido a atividade da enzima fenol oxidase. Após isolamentos do fungo de flores e folhas de árvores de *E. camaldulensis*, durante o período de floração, presumiu-se que o ciclo de vida existente na natureza é sexuado, pois envolve formação de basidiósporos, e a dispersão destes propágulos potencialmente infecciosos ocorre durante a temporada de florescimento (ELLIS & PFEIFFER, 1990).

### 3.5 Epidemiologia

A epidemiologia da criptococose é ainda pouco compreendida, principalmente, em relação às fontes de infecção e, aos casos de recorrência. Acredita-se que a maior parte destes episódios ocorra pela persistência do patógeno em indivíduos imunocomprometidos, embora pouco se saiba que proporção pode ser causada por um novo isolado. A melhor compreensão destes casos beneficiaria as estratégias de prevenção da criptococose (MARTINS et al, 2007).

O surgimento de terapias imunossupressoras agressivas proporcionou um aumento progressivo nos casos confirmados desta doença. Na década de 80, com o advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) o número de casos descritos passou a ser

bastante alto, sendo que hoje esta doença tornou-se um fator predisponente da criptococose (SILVA et al, 2008). Segundo a Coordenação Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde, no período de 1980 a 2002, 6% das infecções oportunistas encontradas em pacientes HIV positivos foram causadas pelo *Cryptococcus neoformans*. Considerando as infecções fúngicas oportunistas que acometem pacientes portadores de HIV no mundo, a criptococose é a segunda mais freqüente, ficando atrás somente das candidíases, causando principalmente complicações neurológicas devido a meningite criptococócica (SILVA et al, 2008).

Embora a criptococose seja uma doença fatal em muitos países em desenvolvimento, a SIDA tornou-se uma doença crônica nos países desenvolvidos após a introdução da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART) em meados da década de 1990. Dessa forma a incidência da criptococose associada ao HIV tem diminuído nos países desenvolvidos desde a introdução dessa terapia. Mesmo assim esta doença continua a causar significativa morbidade e mortalidade (LA HOZ & PAPPAS, 2013), representando uma ameaça mundial, pois acomete 7-15% de pacientes com HIV/ SIDA em todo o mundo, sendo que os percentuais elevam-se a 40% na África (SPEED & DUNT, 1995).

Pesquisas recentes na África analisaram 294 amostras de líquido cefalorraquidiano provenientes de 105 pacientes soropositivos para o HIV. Evidenciou-se positividade para *Cryptococcus* em 29 dessas amostras. Estas foram obtidas de pacientes que não estavam sobre tratamento antiretroviral. Sintomas de meningoencefalite foram observados em 13 pacientes. Isso torna clara a problemática relacionada à criptococose em pacientes HIV positivos na África (DZOYEM et al, 2012).

Na China, infecções por *C. neoformans*, que havia sido considerado um fungo raro no passado, têm aumentado gradativamente nos últimos vinte anos. Ao contrário de muitos outros países, a maioria dos pacientes chineses com criptococose não têm quaisquer doenças subjacentes identificáveis ou condições predisponentes (WU et al, 2011).

Estudo retrospectivo realizado na China em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) observou que os patógenos fúngicos mais freqüentemente encontrados eram o *Cryptococcus neoformans* (50,0%), *Aspergillus spp.* (16,7%) e *Candida spp.* (16,7%). Os locais de infecção incluíam pulmão (44,4%), sistema nervoso central (44,4%) e infecções fúngicas invasivas (11,1%) (CHEN et al 2012).

No Brasil, a criptococose é a segunda doença neurológica mais prevalente em pacientes com SIDA (MARTINS et al, 2007; PAPPALARDO et al, 2007; VIDOTTO et al,

2006). O índice de mortalidade da meningite criptocócica varia de 15% a 30%, mesmo com o tratamento antifúngico (CHARLIER et al, 2008).

*C. gattii* apresenta epidemiologia e ecologia distintas do *C. neoformans*, pois não tem distribuição universal e é praticamente restrito às regiões tropicais e subtropicais do Brasil, África, Austrália e sul da Califórnia nos EUA. No entanto, a descrição do surto de Vancouver Island (Canadá) sugere que *C. gattii* esteja se adaptando aos ambientes de clima temperado (KIDD et al., 2004). Os casos relatados no Canadá contrastam com os casos esporádicos e associados a SIDA, que foram descritos até então pela literatura médica e veterinária (HEITMAN et al, 2011).

### 3.6 Patogenia e manifestações clínicas

A infecção inicial por *C. neoformans* é adquirida pela inalação de esporos de células fúngicas (basidiósporos), que são partículas de pequeno tamanho, facilmente aerossolizáveis e mais resistentes à dessecação do que as células leveduriformes. Constituem-se nas prováveis partículas infectantes que estão no meio ambiente. O processo infeccioso pulmonar permanece latente por períodos variáveis de tempo até que um desequilíbrio na relação agente-hospedeiro permite a reativação da infecção e a disseminação. A doença clinicamente manifestada tem sido principalmente pulmonar e do sistema nervoso central (SNC), uma vez que este último sítio apresenta concentrações ótimas de tiamina, carboidratos, minerais e nutrientes assimiláveis pelo fungo, bem como a presença de precursores de melanina (GARCIA-HERMOSO et al, 1999; LIFSON et al, 2006).

Após a instalação do fungo nos pulmões, o micro-organismo pode ser eliminado pelo sistema imune ou progredir para formas clínicas variáveis, desde formas assintomáticas a quadros pneumônicos com febre, tosse, dor no peito e perda de peso (CHAYAKULKEEREE & PERFECT, 2006). No espaço alveolar, os macrófagos fazem a linha primária de defesa. Estas células são essenciais na defesa do hospedeiro contra *C. neoformans* (MANSOUR & LEVITZ, 2002; SHAO et al, 2005).

Os sinais e sintomas apresentam-se muito semelhantes a um estado gripal, com tosse e expectoração mucóide. Outras vezes podem apresentar-se como dor torácica, hemoptise e febre (MITCHELL & PERFECT, 1995).

Salienta-se que a doença pulmonar sintomática pode não estar necessariamente presente quando a doença extra-pulmonar for reconhecida, podendo assumir formas agudas, subagudas, crônicas, e apresentando-se de difícil diagnóstico sendo, às vezes, confundida com outras doenças pulmonares (MITCHELL & PERFECT, 1995).

A partir dos pulmões, o fungo pode disseminar-se para outros órgãos através da circulação sanguínea, atingindo o sistema nervoso central (SNC), causando meningoencefalite/ meningite criptocócica. O mecanismo pelo qual *C. neoformans* invade o sistema nervoso central é fundamental na compreensão da patogênese da criptococose, que geralmente se apresenta como meningoencefalite. Há evidências de invasão direta das células endoteliais e/ou também após a ingestão por macrófagos. Mais recentemente também foi descrito o mecanismo de invasão direta do cérebro via capilares, envolvendo deformação celular. Assim, o notável neurotropismo de *C. neoformans* pode ter mais de um mecanismo (SHI et al, 2010).

A neurocriptococose é a forma clínica mais importante, sendo também a mais relacionada com mortes em casos de criptococose. Geralmente, em pacientes imunocomprometidos, tais como portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), a neurocriptococose é insidiosa, apresentando poucos sintomas meníngeos. No entanto, em alguns pacientes, a infecção é mais abrupta, causando cefaléia, a visão borrada, ou distúrbios mentais, tais como confusão, depressão e agitação (BRANDÃO et al, 2004).

O neurotropismo de *Cryptococcus spp* pelo sistema nervoso central (SNC) está ligado à necessidade de substratos fenólicos, como catecolaminas, para a formação de melanina. O fungo melanizado resiste melhor ao ataque de macrófagos, pois o caráter antioxidante da melanina torna o fungo mais resistente ao dano oxidativo dos macrófagos (KWON CHUNG & BENNETT, 1992).

A criptococose, além do pulmão e SNC, pode se manifestar em qualquer órgão, incluindo fígado (NARA et al 2008), pele (VAN GRIEKEN et al, 2007; DURDEN et al 1994), trato urinário (SOBEL & VASQUEZ, 1999), olhos (SEATON et al, 1997) e articulações (CUELLAR et al, 1992). Infecções oculares em geral são complicações da meningite criptocócica e tem sido cada vez mais reconhecidas. Suas manifestações incluem ceratite, papiledema, escotoma, coriorretinite, paralisia ocular, podendo muitas vezes levar a perda irreversível da visão. A infecção intra-ocular é o resultado da infiltração das células leveduriformes do espaço subaracnóide ou da disseminação hematogênica de outros sítios infectados (KESTELYN et al 1993). O envolvimento ocular em alguns casos, precede a meningite criptocócica sintomática. A coriorretinite criptocócica é semelhante a infecções

por *Candida*, mas geralmente apresenta-se com poucas lesões. O diagnóstico é feito pelo exame do humor aquoso ou do vítreo. Deve-se enfatizar que há casos de perda de visão na ausência de lesões oculares em pacientes com meningite criptocócica, devido a neurite causada pela invasão do nervo óptico pelo patógeno, que ocorre em 12-24 horas após o início dos sintomas ou no início da terapia medicamentosa (JOHNSTON, CORBETT, FOSTER, 1992; REX et al, 1993). A perda visual progressiva e lenta, relaciona-se com o aumento da pressão intracraniana, podendo ocorrer durante o tratamento da meningite criptocócica. Nesses casos a recuperação de visão é incomum, portanto, o reconhecimento precoce e tratamento são essenciais para evitar sequelas permanentes (PERRY & DONNENFELD, 1990).

O sistema linfático pode ser muitas vezes o único local aparente da infecção, particularmente em doentes infectados com HIV. Os linfonodos cervicais ou supraclaviculares são os mais envolvidos. A aspiração por agulha fina, dos linfonodos aumentados, em pacientes de alto risco, tem representado um procedimento diagnóstico excelente em termos de rendimento e rapidez no isolamento do fungo, bem como detectar a presença desse micro-organismo em preparações citológicas (ALFONSO et al, 1994).

Na pele, podem ocorrer lesões cutâneas após a inoculação desse micro-organismo (NAKA, MASUDA, KONOYAMA, 1995), mas a grande maioria dos casos de lesões de pele são resultantes da disseminação hematogênica (HAY, 1985). Estima-se que ocorram em pelo menos 10-15% dos doentes, principalmente os acometidos pela AIDS, sarcoidose e aqueles que receberam altas doses de corticosteróides (VIVIANI et al, 2006). Pápulas indolores são geralmente as lesões iniciais. Em seguida, lesões múltiplas e extremamente variadas podem ocorrer, como nódulos, úlceras, púrpura, lesões acneiformes, abscessos, granulomas e placas (HAY, 1985). A impressionante variedade de manifestações cutâneas enfatiza a necessidade de realizar exames histopatológicos e cultura de biópsias de qualquer lesão de pele em pacientes de alto risco, uma vez que o diagnóstico da infecção ou de infecções concomitantes podem ser facilitadas (VIVIANI et al, 2006).

Nos ossos, a criptococose é uma infecção rara e grave, dificilmente diagnosticada no momento da apresentação, pois pode ser confundida com outras infecções ou com uma doença neoplásica. A osteomielite afeta hospedeiros imunocompetentes, assim como, imunocomprometidos, com sarcoidose, e é rara em pacientes com AIDS, apesar do envolvimento da medula óssea ter sido observado (BEHRMAN, MASCI, NICHOLAS, 1990). As vértebras e proeminências ósseas são os locais mais envolvidos. Os casos de criptococose óssea em geral são decorrentes da meningite (CASH & GOODMAN, 1983).



Muitas vezes, os sintomas podem estar ausentes, apesar das radiografias apresentarem anormalidades; todavia os sintomas envolvem dor, inchaço dos tecidos moles e sintomas gerais de infecção disseminada. O diagnóstico por imagens revela lesões osteolíticas erodidas consistentes com áreas de destruição óssea associada com abscessos contendo muco e pus. Na histopatologia observa-se tecido de granulação com granulomas de células gigantes. O diagnóstico pode ser feito pela aspiração, incisão, drenagem ou por cirurgia (BEHRMAN, MASCI, NICHOLAS, 1990).

Na criptococose disseminada, qualquer órgão ou tecido pode ter focos de infecção. A próstata tem sido apontada como um reservatório assintomática da infecção, particularmente, em pacientes com a SIDA. O fluido seminal e urina, coletados após massagem prostática, revelaram a presença de *Cryptococcus*. Assim, a infecção pode persistir após o tratamento bem sucedido da doença disseminada. Logo, em caso de interrupção do tratamento, a próstata deve ser avaliada quanto a persistência da infecção (LARSEN et al, 1989).

### 3.7 Fatores de Virulência

Uma variedade de fatores relaciona-se à virulência de *Cryptococcus neoformans*, permitindo o escape do micro-organismo frente às defesas do hospedeiro, garantindo sua sobrevivência e multiplicação. Esses fatores incluem a síntese de melanina (GOMEZ & NOSANCHUK, 2003), produção de urease e protease, secreção fosfolipase e produção de manitol (COX et al 2000; COX et al, 2001), formação de células gigantes (ZARAGOZA et al, 2010) e capacidade de sobrevivência a temperatura corporal do hospedeiro. Todavia, a principal característica que distingue *C. neoformans* de outros fungos patogênicos é a cápsula polissacarídica que circunda a parede da célula sendo considerado o principal fator de virulência (DOERING, 2009).

#### 3.7.1 Cápsula

A cápsula polissacarídica de *C. neoformans* é uma estrutura muito dinâmica. A alteração da dimensão da cápsula é uma característica típica de algumas cepas de *C. neoformans* durante a interação com o hospedeiro; é considerada como resposta morfológica precoce durante a infecção. O aumento capsular ocorre algumas horas após a infecção, em modelos murinos, o que também é observado durante o parasitismo intracelular. Além disso, durante o curso da infecção, as propriedades imunogênicas da cápsula podem mascarar este fenômeno, adaptando-se a fim de permitir a sobrevivência do fungo no hospedeiro (KNOWN-CHUNG et al, 2006). Nesse contexto, níveis aumentados de glucuronoxilomanana (GXM) no soro de pacientes são correlacionados com um prognóstico negativo, indicando a evolução da doença (MCFADDEN, ZARAGOZA & CASADEVALL, 2006).

O tamanho da cápsula também varia em função das condições de crescimento; no solo e sob condições laboratoriais, o tamanho da cápsula é relativamente pequeno e as leveduras são facilmente inaladas. No entanto, no hospedeiro a concentração fisiológica de CO<sub>2</sub>, a limitação de ferro férrico e a presença de soro, proporcionam o aumento do tamanho da cápsula, tornando esse micro-organismo resistente às defesas do hospedeiro (RIVERA et al, 1998; VARTIVARIAN et al, 1993; ZARAGOZA et al, 2009). Em geral, os sinais que induzem o crescimento da cápsula são muito heterogêneos, tais como pH, concentrações de ferro livre, disponibilidade de CO<sub>2</sub>, osmolaridade do meio, concentração de nutrientes, temperatura e presença de soro (ZARAGOZA et al, 2009).

A cápsula de *Cryptococcus neoformans* é composta de polissacarídeos complexos que são sintetizadas dentro da célula, transportados por vesículas através da parede celular e, em seguida, ligam-se de forma não-covalente à superfície da célula, onde se formam polímeros longos. Dessa forma, os polissacarídeos não apenas participam das etapas iniciais de interação do fungo com células hospedeiras, como também está em contato constante com as células do indivíduo infectado. Esse contato determina alterações na regulação de citocinas e interferência na apresentação do antígeno ao hospedeiro. Outro mecanismo é o fato de que, após a fagocitose, o polissacarídeo capsular se acumula dentro de vesículas dos macrófagos promovendo efeitos citotóxicos e levando à morte destas células, o que esclareceria também a diminuição da migração leucocitária nos sítios inflamatórios, como nos pulmões (STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003).

A cápsula polissacarídica não está envolvida apenas na patogênese. Relatos demonstram que essa cápsula também tem um importante papel na sobrevivência do *C. neoformans* no meio ambiente, aumentando a resistência do fungo contra a dessecação, efeito de radiações solares, protegendo o fungo contra predadores, como nematóides e amebas

(ZARAGOZA et al, 2009). Os polissacarídeos encontrados na parede celular são constituídos de uma rede contendo glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomana (GalXM)(KOZEL et al,2003). Além desses, encontram-se manoproteínas, glicanos e quitooligômeros(RODRIGUES& NIMRICHTER,2012). A GXM é o componente mais abundante da cápsula do *C. neoformans* (~90% de toda cápsula) (KOZEL et al, 2003). Ela apresenta massa entre 1700 a 7000 KDa e é composta por uma cadeia linear de manose com ligações  $\alpha$  (1,3) com substituições de xilose  $\beta$  (1,2) e  $\beta$  (1,4) e resíduos de ácido glucurônico (GlcA)  $\beta$  (1,2) (MCFADDEN, ZARAGOZA & CASADEVALL, 2006; MCFADDEN, DE JESUS & CASADEVALL, 2006; RODRIGUES et al, 2009). As fibras de GXM estão unidas a parede celular pelas glucanas por meio de interações não covalentes (FRASES et al., 2008). A GalXM tem uma massa de aproximadamente 100 KDa sendo formada por uma parte central de galactose contendo ligações  $\alpha$  (1,6) e ramificações de galactose  $\beta$  (1,3), manose  $\alpha$  (1,4) e  $\alpha$  (1,3) e de xilose  $\beta$  (1,3) e  $\beta$  (1,2) (MCFADDEN, ZARAGOZA & CASADEVALL, 2006; ZARAGOZA et al, 2009). Alterações no tamanho e densidade da cápsula podem ocorrer como fuga ou evasão ao sistema imune, demonstrando que ela é regulada por células específicas em resposta ao ambiente (O'MEARA & ALSPAUGH, 2012).

A virulência correlaciona-se com o tamanho da cápsula, *in vivo*, sendo que a regulação na formação de cápsula é um fator crítico na fisiopatologia da doença criptocócica. Acredita-se que os processos de regulação do tamanho capsular derivam de mutações de genes específicos, gerando células com cápsulas anormais. Uma variedade de fenótipos está relacionada com o tamanho ou a natureza da cápsula o que permitiu a identificação de uma grande variedade de genes mutantes (CLANCY et al, 2006).

### 3.7.2 Melanina

A produção de melanina constitui outro fator de virulência importante, relacionado ao fungo, pois possui ação antioxidante e antifagocítica (STEENBERGEN&CASADEVALL, 2003). Ela encontra-se na parede celular do *Cryptococcus* spp. e contribui para a sobrevivência do fungo por manter a integridade deste envoltório.

A melanina possui um radical livre estável, que é insolúvel nos solventes fisiológicos e resistente à degradação por ácidos. Desta maneira, protege o fungo dos radicais livres tóxicos que são produzidos pelo sistema de defesa do hospedeiro (STEENBERGEN;

CASADEVALL, 2003). Quimicamente são macromoléculas formadas por polimerização oxidativa de compostos indólicos ou fenólicos, com caráter hidrofóbico e carregadas negativamente. No *C. neoformans* vários tipos de melaninas fúngicas têm sido identificadas e as duas mais importantes, a DHN melanina e a DOPA-melanina, vêm sendo correlacionadas diretamente à patogênese da doença (LANGFELDER et al, 2003).

As espécies do gênero *Cryptococcus* são capazes de sintetizar melanina a partir de catecolaminas como L-DOPA, dopamina, norepinefrina e epinefrina, o que comprova sua virulência para hospedeiros humanos (STEENBERGEN & CASADEVALL, 2003). A capacidade de *C. neoformans* em produzir melanina depende da enzima fenoxidase. Esta enzima está ligada à membrana da célula fúngica e catalisa a reação na presença de compostos fenólicos, incluindo catecolaminas, sendo que o pigmento produzido localiza-se na parede celular do fungo. Isso confere à célula efeito protetor contra reações oxidativas e radiação ultravioleta, bem como ataque às células de defesa (BARLUZZI et al, 2000). Isso também esclarece a habilidade do fungo de usar as catecolaminas, presentes em grandes quantidades no líquido, como substratos para a produção de melanina, explicando, em parte, o forte tropismo de *C. neoformans* e *C. gattii* pelo SNC (CHANG et al, 2001).

A produção de melanina pelo *C. neoformans* foi observada pela primeira vez em ágar contendo extrato de semente de *Guizotia abyssinica* (STAIB, 1962) e, posteriormente, em meio contendo ácidos extraídos de sementes de café e componentes férricos (HOPFER & GRÖSCHEL, 1975). A enzima fenoxidase tem sido identificada como uma lacase, que é codificada por dois genes, *CNLAC1* e *CNLAC2*, mas apenas *CNLAC1* é expresso de forma significativa na maioria das condições e a exclusão de *CNLAC2* não resulta em redução da virulência em camundongos (WILLIAMSON, 1997; ZHU & WILLIAMSON, 2004).

No meio ambiente, a produção de melanina é importante para a sobrevivência do *Cryptococcus* spp., pois estes fungos são também capazes de utilizar compostos difenólicos na natureza para conversão em compostos intermediários e subsequentemente produzir esta substância. Todavia, *C. neoformans* não produz melanina a partir de catecolaminas do solo, sugerindo não ser esta a via preferencial para produção deste composto (BUCHANAN & MURPHY, 1998).

