

ERIKES GONÇALVES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA CRIPTOCOCOSE EXPERIMENTAL SISTÊMICA EM
CAMUNDONGOS BALB/c E TERAPÊUTICA COM ANFOTERICINA B,
FLUCONAZOL E ASSOCIAÇÃO.**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Ciências .

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudete
Rodrigues Paula

São Paulo

2007

RESUMO

SILVA, E.G. Avaliação da criptococose experimental sistêmica em camundongos BALB/c e terapêutica com anfotericina B, fluconazol e associação. 2007. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2007.**

A criptococose clínica foi observada por volta do primeiro dia da inoculação e a sobrevivência dos animais 15 dias após-inoculação (PI). Isolamos *C. neoformans* no cérebro a partir do 5º dia (PI) e no pulmão a partir 11º dia (PI). No 1º dia (PI) observamos por meio do tecido cerebral que já havia um quadro inicial de infecção, presença de edema, que evoluiu durante todo o período. *C. neoformans* foi visualizado primeiramente nos vasos capilares, o que nos leva a sugerir que seja esta rota importante para a entrada da levedura no órgão. A meningite aguda aconteceu por volta do 7º dia quando visualizamos o microrganismo na meninge e com um discreto infiltrado inflamatório. A partir do 13º dia a doença evoluiu para crônica permanecendo até o óbito dos animais. A monoterapia com anfotericina B (AMB) reduziu a sobrevivência dos animais, enquanto que, o tratamento isolado com fluconazol (FLC) prolongou a mesma. A associação AMB-FLC foi eficaz, quando iniciamos o tratamento 24 horas (PI), enquanto que, o mesmo tratamento iniciado a partir do 7º dia quando já tínhamos um quadro compatível de meningite aguda não foi satisfatório. É importante ressaltar que os resultados descritos foram referentes à inoculação com isolado sensível *in vitro* ao fluconazol, enquanto que, o tratamento não resultou em êxito quando empregamos isolado resistente *in vitro* ao fluconazol.

Palavras-chave: Criptococose experimental. Associação terapêutica. Anfotericina B. Fluconazol. *Cryptococcus neoformans*. Monoterapia.

ABSTRACT

SILVA, E.G. Evaluation of experimental systemic cryptococcosis in BALB/c mice, and its treatment with amphotericin B and fluconazole, alone and in association. 2007. 100 f. Master thesis (Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, (2007).**

Clinical cryptococcosis was observed on day 1 postinoculation (PI), and the animals survived until day 15 PI. *C. neoformans* was isolated from brain tissue starting on day 5 PI, and from lung tissue starting on day 11 PI. On day 1 PI, signs of infection were already observed in brain tissue, with presence of edema, which evolved throughout the period. *C. neoformans* was first seen in the capillaries, suggesting that this is an important route for the entrance of the yeast into this organ. Acute meningitis occurred around day 7 PI, when the microorganism was observed in the meninges, along with a discrete inflammatory infiltrate. From day 13 PI onward the disease became chronic, persisting until the death of the animals. Treatment with amphotericin B (AMB) alone shortened the animals' survival, while treatment with fluconazole (FLC) alone lengthened it. Treatment with the two drugs in association was effective when treatment was begun at 24 hours PI, however, when treatment was begun at day 7 PI, already with signs of acute meningitis, the effectiveness was unsatisfactory. It is important to emphasize that these results relate to inoculation with an isolate susceptible in vitro to fluconazole, while the treatment was not effective for an isolate resistant in vitro to fluconazole.

Key words: Experimental cryptococcosis. Therapeutic association. Amphotericin B. Fluconazole. *Cryptococcus neoformans*. Monotherapy.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans variedade *neoformans* é uma levedura patogênica oportunista encontrada em ocos de árvores (REIMÃO *et al.*, 2007) e excretas de pombos e outros pássaros (MONTENEGRO e PAULA, 2000; LACAZ *et al.*, 2002; LITVINTSEVA *et al.*, 2005; CHEE e LEE, 2005; BARONI *et al.*, 2006; CAFARCHIA *et al.*, 2006).