### 3.7.3 Crescimento a 37°C

A capacidade decrescer a 37°C é essencial para a sobrevivência do fungo no hospedeiro. Com exceção do *C. neoformans*, *C. gattii*, e, ocasionalmente, *C. laurentii* isolados

de *C.albidus*, as demais espécies não conseguem crescer acima de 37°C, são consideradas como não patogênicas para os seres humanos. O *C.gattii*, bem como isolados de *C.neoformans* sorotipo D parecem ser mais sensíveis a altas temperaturas (37-39°C) quando comparados a isolados *C.neoformans* sorotipo A (MARTINEZ et al 2001). A capacidade de crescer a 37°C está sob controle genético. Um gene de calcineurina, *CNCALI*, codifica uma proteína, uma fosfatase específica de serina-treonina ativada por  $Ca^{2+}$ -calmodulina, essencial para a sobrevivência, a 37°C em pH 7,3-7,4 numa atmosfera de aproximadamente 5%  $CO_2$  (ODOM et al, 1997). Recentemente outros genes foram identificados e precisam estar intactos em altas temperaturas para proporcionar o crescimento (PERFECT, 2006).

### 3.8 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da criptococose é realizado mediante o exame direto do líquido cefalo-raquidiano (LCR) utilizando-se tinta Nanquim (tinta da Índia), que permite a visualização capsular. Esse teste é positivo para 80% dos pacientes com criptococose e AIDS e 50% nos pacientes não portadores de SIDA, que apresentam sintomas compatíveis com a micose. Em materiais biológicos como líquido, o achado das células leveduriformes capsuladas define o diagnóstico de criptococose. As biópsias também podem ser analisadas por anatomia patológica, com colorações específicas para *C. neoformans*, como mucicarmim de Meyer, que evidencia a cápsula em vermelho ou pelo PAS ou, ainda, impregnação pela prata (método de Gomori-Grocott), que evidencia a parede celular das leveduras, apesar de não demonstrar a cápsula. A coloração de Fontana-Masson pode ser utilizada para evidenciar o depósito de melanina na parede do fungo, enquanto a hematoxilina-eosina pode ser útil em rotina para avaliação do padrão das lesões e evidenciar a cápsula do fungo (LACAZ et al, 2002; LAZÉRA et al, 2004; PERFECT & CASADEVALL, 2002).

Após realização de exame microscópico do líquido deve ser realizado o cultivo para o *Cryptococcus* spp. em ágar Sabouraud dextrose, que deve estar isento de cicloheximida, já que este gênero é inibido por esta substância. O isolamento do fungo pode ser realizado também no ágar extrato de malte. Em ambos os meios a levedura cresce e produz colônias de coloração creme com aspecto brilhante, viscoso e úmido, após três a sete dias de incubação. E, ao longo de um mês as colônias mucóides fluem na superfície e, quando em tubos, acumulam-se no fundo. A temperatura de incubação para o cultivo deste fungo pode variar entre 25 a 37°C sendo esta

uma característica muito importante, uma vez que outras espécies do gênero *Cryptococcus* não crescem a 37°C (LAZÉRA et al., 2004). O uso de preparações com tinta Nanquim (tinta da Índia) em exames diretos para visualização das células leveduriformes, com demonstração da cápsula e a realização de cultura do fungo são, hoje, as metodologias mais empregadas para o diagnóstico de infecção criptocócica (LACAZ et al, 2002).

Todas as espécies de *Cryptococcus* são não-fermentadoras e produzem a enzima urease. Entretanto, *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de crescer a 37°C e produzir uma fenoloxidase. Um meio de cultura contendo extrato aquoso de sementes de níger (*Guizotia abyssinica*), também chamado ágar níger ou meio de Staib (STAIB, 1962) permite o crescimento de colônias com coloração marrom devido à presença da fenoloxidase, enquanto outras leveduras crescem, mas não apresentam esta coloração (LACAZ et al, 2002). Este meio é preparado utilizando em sua composição, além do extrato de sementes de Níger e glicose, o cloranfenicol e a gentamicina para inibição de bactérias e solução de difenil, que funcionará como indicador. A pigmentação das colônias no ágar Níger permite diferenciá-lo de *Rhodotorula spp* (também encapsulada) e de *Candida spp*, no caso das cepas desprovidas de cápsula (MUSSA et al, 2000; PERFECT & CASADEVALL, 2002).

Para distinção fenotípica entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*, pode-se utilizar o meio de CGB, constituído por canavanina, glicina e o indicador azul de bromotimol. Neste meio, *C. gattii* cresce normalmente, já que é resistente à canavanina e é capaz de utilizar a glicina como única fonte de nitrogênio e carbono e produz amônia, elevando o pH, o que modifica a coloração do meio para azul-cobalto, devido à presença do azul de bromotimol. *C. neoformans* não cresce neste meio, pois é naturalmente sensível à canavanina. Os testes sorológicos utilizados para detecção de polissacarídeo capsular e diagnóstico de infecções criptocócicas invasivas são bastante específicos e sensíveis (90%). O método mais comumente usado para detecção do antígeno é o teste de aglutinação em látex, e, ocasionalmente, métodos imunoenzimáticos também são utilizados. Resultados falso-positivos podem ser encontrados devido à reação cruzada em decorrência de polissacarídeo capsular de *Trichosporon beigeli* ou de fator reumatóide. Este último interferente poderá ser bastante reduzido por meio de adequado tratamento do espécime clínico. Resultados falso-negativos poderão raramente ocorrer, devido à presença de imunocomplexos, efeito prozona ou altos títulos, ou ainda por isolados com pequeno diâmetro capsular (LAZÉRA et al, 2004).

Os antígenos de *Cryptococcus spp*. podem não ser detectados durante a infecção ativa, devido a seus baixos níveis, porém com a melhora clínica, os níveis antigênicos vão

setornando detectáveis. Desta forma, não são utilizados para fins diagnósticos ou para decisão terapêutica (PERFECT & CASADEVALL, 2002).

### 3.9 Tratamento

O tratamento clássico da criptococose baseia-se na utilização de uma droga poliênica macrolídea, a anfotericina-B, associada ou não a outro antifúngico, como o derivado pirimidínico (5-flucitosina) ou a algum medicamento da classe dos azólicos. No entanto, algumas destas drogas administradas no tratamento de infecções fúngicas apresentam altas taxas de falhas terapêuticas e a emergência de resistência fúngica intrínseca é outro problema a ser considerado (PERFECT et al, 2010).

De acordo com a sua história natural, a meningite criptocócica é sempre fatal se não tratada. A introdução de anfotericina B desoxicolato em 1950 melhorou o prognóstico desta doença e as taxas de cura para a meningite criptocócica subiram para mais de 50%. No entanto, substancial toxicidade foi relatada. Subsequentemente, a flucitosina foi desenvolvida e, por causa da sua excelente penetração no LCR e seletiva atividade frente a fungos leveduriformes, foi inicialmente utilizada como agente único para o tratamento da meningite criptocócica. Seu uso em monoterapia, no entanto, foi associado com o desenvolvimento de resistência e elevados índices de falhas terapêuticas (BLOCK et al, 1973).

Significativo progresso no tratamento das meningites criptocócicas foi alcançado quando a flucitosina foi combinada com anfotericina B desoxicolato, utilizando-se da vantagem do mecanismo sinérgico de ação e farmacocinética complementares dos dois antifúngicos. Como sua absorção gastrointestinal é insignificante, toda a administração de anfotericina B deve ser intravenosa. Ela é complexada com desoxicolato de sódio, porém existem preparações lipídicas como a solução coloidal e o encapsulamento em lipossomas. Estas formulações lipídicas causam menos efeitos indesejáveis, entretanto o custo é consideravelmente mais alto, desta forma deve se avaliar o custo-benefício em cada caso específico (BENNETT, 2003; RANG et al., 2004).

A terapia combinada permitiu a redução na quantidade de anfotericina B desoxicolato necessária para tratar a criptococose, limitando assim a sua toxicidade e também diminuiu as

preocupações com o desenvolvimento de cepas resistentes a flucitosina (BENNETT et al, 1979).

A emergência de doenças fúngicas associadas com a AIDS, na década de 80, e a frequência aumentada de micoses fatais associadas com o aumentado uso de terapias médicas imunossupressivas, desde 1970, estimulou estudos dirigidos para a descoberta de novos agentes antifúngicos. Os resultados podem ser vistos em seis novos agentes, representantes de duas classes antifúngicas, as quais foram recentemente licenciadas para uso ou estão na fase três dos testes clínicos (ODDS et al, 2003).

Dentre os seis novos agentes antifúngicos, o posaconazol, o ravuconazol e o voriconazol pertencem à classe dos azóis e subdivisão dos triazólicos que corresponde à classe mais bem-sucedida em relação à terapia antifúngica desde 1960. Os outros três, anidulafungina, caspofungina e micafungina são equinocandinas e sucessoras da ciclofungina, cujo uso terapêutico foi abandonado em 1980. No entanto, essas equinocandinas não são utilizadas para o tratamento de infecções por *Cryptococcus*, visto que ele é intrinsecamente resistente a elas. O ritmo da descoberta e desenvolvimento de antifúngicos é excessivamente lento, pois os novos antifúngicos anteriormente citados começaram seus caminhos na clínica em 1980. Desde aquela época há uma carência por novos agentes antifúngicos de uso terapêutico (ODDS et al, 2003).

### 3.10 Resistência

O tratamento das infecções causadas pelo *Cryptococcus neoformans* é historicamente relacionado com o uso de anfotericina B, fluconazol e flucitosina. Com a inserção da terapia antiretroviral altamente ativa (HAART) para a AIDS, as taxas de ocorrência de criptococose caíram; no entanto, as falhas no tratamento e problemas de resistência continuam a ocorrer, causando elevados índices de mortalidade (MAYERS, 2009).

De modo geral, a resistência aos antimicrobianos é um importante problema clínico. Classicamente o termo resistência é empregado para descrever um fenômeno *in vitro*, no qual um micro-organismo não é sensível a um determinado agente antimicrobiano quando comparado a outros isolados da mesma espécie (MAYERS, 2009).

Chama-se resistência primária aquela manifestada em micro-organismos, nunca antes expostos ao fármaco de interesse (MAYERS, 2009). Em *Cryptococcus neoformans* ela é



relativamente incomum, mas já se relatou a ocorrência com flucitosina (CUENCA-ESTRELLA et al, 2001) e fluconazol (ORNI et al, 1999).

A resistência intrínseca é a resistência inerente a todos os isolados de uma espécie frente a um determinado fármaco. Para o *Cryptococcus neoformans* ela é bem descrita para as equinocandinas, cujo mecanismo é a inibição da enzima 1,3  $\beta$ -glucana sintase (WALSH, 2002). As equinocandinas são uma classe de agentes antifúngicos, ineficazes contra o *Cryptococcus neoformans* (ABRUZZO et al 1997; BARTIZAL et al 1997; KRISHNARO et al 1997). Em outros patógenos fúngicos, as equinocandinas são conhecidas como inibidoras da  $\beta$ -1,3 glucana sintase. Evidências sugerem que o *C. neoformans*, possui o alvo apropriado para a ação das equinocandinas, sendo que a  $\beta$ -1,3 glucana está presente na parede celular do fungo, sendo essencial na viabilidade da parede celular (MALIGIE et al, 2005). Estudos enzimáticos *in vitro*, mostram que o *C. neoformans* é sensível a caspofungina. *Cryptococcus* submetidos a concentrações não inibitórias de caspofungina mostraram redução nos níveis de  $\beta$ -1,3 glucana, conduzindo a hipótese que em outros fungos possa existir outro mecanismo de ação para esta classe. No entanto, a baixa quantidade de  $\beta$ -1,3 glucana necessária para o bom crescimento de *C. neoformans* não é bem estabelecida, sendo possível que o *C. neoformans* possa compensar melhor essa redução do que outros fungos equinocandina-susceptíveis (FELDEMESSER et al, 2000).

A resistência secundária, também conhecida como resistência adquirida, resulta da exposição prévia a um fármaco. Esta forma é manifestada principalmente frente à flucitosina e aos antifúngicos azólicos (MAYERS, 2009). Os primeiros casos de resistência secundária observados para a flucitosina foram em 1970; quando esse fármaco era utilizado sozinho no tratamento da meningite criptocócica; porém, quando se utiliza a flucitosina combinada com a anfotericina B, o desenvolvimento de resistência é também incomum (BLOCK et al, 1973).

O termo resistência clínica refere-se a um fenômeno onde o micro-organismo continua a causar doença mesmo com o uso de agentes antimicrobianos. O micro-organismo é sensível *in vitro* e o paciente não evidencia melhora clínica. A resistência clínica nas infecções por *Cryptococcus neoformans* pode ocorrer devido: a) resposta imune deficiente do hospedeiro; b) sítio de infecção (SNC x próstata); c) virulência intrínseca do microorganismo; d) dose e farmacocinética inapropriada do fármaco prescrito; e) pouca adesão do paciente a terapia HAART ou terapia antifúngica recomendada; (PERFECT & COX, 1999).

A resistência secundária a anfotericina B não é um evento comum. Fungos patogênicos como *Candida albicans*, *C. neoformans* e *Aspergillus nidulans* resistentes a anfotericina B, já foram obtidos em laboratório. Esta resistência é explicada pela redução no

conteúdo de ergosterol, conduzindo a diminuição da sensibilidade a anfotericina B (VANDEN et al, 1997).

O advento dos triazólicos na década de 90 trouxe o fluconazol como opção terapêutica importante para o tratamento da criptococose. Este período coincidiu com ascensão da pandemia causada pelo HIV quando ainda não se dispunha da HAART; as taxas de mortalidade eram elevadas (VANDEN et al, 1997 ). Surgiu então a necessidade de avaliar a susceptibilidade de *C. neoformans* ao fluconazol. As técnicas padronizadas para avaliar a susceptibilidade de fungos leveduriformes não definiam *breakpoints* para enquadrar *C. neoformans* como resistente ao fluconazol. Muitos autores passaram a utilizar os *breakpoints* definidos para a *Candida* numa tentativa de caracterizar a maior ou menor susceptibilidade de *C. neoformans*.

Um estudo multicêntrico demonstrou que dentre 1811 isolados clínicos de *C. neoformans* oriundos de cinco continentes, no período de 1990 a 2004, menos de 1% destes isolados eram resistentes (CIM  $\geq$  64 $\mu$ g/mL) ao fluconazol ou a anfotericina B (CIM  $\geq$  2 $\mu$ g/mL) (PFALLER et al, 2005). Na sequência buscou-se relacionar elevadas CIMs aos antifúngicos com falhas terapêuticas; neste contexto Pfaller et al (2004) constatou que a melhor resposta clínica dos pacientes com criptococose ocorria quando as CIMs eram menores do que 16 $\mu$ g/mL ao fluconazol ( PFALLER et al, 2004).

Em outro estudo, contando com 1763 isolados clínicos de *C. neoformans* provenientes de 28 países, Johnson et al (2008) verificaram que a susceptibilidade para a anfotericina B variava entre 0,125-2 $\mu$ g/mL na maioria dos isolados; apenas quatro isolados evidenciaram CIM  $>$  2  $\mu$ g/mL (JOHNSON et al, 2008).

Os principais mecanismos de aquisição de resistência em azólicos ocorrem pelas alterações da parede celular, por redução da afinidade de ligação da enzima 14  $\alpha$ -demetilase ou uma inerente impermeabilidade da mesma, bem como o aumento do conteúdo de ergosterol. Assim, poucos trabalhos têm demonstrado aumento de CIM. A maioria tem mostrado valores abaixo de 1 $\mu$ g/mL (BRANDT et al, 2001).

A resistência a flucitosina pode ser explicada pela perda ou mutação de enzimas associadas à conversão e incorporação de RNA. Recentemente, isolados de *C. neoformans* provenientes de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) mostraram ser menos suscetíveis ao fluconazol e flucitosina do que os pacientes sem SIDA. Estes dados sugerem que o uso de anfotericina B por um grande período pode levar a tolerância ou resistência do micro-organismo (Liet al, 2012).

Na avaliação da susceptibilidade dos agentes de criptococose tem se comparado isolados ambientais versus clínicos. Alves et al (2001) evidenciaram que isolados clínicos eram menos sensíveis ao fluconazol que isolados ambientais. Recentemente Andrade-Silva et al (2013) observou que isolados clínicos eram menos sensíveis a anfotericina B e ao itraconazol; por outro lado, os isolados clínicos eram mais sensíveis ao fluconazol do que os ambientais. Também se comparou a susceptibilidade entre *C.neoformans* e *C. gattii* frente à anfotericina B, fluconazol e itraconazol e não se encontrou diferenças estatísticas entre os dois grupos (ANDRADE-SILVA et al, 2013).

### 3.11 Testes de Susceptibilidade

Os testes de susceptibilidade a antifúngicos tem despertado grande interesse no últimos anos devido a incidência de infecções fúngicas invasivas e o aumento de agentes antifúngicos empregados. Eles fornecem informações que auxiliam na seleção de fármacos antifúngicos, monitoramento do aparecimento de resistência antimicrobiana e fornecem dados para estudos epidemiológicos (PFALLER et al, 2009). Esforços tem sido feitos para a implementação de métodos reprodutíveis e clinicamente relevantes para avaliação da susceptibilidade de leveduras. Modificações na metodologia do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A2, ocorreram pois verificou-se que alguns isolados de *C. neoformans* crescem pouco no meio RPMI-1640, preconizado para os testes de susceptibilidade. Além disso, o tempo de 72h é considerado por alguns autores, muito longo em termos práticos (MAYERS, 2009).

Assim o uso de Yest Nitrogen Base (YNB) no lugar do meio padrão RPMI-1640 poderia facilitar e fornecer maior relevância clínica para as CIMs obtidas (MAYERS, 2009). Comparou-se também o E-test com a técnica de microdiluição para isolados de *C. neoformans*. Aller et al (2000) mostrou que os resultados para o fluconazol e a flucitosina tiveram concordância entre os dois métodos. No entanto, o itraconazol e a anfotericina B, mostraram baixa correlação sendo que isolados resistentes a anfotericina B e ao itraconazol não foram incluídos no teste (ALLER et al, 2000). Usando o mesmo meio e método, outros estudos mostraram boa concordância entre o E-test e a técnica de microdiluição para o voriconazol (94%) e anfotericina B (99%) (MAXWELL et al , 2003).

Estudos relataram que o meio antibiotic medium 3 (AM3) foi superior aos meios YNB e RPMI-1640 para a identificação de isolados anfotericina B-resistentes, utilizando os métodos estabelecidos pelo CLSI (LOZANO-CHIU et al, 1998). Embora tenha havido algumas preocupações iniciais de que o método padronizado pelo CLSI não era ideal para avaliar o *C. neoformans*, tais métodos, como microdiluição em caldo e disco-difusão já foram aplicados em todo o mundo para estudar o aparecimento de resistência em isolados de *Cryptococcus*, fornecendo uma comparação da atividade de agentes novos contra *C. neoformans* e *C. gattii*, dessa forma identificando as cepas laboratoriais e clínicas, permitindo o estudo dos mecanismos de resistência antifúngica. Esses métodos são reprodutíveis e precisos e fornecem informações clinicamente úteis comparáveis aos testes com antibacterianos (ALLER et al, 2000; REX & PFALLER, 2002).

Existe um apoio substancial dos experimentos em modelos animais, nos estudos de sensibilidade às drogas antifúngicas *in vitro* envolvendo *C. neoformans*. Pode-se prever resultados do tratamento, bem como inúmeros relatos e séries de casos de CIMs elevadas de poliênos, flucitosina e azóis associada a falhas clínicas no tratamento de criptococose (SANGUINETTI et al 2006; VELEZ et al 1993). As CIMs e zonas de diâmetro para interpretação dos *breakpoints*, não estão estabelecidos para nenhum agente antifúngico de tratamento do *Cryptococcus*. No entanto, fica claro que pacientes infectados com o *Cryptococcus neoformans*, cujos CIMs foram  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$  para o fluconazol, responderam melhor ao tratamento do que aqueles com CIMs  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  (ALLER et al, 2000). Estudos prospectivos adicionais são necessários para identificar precisamente os *endpoints* para determinação de resistência aos fármacos. Os *breakpoints* geralmente usados para determinar resistência para *C. neoformans*, baseiam-se em experiências clínicas o que permite estabelecer os seguintes valores para os fármacos antifúngicos comumente utilizados: CIM  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  para fluconazol,  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$  para o itraconazol,  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  para flucitosina,  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$  para AMB. Esses *breakpoints* são apenas diretrizes, devendo ser interpretados com cuidado no cenário clínico (MAYERS et al, 2009).

### 3.11.1 Relevância clínica dos testes de suscetibilidade

Muitos estudos têm encontrado relação entre os resultados dos testes de susceptibilidade e respostas clínicas para doenças criptocócicas (ALLER et al 2000; MENICHETTI et al, 1996; VAN DUIN et al, 2002; WITT et al, 1996).

A maioria desses estudos tem focado em prever os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para o fluconazol. Aller et al (2000) realizaram um estudo com 25 pacientes com SIDA que apresentavam relatos de doença criptocócica. Esses relatos ocorreram entre os anos de 1994-1996 nos EUA e Espanha. Falhas terapêuticas foram observadas em 5 dos 25 pacientes com AIDS associadas a infecção criptocócica. Foi estatisticamente significativa a associação entre as maiores CIMs de fluconazol ( $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ ) e taxas de mortalidade após falhas no tratamento. Os testes de susceptibilidade nesse estudo seguiram a padronização estabelecida pela M27-A (ALLER et al, 2000). Conduziu-se um estudo com altas doses de fluconazol por 14 dias consecutivos em pacientes com AIDS e meningite criptocócica. O tempo necessário para haver a negatificação das culturas foi de 56 dias para pacientes cujo isolado possuía CIMs de  $4 \mu\text{g/mL}$  e 16 dias para pacientes cujo CIM foi  $< 4 \mu\text{g/mL}$ . Análises correlacionando resultados clínicos com as CIMs do fluconazol não foram avaliados nesse estudo (MENICHETTI et al, 1996)

Witt et al (1996) usando a técnica de microdiluição e Ghannoum et al (1992) utilizando técnicas de macrodiluição tentaram determinar se a susceptibilidade *in vitro* ao fluconazol em conjunto com variáveis clínicas poderia prever o resultado do tratamento para pacientes com meningite criptocócica associada a AIDS aguda. Avaliou-se diferentes doses de fluconazol com ou sem flucitosina. O tratamento foi considerado de sucesso se ao final de 10 dias os pacientes sobreviviam e não apresentavam culturas positivas para *Cryptococcus*. As médias logarítmicas dos CIMs para fluconazol foram significativamente maiores para os isolados de pacientes que tiveram falhas na terapia em comparação com aqueles que tiveram sucesso no tratamento. Não houve nenhuma diferença estatística significativa na média geométrica das CIMs, quando eles foram medidos pela técnica padrão de macrodiluição (M27-A). Os autores sugerem que esta discrepância pode ser devida, em parte, a maior crescimento em meio YNB, quando comparado com o meio RPMI 1640 usado na técnica de macrodiluição (GHANNOUM et al, 1992; WITT et al, 1996).