Estas excretas constituem fator importante na transmissão de *C. neoformans* em área urbana (SOARES *et al.*, 2005), bem como em zona rural (DELGADO *et al.*, 2005).

É o agente etiológico da criptococose, que atinge pacientes imunodeprimidos (HIV-positivos) e imunossuprimidos por terapias ou outras doenças (CASADEVALL e PERFECT, 1998), apresentando um tropismo pelo sistema nervoso central que é fator determinante do óbito em infecção experimental (CASADEVALL e PERFECT, 1998; SILVA *et al.*, 2006).

Duas variedades são conhecidas: var. *gattii* (sorotipos B e C) e var. *neoformans* (sorotipos A, D e AD), sendo que FRANZOT *et al.*, 1999, propôs subdividir a variedade *neoformans* em, var. *neoformans* (sorotipo D) e var. *grubii* (sorotipo A). No Brasil, o sorotipo A, *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, é o mais prevalente (CASALI *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Estudo em diferentes locais de Seul na Coreia com amostras isoladas de excretas de pombos revelou que todas as amostras pertenciam ao sorotipo A (CHEE e LEE, 2005). Na Colômbia pesquisas realizadas com amostras isoladas de excretas de pombos revelaram que 31% pertenciam ao sorotipo A (QUINTERO *et al.*, 2005). Na Espanha o sorotipo prevalente de isolados ambientais é o D e o AD, enquanto

que, em isolados clínicos o sorotipo A é o mais freqüente (BARÓ *et al.*, 1999).

Pesquisas realizadas com amostras isoladas de pacientes de 40 localidades de Nova Iorque mostraram que, 85% dos isolados pertenciam ao sorotipo D, indicando uma significativa diferença quando comparados com estudos anteriores, que demonstravam a prevalência do sorotipo A em outros isolados norte americanos. (STEENBERGEN e CASADEVALL, 2000).

1.2 CRIPTOCOCOSE

É uma micose sistêmica subaguda ou crônica, de natureza cosmopolita, responsável por uma alta taxa de mortalidade e morbidade especialmente em pacientes com AIDS (FERNANDES *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2006); é considerada a quarta infecção mais comum em indivíduos imunocompromissados (KOVACS *et al.*, 1985) podendo ser fatal quando não tratada (CASADEVAL e PERFECT, 1998).

A maioria das infecções por *C. neoformans* são causadas pelo sorotipo A (CASADEVALL e PERFECT, 1998; CASALI *et al.*, 2003). Na América Latina, pesquisa com isolados de pacientes com AIDS revelou que 96,8% pertenciam ao sorotipo A (CALVO *et al.*, 2001). A prevalência do sorotipo A em isolados clínicos de pacientes com criptococose pode ser devido à elevada temperatura corpórea causada pela febre (MARTINEZ *et al.*, 2001).

Cryptococcus neoformans pode ser disseminado pelo ar e infectar humanos, usando como porta de entrada as vias respiratórias, alojando-se primariamente nos pulmões (BUCHANAN e MURPHY, 1998; LACAZ *et al.*, 2002). Há evidências consideráveis que ocorre uma fase de latência da levedura após a

sua inalação (GARCIA-HERMOSO *et al.*, 1999). A doença se desenvolve como resultado da disseminação hematogênica da levedura indo do pulmão para o cérebro (CHANG *et al.*, 2004a). Para causar a meningoencefalite as células do fungo tem que sobreviver na circulação sanguínea e atravessar a barreira hematoencefálica (BBB) (RUBIN, 1999), provavelmente alcançando o sistema nervoso central pelo endotélio microvascular do cérebro (KIM, 2003).

A patogenicidade de *C. neoformans* varia entre os isolados e ainda não é completamente explicada (PAL, 2005).