Em outro estudo, avaliou-se 4 isolados de *Cryptococcus* provenientes de pacientes com AIDS apresentando quadros de meningite. As CIMs para a anfotericina B variaram de 0,4-1,6 µg/mL o que correlacionou-se com recaídas clínicas. Outros autores tem descrito, a susceptibilidade de uma série de isolados de *C. neoformans* obtidos de pacientes com meningite recorrente e esses isolados não mostraram resistência a anfotericina B, quando comparados com os isolados iniciais. Finalmente, deve ser enfatizado que os valores das CIMs não são os últimos preditores de resposta clínica, mas devem ser sempre avaliados num contexto (POWDERLY et al, 1992).

### 3.11.2 Influência dos fatores de virulência nos testes de susceptibilidade.

A patogenicidade da criptococose influencia nos padrões de resistência clínica. Mitchell et al (1995) realizaram um estudo retrospectivo com pacientes com criptococose cerebral na Austrália, entre os anos de 1985 e 1992. Infecção com *C. gattii* foi associada com um pior prognóstico, apesar da administração prolongada de AMB e cuidados no aumento da pressão intracraniana (MITCHELL et al, 1995). Além das diferentes espécies, temos a capacidade da levedura de produzir melanina, que também influencia na patogênese (BUCHANAN & MURPHY, 1998).

A melanina pode proteger o *C. neoformans* contra danos pela radiação UV, extremos de temperatura, stresse oxidativo e contra macrófagos do hospedeiro (CASADEVALL, CASADEVALL, ROSAS, NOSANCHUK, 2000). Van Duin et al (2002) demonstraram que a melanização reduziu a susceptibilidade de *C. neoformans* a anfotericina B e caspofungina com base na metodologia de curvas de morte (*Time-Kill curve*) (VAN DUIN, CASADEVALL, NOSANCHUK, 2002).

A cápsula do *Cryptococcus spp* também tem mostrado um papel importante na virulência. Mutantes acapsulares são tipicamente avirulentos; no entanto, micro-organismos encapsulados promovem graus diferentes de patogenicidade. Vitale et al (2012) comparou a atividade *in vitro* de diferentes agentes antifúngicos para 34 isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans var. grubii* com ou sem indução de cápsula e demonstrou que após a indução o fluconazol mostrou CIMs mais elevadas quando comparadas a outros antifúngicos testados. Dessa forma a determinação da

atividade antifúngica considerando fatores de virulência poder ser clinicamente relevante e utilizada para avaliar a correlação entre os resultados *in vitro* e evolução clínica (VITALE, PASCUCCELLI, AFELTRA, 2012).

Alguns estudos sugerem que as cepas encapsuladas são mais tolerantes a ação da anfotericina B. Acredita-se que a cápsula confira resistência às espécies reativas de oxigênio, redução na fagocitose, desta forma oferecendo resistência aos peptídeos antimicrobianos e fármacos antifúngicos, tais como a anfotericina B (ZARAGOZA et al, 2008).

Cordoba et al (2011) avaliaram a atividade de anfotericina B pela metodologia de curvas de morte (*Time-Kill*) para 20 isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* onde a indução capsular *in vitro* foi realizada. Em geral, as cepas encapsuladas foram mais resistentes à anfotericina B, quando comparadas com aquelas com pequenas cápsulas (CÓRDOBA, AFELTRA, VITALE, 2011).

Desta forma, características do hospedeiro, limitações farmacológicas e fatores de virulência do fungo contribuem para a resistência clínica ao *Cryptococcus*. Assim, os testes de susceptibilidade para antimicrobianos, são preditores de resultados clínicos na infecção criptocócica (VELEZ et al, 1993).

### 3.11.3 Utilização da terapia combinada no tratamento da criptococose.

Infecções invasivas causadas por fungos estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade entre pacientes imunocomprometidos. Atualmente, diferentes agentes antifúngicos estão disponíveis no mercado, mas nenhum apresenta altas taxas de eficácia terapêutica no tratamento de infecções causadas por *Cryptococcus*. Em decorrência das altas taxas de mortalidade causadas pela criptococose é que novas estratégias de tratamento, como a terapia de combinação, merecem ser estudadas com o objetivo de buscar novas alternativas terapêuticas.

O FDA (Food and Drug Administration) aprovou vários agentes antifúngicos de várias classes (azóis, equinocandinas, pirimidinas, poliênicos) como opções terapêuticas para infecções fúngicas (DISMUKES, 2000). Entretanto, muitas vezes o tratamento é complicado pela elevada toxicidade, baixa tolerabilidade ou estreito espectro de ação.

Estas dificuldades têm conduzido esforços recentes para determinar a eficácia da terapia combinada no tratamento de infecções invasivas (MUKHERJEE et al, 2005).

Benefícios potenciais do uso da terapia de combinação incluem o amplo espectro de ação, maior potência comparada a monoterapia, tolerabilidade e redução da resistência (LEWIS & KONTOYIANNIS, 2001). Por outro lado, a terapia combinada nem sempre resulta em interações sinérgicas. Assim, a administração de combinações entre fármacos de diferentes classes terapêuticas deve ser fundamentada em estudos *in vitro* e *in vivo*, para se evitar interações indesejáveis.

Nos últimos anos, a descoberta de novos agentes antifúngicos tem sido incrementada numa tentativa de atender a crescente demanda na área da micologia médica. Atualmente, diferentes agentes antifúngicos estão disponíveis no mercado, os quais se encontram classificados em: alilaminas (terbinafina e naftifina), antimetabólitos (5-flucitosina), azólicos (cetoconazol, miconazol, itraconazol, fluconazol e voriconazol), inibidores da síntese da glucana (caspofungina) e derivados poliênicos (anfotericina B e nistatina). A combinação de agentes antifúngicos de diferentes classes pode determinar melhor eficácia no tratamento quando o sinergismo for observado (JOHNSON et al, 2004).

O aumento do número de compostos antifúngicos disponíveis levou a busca de melhores estratégias terapêuticas, como a utilização desses compostos em combinação. Compostos antifúngicos utilizados em combinação podem promover a eficácia de cada droga, utilizando-se uma dose mais baixa de cada uma das drogas. A terapia de combinação pode ser utilizada numa tentativa de evitar ou retardar o aparecimento *in vivo* de populações resistentes de fungos patogênicos (FISHMAN et al, 2002; LUPETTI et al, 2003). Estudos de combinações de agentes antifúngicos com agentes não-antifúngicos são ainda pouco investigados (MUKHERJEE et al, 2005).

As principais combinações entre antifúngicos que estão envolvidas no tratamento da criptococose são: anfotericina B+flucitosina, anfotericina B+fluconazol e fluconazol+flucitosina.

O mecanismo sinérgico entre anfotericina B e flucitosina se baseia na ação da anfotericina B na membrana celular fúngica abrindo poros, permitindo a entrada da flucitosina exercendo seu efeito letal em qualquer fungo sobrevivente (POLAK, 1978). Da mesma maneira que os resultados observados em estudos com *Cryptococcus neoformans*, a administração de flucitosina juntamente com anfotericina B auxilia na prevenção da emergência de cepas resistentes (POLAK, 1978). Brower et al (2004) estudando combinações entre terapias antifúngicas para o tratamento da meningite criptocócica em pacientes HIV positivos, observaram que a combinação anfotericina B+flucitosina, mostrou ser o regime mais rapidamente fungicida (BICANIC et al, 2008; BROWER et al, 2004). Alguns estudos



relatam que interações antagônicas estão presentes em doses mais elevadas destes antifúngicos ou quando os isolados são previamente expostos a anfotericina B ou a flucitosina (PORE, 1992). Ao analisar diferentes isolados de *Cryptococcus neoformans*, os achados *in vitro* não demonstram sinergismo de forma consistente (MEDOFF, CONFORT, KOBAYASHI, 1971; CHEN, LIUSHIH, HSIEH, 1982) e interações indiferentes (GRANNOUM et al,1995; ODDS, 1982) ou antagônicas (HAMILTON& ELLIOTT, 1975) foram observadas.

A combinação de anfotericina B combinada com azóis é uma questão controversa; no entanto, há um predomínio de interações indiferentes que é observado frente isolados de *Cryptococcus neoformans* quando anfotericina B é combinada com fluconazol ou itraconazol (BARCHIESI et al,2000; PORE, 1992). A pré-exposição aos azólicos pode reduzir subsequentemente a atividade da anfotericina B. Acredita-se que a anfotericina B aja primariamente na membrana celular fúngica, após a ligação ao ergosterol. Os azóis atuam através da inibição da biossíntese de ergosterol; assim os azóis poderiam antagonizar os efeitos da anfotericina B (BARCHIESI et al, 2000). Resultados *in vivo*, demonstraram redução da infecção tecidual e aumento da sobrevivência dos animais infectados, sendo que essa combinação não é antagonista, e é pelo menos aditiva (JOHNSON et al, 2004).

O mecanismo proposto para a *combinação* de fluconazol+flucitosina baseia-se no dano causado pelos azólicos a membrana celular fúngica, permitindo que a flucitosina penetre na célula e exerça seu mecanismo de ação (BARCHIESI et al, 1999; ALLENDOERFER *et al.*, 1991). Estudos com azólicos mais antigos demonstram antagonismo para a maioria dos isolados de *Cryptococcus neoformans* (DUPONT & DROUHET, 1979). Em combinações entre flucitosina e fluconazol, sinergismo é o resultado mais comumente observado (ALLENDOERFER et al, 1991; BARCHIESI et al, 2001; GHANNOUM et al,1995). Estudos *in vivo* demonstram que as combinações entre flucitosina e fluconazol são efetivas no tratamento da meningite criptocócica (DIAMOND et al,1998; LARSEN et al, 1996). Em estudo desenvolvido na África, observou-se que numa análise de líquido de pacientes infectados com *Cryptococcus*, houve uma redução nas unidades formadoras de colônia (UFC) após a administração de fluconazol+flucitosina (NUSSBAUM et al, 2010).

Várias classes de agentes antibacterianos tem sido investigadas para o tratamento de infecções fúngicas com resultados bastante diversos. Alguns antibacterianos possuem atividade isolada, no entanto, outros aumentam a atividade antifúngica de antifúngicos tradicionais. Os antimicrobianos variam em mecanismo, potência e força no que refere-se a sua atividade antifúngica (JUDD et al, 2009).

A minociclina é um fármaco pertencente a classe das tetraciclinas, que são inibidoras da síntese de proteínas. Geralmente não possuem atividade antifúngica relatada, no entanto, relatou-se a atividade isolada da minociclina para o fungo *Pythium insidiosum* (LORETTO et al, 2011). O sinergismo foi observado quando combinou-se tetraciclinas com anfotericina B, *in vitro* e *in vivo* para *Coccidioides immitis* (KWAN et al, 1972; HUPPERT et al, 1974). Hughes et al (1984) observaram sinergismo para *Aspergillus*, com a combinação de anfotericina B+minociclina (HUGHES et al, 1984). Lew et al (1978), observaram sinergismo através da metodologia por *time-kill* para a combinação de anfotericina B + minociclina frente a diversas leveduras de interesse médico, sendo que o *Cryptococcus neoformans*, foi o mais susceptível a esta combinação (LEW et al, 1978). Estudos mais recentes, relatam que a minociclina+fluconazol, mostrou sinergismo para *Candida albicans* (SHI et al, 2010).

A linezolida é a primeira oxazolidinona utilizada para uso comercial (ESTES & DERENDORF, 2010). Munõz et al (2007), relataram um caso de um paciente transplantado cardíaco, com recidiva de *Rhodococcus equi*, que também apresentou infecção pulmonar criptococócica. Esse paciente foi tratado com a combinação de linezolida e fluconazol, mostrando resultados satisfatórios para a infecção pulmonar por *Cryptococcus* (MUNÕZ et al, 2007).

A tigeciclina pertence a uma classe de antibióticos bacteristáticos, denominada glicilciclinas. Possuem o mesmo esqueleto das tetraciclinas, por isso apresentam um mecanismo de ação semelhante, ligando-se a subunidade ribossomal 30s, impedindo a síntese protéica (PANKEY, 2005). Sua atividade fúngica, foi relatada por Ku et al (2010), que observaram a atividade de altas concentrações de tigeciclina frente a biofilmes de *Candida albicans*; no entanto, nesse estudo não observou-se a potencialização dos fármacos antifúngicos quando utilizados combinados (KU et al 2010). Mahl et al (2012), relataram a atividade de tigeciclina para o fungo *Pythium insidiosum*, demonstrando que esse fármaco tem potencial para tratamento de infecções fúngicas (MAHL et al, 2012).

A azitromicina, é um macrolídeo, que tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de proteínas através da ligação a subunidade 50s do ribossomo, bloqueando as ligações peptídicas. Ela é amplamente distribuída no tecido cerebral após a administração em humanos (JARURATANASIRIKUL et al, 1996). A anfotericina B combinada com a azitromicina mostrou atividade sinérgica *in vitro* para 26 isolados clínicos de *Fusarium*, um fungo que geralmente é refratário aos fármacos antifúngicos disponíveis. A azitromicina isoladamente foi inativa, mas quando combinada com a anfotericina B, diminuiu as CIMs desse antifúngico em 2 a 8 vezes (CLANCY & NGUYEN, 1998; VENTURINI et al, 2011).

Sinergismo também foi observado para espécies de *Aspergillus*, quando combinou-se com anfotericina B (NGUYEN et al, 1997). A *Naegleria fowleri* é uma ameba que causa meningoencefalite primária fatal. O tratamento comumente utilizado é a administração de anfotericina B embora apresente inúmeras falhas. Shannon & Brenner (2007) estudaram a combinação de anfotericina B + azitromicina e encontraram resultados sinérgicos pra essa combinação (SALTON & BRENNER, 2007). Nguyen et al (1997) avaliaram a atividade da combinação de anfotericina B + azitromicina para 25 isolados de *Aspergillus*, sendo que para todas as cepas foi observado sinergismo (NGUYEN et al, 1997).

O trimetropim é um inibidor da síntese de ácido fólico, não sendo utilizado sozinho no tratamento de infecções fúngicas. A combinação sulfametoxazol/trimetropim tem sido utilizada na profilaxia e tratamento de infecções oportunistas causadas por *Pneumocystis jiroveci*. Essa combinação também é escolhida na profilaxia de pacientes com alto risco de infecções, tais como aqueles com SIDA e trasplantados (JUDD et al, 2009). Mihon et al (2013) relataram o caso de um paciente com infecções fúngicas múltiplas, onde utilizou-se a combinação trimetropim+ sulfametoxazol combinado com a anfotericina B, resultando em melhora substancial do paciente (MIHON et al, 2013). Como visto anteriormente, geralmente o trimetropim é usado em combinação com o sulfametoxazol, no entanto em estudos mostram que a atividade antibacteriana do trimetropim não é aumentada pela adição de sulfametoxazol em infecções urinárias pediátricas por *Escherichia coli* (NGUEYN et al, 2010).

A daptomicina é um derivado de aminoácidos lipopeptídicos, cuja atividade antifúngica não se tem relatos até o momento. Um estudo avaliou os efeitos da tigeciclina e daptomicina na colonização de *Candida albicans* no intestino de murinos. Os camundongos tratados com daptomicina apresentaram um leve aumento na concentração de *C. albicans* nas fezes (SAMONIS et al, 2008).

## 4 ARTIGO

**Title:** Interactions of amphotericin B plus antifungal or antibacterial agents against *Cryptococcus neoformans* before and after capsular induction

**Authors:** Luana Rossato<sup>1</sup>, Érico Silva de Loreto<sup>2</sup>, Régis Zanette<sup>2</sup>, Louise Vignoles Neves<sup>3</sup>, Janio Morais Santurio<sup>2</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>1\*</sup>

**Title:** Interactions of amphotericin B plus antifungal or antibacterial agents against *Cryptococcus neoformans* before and after capsular induction.

**Authors:** Luana Rossato<sup>1</sup>, Érico Silva de Loreto<sup>2</sup>, Régis Zanette<sup>2</sup>, Louise Vignoles Neves<sup>3</sup>, Janio Morais Santurio<sup>2</sup>, Sydney Hartz Alves<sup>1\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

**Institution address:**

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria-RS, Brasil, 97105-900.

\*Corresponding author: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, Rua Andradas 1985/201, 97010-033. Santa Maria - RS. Phone/Fax: +55 32208906. E-mail: sydneyalves.ufsm@gmail.com

## ABSTRACT

This study evaluated the *in vitro* activity of amphotericin B (AMB), fluconazole (FLZ), flucytosine (5FC) and to determine the synergistic interactions between AMB with azithromycin (AZM), daptomycin(DAP),linezolid (LNZ), minocycline (MINO) and tigecycline(TIG)against clinically isolates of *C. neoformans*before and after capsular induction *in vitro*.The susceptibility tests were carried out using the broth microdilution method in accordance with the CLSI document M27-A3. MICs of antifungal agents were higher in group II (capsular induction) than in group I (without inducing capsule) but statistically significant differences were observed only for 5FC. All antibacterial evaluated showed no detectable MICs. However, high percentages of synergism (> 75%) were observed for the combinations AMB+5FC and AMB+LZD only for strains of group II and when AMB was combined with AZM, MINO and TIG for both groups.New proposals for assessing susceptibility of *C. neoformans* that consider the presence of the capsule and future *in vitro* and *in vivo* methods using new drug combinations will provide a better understanding to increase the effectiveness of treatment of cryptococcosis.

**Keywords:**Susceptibility; antifungal; antibacterial; capsule;

## INTRODUCTION

The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* is the main virulence factor of this pathogen (1, 2) which together with other virulence traits allows adaptation and survival of the fungus to the host immune system (3, 4). *In vivo*, *C. neoformans* cells have typically large capsules and although the presence and size of the capsule are associated with reduced susceptibility to antifungal (5, 6), *in vitro* susceptibility testing such as CLSI M27-A3 (7) are performed under laboratory conditions in which normally *C. neoformans* capsule shows small size.

Despite the standard treatment with amphotericin B (AMB), flucytosine (5FC) and fluconazole (FLZ) (8) and the *in vitro* susceptibility of *C. neoformans* to these antifungal (9, 10), cryptococcosis is a disease that remains to emerge parallel to the AIDS/HIV epidemic and currently 1 million cases of meningitis and approximately 625,000 deaths have been estimated in endemic areas of sub-Saharan Africa annually (11). Antifungal resistance (12, 13), immune factors of the host (14) and pharmacotherapy choices under resource-limited conditions (15) are directly related to treatment failure.

In this context, the aim of this work was to determine the *in vitro* activity of AMB, 5FC and FLZ and to evaluate the *in vitro* combination of 5FC+FLZ and AMB with 5FC, FLZ and six antibacterial agents against clinically isolates of *C. neoformans* before and after capsular induction *in vitro*.

## MATERIAL AND METHODS

The drugs tested were amphotericin (AMB) (Bristol Myers Squibb<sup>®</sup>), fluconazole (FLZ) and flucytosin (5FC) (Sigma Aldrich<sup>®</sup>), minocycline (MINO) (Pharma Nostra<sup>®</sup>), linezolid (LZD) (Zyvox<sup>®</sup>, Pfizer), tigecycline (TIG) (Tygacil<sup>®</sup>, Pfizer), daptomycin (DAP) (Pharma Nostra<sup>®</sup>), azithromycin (AZM) (Pharma Nostra<sup>®</sup>), trimethoprim (TMP) (Proloprim<sup>®</sup>; Monarch Pharmaceuticals, Inc), and were purchased commercially. The thirty strains of *C. neoformans* clinical isolates evaluated were provided by Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI). *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Cryptococcus*

*neoformans* ATCC 90112 were used as quality control strains. All strains were grown in Sabouraud glucose agar (SGA) at 35°C for 48h.

The MICs were determined following the CLSI M27-A3 guidelines(7) in two conditions: without capsule induction(Group I) and with capsule induction as described by Vitale et al. (5) (Group II) for all drugs. The interaction between AMB, FLZ, 5FC and the antibacterial drugs against the thirty strains of each group (I and II) was evaluated using the microdilution checkerboard method(16). All tests were performed in duplicate at two different days. The high and the low off-scale MICs were converted to the next higher and to the next lower concentration when need. The differences between Groups I and II were analyzed with the nonparametric Wilcoxon paired t-test. The differences among fractional inhibitory concentration index (FICI) obtained from the different groups were compared with the nonparametric Friedman test followed by Dunn's post hoc test using Graph Pad Prism 6.01 Software. The significance level was 0.05.