A doença deve ser considerada realizando-se diagnóstico diferencial das infecções oportunistas nos indivíduos imunodeprimidos, sendo fundamental o diagnóstico precoce para reduzir a morbidade e mortalidade desta micose que na maioria dos casos se apresenta na forma de meningoencefalite (FILIU *et al.*, 2002; PAPPALARDO e MELHEM, 2003) podendo ser considerado como marcador de sentinela na infecção pelo HIV (LEITE *et al.*, 2004; LIZARAZO *et al.*, 2007; AKCAGLAR *et al.*, 2007). Estima-se que de 25 a 30% de pacientes com AIDS morrerão em consequência da doença (ROBINSON *et al.*, 1999; FORD, 2000; PITISUTTITHUM *et al.*, 2001).

A incidência da infecção por *Cryptococcus neoformans* tem aumentado muito desde a década de 70, sendo que nos anos 90, em consequência da epidemia de AIDS, a criptococose tem aumentado de modo significativo (MITCHELL e PERFECT, 1995; CASADEVALL e PERFECT, 1998). A infecção pelo vírus HIV continua sendo um importante fator para o desenvolvimento da criptococose no sistema nervoso central (LAKSHMI *et al.*, 2007).

1.3 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIFUNGICOS

A avaliação da suscetibilidade de *C. neoformans* aos antifúngicos é de grande interesse considerando a alta frequência e as severas manifestações clínicas da infecção por esta levedura (BARCHIESI *et al.*, 1995).

Os testes de susceptibilidade antifúngica para leveduras ainda requerem mais estudos, devido às divergências quanto ao uso de drogas, a diversidade dos organismos e as metodologias específicas. Existem alguns métodos, como os que empregam discos de papel de filtro impregnados em solução do antifúngico; os métodos de macrodiluição e microdiluição em caldo proposto pelo NCCLS (“National Committee for Clinical Laboratory Standards”), atualmente denominado “CLSI”, (“Clinical and Laboratory Standards Institute”) e o método EUCAST (“European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”) (RODRIGUES-TUDELA, 2002).

Alem da recomendação do CLSI no uso do meio RPMI 1640 + MOPS acrescido de 2% de glicose, o meio YNB (“Yeast Nitrogen Base”) pH 7.0 também é um excelente meio na execução dos testes de susceptibilidade aos antifúngicos através da técnica do E-test (PETROU e SHANSON, 2000).

Rodrigues-Tudela *et al.* (2000), estudaram três meios (RPMI 1640, RPMI 1640-2% glicose e (YNB) indicado pelo (CLSI) e verificaram a habilidade de crescimento e a concentração inibitória mínima de *Cryptococcus neoformans* em microplacas incubadas a 35° C por 48 horas. Os resultados obtidos mostraram que no meio RPMI 1640 o crescimento foi ótimo, e neste meio suplementado com 2% de glicose o crescimento não melhorou. Comparando os CIMs para anfotericina B, entre estes meios, observaram ser muito pequena a diferença entre susceptibilidade e

resistência da levedura. No meio YNB, obtiveram resultados de MICs melhores para fluorocitosina e fluconazol.

Montenegro e Paula (2000) em seu estudo com cepas ambientais de São Paulo, assim como Baroni (2001) estudando cepas ambientais do Rio de Janeiro e utilizaram o E-test com o meio YNB modificado.

O método de difusão em disco usando ágar Müller – Hinton acrescido de glicose e azul de metileno tem uma aproximação útil para determinar a susceptibilidade de *C. neoformans* ao fluconazol (PAFALLER *et al.*, 2004).

Estudo realizado por Dias *et al.*, (2006) revelou que exceto a anfotericina B a correlação entre o E-test e o método EUCAST é muito boa.

1.3.1 METODO DO E-TEST

O E-test é um método potencial para testes de susceptibilidade aos antifúngicos produzidos pela AB BIODISK (Solna, Suécia). Ele é composto de fita graduada com valores expressos em µg/mL contendo um gradiente de concentração de uma droga pré-definida. Neste método é possível se obter uma reprodutibilidade quantitativa, nas leituras das concentrações inibitórias mínimas das drogas. É um excelente método para se discriminar cepas sensíveis e resistentes de *C. neoformans* (LOZANO-CHIU *et al.*, 1998).

Com exceção do itraconazol, a correlação do método de E-test e o método de microdiluição (CLSI) é muito boa. O método é simples, e os resultados podem ser lidos entre 24 e 48 horas após a inoculação (CHANG *et al.*, 2001). O E-test é uma excelente alternativa no laboratório clínico para se determinar a susceptibilidade ao fluconazol e fluorocitosina (ALLER *et al.*, 2000a). É muito útil para

se determinar a susceptibilidade de *C. neoformans in vitro* aos antifúngicos para anfotericina B (MAXWELL *et al.*, 2003). Exceto ao itraconazol, a correlação do método E-test e o método de microdiluição (CLSI) é muito boa (MAXWELL *et al.*, 2003) e fidedigna com relação ao fluconazol (MATAR *et al.*, 2003).

1.3.2 SUSCEPTIBILIDADE IN VITRO

Estudo realizado por Alves *et al.*, (2001) demonstrou que as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) entre isolados de pacientes HIV-positivos e isolados ambientais foram semelhantes para anfotericina B, enquanto que, frente ao fluconazol os isolados clínicos mostraram ser menos sensíveis do que os provenientes do ambiente. A susceptibilidade entre isolados ambientais antes e após a inoculação em camundongos BALB/c foram semelhantes frente ao fluconazol, (SILVA, 2003). Cepas ambientais e clínicas mostraram semelhança com relação ao perfil de susceptibilidade, quanto a anfotericina B e ao fluconazol (SOUZA *et al.*, 2005). Pesquisa *in vitro* com cepas isoladas de excretas de pombos apresentaram 100% de sensibilidade a anfotericina B e ao fluconazol (KOBAYASHI *et al.*, 2005). A criptococose em humanos pode ser adquirida a partir de cepas ambientais com CIM semelhante às cepas clínicas para agentes antifúngicos (DELGADO *et al.*, 2005). Isolados do ambiente podem mostrar valores de CIMs altos *in vitro* sugerindo que estes isolados possam ter resistência primária a algumas drogas (PEDROSO *et al.*, 2006).

No período de 2003, estudo com isolados clínicos de *C. neoformans* em Taiwan revelou uma diminuição da sensibilidade a anfotericina B e ao fluconazol, (HSUEH *et al.*, 2005).

A susceptibilidade a antifúngicos *in vitro* usando as técnicas atuais pode não prever antecipadamente bons resultados clínicos em pacientes com criptococose (DANNAOUI *et al.*, 2006).

1.4 TRATAMENTO

O fato das infecções fúngicas representarem parasitismo de um organismo eucariótico sobre outro eucariótico, com diferenças fisiológicas muito pequenas, é necessário que as drogas antifúngicas tenham aplicação clínica adequada, com o mínimo de efeitos colaterais (LACAZ e NEGRO, 1991).

Um número limitado de agentes antifúngicos inclusive azólicos, poliênicos, análogos da pirimidina são usados hoje para combater infecções causadas por leveduras patogênicas (LACAZ *et al.*, 2002).

Enquanto que fatores clínicos podem contribuir para o insucesso no tratamento destas doenças, a exposição do *cryptococcus* aos agentes antifúngicos pode limitar a ação dos mesmos por serem intrinsecamente resistentes ou por adquirirem resistência específica (SANGLARD, 2002).

O tratamento da maioria das infecções estão embasadas nos resultados da sensibilidade *in vitro*, esses resultados podem prever a resposta clínica, porém, esta resposta depende de vários outros fatores intrínsecos ao antifúngico bem como da interação patógeno *versus* hospedeiro. Devido a essa multiplicidade de fatores é evidente que existam discrepâncias entre os resultados de sensibilidade *in vitro* e *in vivo* (RIVAS e SERRANO, 2003).