## RESULTS AND DISCUSSION

The *in vitro* susceptibility of 30 *C. neoformans* isolates against the antifungals and antibacterial drugs are listed in Table 1. Minimal Fungicidal Concentration in µg/mL (MIC range before capsule induction (geometric mean)/MIC range after capsule induction (geometric mean) were 0.06-0.5(0.22)/0.12-0.5(0.3) for AMB, 1-32(8.7)/4-32(11.31) for FLZ, 0.5-4(2.36)/4-16(7.29) for 5FC, >4 for TMP, >128 for TIG and >64 for MINO, LZD, DAP and AZM. However only MICs for 5FC showed significant differences between both methods (P< 0.05). The MICs of the control strains were within the range provided by CLSI.

The results of the drug combination are described in the Table 2. The percentage of synergism (Group I/ Group II) observed were: AMB+FLC (17/23), AMB+5FC (0/83), 5FC+FLC(10/10), AMB+AZM (77/90), AMB+DAP (20/50), AMB+LZD (37/87), AMB+MINO (90/87), AMB+TIG (83/97) and AMB+TMP (13/57). Statistical differences between Groups I and II were observed for AMB+5FC (P<0.001), AMB+MINO (P=0.040), AMB+LZD and AMB+TIG (P=0.01).

Based on the mean geometric, the MIC's of antifungal agents were higher in group II (capsular induction) than in group I (without inducing capsule) but statistically significant



differences were observed only for 5FC. All antibacterial evaluated showed no detectable MICs. However, high percentages of synergism (> 75%) were observed for the combinations AMB+5FC and AMB+LZD only for strains of group II and when AMB was combined with AZM, MINO and TIG for both groups. Also interesting, the combination AMB+DAP and AMB+TMP showed an increasing in synergism interaction when in presence of capsule.

The reduction of *in vitro* susceptibility to antifungal agents when the capsule of *C. neoformans* induced *in vitro* has been discussed previously by microdilution and time-kill curve methodologies (5, 6). Vitale et al. (5) described also, different from the present study, differences in MICs of fluconazole among isolates with and without capsular induction. The observation of synergism between AMB and 5FC justifies the historical success of this combination in the treatment of cryptococcosis (8, 15, 17).

However, we highlight the new perspectives of the synergy between AMB and antibiotics which are inhibitors of bacterial protein synthesis (AZM, LZD, MINO and TIG) in future studies of susceptibility of *C. neoformans*. Some reports of the use of antibacterial, antifungal associated or not, to describe the potential of these classes of drugs in combating fungal infections. The combination AMB+AZM showed antimicrobial activity against *Fusarium* spp (18) and *Naegleria fowleri* (19), FLZ+LNZ showed significant improvement in transplant patients with pulmonary cryptococcosis (20) and combinations of AZM, MINO and TIG with antifungal demonstrated synergism against *Aspergillus* spp, *C. albicans* and *C. neoformans* (21-24). The use of trimethoprim+sulfamethoxazole in prophylaxis and treatment of *Pneumocystis jiroveci* infections and associated with AMB in the treatment of multiple fungal infections has also been described (25, 26). Interaction between AMB and DAP were not found.

The synergism observed between the AMB and antibacterial probably is due to facilitating entry of these antibacterial which is promoted by the formation of pores in the plasma membrane of the yeast cell by the action of AMB. In addition, combinations of these antibacterial with AMB and other drugs have potential for the treatment of cryptococcal meningitis, since those drugs have known antimicrobial activity in the treatment of infections of the central nervous system (27). Future *in vitro* and *in vivo* experiments designed to evaluate the interactions of AMB with other antibacterial drugs and the antibacterial described herein with other antifungals will elucidate the potential of association of these classes of drugs in the treatment of cryptococcosis.

## CONCLUSIONS

In conclusion, in this study it was demonstrated that the capsular induction *in vitro* of *C. neoformans* results in a decrease of susceptibility of this yeast to the antifungals. Additionally was evidenced the potential of the synergistic *in vitro* interaction of the combination AMB with AZM, LNZ, MINO and TIG. New proposals for assessing susceptibility of *C. neoformans* that consider the presence of the capsule and future *in vitro* and *in vivo* methods using new drug combinations will provide a better understanding to increase the effectiveness of treatment of cryptococcosis.

### Acknowledgements

Érico Silva de Loreto is financially supported by fellow ships from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, Brazil (PNPD-CAPES).

## REFERENCES

1. **Rodrigues ML, Casadevall A, Zaragoza O.** 2011. The architecture and antigenic composition of the polysaccharide capsule, p. 43-54. *In* Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A (ed.), *Cryptococcus : from human pathogen to model yeast*. ASM Press, Washington, DC.
2. **Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A.** 2009. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*, p. 133-216. *In* Laskin AI, Sariaslani S, Gadd GM (ed.), *Adv. Appl. Microbiol.*, 1 ed, vol. Volume 68. Academic Press.
3. **Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JMH, Hu GG, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J.** 2011. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**:193-203.
4. **Garcia-Rodas R, Zaragoza O.** 2012. Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **64**:147-161.
5. **Vitale RG, Pascuccelli V, Afeltra J.** 2012. Influence of capsule size on the *in vitro* activity of antifungal agents against clinical *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strains. *J. Med. Microbiol.* **61**:384-388.
6. **Cordoba S, Afeltra J, Vitale RG.** 2011. Evaluation of the *in vitro* activity of amphotericin B by time-kill curve methodology against large and small capsulate *C. neoformans* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **71**:260-262.
7. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : approved standard, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
8. **Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC.** 2010. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **50**:291-322.
9. **Govender NP, Patel J, van Wyk M, Chiller TM, Lockhart SR, Dis GERM.** 2011. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates obtained through population-based surveillance in South Africa in 2002-2003 and 2007-2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:2606-2611.

10. **Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, Doern GV, Diekema DJ.** 2005. Global trends in the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). *J. Clin. Microbiol.* **43**:2163-2167.
11. **Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TA.** 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* **23**:525-530.
12. **Hanson KE, Alexander BD, Perfect J.** 2009. Drug Resistance in *Cryptococcus neoformans*, p. 967-985. *In* Mayers DL, Lerner SA, Ouellette M, Sobel JD (ed.), *Antimicrobial drug resistance*, 1 ed, vol. 2. Humana Press, Totowa, N.J.
13. **Pfaller MA, Lodge JK, Ghannoum MA.** 2011. Drug resistance in *Cryptococcus*: Epidemiology and molecular mechanisms, p. 203-216. *In* Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A (ed.), *Cryptococcus : from human pathogen to model yeast*. ASM Press, Washington, DC.
14. **Nguyen MH, Husain S, Clancy CJ, Peacock JE, Hung CC, Kontoyiannis DP, Morris AJ, Heath CH, Wagener M, Yu VL.** 2010. Outcomes of central nervous system cryptococcosis vary with host immune function: Results from a multi-center, prospective study. *J. Infect.* **61**:419-426.
15. **Jackson A, Hosseinipour MC.** 2010. Management of cryptococcal meningitis in sub-Saharan Africa. *Current HIV/AIDS reports* **7**:134-142.
16. **Moody J.** 2007. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods, p. 1-23. *In* Garcia LS, Isenberg HD (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
17. **Mitchell TG, Perfect JR.** 1995. Cryptococcosis in the era of Aids - 100 Years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:515-548.
18. **Clancy CJ, Nguyen MH.** 1998. The combination of amphotericin B and azithromycin as a potential new therapeutic approach to fusariosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**:127-130.
19. **Soltow SM, Brenner GM.** 2007. Synergistic activities of azithromycin and amphotericin B against *Naegleria fowleri* *in vitro* and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:23-27.

20. **Munoz P, Palomo J, Guinea J, Yanez J, Giannella M, Bouza E.** 2008. Relapsing *Rhodococcus equi* infection in a heart transplant recipient successfully treated with long-term linezolid. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **60**:197-199.
21. **Hughes CE, Harris C, Peterson LR, Gerding DN.** 1984. Enhancement of the *in vitro* activity of amphotericin B against *Aspergillus* spp. by tetracycline analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**:837-840.
22. **Lew MA, Beckett KM, Levin MJ.** 1978. Combined activity of minocycline and amphotericin B *in vitro* against medically important yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**:465-469.
23. **Ku TS, Palanisamy SK, Lee SA.** 2010. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to azithromycin, tigecycline and vancomycin and the interaction between tigecycline and antifungals. *Int. J. Antimicrob. Agents* **36**:441-446.
24. **Shi WN, Chen ZZ, Chen X, Cao LL, Liu P, Sun SJ.** 2010. The combination of minocycline and fluconazole causes synergistic growth inhibition against *Candida albicans*: an *in vitro* interaction of antifungal and antibacterial agents. *FEMS Yeast Res.* **10**:885-893.
25. **Judd WR, Martin CA.** 2009. Antifungal activity of nontraditional antifungal agents. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **3**:86-95.
26. **Mihon C, Alexandre T, Pereira A.** 2013. Clinical experience in invasive fungal infections: multiple fungal infection as the first presentation of HIV. *Clin. Drug Investig.* **33**:S37-S40.
27. **Nau R, Sorgel F, Eiffert H.** 2010. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**:858-883.

Table1: Minimal Fungicidal Concentration(MIC) of antifungal and antibacterial against *Cryptococcus neoformans* ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Drugs	Groups <sup>a</sup>	GM	MIC Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
<b>Antifungals</b>					
Amphotericin B	I	0.22	0.5-0.06	0.125	0.25
	II	0.3	0.5-0.12	0.25	0.5
Fluconazole	I	8.7	3.0-1.0	8.0	32.0
	II	11.31	32.0-4.0	8.0	16.0
Flucytosine	I	2.36*	4.0- 0.5	2.0	4.0
	II	7.29*	16.0-4.0	8.0	16.0
<b>Antibacterial</b>					
Azithromycin	I and II	nd	> 64	nd	nd
Daptomycin	I and II	nd	> 64	nd	nd
Linezolid	I and II	nd	> 64	nd	nd
Minocycline	I and II	nd	> 64	nd	nd
Tigecycline	I and II	nd	> 128	nd	nd
Trimethoprim	I and II	nd	> 4	nd	nd

<sup>a</sup>Groups of isolates: I, before capsule induction and II, after capsule induction; MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>, MIC at which 50% and 90% of the isolates tested were inhibited, respectively; GM, MIC geometric mean; nd, not determined; \* $p < 0.05$ .

Table 2. Fractional inhibitory concentration index (FICI) geometric mean (GM) of the interactions of drugs against clinical isolates of *C. neoformans*.

Drug Combination	Group I			Group II				
	FICI- GM <sup>#</sup>	Interaction (%)			FICI- GM <sup>#</sup>	Interaction (%)		
		Syn	Ind	Ant		Syn	Ind	Ant
Amphotericin B + fluconazole	0.908 <sup>b</sup>	17	83	0	0.650 <sup>b</sup>	23	77	0
Amphotericin B + flucytosine	1.654 <sup>a</sup>	0	100	0	0.317 <sup>cd**</sup>	83	17	0
Fluconazole + flucytosine	1.155 <sup>a</sup>	10	73	17	1.007 <sup>a</sup>	10	90	0
Amphotericin B + minocycline	0.240 <sup>d</sup>	90	10	0	0.320 <sup>cd*</sup>	87	13	0
Amphotericin B + linezolid	0.493 <sup>cd</sup>	37	63	0	0.260 <sup>d*</sup>	87	13	0
Amphotericin B + tigecycline	0.249 <sup>d</sup>	83	17	0	0.154 <sup>d*</sup>	97	3	0
Amphotericin B + trimethoprim	0.628 <sup>c</sup>	13	87	0	0.402 <sup>bc</sup>	57	43	0
Amphotericin B + azithromycin	0.400 <sup>cd</sup>	77	23	0	0.344 <sup>cd</sup>	90	10	0
Amphotericin B + daptomycin	0.627 <sup>c</sup>	20	80	0	0.569 <sup>b</sup>	50	47	3

Syn, synergism; Ind, indifference; Ant, antagonismo; Group I, without inducing capsule; Group II, capsular induction; <sup>#</sup>Different letters in the column represent significant difference among drug combinations ( $P < 0.05$ ). \* significant difference ( $P < 0.05$ ) between groups I and II; \*\*significant difference ( $P < 0.001$ ) between groups I and II

## 5DISCUSSÃO

*Cryptococcus neoformans* apresenta um fator de resistência bem conhecido, que é a cápsula polissacarídica. Sabe-se que a cápsula aumenta de tamanho nas infecções *in vivo*, o que contribui para sua virulência. Estudos *in vitro* têm demonstrado a influência da cápsula nos testes de susceptibilidade, verificando-se que geralmente as CIMs foram maiores após a indução capsular (VITALE et al, 2012). Nesse sentido, buscou-se avaliar a influência de fatores de virulência, tais como a cápsula, nos testes de susceptibilidade, bem como buscar novas combinações que ofereçam potencial no tratamento da criptococose.

Num primeiro momento avaliou-se a influência da cápsula na susceptibilidade de antifúngicos comumente utilizados para o tratamento da criptococose. Observou-se que comparando as CIMs dos grupos I (antes da indução capsular) e II (após indução capsular), obteve-se CIMs mais elevadas após a indução capsular. Esses dados estão em concordância com aqueles encontrados por Vitale et al (2012). No entanto, em nosso estudo os resultados para a flucitosina foram estatisticamente maiores no grupo II, o que discorda com os achados de Vitale et al 2012, onde observaram essas diferenças para o fluconazol. Em virtude das poucas opções terapêuticas empregadas no tratamento da criptococose e do rápido desenvolvimento de resistência quando os fármacos foram utilizados sozinhos, a terapia combinada oferece vantagens, tais como a rápida resposta antifúngica, redução dos casos de resistência a esses fármacos e aumento do espectro de atividade (NGUYEN et al, 2010).

Em nosso trabalho a combinação entre os fármacos AMB+5FC mostrou os melhores percentuais de sinergismo e diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, quando comparada a outras combinações entre antifúngicos (AMB+FLUCO; FLUCO+FLUCI), o que pode explicar a eficácia dessa combinação na clínica. Verificou-se também que quando os fármacos foram usados em combinação, houve uma redução significativa nas concentrações dos fármacos, proporcionando resultados sinérgicos.

Quando utilizou-se a combinação de antifúngicos e agentes antibacterianos, os resultados foram ainda melhores do que os encontrados para as combinações usualmente utilizadas no tratamento da criptococose (Tabela 4). Alguns autores relatam a atividade de agentes antibacterianos combinadas com agentes antifúngicos, não só para *Cryptococcus spp*, mas para outros fungos patogênicos (AFELTRA & VERWEIJ, 2003; JUDD & MARTIN, 2009).

Para as combinações envolvendo antibacterianos, no grupo I a AMB+MINO e AMB+TIGE, apresentaram os melhores resultados. A média dos FICIs evidenciou diferenças estatísticas entre os grupos I e II, e os elevados percentuais de sinergismo destas associações para os dois grupos indicam que estas combinações são ativas sob qualquer condição.

Relatou-se a atividade da minociclina combinada com outros agentes antifúngicos frente a microorganismos como o *Aspergillus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* mostrando boa atividade no combate a eles (LEW et al, 1978; HUGHES et al, 1984; SHI et al, 2010). A combinação da minociclina com outros agentes antifúngicos pode apresentar potencial para o tratamento da meningite criptocócica, pois a minociclina penetra no sistema nervoso central (SNC) melhor que outras tetraciclina (SHI et al, 2010).

A tigeciclina em altas doses foi relatada com atividade para biofilmes de *Candida albicans*, no entanto, não potencializou a atividade antifúngica de fármacos antifúngicos (SHENG, POLANISAMY, LEE, 2010). Os mecanismos desta atividade são desconhecidos para a combinação AMB+ TIGE, mas acredita-se que ocorre devido à capacidade de anfotericina B em abrir poros na membrana plasmática do fungo, permitindo a entrada do fármaco para dentro da célula, evitando a síntese de proteínas. A boa atividade da tigeciclina em combinação com anfotericina B, tem potencial para o tratamento de criptococose, uma vez que em doses elevadas ocorre penetração de tigeciclina nos tecidos (BARBOUR et al, 2009).

A combinação AMB+ LINEZ e AMB+ TIGE apresentaram os melhores resultados após a indução capsular (Grupo II). Elevados percentuais de sinergismo observados para essas combinações no grupo II (87% e 97% respectivamente) sugerem que essa combinação deve ser avaliada *in vivo* para comprovação destes achados. Nessas combinações observou-se que os resultados foram semelhantes aqueles obtidos para a AMB+FLUCI.

A linezolida é a primeira oxazolidinona aprovada para uso comercial (ESTES & DERENDORF, 2010). Relatos de pacientes com transplante cardíaco que mostraram infecção pulmonar por *C. neoformans*, quando tratados com a combinação de linezolida e fluconazol, mostraram melhora significativa (MITCHELL & PERFECT, 1995).

Para a combinação AMB+TRIM não se detectou diferenças significativas na média dos FICIs entre os grupos I e II. Todavia, os percentuais de sinergismo no grupo II foram 4,4 vezes maior o que demonstra a atividade dessa combinação após a indução capsular. O trimetoprimé relatado comumente associado com o sulfametoxazol. Existe um relato da combinação do trimetoprim com anfotericina B para o tratamento de um paciente com várias infecções fúngicas em uma primeira manifestação do HIV, resultando em



melhora significativa ([MIHON](#), et al 2013). Não foi reportado o uso de trimetoprimsozina com outros agentes antifúngicos.

A combinação ANFO + AZITRO não mostrou diferenças significativas na média do FICIs nos grupos I e II. Vale ressaltar que, o alto percentual de sinergismo (90%) encontrado no grupo II, fornece dados que precisam ser melhor explorados. A combinação de azitromicina e anfotericina foi relatada anteriormente com atividade contra espécies de *Fusarium* spp. (CLANCY & NGUYEN, 1998.) e *Naegleria fowleri* (SOLTOW & BRENNER, 2007) e, neste último caso, ela era ativa tanto *in vitro* como *in vivo*. O mecanismo de ação é desconhecido, mas acredita-se ser a mesma como relatado para a tigeciclina.

A AMB+ DAPTO, também não mostrou diferenças entre os grupos I e II. Mas a análise *in vitro*, mostrou que essa combinação apresentou resultados semelhantes à combinação AMB+FLUCO no grupo II. Nesse sentido, merece estudos para investigação dessa atividade. Não há relatos na literatura que mostrem a atividade antifúngica da daptomicina.

## 6 CONCLUSÕES

### **6.1 Avaliação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para os fármacos antifúngicos, antes e após a indução capsular:**

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para os fármacos antifúngicos, foram superiores no grupo após a indução capsular (grupo II), no entanto, essas diferenças foram significativas apenas para a flucitosina; para a anfotericina B e fluconazol, não observou-se diferenças estatísticas entre os dois grupos.

### **6.2 Avaliação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para os fármacos antibacterianos, antes e após indução capsular:**

Nenhum dos agentes antibacterianos avaliados, isoladamente, evidenciaram atividade antifúngica a *C.neoformans*, para ambos os grupos.

### **6.3 Avaliação das associações entre fármacos antifúngicos através da utilização do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) antes e após indução capsular:**

As associações de AMB+FLC, AMB+5FC e 5FC+FLC, mostraram que antes da indução capsular (grupo I), os resultados sinérgicos foram melhores para a combinação AMB+FLC, mas no grupo após a indução capsular (II), os resultados foram superiores para AMB+5FC.

### **6.4 Avaliação da suscetibilidade do gênero *Cryptococcus* a anfotericina B associada com agentes antibacterianos antes da indução capsular (Grupo I) através da utilização do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF):**

A avaliação da suscetibilidade *in vitro* do *Cryptococcus* frente à anfotericina B combinada com agentes antibacterianos evidenciou que a atividade antifúngica *in vitro* das combinações de fármacos foram melhores do que a atividade dos agentes isoladamente, sendo que as combinações de anfotericina B + minociclina e anfotericina B + tigeciclina, apresentaram os melhores resultados antes da indução capsular.

### **6.5 Avaliação da suscetibilidade do gênero *Cryptococcus* a anfotericina B associada com agentes antibacterianos após indução capsular:**

A avaliação da suscetibilidade *in vitro* do *Cryptococcus* frente à anfotericina B combinada com agentes antibacterianos evidenciou excelente atividade frente aos micro-organismos testados, sendo que as combinações de anfotericina B + linezolida e anfotericina B + tigeciclina, apresentaram os melhores resultados após a indução capsular, sendo iguais ou superiores a combinação AMB+5FC.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS

ABRUZZO, G.K.; FLATERRY, A.M.; GILL, C.J.; KONG, L.; SMITH, J.G.; PIKOUNIS, V.B.; BALKOVEC, J.M.; BOUFARD, A.F.; DROPINSKI, J.F.; ROSEN, H.; KROPP, H.; BARTIZAL, K. Evaluation of the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743, 872): efficacies in mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis and cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2333-2336, 1997.

AFELTRA, J., VERWEIJ, P. E. Antifungal activity of nonantifungal drugs. *European Journal Clinical Microbiology Infect Disease*, v.22, p.397-407, 2003.

ALFONSO, F.; GALLO, L.; WINKLER, B.; SUHRLAND, M.J. Fine needle aspiration cytology of peripheral lymph node cryptococcosis. A report of three cases. **Acta Cytology**, v. 38, p.459, 1994.

ALLEENDOERFER, R. *et al.* Combined therapy with fluconazole and flucytosine in murine cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p.726-729, 1991.

ALLER, A.I.; MARTIN-MANUELOS, E.; LOZANO, F.; GOMEZ-MATEOS, J.; STEEL-MORE, L.; HOLLOWAY, W.J.; GUTIERREZ, M.J.; RECIO, F.J.; ESPINEL-INGROFF. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 1544-1448, 2000.

ALVES, S. H.; LOPES, J. O.; COSTA, J. M.; KLOCK, C. Development of secondary resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 39, p. 359-361, 1997.

ANDRADE-SILVA, L.; FERREIRA-PAIM, K. ; MORA, D.J.; SILVA, P.R DA.; ANDRADE, A.A.; ARAUJO, N.E.; PEDROSA, A.L.; SILVA-VERGARA, M.L. [Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of \*Cryptococcus neoformans\* and \*Cryptococcus gattii\* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil.](#) **Medical Mycology**, p.1-6, 2013.

BARBOUR, A.; SCHMIDT, S. M.A. B.; SCHIEFELBEIN, L.; RAND, K.H.; BURKHARDT, O.; DERENDORF, H. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tigecycline. **Clinical Pharmacokinetic**, v.48, p. 575-84, 2009.

**BARCHIESI, F. et al.** In-vitro interactions of itraconazole with flucytosine against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 44, p.65-70, 1999.

**BARCHIESI, F. et al.** Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2435-2441, 2000.

**BARCHIESI, F. et al.** Interactions of posaconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p.1355-1359, 2001.

BARLUZZI, R.; BROZZETTI, A.; MARIUCCI, G.; TANTUCCI, M.; NEGLIA, R. G.; BISTONI, F.; BLASI, E. Establishment of protective immunity against cerebral cryptococcosis by means of an avirulent, non melanogenic *Cryptococcus neoformans* strain. **Journal of Neuroimmunology**, v. 109, p. 75–86, 2000.

BARTIZAL, K.C.; GILL, C.; ABRUZZO, G.; FLATERRY, A.M.; KONG, L.; SCOTT, P.M.; SMITH, J.G.; LEIGHTON, C.E; BOUFFARD, A.; DROPINSK, JF, BALKOVEC J. In vitro preclinical evaluation studies with equinochandin antifungal MK-0991 (L-743, 872). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 2326-2332, 1997.

BENNETT, J. E.; DISMUKES, W.E.; DUMA, R.J.; et al. A comparison of amphotericin B alone and combined with flucytosine in the treatment of cryptococcal meningitis. [The New England Journal of Medicine](#), v. 301, p.126, 1979.

BEHRMAN, R.E.; MASCI, J.R.; NICHOLAS, P. Cryptococcal skeletal infections: case report and review. **Review Infections Disease**, v. 12, p.181, 1990.

BICANIC, T.; WOOD, R.; MEINTJES, G.; REBE, K.; BROUWER, A.; LOYSE, A.; BEKKER, LG.; JAFFAR, S.; HARRISON, T. High-Dose Amphotericin B with Flucytosine for the Treatment of Cryptococcal Meningitis in HIV-Infected Patients: A Randomized Trial. **Clinical Infections Disease**, v. 47, p.123-130, 2008.

BLOCK, E.R.; JENNINGS, A.E.; BENNETT, J.E. 5- Fluorocytosine resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 3, p. 649-656, 1973.

BRANDT, M. E.; PFALLER, M. A.; HAJJEH, R. J. H.; PAPPAS, P. G.; REINGOLD, A. L.; RINLAND, D.; WARNOCK, D. W.; THE CRYPTOCOCCAL DISEASE ACTIVE SURVEILLANCE GROUP. Trends in Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 3065-3069, 2001.

BROUWER, A. E.; RAJANUWONG, A.; CHIERAKUL W.; GRIFFIN. G. E; LARSEN, R. A; WHITE, N. J.; HARRISON, T. S. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. **Lancet**, v.363, p.1764–67, 2004.

BUCHANAN, K.L.; MURPHY, J.W. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerging Infectious Disease**, v.4, p. 71-83, 1998.

CASADEVALL A.; PERFECT JR. *Cryptococcus neoformans* 1<sup>st</sup> ed. Washington, DC: American society for microbiology press, 1998.

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

CASH, J.B.; GOODMAN, N.L. Cryptococcal infection of the temporal bone. **Diagnostic Microbiology Infections Disease**, v.1, p.257, 1983.

CHANG, H. C.; LEAW, S. N.; HUANG, A. H.; WU, T. L.; CHANG, T. C. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3466-3471, 2001.

CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; BRIGITTE, M.; CHRETIEN, F.; DROMER, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection Immunity**, v. 77(1), p. 120-7, 2008.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.20, p.507-44, 2006.

CHEN, G.L.; CHEN, Y.; ZHU, C.Q.; YANG, C.D.; YE, S. Invasive fungal infection in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v. 31, p. 1087-1091, 2012.

CHEN, H.; LIUSHIH. R. N.; HSIEH, W. C. Combined in vitro activity of amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **Chung-Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih**, v. 15, p. 106-112, 1982.

CLANCY, C.J; NGUYEN, M.H. The combination of amphotericin B and azithromycin as a potential new therapeutic approach to fusariosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, p. 127–130, 1998.

CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H.; ALANDOERFFER, R.; CHENG, S.; ICZKOWSKI K, et al. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates recovered from persons with AIDS demonstrate a wide range of virulence during murine meningoencephalitis that correlates with the expression of certain virulence factors. **Microbiology**, v.152, p.2247–2255, 2006.

CÓRDOBA, S.; AFELTRA, J.; VITALE, R.G. Evaluation of the in vitro activity of amphotericin B by time–kill curve methodology against large and small capsulate *C. neoformans* isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, p. 260–262, 2011.

COSTA, A. K.; SIDRIM, J. J.; CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeast: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. **Mycopathologia**, v.29, 2009.

COX, G.M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G.T.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. **Infection Immunity**, v.68, p. 443–448, 2000.

COX, G.M.; MCDADE, H.C.; CHEN, S.C.; TUCKER, S.C.; GOTTFREDSSON, M. et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v.39, p. 166–175, 2001.

CUELLAR, M.L.; SILVEIRA, L.H.; ESPINOZA, L.R. Fungal arthritis. **Annual Rheumatology Disease**, v.51, p.690–7, 1992.

CUENCA-ESTRELLA M, DIAZ-GUERRA TM, MELLADO E, RODRIGUEZ-TUDELLA JL. Flucytosine primary resistance in *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. **European Journal Clinical Microbiology Infections Disease**, v.20, p. 276-279, 2001.

DIAMOND, D. M. *et al.* Amphotericin B colloidal dispersion combined with flucytosine with or without fluconazole for treatment of murine cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p.528-533, 1998.

DISMUKES, W. E. Introduction to antifungal drugs. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p.653-657, 2000.

DOERING, T.L. How sweet it is! Capsule formation and cell wall biogenesis in *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review Microbiology**, v. 63, p. 223–247, 2009.

DROMER, F.; MOULIGNIER, A.; DUPONT, B.; et al. Myeloradiculitis due to *Cryptococcus curvatus* in AIDS (letter). **AIDS**, v.9, p.395, 1995.

**DUPONT, B.; DROUHET E.** In vitro synergy and antagonism of antifungal agents against yeast-like fungi. **Postgraduate Medical Journal**, v. 55, p.683-686, 1979.

DURDEN, F.M.; ELEWSKI, B. Cutaneous involvement with *Cryptococcus neoformans* in AIDS. **[Journal of the American Academy of Dermatology](#)**, v. 30, p.844-848, 1994.

DZOYEM, J.P.; KECHIA, F.A.; NGABA, G.P.; LUNGA, P.K.; LOHOUE, P.J. Prevalence of cryptococcosis among HIV-infected patients in Yaounde, Cameroon. **African Health Sciences**. v. 12 , n. 2, 2012.

ELLIS, D.H; PFEIFFER, T.J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 25, p. 430-431, 1990.

ESTES, K.S.; DERENDOR, H. Comparison of the pharmacokinetic properties of vancomycin, linezolid, tigecyclin and daptomycin. **European Journal of Medical Research**, v. 15, p.533-543, 2010.

FELDEMESSER, M.; KRESS, Y.; MEDNICK, A.; CASADEVALL, A. The effect of the equinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis of *Cryptococcus neoformans*. **Journal Infections Disease**, v.182, p. 1791-1795, 2000.

FISHMAN, J. A. Summary: future directions in antifungal therapy. **Transplant Infectious Diseases**, v. 4, p. 67-68, 2002.

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

FRASES, S., PONTES, B., NIMRICHTER, L., VIANA, N.B., RODRIGUES, M.L., CASADEVALL, A. Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. **[Proceedings of the National Academy of Sciences](#)**, v.106, p. 1228-33, 2009.

GARCIA-HERMOSO, D.; JANBORN, G.; DROMER, F.; Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37. p. 3204-9, 1999.



**GHANNOUM, M. A. et al.** In vitro determination of optimal antifungal combinations against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.39, p. 2459-2465, 1995.

GHANNOUM MA, IBRAHIM AS, FU Y, SHAFIQ MC, EDWARDS JE, CRIDDLE RS. Susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*- a microdilution technique. **Journal Clinical Microbiology**, v.30, p. 3138-3145, 1992.

GOMEZ, B.L.; NOSANCHUK, J.D. Melanin and fungi. **Current Opinion Infection Disease**, v.16, p.91–96, 2003.

HAY, R.J. *Cryptococcus neoformans* and cutaneous cryptococcosis. **Sem Dermatol**, v.4, p.252, 1985.

**HAMILTON, J. D.; ELLIOTT, D. M.** Combined activity of amphotericin B and 5-fluorocytosine against *Cryptococcus neoformans* in vitro and in vivo in mice. **Journal Infections Disease**, v. 131, p.129-137,1975.

HEITMAN, J.; KOZEL, T.R.; KWON-CHUG, K.J.; PERFECT, J.R.; CASADEVALL A. **Cryptococcus from human pathogen to model yeast**. 2nd ed. Washington: ASM press. 620p. 2011.

HOPFER, R.L.; GRÖSCHEL, D. Six-hour pigmentation test for the identification of *Cryptococcus neoformans*. **Journal Clinical Microbiology**, v.2, p.96, 1975.

HOSPENTHAL, D.R.; BENNETT, J.R. Flucytosine monotherapy for cryptococcosis. **Clinical Infections Disease**, v.27, p. 260-264, 1998.

HUGHES, C.E; HARRIS, C.; PETERSON, L.R; GERDING, D.N. Enhancement of the in vitro activity of amphotericin B against *Aspergillus* spp. by tetracycline analogs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.26, p.837-840, 1984.

HUPPERT, M.; SUN, S.H; VUKOVICH, K. R. Combined amphotericin B-tetracycline therapy for experimental coccidioidomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.5, p. 473-8, 1974.

JARURATANASIRIKUL, S. Distribution of azithromycin into brain tissue, cerebrospinal fluid, and aqueous humor of the eye. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p.825-826, 1996.

[JOHNSON, M.D.](#), et al. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 693-715, 2004.

JOHNSON, [E.](#); [ESPINEL-INGROFF, A.](#); [SZEKELY, A.](#); [HOCKEY, H.](#); [TROKE, P.](#) Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. [International Journal Antimicrobial Agents](#), v.32, p.511-4, 2008.

JOHNSTON, S.R.D.; CORBETT, E.L.; FOSTER, O. et al. Raised intracranial pressure and visual complications in AIDS patients. **Journal Infections**, v. 24, p.185, 1992.

JUDD, W.R.; MARTIN, C.A. Antifungal of nontraditional antifungal agents. **Current Fungal Infections Reports**, v.3, p.86-95, 2009.

KATSU M, KIDD S, ANDO A, MORETTI-BRANCHINI ML, MIKAMI Y, NISHIMURA K, MEYER W. The internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **FEMS Yeast Research**, v.4, p.377-388, 2004.

KIDD, S.E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R.L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K.H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K.J.; MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p. 17258-63, 2004.

KRAJDEN, S.; SUMMERBELL, R.C.; KANE, J. et al. Normally saprobic cryptococci isolated from *Cryptococcus neoformans* infections. **Journal Clinical Microbiology**, v. 29, p.1883, 1991.

KWON-CHUNG, K. J. A new species of *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. **Mycology**, v.67, p. 1197-1200, 1975.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Epidemiology**, v.120, p.123-130, 1984.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Cryptococcosis. **Medical Mycology**, p. 397-446., Philadelphia. 1992.

KWON-CHUNG, K.J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **FEMS Yeast Research**, v.6, p.574–87, 2006.

KORDOSSIS, T.; AVLAMI, A.; VELEGRAKI, A.; et al. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. **Medical Mycology**, v.36, p.335, 1998.

KOZEL, T.R, et al. Antigenic and biological characteristics of mutant strains of *Cryptococcus neoformans* lacking capsular O-acetylation or xylosyl side chains. **Infection and Immunity**, v.71, p.2868–2875, 2003.

KRISHNARO, T.; GALGIANI, J. Comparison of the in vitro activities of the equinocandin LY 303366, the pneumocandin MK-0991 and fluconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, p. 1957-1960, 1997.

KESTELYN, P.; TAELEMAN, H.; BOGAERTS, J. et al. Ophthalmic manifestations of infections with *Cryptococcus neoformans* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **American Journal Ophthalmology**, v.116, p.721, 1993.

KNOKE, M.; SCHWESINGER, G. One hundred years ago: the history of cryptococcosis in Greifswald. Medical mycology in the nineteenth century. **Mycoses**, v.37, p.229-233, 1994.

KU, T, S,N.; PALANISAMY, K, A, S.; LEE, S.A. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to azithromycin, tigecycline and vancomycin and the interaction between tigecycline and antifungals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.36, p.441–446, 2010.

KWAN, C. N.; MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G. S.; SCHLESSINGER, D.; RASKAS, H. J. Potentiation of the antifungal effects of antibiotics by amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 2, p.61-65, 1972.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*. In: \_\_\_\_\_ . **The Yeasts: a taxonomic study** . 5<sup>th</sup> ed. New York: ACM Press, 2011, p. 1661-1662.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO N. T. *Criptococose*. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**, São Paulo: Sarvier, 9 ed., p. 416- 440. 2002.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 143-158, 2003.

LARSEN, R. A. *et al.* Effect of fluconazole on fungicidal activity of flucytosine in murine cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2178-2182, 1996.

LA HOZ RM, PAPPAS PG. Cryptococcal Infections: Changing Epidemiology and Implications for Therapy. **Drugs**, 2013.

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

LAZÉRA, M. S.; SALMITO CAVALCANTI, M. A.; LONDERO, A. T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology**, v. 38, p. 379-83, 2000.

LAZÉRA, M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. Criptococose. In: SIDRIM, J. J. e ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S. A., p.252-264. 2004.

LEW, M.A; BECKETT, K.M.; LEVIN, M.J. Combined activity of minocycline and amphotericin B in vitro against medically important yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 14, p.465-469, 1978.

LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Rationale for combination antifungal therapy. **Pharmacotherapy**, v. 21, p. 149S-164S, 2001.

[LI, M.](#); [LIAO, Y.](#); [CHEN, M.](#); [PAN, W.](#); [WENG, L.](#) Antifungal susceptibilities of *Cryptococcus* species complex isolates from AIDS and non-AIDS patients in Southeast China. [Brazilian Journal Infections Disease](#), v.16, p.175-9, 2012.

LIFSON, A.R.; RHAME, F.S.; BELLOSO, W.H.; DRAGSTED, U.B.; EL-SADR, W.M.; GATELL, J.M. Reporting and Evaluation of HIV-Related Clinical Endpoints in Two Multicenter International Clinical Trials. **HIV Clinical Trials**, v. 7, p. 125-141, 2006.

LITTMAN, M.L; BOROK, R. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathology Mycology Apply**, v. 35, p.922-933, 1968.

LORETO, E.S; [MARIO, D.A](#); [DENARDI, L.B](#); [ALVES, S.H](#); [SANTURIO, J.M](#). In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, p.3588-90, 2011.

LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V.L; GHANNOUM, M.A.; REX, J.H. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus* clinical isolates: performance of three different media assessed by using E-test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A methodologies. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2817-2822, 1998.

LUPETTI, A.; NIBBERING, P. H; CAMPA, M. et al. Molecular targeted treatments for fungal infections: the role of drug combinations. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, p. 269–76, 2003.

MAHL, [D.L.](#); [DE JESUS, F.P](#); [LORETO, É](#); [ZANETTE, R.A.](#); [FERREIRO, L.](#); [PILOTTO, M.B](#); [ALVES, S.H](#); [SANTURIO, J.M](#). In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, p.4021-3, 2012.

MALIGIE, M.A.; SELITRENNIKOFF, C.P. *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3) beta-glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p. 2851-2856, 2005.

MANSOUR MK, LEVITZ SM. Interactions of fungi with phagocytes. **Current Opinion Microbiology**, v.5, p.359–365. 2002.

MARTINS M.A, PAPPALARDO M.C, MELHEM M.S, PEREIRA-CHIOCCOLA VL. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p.777-84, 2007.

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

MAYERS, D.L.; Antimicrobial drug resistance. In: HANSON, K.E.; ALEXANDER B.D.; PERFECT, J. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. USA: Humana Press, 2009. p. 967-985.

MAXWELL, M.J.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A. Evaluation of E test method for determining voriconazole and amphotericin B MICs for 162 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41(1), p. 97-99, 2003.

MCFADDEN, D.C., DE JESUS, M., et al. The Physical Properties of the Capsular Polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* Suggest Features for Capsule Construction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p.1868-1875, 2006.

MCFADDEN, D.; ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. **Trends Microbiology**, v.14, p.497-505, 2006.

MEDOFF, G., COMFORT, M., AND KOBAYASHI, G. S. Synergistic action of amphotericin B and 5-fluorocytosine against yeast-like organisms. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 138, p.571-574, 1971.

MENICHETTI, F.; FIORIO, M.; TOSTI, A.; GATTI, G.; BRUNA, PASTICCI, M.; MILETICH, F.; MARRONI, M.; BASSETTI, D.; PAULUZZI, S. High-dose fluconazole therapy for cryptococcal meningitis in patients with AIDS. **Clinical Infections Disease**. v.22(5), p.838-40, 1996.

[MIHON, C.](#); [ALEXANDRE, T.](#); [PEREIRA, A.](#) Clinical experience in invasive fungal infections: multiple fungal infections as the first presentation of HIV. **Clinical Drug Investigation**, v.33, p. 37-40, 2013.

MITCHELL, T.J.; PERFECT, J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Review**, v.8, 1995.

MITCHELL DH, SORREL TC, ALLOWORTH AM et al. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent hosts--influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. **Clinical Infections Disease**, v. 20, p.611-613, 1995.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 163-194, 2005.

MUÑOZ, P.; PALOMA, J.; GUINEA, J.; YÁÑEZ, J.; GIANELLA, M.; BOUZA, E. Relapsing *Rhodococcus equi* infection in a heart transplant recipient successfully treated with long-term linezolid. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.60, p. 197-199, 2007.

MUSSA, A. Y.; RANDHAWA, H. S.; KHAN, Z. U. Decaying wood as a natural habitat of melanin-forming (Mel+) Variant of *Cryptococcus laurentii*. **Current Science**, Kuwait, v. 79, p. 1471-1474. 2000.

NAKA, W.; MASUDA, M.; KONOYAMA, A. et al. Primary cutaneous cryptococcosis and *Cryptococcus neoformans* serotype D. **Clinical Experiences Dermatology**, v.20, p.221, 1995.

NARA, S.; SANO, T.; OJIMA, H.; ONAYA, H.; IKEDA, M.; MORIZANE, C.; ESAKI, M.; SAKAMOTO, Y.; SHIMADA, K.; KOSUGE, T. Liver cryptococcosis manifesting as obstructive jaundice in a young immunocompetent man: report of a case. **Surgery Today**, v.38, p.271-4, 2008.

NGUYEN, H.T; HURWITZ, R.S; DEFOOR, W.R; MINEVICH, E.; MCADAM, A.J; MORTENSEN, J.E; NOVAK-WEEKLEY, S.M; MINNILLO, B.J; ELDER, J.S. Trimethoprim in vitro antibacterial activity is not increased by adding sulfamethoxazole for pediatric *Escherichia coli* urinary tract infection. **Journal Urology**, v.84, p.305-10, 2010.

NGUYEN, M.H.; HUSAIN, S.; CLANCY, C.J.; PEACOCK, J.E.; HUNG, C.C.; KONTOYIANNIS, D.P.; MORRIS, A.J.; HEATH, C.H.; WAGENER, M.; YU, V.L. Outcomes of central nervous system cryptococcosis vary with host immune function: results from a multi-center, prospective study. **Journal Infections**, v.61, p. 419-426, 2010.

NGUYEN, [M.H](#); [CLANCY, C.J](#); [YU, Y.C](#); [LEWIN, A.S](#). Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by azithromycin against *Aspergillus* species. [European Journal Clinical Microbiology Infections Disease](#), v.16, p.846-8, 1997.

NUSSBAUM, [J.C](#); [JACKSON, A](#); [NAMARIKA, D](#); [PHULUSA, J](#); [KENALA, J](#); [KANYEMBA, C](#); [JARVIS, J.N](#); [JAFFAR, S](#), [HOSSEINIPOUR MC](#), [KAMWENDO D](#), [VAN DER HORST CM](#), [HARRISON TS](#). Combination flucytosine and high-dose fluconazole compared with fluconazole monotherapy for the treatment of cryptococcal meningitis: a randomized trial in Malawi. [Clinical Infections Disease](#), v.50, n.1, p.338-44, 2010.

ODDS, F. C.; BROWN A. J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Tren. Microb.**, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

ODDS, F. C. Interactions among amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole, and miconazole against pathogenic fungi *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 22, p. 763-770, 1982.

ODOM, A.; MUIR, S.; LIM, E.; et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **EMBO Journal**, v.16, p.2576, 1997.

O'MEARA, T.R.; ALSPAUGH, A.J. The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v.25, p.387, 2012.