Segundo Pfaller *et al.*, (1999) e Brandt *et al.*, (2001), o fracasso no tratamento geralmente não é devido à resistência adquirida a droga e sim pela resistência inicial da cepa ao antifúngico.

O uso crescente de agentes antifúngicos contra leveduras patogênicas em pacientes imunocomprometidos tem feito com que cepas resistentes a estes agentes sejam selecionadas, sendo necessária uma maior vigilância quanto ao uso indiscriminado destas drogas (PFALLER *et al.*, 2005).

O regime inicial no tratamento da criptococose continua sendo com anfotericina B com ou sem fluorocitosina, enquanto que, para tratamentos mais longos a droga de escolha é o fluconazol (SAAG *et al.*, 2000).

1.4.1 ANFOTERICINA B

A anfotericina B é um antibiótico poliênico macrocíclico produzido pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus* com atividade fungicida contra inúmeros fungos, é comumente usada no tratamento de infecções sistêmicas causadas por leveduras em pacientes imunocomprometidos (BODEY, 1986; WASAN *et al.*, 1997). O efeito fungicida da droga contra *C. neoformans* depende da concentração administrada (KLEPSEY *et al.*, 1998). A ação da anfotericina B depende da concentração usada, do tipo celular e de um bom veículo para a droga. (ARAUJO *et al.*, 2005).

Este fármaco age, principalmente, ligando-se ao esterol da membrana da levedura, especialmente no ergosterol, danificando esta estrutura, produzindo poros. Esta ligação altera a permeabilidade da membrana, causando vazamento de cátions e íons conduzindo, eventualmente, a morte celular (SUGAR, 1995a), interage diretamente com o ergosterol da membrana celular fúngica, não interferindo na

síntese da membrana do fungo, somente a desestabiliza (THIPINE *et al.*, 1999). O ergosterol é necessário na manutenção da permeabilidade e fluidez da membrana (KELLY *et al.*, 1990), garantindo a modulação de enzimas ligadas à membrana plasmática (AOKI *et al.*, 1993). A ausência do ergosterol e o acúmulo de seus precursores afetam a estrutura da membrana plasmática e a absorção de vários nutrientes, tornando os fungos vulneráveis a danos (GEORPAPADOKOU e WALSH, 1994, 1996).

Anfotericina B pode afetar a morfologia da cápsula polissacarídica de *C. neoformans* sugerindo um mecanismo de ação adicional na eficácia da criptococose (ZARAGOZA *et al.*, 2005).

Por mais de 30 anos anfotericina B tem sido uma das mais importantes drogas usadas em infecções fúngicas severas. Porém, o uso tem sido limitado devido aos vários efeitos adversos sendo o mais importante sua nefrotoxicidade (DERAY, 2002; MEDRANO *et al.*, 2005). Tanto na formulação convencional como na lipídica sua eficácia se equivale (CHEN, 2002).

Por ter pouca absorção no trato gastrointestinal, em infecções sistêmicas a droga deve ser administrada por via intravenosa. Em altas concentrações alcançam o fígado, baço, pulmão e rins. Sua penetração no líquido celafoloraquidiano (LCR) é muito baixa (2 a 4%). Sua eliminação é lenta fundamentalmente por via biliar (< 15%) e renal (3%). Em alguns tecidos como o fígado, a anfotericina B pode ser detectada até 12 meses após a sua administração.

Na urina e no soro a droga pode ser detectada até sete semanas após um curso de terapia. A droga entra nos líquidos pleural, peritonal e sinovial atingindo cerca de 50% das concentrações séricas. O liquor apresenta concentrações de um terço à metade das do soro. No corpo humano, a maior parte da anfotericina B

provavelmente está ligada à membrana que contém colesterol em locais tissulares (NEU, 1994). A principal via para a disposição da droga não é conhecida, parte é excretada pelas vias biliares e apenas 3% de uma dose é eliminada na urina com concentrações equivalentes às do plasma (NEU, 1994).