ORNI-WASSERLAUF, R.; IZKHAKOV, E.; SIEGMAN-IGRA, Y.; BASH, E.; POLACHEK, I.; GILADI, M. Fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans* isolated from an immunocompetent patient without prior exposure to fluconazole. **Clinical Infections Disease**, v.29, p.1337-1338, 1999.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; ALEXANDER, B.D.; KETT, D.H., et al. Multicenter clinical evaluation of the (1,3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. **Clinical Infections Disease**, v. 41, p.654, 2005.

PANKEY, G.A. Tigecycline. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 56, p. 470-80, 2005.

PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer. In: Heitman J, Filler SG, Edwards JE, Mitchell AP (eds) Molecular Principles of Fungal Pathogenesis. ASM Press, Washington DC, 2006, p.281.

PERFECT, J. R. & CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infections Disease Clinical. North Am.**, Durham, v.16, p. 837-874. 2002

PERFECT, J.R.; COX, G.M. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Drug resistance Updates**, v. 2, p. 250-269, 1999.

PERFECT, J.R.; DISMUKES, W.E.; DROMER, F.; GOLDMAN, D.L.; GRAYBILL, J.R.; HAMILL, R.J.; HARRISON, T.S.; LARSEN, R.A.; LORTHOLARY, O.; NGUYEN, M.H.; PAPPAS, P.G.; POWDERLY, W.G.; SINGH, N.; SOBEL, J.D.; SORRELL, T.C. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infections Disease**, v.50, p.291-322, 2010.

PERRY, H.D.; DONNENFELD, E.D. Cryptococcal keratitis after keratoplasty (correspondence). **American Journal Ophthalmology**, v. 110, p.320, 1990.

PFALLER, M.A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; MESSER, S.A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D.J. In vitro susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus*



*neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. **Journal Clinical Microbiology**, v.43, p.3807-3810, 2005.

**POLAK, A.** Synergism of polyene antibiotics with 5-fluorocytosine. **Chemotherapy**, v.24, p. 2-16, 1978.

**PORE, R. S.** Amphotericin B synergy testing by the FCST. **Current Microbiology**, v. 24, p. 171-177, 1992.

POWDERLY, W.G.; KEATH, W.J.; SOKOL-ANDERSON, M. Amphotericin b-resistance *Cryptococcus neoformans* in a patient with AIDS. **Infections Disease in Clinical Practice**. v. 1, p.314-316, 1992.

REX, J.H.; LARSEN, R.A.; DISMUKES, W.E.; et al. Catastrophic visual loss due to *Cryptococcus neoformans* meningitis. **Medicine (Baltimore)**, v. 72, p.207, 1993.

REX, J.H.; PFALLER, M.A. Has antifungal susceptibility come of age? **Clinical Infections Disease**, v.35, p.983-989, 2002.

RIVERA, J.; FELDMESSER, M.; CAMMER, M.; CASADEVALL, A. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. **Infection Immunity**, v. 66, p. 5027–30, 1998.

RIMEK, D.; HAASE, G.; LUCK, A. et al. First report of a case of meningitis caused by *Cryptococcus adeliensis* in a patient with acute myeloid leukemia. **Journal Clinical Microbiology**, v.42, p.481, 2004.

RODRIGUES, M.L.; FONSECA, F.L., et al. The still obscure attributes of cryptococcal glucuronoxylomannan. **Medical Micology**, p. 1-7, 2009.

RODRIGUES, M.L.; NIMRICHTER, L.; Ingood company: association between fungal glycans generates molecular complexes with unique functions. **Frontiers Microbiology**, v. 3, p. 249, 2012.

SAMONIS, G.; MANTADAKIS, E.; BARBOUNAKIS, E.; KOFTERIDIS, D.; PAPADAKIS, G.; SIFAKI, L.; MARAKI, S. Effects of tigecycline and daptomycin on murine gut colonization by *Candida albicans*. **Mycoses**, v.51, p.324–327, 2008.

SANGUINETTI M, POSTERARO B, LASORDA M, TORELLI R, FIORI B, SANTANGELO R, DELOGU G, AND FADDA G. Role of AFR1, an ABC transporter

encoding gene, in the in vivo response to fluconazole and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v.74, p.1352-1359, 2006.

SEATON, R.A.; VERMA, N.; NARAQI, S.; WEMBRI, J.P.; WARRELL, D.A. Visual loss in immunocompetent patients with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.91, p.44-9, 1997.

SHAO, X.; MEDNICK, A.; ALVAREZ, M.; VAN ROOIJEN, N.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D.L. An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia. **Journal Immunology**, v.175, p.3244–3251, 2005.

SHI, W.; CHEN, Z.; CHEN, X.; CAO, L.; LIU, P.; SUN, S. The combination of minocycline and fluconazole causes synergistic growth inhibition against *Candida albicans*: an *in vitro* interaction of antifungal and antibacterial agents. **Federation of European Microbiological Societies**, v.10, p. 885-893, 2010.

SHENG NKU, T.; POLANISAMY, S.K.A.; LEE, S.A. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to azithromycin, tigecycline and vancomycin and the interaction between tigecycline and antifungals. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.36, p. 441–446, 2010.

SILVA, P.R.; RABELO, R.A.; TERRA, A.P.; TEIXEIRA, D.N. Susceptibility to antifungal agents among *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from patients at a university hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.158-62, 2008.

SOBEL, J.D.; VAZQUEZ, J.A. Fungal infections of the urinary tract. **World Journal Urology**, v.17, p.410–4, 1999.

SOLTOW, S.M.; BRENNER, G.M. Synergistic activities of azithromycin and amphotericin B against *Naegleria fowleri* in vitro and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 23–27, 2007.

STAIB, F. *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D.C.) Farbreaktion für *Cr. neoformans*. **Zbl Hyg**, v.148, p.466, 1962.

SPEED, B.; DUNT, D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Infection Disease**, v.21, p.28-36. 1995.

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

VANDEN, B. H. Mechanisms of antifungal resistance. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 14, p. 44-49, 1997.

VAN DER HORST, C.M.; SAAG, M.S.; CLOUD, G.A. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med**, v.337, p.15-21, 1997.

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

VAN GRIEKEN, S.A.; DUPONT, L.J.; VAN RAEMDONCK, D.E.; VAN BLEYENBERGH, P.; VERLEDEN, G.M. Primary cryptococcal cellulitis in a lung transplant recipient. [The Journal of Heart and Lung Transplantation](#), v.26, p.285-9, 2007.

VARTIVARIAN, S.E.; ANAISSIE, E.J.; COWART, R.E.; et al. Regulation of cryptococcal capsular polysaccharide by iron. **Journal Infection Disease**, v.167, p.186, 1993.

VELEZ, J.D.; ALLENDOERFER, R.; LUTHER, M.; RINALDI, M.G; GRAYBILL, J.R. Correlation of in vitro azole susceptibility with *in vivo* response in a murine model of cryptococcal meningitis. **Journal Infections Disease**, v. 168, p.508-510, 1993.

VENTURINI, T.P; ROSSATO, L; SPADER, T.B; TRONCO-ALVES, G.R; AZEVEDO, M.I; WEILER, C.B; SANTURIO, J.M; ALVES, S.H. In vitro synergisms obtained by amphotericin B and voriconazole associated with non-antifungal agents against *Fusarium spp.* **Diagnostic Microbiology Infections Disease**, v.71, p.126-30, 2011.

VITALE, R.G. ; PASCUCCELLI, V. ; AFELTRA, J. Influence of capsule size on the vitro activity of antifungal agents against clinical *Cryptococcus neoformans var. grubii* strains. [Journal Medical Microbiology](#), v.61, p. 384-388, 2012.

VIVIANI, M.A.; COGLIATI, M.; ESPOSTO, M.C.; et al, and the ECMM Cryptococcosis Study Group. Molecular analysis of 311 *Cryptococcus neoformans* isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe. **FEMS Yeast Research**, v.6, p.614, 2006.

WALSH, T.J. Echinocandins- an advance in the primary treatment of invasive candidiasis. [The New England Journal of Medicine](#), v. 347, p. 2070-2072, 2002.

WILLIAMSON, P. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. [Frontiers in Bioscience](#), v.2, p.99, 1997.

WITT, M.D.; LEWIS, R.J.; LARSEN, R.A.; MILEFCHIK, E.N.; LEAL, M.A.; HAUBRICH, R.H.; RICHIE, J.A.; EDWARDS, J.E.; GHANNOUM, MA. Identification of patients with acute AIDS-associated cryptococcal meningitis who can be effectively treated with fluconazole: the role of antifungal susceptibility testing. **Clinical Infections Disease**.v. 22, p.322-238, 1996.

WU, S.X; GUO, N.R.; LI, X.F.; LIAO, W.Q.; CHEN, M.; ZHANG, Q.Q, et al. Human pathogenic fungi in China-emerging trends from ongoing national survey for 1986, 1996, and 2006. **Mycopathologia**, v. 171, p. 387-393, 2011.

ZARAGOZA, O. ; CHRISMAN, C.J.; CASTELLI, M.V.; FRASES, S.; CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L.; CASADEVALL, A. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. **Cell Microbiology**, v.10, p.2043-2057, 2008.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M.L., et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. [Advances in Applied Microbiology](#), v. 68, p.133-216, 2009.

ZARAGOZA, O.; GARCIA-RODAS, R.; NOSANCHUK, J.D.; CUENCA-ESTRELLA M, RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; et al. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **PLoS Pathogen** , v.6, 2010.

ZHU, X.; WILLIAMSON, P.R. Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, v.5, p.1-10, 2004.

## 8 APÊNDICES

### APÊNDICE A - Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) para os antifúngicos testados em cepas antes e após indução capsular frente ao *Cryptococcus neoformans*(<sub>C</sub>).

CEPAS	ANFO	ANFO <sub>C</sub>	FLUCO	FLUCO <sub>C</sub>	FLUCI	FLUCI <sub>C</sub>
15	0,250	0,500	8,000	8,000	2,000	8,000
20	0,250	0,250	16,000	16,000	2,000	4,000
21	0,250	0,250	8,000	8,000	1,000	4,000
28	0,125	0,125	8,000	8,000	0,500	8,000
33	0,0625	0,250	4,000	16,000	2,000	8,000
35	0,125	0,250	8,000	16,000	2,000	8,000
37	0,125	0,250	4,000	8,000	2,000	8,000
44	0,500	0,500	8,000	8,000	2,000	8,000
57	0,250	0,250	16,000	16,000	4,000	8,000
58	0,250	0,250	16,000	8,000	2,000	8,000
64	0,250	0,500	8,000	8,000	1,000	16,000
92	0,0625	0,500	2,000	4,000	2,000	8,000
107	0,0625	0,125	8,000	8,000	1,000	4,000
109	0,125	0,125	8,000	16,000	4,000	16,000
124	0,125	0,500	8,000	8,000	4,000	16,000
150	0,250	0,500	1,000	8,000	4,000	8,000
159	0,125	0,500	4,000	16,000	4,000	8,000
160	0,125	0,500	8,000	16,000	2,000	4,000
161	0,0625	0,250	4,000	16,000	2,000	16,000
162	0,250	0,500	8,000	8,000	2,000	8,000
163	0,125	0,250	8,000	16,000	2,000	16,000
165	0,0625	0,250	4,000	4,000	1,000	4,000
166	0,250	0,250	8,000	8,000	2,000	8,000
167	0,250	0,500	32,000	16,000	4,000	8,000
168	0,500	0,250	16,000	16,000	4,000	8,000
169	0,125	0,500	32,000	32,000	4,000	8,000
170	0,250	0,250	32,000	16,000	4,000	4,000
171	0,250	0,250	32,000	16,000	4,000	4,000
172	0,125	0,250	32,000	32,000	4,000	4,000
173	0,125	0,250	8,000	8,000	2,000	4,000

ANFO: Anfotericina; FLUCO: Fluconazol; FLUCI: Flucitosina  
c Após indução capsular.

**APÊNDICE B – Atividades combinadas de anfotericina B e fluconazol frente ao *Cryptococcus neoformans* antes da indução capsular (Grupo I).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado			
anfotericina B fluconazol	15	0,250 2,000	0,250 8,000	1, 000 0, 250	1,250	Indiferença
anfotericina B fluconazol	20	0,125 0,500	0,250 16,000	1, 000 0, 031	1,031	Indiferença
anfotericina B fluconazol	21	0,250 0,500	0,250 8,000	0, 500 0, 062	0,562	Indiferença
anfotericina B fluconazol	28	0,015 16,000	0,125 32,000	0, 250 0, 500	0,750	Indiferença
anfotericina B fluconazol	33	0,125 2,000	0,062 4,000	2, 016 0, 500	2,516	Indiferença
anfotericina B fluconazol	35	0,062 0,500	0,125 8,000	0, 500 0, 062	0,562	Indiferença
anfotericina B fluconazol	37	0,250 4,000	0,125 4,000	1, 000 1, 000	2,000	Indiferença
anfotericina B fluconazol	44	0,250 0,500	0,500 8,000	0, 500 0, 062	0,562	Indiferença
anfotericina B fluconazol	57	0,250 0,500	0,250 16,000	1, 000 0, 032	1,031	Indiferença
anfotericina B fluconazol	58	0,250 0,500	0,250 16,000	1, 000 0, 032	1,031	Indiferença
anfotericina B fluconazol	64	0,250 2,000	0,250 8,000	1, 000 0, 250	1,250	Indiferença
anfotericina B fluconazol	92	0,250 0,500	0,062 2,000	2, 016 0, 250	2,266	Indiferença
anfotericina B fluconazol	107	0,0156 8,000	0,062 8,000	0, 504 1, 000	1,504	Indiferença
anfotericina B fluconazol	109	0,125 0,500	0,250 8,000	0, 500 0, 062	0,562	Indiferença
anfotericina B fluconazol	124	0,500 0,125	0,125 8,000	1, 000 0, 062	1,062	Indiferença
anfotericina B fluconazol	150	0,015 8,000	0,250 32,000	0, 125 0, 250	0,375	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	159	0,062 4,000	0,125 4,000	0, 500 1, 000	1,500	Indiferença
anfotericina B fluconazol	160	0,015 8,000	0,125 8,000	0, 250 1, 000	1,250	Indiferença
anfotericina B fluconazol	161	0,015 16,000	0,062 4,000	0, 504 2, 000	2,504	Indiferença
anfotericina B fluconazol	162	0,250 0,500	0,250 8,000	1, 000 0, 062	1,062	Indiferença
anfotericina B fluconazol	163	0,125 0,500	0,125 8,000	1, 000 0, 062	1,062	Indiferença
anfotericina B fluconazol	165	0,0156 8,000	0,062 8,000	0, 504 1, 000	1,504	Indiferença

anfotericina B fluconazol	166	0,250 0,500	0,250 8,000	1, 000 0, 062	1,062	Indiferença
anfotericina B fluconazol	167	0,015 8,000	0,250 32,000	0, 125 0, 250	0,375	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	168	0,015 8,000	0,250 32,000	0, 125 0, 250	0,375	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	169	0,015 16,000	0,125 32,000	0, 250 0, 500	0,750	Indiferença
anfotericina B fluconazol	170	0,0625 0,500	0,250 32,000	0, 250 0, 015	0,256	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	171	0,0625 8,000	0,250 32,000	0, 250 0, 250	0,500	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	172	0,015 16,000	0,125 32,000	0, 250 0, 500	0,750	Indiferença
anfotericina B fluconazol	173	0,015 16,000	0,125 32,000	0, 250 0, 500	0,750	Indiferença

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE C – Atividades combinadas de anfotericina B e flucitosina ao frente ao *Cryptococcus neoformans* antes da indução capsular (grupo I).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado			
anfotericina B flucitosina	15	0,250 0,250	0,250 2,000	1, 000 0, 250	1 ,25	Indiferença
anfotericina B flucitosina	20	0,250 0,250	0,250 2,000	1, 000 0, 250	1 ,25	Indiferença
anfotericina B flucitosina	21	0,250 0,250	0,250 1,000	1, 000 0, 500	1, 500	Indiferença
anfotericina B flucitosina	28	0,125 0,250	0,125 0,500	1, 000 1, 000	2, 000	Indiferença
anfotericina B flucitosina	33	0,125 0,250	0,062 2,000	2, 016 0, 250	2, 266	Indiferença
anfotericina B flucitosina	35	0,500 0,250	0,125 2,000	4, 000 0, 250	4 ,25	Antagonismo
anfotericina B flucitosina	37	0,250 0,250	0,125 2,000	2, 000 0, 250	2 ,25	Indiferença
anfotericina B flucitosina	44	0,250 0,250	0,500 2,000	0, 500 0, 250	0, 750	Indiferença
anfotericina B flucitosina	57	0,250 0,250	0,250 4,000	1, 000 0, 125	1, 125	Indiferença
anfotericina B flucitosina	58	0,250 1,000	0,250 2,000	1, 000 1, 000	2, 000	Indiferença
anfotericina B flucitosina	64	0,250 0,500	0,250 1,000	1, 000 1, 000	2, 000	Indiferença
anfotericina B flucitosina	92	0,125 0,250	0,062 2,000	2, 016 0, 250	2, 266	Indiferença
anfotericina B flucitosina	107	0,015 4,000	0,062 1,000	0, 500 4, 000	4, 500	Antagonismo
anfotericina B flucitosina	109	1,000 0,250	0,250 4,000	1, 000 0, 125	1, 125	Indiferença
anfotericina B flucitosina	124	0,015 4,000	0,125 4,000	0, 250 2, 000	2, 250	Indiferença
anfotericina B flucitosina	150	0,125 0,250	0,250 4,000	0, 500 0, 125	0, 625	Indiferença
anfotericina B flucitosina	159	0,125 0,250	0,125 4,000	1, 000 0, 125	1, 125	Indiferença
anfotericina B flucitosina	160	0,015 2,000	0,125 2,000	0, 250 2, 000	2, 250	Indiferença
anfotericina B flucitosina	161	0,015 2,000	0,062 2,000	0, 504 2, 000	2, 500	Indiferença
anfotericina B flucitosina	162	2,000 0,015	0,250 2,000	0, 125 2, 000	2, 125	Indiferença
anfotericina B flucitosina	163	0,015 2,000	0,125 2,000	0, 250 2, 000	2, 125	Indiferença



anfotericina B flucitosina	165	0,015 1,000	0,062 1,000	0, 504 2, 000	2, 504	Indiferença
anfotericina B flucitosina	166	0,015 1,000	0,250 2,000	0, 125 1, 000	1, 125	Indiferença
anfotericina B flucitosina	167	1,000 0,250	0,250 4,000	1, 000 0, 125	1, 125	Indiferença
anfotericina B flucitosina	168	1,000 0,250	0,250 4,000	1, 000 0, 125	1, 125	Indiferença
anfotericina B flucitosina	169	0,015 4,000	0,125 4,000	0, 250 2, 000	2, 250	Indiferença
anfotericina B flucitosina	170	0,125 0,500	0,250 4,000	0, 500 0, 250	0, 750	Indiferença
anfotericina B flucitosina	171	0,125 0,500	0,250 4,000	0, 500 0, 250	0, 750	Indiferença
anfotericina B flucitosina	172	0,015 4,000	0,125 4,000	0, 250 2, 000	2, 250	Indiferença
anfotericina B flucitosina	173	0,015 4,000	0,125 4,000	0, 250 2, 000	2, 250	Indiferença

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE D – Atividades combinadas de fluconazol e flucitosina frente ao *Cryptococcus neoformans* antes da indução capsular (grupo I).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado			
fluconazol flucitosina	15	0,500 2,000	8,000 2,000	0,062 1,000	1,062	Indiferença
fluconazol flucitosina	20	0,500 2,000	16,000 2,000	0,031 1,000	1,031	Indiferença
fluconazol flucitosina	21	0,500 4,000	8,000 1,000	0,062 4,000	4,062	Antagonismo
fluconazol flucitosina	28	32,000 0,250	8,000 0,500	4,000 0,500	4,500	Antagonismo
fluconazol flucitosina	33	0,500 4,000	4,000 2,000	0,125 2,000	2,125	Indiferença
fluconazol flucitosina	35	0,500 8,000	8,000 2,000	0,062 4,000	4,062	Indiferença
fluconazol flucitosina	37	0,500 8,000	4,000 2,000	0,125 4,000	4,125	Antagonismo
fluconazol flucitosina	44	0,500 2,000	8,000 2,000	0,062 1,000	1,062	Indiferença
fluconazol flucitosina	57	2,000 0,250	16,000 4,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
fluconazol flucitosina	58	2,000 0,250	16,000 2,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
fluconazol flucitosina	64	0,500 4,000	8,000 1,000	0,062 4,000	4,062	Antagonismo
fluconazol flucitosina	92	0,500 4,000	2,000 2,000	0,250 2,000	2,250	Indiferença
fluconazol flucitosina	107	0,500 2,000	8,000 1,000	0,062 2,000	2,062	Indiferença
fluconazol flucitosina	109	0,500 4,000	8,000 4,000	0,062 1,000	1,062	Indiferença
fluconazol flucitosina	124	0,500 4,000	8,000 4,000	0,062 1,000	1,062	Indiferença
fluconazol flucitosina	150	0,500 2,000	1,000 4,000	1,000 1,000	1,000	Indiferença
fluconazol flucitosina	159	0,500 4,000	4,000 4,000	0,125 1,000	1,125	Indiferença
fluconazol flucitosina	160	0,500 2,000	8,000 2,000	0,062 1,000	1,062	Indiferença
fluconazol flucitosina	161	0,500 2,000	4,000 2,000	0,125 1,000	1,125	Indiferença
fluconazol flucitosina	162	0,500 2,000	8,000 2,000	0,062 1,000	1,062	Indiferença
fluconazol flucitosina	163	0,500 8,000	8,000 2,000	0,062 4,000	4,062	Antagonismo
fluconazol flucitosina	165	0,500 2,000	4,000 1,000	0,125 2,000	2,125	Indiferença

fluconazol flucitosina	166	0,500 2,000	8, 000 2, 000	0, 062 1, 000	1, 062	Indiferença
fluconazol flucitosina	167	0,500 4,000	32, 000 4, 000	0, 015 0, 500	0, 515	Indiferença
fluconazol flucitosina	168	2,000 0,250	16, 000 4, 000	0, 125 0, 062	0, 187	Sinergismo
fluconazol flucitosina	169	0,500 4,000	32, 000 4, 000	0, 015 0, 500	0, 515	Indiferença
fluconazol flucitosina	170	0,500 4,000	32, 000 4, 000	0, 015 0, 500	0, 515	Indiferença
fluconazol flucitosina	171	0,500 4,000	32, 000 4, 000	0, 015 0, 500	0, 515	Indiferença
fluconazol flucitosina	172	0,500 4,000	32, 000 4, 000	0, 015 0, 500	0, 515	Indiferença
fluconazol flucitosina	173	0,500 2,000	8, 000 2, 000	0, 062 1, 000	1, 062	Indiferença

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE E – Atividades combinadas de anfotericina B e fluconazol frente ao *Cryptococcus neoformans* após idução capsular (grupo II).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado			
anfotericina B fluconazol	15	0,125 0,500	0,500 8,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B fluconazol	20	0,500 0,500	0,250 16,000	2,000 0,031	2,031	Indiferença
anfotericina B fluconazol	21	0,125 0,500	0,250 8,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B fluconazol	28	0,015 16,000	0,125 8,000	0,250 2,000	2,250	Indiferença
anfotericina B fluconazol	33	0,062 0,500	0,250 16,000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	35	0,062 4,000	0,250 16,000	0,125 0,250	0,375	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	37	0,125 1,000	0,250 8,000	0,500 0,125	0,625	Indiferença
anfotericina B fluconazol	44	0,062 4,000	0,500 8,000	0,125 0,500	0,625	Indiferença
anfotericina B fluconazol	57	0,250 0,500	0,250 16,000	1,000 0,031	1,031	Indiferença
anfotericina B fluconazol	58	0,250 0,500	0,250 8,000	1,000 0,062	1,062	Indiferença
anfotericina B fluconazol	64	0,125 0,500	0,500 8,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B fluconazol	92	0,250 1,000	0,500 4,000	1,000 0,250	1,250	Indiferença
anfotericina B fluconazol	107	0,062 1,000	0,125 8,000	0,500 0,125	0,625	Indiferença
anfotericina B fluconazol	109	0,250 8,000	0,125 16,000	1,000 0,500	1,500	Indiferença
anfotericina B fluconazol	124	0,062 0,500	0,500 8,000	0,125 0,062	0,625	Indiferença
anfotericina B fluconazol	150	0,062 0,500	0,500 8,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	159	0,125 1,000	0,500 16,000	0,250 0,062	0,312	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	160	0,015 16,000	0,500 16,000	0,062 1,000	1,062	Indiferença
anfotericina B fluconazol	161	0,015 16,000	0,250 16,000	0,125 1,000	1,125	Indiferença
anfotericina B fluconazol	162	0,250 0,500	0,500 8,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B fluconazol	163	0,015 8,000	0,250 16,000	0,125 1,000	1,125	Indiferença

anfotericina B fluconazol	165	0,062 1,000	0, 250 4, 000	0, 250 0, 250	0, 500	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	166	0,015 8,000	0,250 8, 000	0, 125 1, 000	1, 125	Indiferença
anfotericina B fluconazol	167	0,250 2,000	0, 500 16, 000	0, 500 0, 125	0, 625	Indiferença
anfotericina B fluconazol	168	0,062 0,500	0, 250 16, 000	0, 250 0, 031	0, 281	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	169	0,125 8,000	0, 500 32, 000	0, 250 0, 250	0, 500	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	170	0,125 1,000	0, 250 16, 000	0, 500 0, 062	0, 562	Indiferença
anfotericina B fluconazol	171	0,015 1,000	0, 250 16, 000	0, 125 0, 062	0, 187	Sinergismo
anfotericina B fluconazol	172	0,015 16,000	0, 250 32, 000	0, 125 0, 500	0, 625	Indiferença
anfotericina B fluconazol	173	0,015 16,000	0, 250 8, 000	0, 125 0, 500	0, 625	Indiferença

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE F – Atividades combinadas de anfotericina B e flucitosina frente ao *Cryptococcus neoformans* após indução capsular (Grupo II).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado			
anfotericina B flucitosina	15	0,062 1,000	0,500 8,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	20	0,125 1,000	0,250 4,000	0,500 0,250	0,750	Indiferença
anfotericina B flucitosina	21	0,062 1,000	0,250 4,000	0,250 0,250	0,500	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	28	0,015 2,000	0,125 8,000	0,250 0,250	0,500	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	33	0,015 0,500	0,250 8,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	35	0,062 1,000	0,250 8,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	37	0,062 0,250	0,250 8,000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	44	0,062 0,250	0,500 8,000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	57	0,125 0,250	0,250 8,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
anfotericina B flucitosina	58	0,125 0,250	0,250 8,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
anfotericina B flucitosina	64	0,062 0,250	0,500 16,000	0,125 0,015	0,140	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	92	0,125 0,250	0,500 8,000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	107	0,062 1,000	0,125 4,000	0,500 0,250	0,750	Indiferença
anfotericina B flucitosina	109	0,015 2,000	0,125 16,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	124	0,015 2,000	0,500 16,000	0,062 0,125	0,187	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	150	0,062 1,000	0,500 8,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	159	0,015 0,500	0,500 8,000	0,062 0,062	0,125	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	160	0,125 0,500	0,500 4,000	0,250 0,062	0,312	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	161	0,062 4,000	0,250 16,000	0,250 0,250	0,500	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	162	0,125 0,250	0,500 8,000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	163	0,062 1,000	0,250 16,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	165	0,062 0,500	0,250 4,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo

anfotericina B flucitosina	166	0,062 0,500	0,250 8,000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	167	0,125 1,000	0,500 8,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	168	0,062 1,000	0,250 8,000	0,250 0,250	0,500	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	169	0,125 0,250	0,500 8,000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	170	0,125 0,500	0,250 4,000	0,500 0,125	0,625	Indiferença
anfotericina B flucitosina	171	0,062 1,000	0,250 4,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	172	0,015 1,000	0,250 4,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B flucitosina	173	0,015 1,000	0,250 4,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE G – Atividades combinadas de fluconazol e flucitosina frente ao *Cryptococcus neoformans* após indução capsular (Grupo II).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado			
flucitosina fluconazol	15	16,000 0,500	8,000 8,000	2,000 0,002	2,002	Indiferença
flucitosina fluconazol	20	4,000 0,500	16,000 4,000	1,000 0,031	1,031	Indiferença
flucitosina fluconazol	21	16,000 0,500	8,000 4,000	2,000 0,031	2,031	Indiferença
flucitosina fluconazol	28	4,000 0,500	8,000 8,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
flucitosina fluconazol	33	16,000 0,500	16,000 8,000	2,000 0,031	2,031	Indiferença
flucitosina fluconazol	35	4,000 0,500	16,000 8,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
flucitosina fluconazol	37	4,000 0,500	8,000 8,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
flucitosina fluconazol	44	4,000 0,500	8,000 8,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
flucitosina fluconazol	57	4,000 0,500	16,000 8,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
flucitosina fluconazol	58	4,000 0,500	8,000 8,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
flucitosina fluconazol	64	16,000 0,500	8,000 16,000	1,000 0,062	1,062	Indiferença
flucitosina fluconazol	92	4,000 0,500	4,000 8,000	0,500 0,125	0,625	Indiferença
flucitosina fluconazol	107	16,000 0,500	8,000 4,000	4,000 0,062	4,062	Indiferença
flucitosina fluconazol	109	4,000 0,500	16,000 16,000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
flucitosina fluconazol	124	16,000 0,500	8,000 16,000	1,000 0,062	1,062	Indiferença
flucitosina fluconazol	150	16,000 0,500	8,000 8,000	2,000 0,062	2,062	Indiferença
flucitosina fluconazol	159	16,000 0,500	16,000 8,000	2,000 0,031	2,031	Indiferença
flucitosina fluconazol	160	8,000 0,500	16,000 4,000	2,000 0,031	2,031	Indiferença
flucitosina fluconazol	161	8,000 0,500	16,000 16,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
flucitosina fluconazol	162	8,000 0,500	8,000 8,000	1,000 0,062	1,062	Indiferença
flucitosina fluconazol	163	8,000 0,500	16,000 16,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença



flucitosina fluconazol	165	8,000 0,500	4,000 4,000	2,000 0,125	2,015	Indiferença
flucitosina fluconazol	166	8,000 0,500	8,000 8,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
flucitosina fluconazol	167	16,000 0,500	16,000 8,000	2,000 0,031	2,031	Indiferença
flucitosina fluconazol	168	8,000 0,500	16,000 8,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
flucitosina fluconazol	169	8,000 16,000	32,000 8,000	1,000 0,500	1,500	Indiferença
flucitosina fluconazol	170	8,000 0,500	16,000 4,000	2,000 0,031	2,031	Indiferença
flucitosina fluconazol	171	8,000 0,500	16,000 4,000	2,000 0,031	2,031	Indiferença
flucitosina fluconazol	172	8,000 16,000	32,000 8,000	1,000 0,500	1,500	Indiferença
flucitosina fluconazol	173	16,000 0,500	8,000 4,000	2,000 0,031	2,031	Indiferença

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE H - Concentração inibitória mínima (µg/ml) para fármacos antibacterianos antes e após indução capsular frente ao *Cryptococcus neoformans*.**

CEPAS	TRIM	LINEZ	MINO	TIG	AZITRO	DAPTO
15	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
20	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
21	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
28	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
33	>4,00:0	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
35	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
37	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
44	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
57	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
58	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
64	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
92	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
107	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
109	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
124	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
150	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
159	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
160	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
161	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
162	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
163	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
165	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
166	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
167	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
168	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
169	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	> 64,000
170	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
171	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
172	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000
173	>4,000	>64,000	>64,000	>128,000	>64,000	>64,000

**APÊNDICE I – Atividades combinadas de anfotericina B e minociclina na frente ao *Cryptococcus neoformans* da indução capsular ( grupo I)**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado*			
anfotericina B minociclina	15	0,015 8,000	0,250 >64,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B minociclina	20	0,015 0,500	0,250 >64,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B minociclina	21	0,015 0,500	0,250 >64,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B minociclina	28	0,015 0,500	0,125 >64,000	0,250 0,003	0,250	Sinergismo
anfotericina B minociclina	33	0,015 0,500	0,062 >64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B minociclina	35	0,015 0,500	0,125 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	37	0,015 1,000	0,125 >64,000	0,250 0,007	0,257	Sinergismo
anfotericina B minociclina	44	0,625 0,500	0,500 >64,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B minociclina	57	0,015 0,500	0,250 >64,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B minociclina	58	0,015 0,500	0,250 >64,000	0,250 0,003	0, 253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	64	0,062 0,500	0,250 >64,000	0,250 0,003	0, 253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	92	0,015 8,000	0,062 >64,000	0,125 0,062	0, 187	Sinergismo
anfotericina B minociclina	107	0,062 0,500	0,0625 >64,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B minociclina	109	0,015 1,000	0,250 >64,000	0,125 0,007	0, 132	Sinergismo
anfotericina B minociclina	124	0,015 4,000	0,125 >64,000	0,250 0,031	0, 281	Sinergismo
anfotericina B minociclina	150	0,125 0,500	0,125 >64,000	0,250 0,003	0, 253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	159	0,125 0,500	0,125 >64,000	0,250 0,003	0, 253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	160	0,015 8,000	0,125 >64,000	0,250 0,062	0, 312	Sinergismo
anfotericina B minociclina	161	0,015 2,000	0,062 >64,000	0,500 0,015	0, 515	Indiferença
anfotericina B minociclina	162	0,015 8,000	0,250 >64,000	0,125 0,062	0, 187	Sinergismo
anfotericina B minociclina	163	0,015 1,000	0,125 >64,000	0,250 0,007	0, 257	Sinergismo

anfotericina B minociclina	165	0,015 2,000	0,0625 >64,000	0,500 0,015	0, 515	Indiferença
anfotericina B minociclina	166	0,015 1,000	0,250 >64,000	0,125 0,007	0, 132	Sinergismo
anfotericina B minociclina	167	0,015 8,000	0,250 >64,000	0,125 0,003	0, 253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	168	0,125 0,500	0,500 >64,000	0,250 0,003	0, 253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	169	0,015 1,000	0,125 >64,000	0,250 0,007	0, 257	Sinergismo
anfotericina B minociclina	170	0,015 8,000	0,125 >64,000	0,125 0,062	0, 187	Sinergismo
anfotericina B minociclina	171	0,015 8,000	0,125 >64,000	0,125 0,062	0, 187	Sinergismo
anfotericina B minociclina	172	0,015 16,000	0,125 >64,000	0,250 0,125	0, 370	Sinergismo
anfotericina B minociclina	173	0,015 16,000	0,125 >64,000	0,250 0,125	0, 370	Sinergismo

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

\* Quando a CIM >64, foi considerado CIM= 128µg/mL para calcular o CIF da minociclina.

**APÊNDICE J – Atividades combinadas de anfotericina B e linezolida contra *Cryptococcus neoformans* antes da indução capsular (grupo I).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado*			
anfotericina B linezolida	15	0,031 16,000	0,250 128,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B linezolida	20	0,125 8,000	0,250 128,000	0,500 0,062	0,560	Indiferença
anfotericina B linezolida	21	0,125 2,000	0,250 128,000	0,500 0,015	0,515	Indiferença
anfotericina B linezolida	28	0,062 2,000	0,125 128,000	0,500 0,015	0,515	Indiferença
anfotericina B linezolida	33	0,062 2,000	0,062 128,000	0,500 0,015	0,515	Indiferença
anfotericina B linezolida	35	0,062 32,000	0,125 128,000	0,500 0,250	0,750	Indiferença
anfotericina B linezolida	37	0,015 8,000	0,125 128,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo
anfotericina B linezolida	44	0,125 0,500	0,500 128,000	0,250 0,003	0, 253	Sinergismo
anfotericina B linezolida	57	0,062 0,500	0,250 128,000	0,250 0,003	0, 253	Sinergismo
anfotericina B linezolida	58	0,062 0,500	0,250 128,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B linezolida	64	0,06 32,000	0,250 128,000	0,250 0,250	0,500	Sinergismo
anfotericina B linezolida	92	0,062 1,000	0,062 128,000	1,008 0,007	1,015	Indiferença
anfotericina B linezolida	107	0,003 32,000	0,062 128,000	0,504 0,125	0,0629	Sinergismo
anfotericina B linezolida	109	0,125 8,000	0,250 128,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B linezolida	124	0, 062 8,000	0,125 128,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B linezolida	150	0, 062 8,000	0,125 128,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B linezolida	159	0,062 32,000	0,125 128,000	0,500 0,250	0,750	Indiferença
anfotericina B linezolida	160	0,062 32,000	0,125 128,000	0,500 0,250	0,750	Indiferença
anfotericina B linezolida	161	0,015 32,000	0,062 128,000	0,504 0,250	0,754	Indiferença
anfotericina B linezolida	162	0,015 64,000	0,250 128,000	1,250 0,500	1,750	Indiferença
anfotericina B linezolida	163	0,015 8,000	0,125 128,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo

anfotericina B linezolida	165	0,015 4,000	0,0625 128,000	0,500 0,0625	0,562	Indiferença
anfotericina B linezolida	166	0,015 8,000	0,250 128,000	0,125 0,0625	0,187	Sinergismo
anfotericina B linezolida	167	0,0156 32,000	0,250 128,000	0,500 0,250	0,750	Indiferença
anfotericina B linezolida	168	0,125 0,500	0,500 128,000	0,250 0,007	0,257	Sinergismo
anfotericina B linezolida	169	0,125 16,000	0,125 128,000	1,000 0,250	1,250	Indiferença
anfotericina B linezolida	170	0,0156 32,000	0,125 128,000	0,250 0,500	0,750	Indiferença
anfotericina B linezolida	171	0,062 32,000	0,125 128,000	0,500 0,500	1,000	Indiferença
anfotericina B linezolida	172	0,0625 8,000	0,125 128,000	0,500 0,125	0,620	Indiferença
anfotericina B linezolida	173	0,0156 8,000	0,125 128,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE K – Atividades combinadas de anfotericina B e tigeciclina contra *Cryptococcus neoformans* antes da indução capsular (grupo I).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado*			
anfotericina B tigeciclina	15	0,015 16,000	0,250 >128,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	20	0,015 16,000	0,250 >128,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	21	0,125 0,031	0,250 >128,000	0,125 0,003	0,156	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	28	0,015 8,000	0,125 >128,000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	33	0,015 16,000	0,062 >128,000	0,500 0,060	0,562	Indiferença
anfotericina B tigeciclina	35	0,015 16,000	0,125 >128,000	0,250 0,060	0,312	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	37	0,015 16,000	0,125 >128,000	0,250 0,006	0,310	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	44	0,015 16,000	0,500 >128,000	0,125 0,060	0,187	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	57	0,015 16,000	0,250 >128,000	0,125 0,060	0,187	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	58	0,015 4,000	0,250 >128,000	0,125 0,015	0,140	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	64	0,062 1,000	0,250 >128,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	92	0,015 8,000	0,062 >128,000	0,504 0,031	0,535	Indiferença
anfotericina B tigeciclina	107	0,015 8,000	0,062 >128,000	0,504 0,031	0,535	Indiferença
anfotericina B tigeciclina	109	0,015 2,000	0,250 >128,000	0,125 0,007	0,132	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	124	0,015 16,000	0,125 >128,000	0,250 0,062	0,312	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	150	0,015 1,000	0,125 >128,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	159	0,015 8,000	0,125 >128,000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	160	0,015 8,000	0,125 >128,000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	161	0,015 8,000	0,062 >128,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
anfotericina B tigeciclina	162	0,015 8,000	0,250 >128,000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	163	0,015 8,000	0,125 >128,000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	165	0,015 1,000	0,0625 >128,000	0,504 0,003	0,507	Indiferença

anfotericina B tigeciclina	166	0,015 16,000	0,250 >128,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	167	0,015 1,000	0,250 >128,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	168	0,062 1,000	0,500 >128,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	169	0,015 4,000	0,125 >128,000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	170	0,015 16,000	0,125 >128,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	171	0,015 2,000	0,125 >128,000	0,125 0,007	0,132	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	172	0,015 32,000	0,125 >128,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	173	0,015 32,000	0,125 >128,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

\* Quando a CIM >128, foi considerado CIM= 256µg/mL para calcular o CIF da tigeciclina.



**APÊNDICE L – Atividades combinadas de anfotericina B e daptomicina contra *Cryptococcus neoformans* antes da indução capsular (grupo I).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado*			
anfotericina B daptomicina	15	0,125 2,000	0,250 >64,000	0,500 0,015	0,515	Indiferença
anfotericina B daptomicina	20	0,125 8,000	0,250 >64,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B daptomicina	21	0,062 32,000	0,250 >64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	28	0,125 32,000	0,125 >64,000	1,000 0,250	1,250	Indiferença
anfotericina B daptomicina	33	0,125 64,000	0,062 >64,000	1,008 0,500	1,508	Indiferença
anfotericina B daptomicina	35	0,125 2,000	0,125 >64,000	1,000 0,015	1,015	Indiferença
anfotericina B daptomicina	37	0,0625 4,000	0,125 >64,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
anfotericina B daptomicina	44	0,0625 8,000	0,500 >64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	57	0,125 1,000	0,250 >64,000	0,500 0,005	0,507	Indiferença
anfotericina B daptomicina	58	0,015 2,000	0,250 >64,000	0,125 0,015	0,140	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	64	0,125 8,000	0,250 >64,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B daptomicina	92	0,015 32,000	0,062 >64,000	0,504 0,250	0,754	Indiferença
anfotericina B daptomicina	107	0,062 8,000	0,062 >64,000	1,008 0,062	1,070	Indiferença
anfotericina B daptomicina	109	0,125 2,000	0,250 >64,000	0,500 0,015	0,515	Indiferença
anfotericina B daptomicina	124	0,125 1,000	0,125 >64,000	1,000 0,007	1,007	Indiferença
anfotericina B daptomicina	150	0,0625 8,000	0,125 >64,000	0,5 0,0625	0,562	Indiferença
anfotericina B daptomicina	159	0,0625 8,000	0,125 >64,000	0,5 0,0625	0,562	Indiferença
anfotericina B daptomicina	160	0,125 4,000	0,125 >64,000	1,000 0,031	1,031	Indiferença
anfotericina B daptomicina	161	0,062 0,500	0,062 >64,000	1,008 0,003	1,011	Indiferença
anfotericina B daptomicina	162	0,062 8,000	0,250 >64,000	0,250 0,062	0,312	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	163	0,062 32,000	0,125 >64,000	0,500 0,250	0,750	Indiferença
anfotericina B daptomicina	165	0,062 32,000	0,0625 >64,000	1,00 0,015	1,015	Indiferença

anfotericina B daptomicina	166	0,062 8,000	0,250 >64,000	0,250 0,0625	0,312	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	167	0,125 2,000	0,250 >64,000	0,500 0,015	0,515	Indiferença
anfotericina B daptomicina	168	0,125 2,000	0,500 >64,000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	169	0,125 0,500	0,125 >64,000	1,000 0,003	1,003	Indiferença
anfotericina B daptomicina	170	0,062 4,000	0,125 >64,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
anfotericina B daptomicina	171	0,125 2,000	0,125 >64,000	1,000 0,015	1,015	Indiferença
anfotericina B daptomicina	172	0,125 1,000	0,125 >64,000	1,000 0,007	1,007	Indiferença
anfotericina B daptomicina	173	0,062 32,000	0,125 >64,000	0,500 0,250	0,750	Indiferença

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE M- Atividades combinadas de anfotericina B e trimetropim frente ao *Cryptococcus neoformans* antes da indução capsular (grupo I).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado*			
anfotericina B trimetropim	15	0,125 0,015	0,250 4,000	0,500 0,007	0,507	Indiferença
anfotericina B trimetropim	20	0,125 0,0625	0,250 4,000	0,500 0,015	0,515	Indiferença
anfotericina B trimetropim	21	0,125 0,015	0,250 4,000	0,500 0,007	0,507	Indiferença
anfotericina B trimetropim	28	0,062 0,015	0,125 4,000	0,500 0,007	0,507	Indiferença
anfotericina B trimetropim	33	0,125 0,0625	0,062 4,000	2,016 0,015	2,031	Indiferença
anfotericina B trimetropim	35	0,062 0,062	0,125 4,000	0,500 0,015	0,515	Indiferença
anfotericina B trimetropim	37	0,062 0,015	0,125 4,000	0,500 0,007	0,507	Indiferença
anfotericina B trimetropim	44	0,062 0,015	0,500 4,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	57	0,125 0,250	0,250 4,000	0,250 0,062	0,312	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	58	0,125 0,250	0,250 4,000	0,250 0,062	0,312	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	64	0,125 0,015	0,250 4,000	0,500 0,007	0,507	Indiferença
anfotericina B trimetropim	92	0,125 0,015	0,062 4,000	2,016 0,007	2,023	Indiferença
anfotericina B trimetropim	107	0,125 0,0625	0,062 4,000	2,016 0,031	2,047	Indiferença
anfotericina B trimetropim	109	0,0625 0,0625	0,250 4,000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	124	0,125 0,125	0,125 4,000	1,000 0,031	1,031	Indiferença
anfotericina B trimetropim	150	0,062 0,015	0,125 4,000	0,500 0,007	0,507	Indiferença
anfotericina B trimetropim	159	0,250 0,062	0,125 4,000	1,000 0,015	1,015	Indiferença
anfotericina B trimetropim	160	0,062 0,500	0,125 4,000	0,500 0,125	0,625	Indiferença
anfotericina B trimetropim	161	0,062 0,007	0,062 4,000	1,008 0,007	1,015	Indiferença
anfotericina B trimetropim	162	0,125 0,015	0,250 4,000	0,500 0,007	0,507	Indiferença
anfotericina B trimetropim	163	0,500 0,062	0,125 4,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B trimetropim	165	0,062 0,015	0,0625 4,000	1,008 0,007	1,015	Indiferença

anfotericina B trimetropim	166	0,125 0,015	0,250 4,000	0,500 0,007	0,507	Indiferença
anfotericina B trimetropim	167	0,125 0,0625	0,250 4,000	0,500 0,015	0,515	Indiferença
anfotericina B trimetropim	168	0,125 0,015	0,250 4,000	0,500 0,007	0,507	Indiferença
anfotericina B trimetropim	169	0,125 0,062	0,125 4,000	1,000 0,015	1,015	Indiferença
anfotericina B trimetropim	170	0,125 0,125	0,125 4,000	1,000 0,031	1,031	Indiferença
anfotericina B trimetropim	171	0,062 0,062	0,125 4,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
anfotericina B trimetropim	172	0,062 0,015	0,125 4,000	0,500 0,007	0,507	Indiferença
anfotericina B trimetropim	173	0,062 0,015	0,125 4,000	0,500 0,007	0,507	Indiferença

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado. *b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE N – Atividades combinadas de anfotericina B e azitromicina frente ao *Cryptococcus neoformans* antes da indução capsular (Grupo I)**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado*			
anfotericina B azitromicina	15	0,062 0,500	0,250 > 64,000	0,250 0,003	0, 253	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	20	0,125 0,500	0,250 > 64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	21	0,125 0,500	0,250 > 64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	28	0,062 0,500	0,125 > 64,000	0,25 0,003	0,255	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	33	0,031 2,000	0,062 > 64,000	0,504 0,001	0,519	Indiferença
anfotericina B azitromicina	35	0,062 0,500	0,125 > 64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	37	0,062 0,500	0,125 > 64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	44	0,125 0,500	0,500 > 64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	57	0,062 0,500	0,250 > 64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	58	0,125 0,500	0,250 > 64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	64	0,125 0,500	0,250 > 64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	92	0,062 1,000	0,062 > 64,000	0,504 0,007	0,512	Indiferença
anfotericina B azitromicina	107	0,062 4,000	0,062 > 64,000	0,504 0,031	0,530	Indiferença
anfotericina B azitromicina	109	0,062 0,500	0,250 > 64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	124	0,062 0,500	0,125 > 64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	150	0,062 0,500	0,125 >64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	159	2,000 0,032	0,125 > 64,000	0,250 0,015	0, 265	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	160	0,062 0,500	0,125 > 64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	161	0,062 1,000	0,062 > 64,000	0,504 0,007	0,512	Indiferença
anfotericina B azitromicina	162	0,125 0,500	0,250 > 64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	163	0,032 16,000	0,125 > 64,000	0, 250 0,125	0,375	Sinergismo

anfotericina B azitromicina	165	0,062 4,000	0,062 > 64,000	0,504 0,031	0,530	Indiferença
anfotericina B azitromicina	166	0,062 1,000	0,250 > 64,000	0,125 0,007	0,132	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	167	0,062 1,000	0,250 > 64,000	0,125 0,007	0,132	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	168	0,125 0,500	0,500 > 64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	169	0,125 2,000	0,125 > 64,000	1,000 0,015	1,015	Indiferença
anfotericina B azitromicina	170	0,031 2,000	0,125 > 64,000	0,250 0,015	0,256	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	171	0,125 2,000	0,125 > 64,000	1,000 0,015	1,015	Indiferença
anfotericina B azitromicina	172	0,031 1,000	0,125 > 64,000	0,250 0,007	0,257	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	173	0,031 1,000	0,125 > 64,000	0,250 0,007	0,257	Sinergismo

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE O-Atividades combinadas de anfotericina B e minociclina frente ao *Cryptococcus neoformans* após indução capsular (Grupo II).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado			
anfotericina B minociclina	15	0,125 2,00	0,500 >64,000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo
anfotericina B minociclina	20	0,250 0,500	0,250 >64,000	1,000 0,003	1,003	Indiferença
anfotericina B minociclina	21	0,062 0,500	0,250 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	28	0,125 0,500	0,125 >64,000	1,000 0,003	1,003	Indiferença
anfotericina B minociclina	33	0,062 8,000	0,250 >64,000	0,250 0,006	0,312	Sinergismo
anfotericina B minociclina	35	0,125 0,500	0,250 >64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B minociclina	37	0,125 0,500	0,250 >64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B minociclina	44	0,062 0,500	0,500 >64,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B minociclina	57	0,062 0,500	0,250 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	58	0,062 0,500	0,250 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	64	0,125 0,500	0,500 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	92	0,062 0,500	0,500 >64,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B minociclina	107	0,125 0,500	0,125 >64,000	1,000 0,003	1,003	Indiferença
anfotericina B minociclina	109	0,125 2,000	0,125 >64,000	1,000 0,015	1,015	Indiferença
anfotericina B minociclina	124	0,125 0,500	0,500 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	150	0,015 8,000	0,500 >64,000	0,062 0,062	0,125	Sinergismo
anfotericina B minociclina	159	0,062 0,500	0,500 >64,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B minociclina	160	0,125 0,500	0,500 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	161	0,125 0,500	0,250 >64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B minociclina	162	0,062 0,500	0,500 >64,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B minociclina	163	0,125 0,500	0,250 >64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo

anfotericina B minociclina	165	0,062 0,500	0,250 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	166	0,015 32,000	0,250 >64,000	0,125 0,250	0,375	Sinergismo
anfotericina B minociclina	167	0,125 0,500	0,500 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	168	0,062 2,000	0,250 >64,000	0,500 0,003	0,265	Sinergismo
anfotericina B minociclina	169	0,015 8,000	0,500 >64,000	0,062 0,125	0,187	Sinergismo
anfotericina B minociclina	170	0,062 0,500	0,250 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B minociclina	171	0,125 0,500	0,250 >64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B minociclina	172	0,015 64,000	0,250 >64,000	0,125 0,250	0,375	Sinergismo
anfotericina B minociclina	173	0,125 0,500	0,250 >64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.



**APÊNDICE P – Atividades combinadas de anfotericina B e linezolida frente ao *Cryptococcus neoformans* após indução capsular (grupo II).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado			
anfotericina B linezolida	15	0,062 2,000	0, 500 >64, 000	0,125 0,025	0,140	Sinergismo
anfotericina B linezolida	20	0,062 4,000	0,250 >64, 000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
anfotericina B linezolida	21	0,015 16,000	0,250 >64, 000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B linezolida	28	0,125 0,500	0, 125 >64,000	1,000 0,003	1,003	Indiferença
anfotericina B linezolida	33	0,062 0,500	0, 250 >64, 000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B linezolida	35	0,062 2,000	0, 250 >64, 000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo
anfotericina B linezolida	37	0,015 4,000	0, 250 >64, 000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo
anfotericina B linezolida	44	0,015 4,000	0, 500 >64, 000	0,062 0,031	0,093	Sinergismo
anfotericina B linezolida	57	0,062 0,500	0, 250 >64, 000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B linezolida	58	0,062 2,000	0, 250 >64, 000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo
anfotericina B linezolida	64	0,250 0,500	0, 500 >64, 000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B linezolida	92	0,062 0,500	0,500 >64,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B linezolida	107	0,062 0,500	0,125 >64, 000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B linezolida	109	0,125 8,000	0, 125 >64, 000	1,000 0,062	1,062	Indiferença
anfotericina B linezolida	124	0,125 2,000	0,500 >64, 000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo
anfotericina B linezolida	150	0,125 2,000	0,500 >64, 000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo
anfotericina B linezolida	159	0,015 16,000	0,500 >64, 000	0,062 0,125	0,187	Sinergismo
anfotericina B linezolida	160	0,062 16,000	0,500 >64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B linezolida	161	0,015 4,000	0,250 >64, 000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo
anfotericina B linezolida	162	0,015 8,000	0,500 >64, 000	0,062 0,062	0,125	Sinergismo
anfotericina B linezolida	163	0,062 2,000	0, 250 >64,000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo

anfotericina B linezolida	165	0,062 2,000	0,250 >64,000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo
anfotericina B linezolida	166	0,062 0,500	0,250 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B linezolida	167	0,125 2,000	0,500 >64,000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo
anfotericina B linezolida	168	0,015 4,000	0,250 >64,000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo
anfotericina B linezolida	169	0,062 0,500	0,500 >64,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B linezolida	170	0,015 2,000	0,250 >64,000	0,125 0,015	0,140	Sinergismo
anfotericina B linezolida	171	0,125 2,000	0,250 >64,000	0,500 0,015	0,515	Indiferença
anfotericina B linezolida	172	0,125 8,000	0,250 >64,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B linezolida	173	0,125 0,500	0,250 >64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE Q – Atividades combinadas de anfotericina B e tigeciclina frente ao *Cryptococcus neoformans* após indução capsular (Grupo II).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado			
anfotericina B tigeciclina	15	0,015 8,000	0, 500 >128,000	0,062 0,031	0,093	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	20	0,015 32,000	0,250 >128,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	21	0,015 8,000	0,250 >128,000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	28	0,015 64,000	0, 125 >128,000	0,250 0,250	0,500	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	33	0,015 8,000	0, 250 >128,000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	35	0,015 8,000	0, 250 >128,000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	37	0,015 2,000	0, 250 >128,000	0,125 0,007	0,132	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	44	0,015 4,000	0, 500 >128,000	0,062 0,015	0,078	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	57	0,015 4,000	0, 250 >128,000	0,125 0,015	0,140	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	58	0,015 8,000	0, 250 >128,000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	64	0,062 16,000	0, 500 >128,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	92	0,015 8,000	0,500 >128,000	0,062 0,031	0,093	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	107	0,015 16,000	0,125 >128,000	0,250 0,062	0,312	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	109	0,125 4,000	0, 125 >128,000	1,000 0,015	1,015	Indiferença
anfotericina B tigeciclina	124	0,062 1,000	0,500 >128,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	150	0,062 1,000	0,500 >128,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	159	0,062 2,000	0,500 >128,000	0, 062 0,007	0,070	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	160	0,015 8,000	0,500 >128,000	0,062 0,031	0,093	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	161	0,015 2,000	0,250 >128,000	0,125 0,007	0,132	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	162	0,015 8,000	0,500 >128,000	0, 062 0,031	0,093	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	163	0,015 8,000	0, 250 >128,000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo

anfotericina B tigeciclina	165	0,015 16,000	0,250 >128,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	166	0,015 8,000	0,250 >128,000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	167	0,062 1,000	0,500 >128,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	168	0,015 2,000	0,250 >128,000	0,125 0,007	0,132	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	169	0,062 1,000	0,500 >128,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	170	0,015 4,000	0,250 >128,000	0,125 0,015	0,140	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	171	0,015 8,000	0,250 >128,000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	172	0,015 16,000	0,250 >128,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B tigeciclina	173	0,015 16,000	0,250 >128,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE R – Atividades combinadas de anfotericina B e daptomicina frente ao *Cryptococcus neoformans* após indução capsular.**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado			
anfotericina B daptomicina	15	0,250 4,000	0,500 >64,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
anfotericina B daptomicina	20	0,062 0,500	0,250 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	21	0,015 4,000	0,250 >64,000	0,125 0,031	0,156	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	28	0,125 1,000	0,125 >64,000	1,000 0,003	1,003	Indiferença
anfotericina B daptomicina	33	0,125 2,000	0,250 >64,000	1,000 0,015	1,015	Indiferença
anfotericina B daptomicina	35	0,125 1,000	0,250 >64,000	1,000 0,007	1,007	Indiferença
anfotericina B daptomicina	37	0,062 1,000	0,250 >64,000	0,250 0,007	0,257	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	44	0,125 16,000	0,500 >64,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	57	0,125 8,000	0,250 >64,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B daptomicina	58	0,015 32,000	0,250 >64,000	0,125 0,250	0,375	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	64	0,500 1,000	0,500 >64,000	2,000 0,007	2,007	Indiferença
anfotericina B daptomicina	92	0,250 32,000	0,500 >64,000	0,500 0,250	0,750	Indiferença
anfotericina B daptomicina	107	0,015 32,000	0,125 >64,000	0,500 0,250	0,750	Indiferença
anfotericina B daptomicina	109	0,125 0,500	0,125 >64,000	1,000 0,003	1,003	Indiferença
anfotericina B daptomicina	124	0,250 16,000	0,500 >64,000	0,500 0,125	0,625	Indiferença
anfotericina B daptomicina	150	0,125 0,500	0,500 >64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	159	0,015 4,000	0,500 >64,000	0,062 0,031	0,093	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	160	0,500 0,500	0,500 >64,000	1,000 0,003	1,003	Indiferença
anfotericina B daptomicina	161	0,250 0,500	0,250 >64,000	1,000 0,003	1,003	Indiferença
anfotericina B daptomicina	162	0,125 16,000	0,500 >64,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	163	1,000 16,000	0,250 >64,000	4,000 0,125	4,125	Antagonismo

anfotericina B daptomicina	165	0,500 0,500	0,250 >64,000	2,000 0,003	2,003	Indiferença
anfotericina B daptomicina	166	0,125 4,000	0,250 >64,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
anfotericina B daptomicina	167	0,125 16,000	0,500 >64,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	168	0,015 16,000	0,250 >64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	169	0,062 16,000	0,500 >64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	170	0,062 16,000	0,250 >64,000	0,250 0,125	0,375	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	171	0,015 32,000	0,250 >64,000	0,125 0,250	0,375	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	172	0,125 0,500	0,250 >64,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B daptomicina	173	0,015 16,000	0,250 >64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.

**APÊNDICE S – Atividades combinadas de anfotericina B e trimetropim frente ao *Cryptococcus neoformans* após indução capsular (Grupo II).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado			
anfotericina B trimetropim	15	0,500 0,015	0,500 >4,000	1,000 0,003	1,003	Indiferença
anfotericina B trimetropim	20	0,125 0,062	0,250 >4,000	0,500 0,007	0,507	Indiferença
anfotericina B trimetropim	21	0,015 0,500	0,250 >4,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	28	0,250 0,062	0,125 >4,000	2,000 0,007	2,007	Indiferença
anfotericina B trimetropim	33	0,062 0,015	0,250 >4,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	35	0,125 0,125	0,250 >4,000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	37	0,125 0,062	0,250 >4,000	0,250 0,007	0,257	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	44	0,125 0,125	0,500 >4,000	0,125 0,015	0,140	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	57	0,062 0,125	0,250 >4,000	0,250 0,015	0,265	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	58	0,125 0,015	0,250 >4,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	64	0,250 0,125	0,500 >4,000	0,500 0,015	0,515	Indiferença
anfotericina B trimetropim	92	0,062 0,015	0,500 >4,000	0,125 0,003	0,128	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	107	0,500 0,015	0,125 >4,000	4,000 0,003	4,003	Indiferença
anfotericina B trimetropim	109	0,250 0,062	0,125 >4,000	2,000 0,007	2,007	Indiferença
anfotericina B trimetropim	124	0,250 0,015	0,500 >4,000	0,500 0,003	0,503	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	150	0,015 1,000	0,500 >4,000	0,062 0,250	0,312	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	159	0,125 0,250	0,500 >4,000	0,250 0,031	0,281	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	160	0,250 0,500	0,500 >4,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B trimetropim	161	0,125 0,125	0,250 >4,000	0,500 0,015	0,515	Indiferença
anfotericina B trimetropim	162	0,250 0,500	0,500 >4,000	0,500 0,062	0,562	Indiferença
anfotericina B trimetropim	163	0,062 1,000	0,250 >4,000	0,250 0,125	0,375	Indiferença

anfotericina B trimetropim	165	0,015 0,062	0,250 >4,000	0,125 0,007	0,132	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	166	0,250 0,015	0,250 >4,000	1,000 0,003	0,1003	Indiferença
anfotericina B trimetropim	167	0,015 0,062	0,500 >4,000	0,062 0,007	0,070	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	168	0,250 0,250	0,250 >4,000	1,000 0,031	1,031	Indiferença
anfotericina B trimetropim	169	0,500 0,500	0,500 >4,000	1,000 0,062	1,062	Indiferença
anfotericina B trimetropim	170	0,062 2,000	0,250 >4,000	0,250 0,250	0,500	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	171	0,062 2,000	0,250 >4,000	0,250 0,250	0,500	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	172	0,015 1,000	0,250 >4,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B trimetropim	173	0,015 1,000	0,250 >4,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.



**APÊNDICE T – Atividades combinadas de anfotericina B e azitromicina frente ao *Cryptococcus neoformans* após indução capsular (Grupo II).**

Fármacos	Cepa	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cada fármaco		CIF ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sub>a</sub>	ICIF <sub>b</sub>	Resultado
		Na combinação	Isolado*			
anfotericina B azitromicina	15	0,015 8,000	0,250 > 64,000	0,062 0,062	0,125	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	20	0,015 8,000	0,250 > 64,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	21	0,015 32,000	0,250 > 64,000	0,125 0,250	0,375	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	28	0,015 32,000	0,125 > 64,000	0,250 0,250	0,500	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	33	0,015 16,000	0,062 > 64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	35	0,015 32,000	0,125 > 64,000	0,125 0,250	0,375	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	37	0,062 32,000	0,125 > 64,000	0,250 0,250	0,500	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	44	0,125 32,000	0,500 > 64,000	0,250 0,250	0,500	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	57	0,015 32,000	0,250 > 64,000	0,125 0,250	0,375	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	58	0,250 4,000	0,250 > 64,000	1,000 0,031	1,031	Indiferença
anfotericina B azitromicina	64	0,250 4,000	0,250 > 64,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
anfotericina B azitromicina	92	0,250 4,000	0,062 > 64,000	0,500 0,031	0,531	Indiferença
anfotericina B azitromicina	107	0,250 4,000	0,062 > 64,000	2,000 0,031	2,031	Indiferença
anfotericina B azitromicina	109	0,015 32,000	0,250 > 64,000	0,250 0,250	0,500	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	124	0,015 32,000	0,125 > 64,000	0,062 0,250	0,312	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	150	0,015 32,000	0,125 > 64,000	0,062 0,250	0,312	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	159	0,062 16,000	0,125 > 64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	160	0,062 0,500	0,125 > 64,000	0,250 0,003	0,253	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	161	0,015 8,000	0,062 > 64,000	0,125 0,062	0,187	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	162	0,015 16,000	0,250 > 64,000	0,062 0,062	0,125	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	163	0,015 32,000	0,125 > 64,000	0,125 0,250	0,375	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	165	0,015 16,000	0,062 > 64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo

anfotericina B azitromicina	166	0,015 32,000	0,250 > 64,000	0,125 0,250	0,375	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	167	0,015 16,000	0,250 > 64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	168	0,015 16,000	0,500 > 64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	169	0,015 16,000	0,125 > 64,000	0,062 0,250	0,312	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	170	0,015 16,000	0,125 > 64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	171	0,015 16,000	0,125 > 64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo
anfotericina B azitromicina	172	0,125 16,000	0,125 > 64,000	0,250 0,500	0,750	Indiferença
anfotericina B azitromicina	173	0,015 16,000	0,125 > 64,000	0,125 0,125	0,250	Sinergismo

*a* Divisão da CIM do fármaco na combinação pela CIM do fármaco isolado.

*b* ICIF é a soma das CIFs dos fármacos em combinação.