1.4.2 FLUCONAZOL

Antifúngico triazólico, que age na inibição da síntese de esteroides fungicos e praticamente não altera a síntese de colesterol dos mamíferos, sendo menos tóxico e melhor absorvido que os outros azóis (WALSH *et al.*, 1997).

É facilmente solúvel em água, sua absorção por via oral é completa e muito rápida. Uma das características mais importantes da droga é a sua elevada penetração nos líquidos biológicos de todos os organismos, no líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite, alcançando níveis de 90%.

O principal mecanismo de ação dos azólicos é a inibição da biossíntese do ergosterol, que é importante para a integridade e a manutenção da função da membrana celular dos fungos. Os imidazóis inibem a incorporação do acetato de ergosterol, inibindo a lanosterol dimetilase, por interferência no citocromo P-450 da levedura, trazendo como consequência alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, prejudicando a captação dos nutrientes, o que se traduz por inibição do crescimento fungico, originando alterações morfológicas que resultam em necrose celular (RICHARDSON e WARNOCK, 1993). A monoterapia com azóis só é eficaz na criptococose primária pulmonar (JUST-NUBLING, 1994). Pesquisa realizada *in vitro* revelou que independente da concentração do fluconazol esta droga tem efeito fungistático contra *C. neoformans*

(KLEPSEK *et al.*, 1998), enquanto que, em modelo animal com criptococose moderada, o fluconazol administrado em altas doses tem atividade fungicida (DING *et al.*, 1997). A terapia com fluconazol pode ser efetiva em pacientes imunocompetentes com criptococose pulmonar (NÚÑEZ *et al.*, 2000). É uma excelente droga quando usada na prevenção e tratamento de infecção por *C. neoformans* (LUMBRERAS *et al.*, 2003).

A administração de altas doses de fluconazol como profilaxia ou pós-infecção por *C. neoformans* pode ser altamente eficaz no tratamento e na prevenção de meningoencefalites (HOSSAIN *et al.*, 2002). A profilaxia primária com fluconazol é efetiva reduzindo a incidência da criptococose em adultos HIV-positivos em estado avançado (CHANG *et al.*, 2005) e pode ser eficaz na prevenção da criptococose invasiva (CANTEY *et al.*, 2005).

A monoterapia com fluconazol pode ser uma opção no tratamento de pacientes com criptococose associada a AIDS em países com poucos recursos e acesso limitado a terapias antifúngicas (SCHAARS *et al.*, 2006).

A criptococose em pacientes com AIDS raramente é curada, e o fluconazol é a droga de escolha necessária para a manutenção do tratamento (POWDERLY *et al.*, 1992, 2000). O uso indiscriminado deste fármaco em pacientes com AIDS, a longo prazo, pode ainda resultar em resistência (BRANDT *et al.*, 2001; SANAT *et al.*, 2006; ROGERS, 2006). Estudo com cepas clínicas homogêneas demonstrou a ocorrência de heteroresistência ao fluconazol, segundo esse mesmo estudo isso ocorreu devido a seleção de clones de heteroresistência e a indução através da exposição ao fluconazol (YAMAZUMI *et al.*, 2003).

O aparecimento de cepas resistentes à droga intensificou a necessidade da avaliação *in vitro* da susceptibilidade de *C. neoformans* ao fluconazol (ESPINEL-

INGROFF, 1997). A susceptibilidade ao fluconazol *in vitro* pode prever resposta confiável *in vivo* (LARSEN *et al.*, 2005). O estudo da CIM *in vitro* de isolados de pacientes durante a terapia com a droga, como também de pacientes em que a terapia tenha falhado, pode prever uma potencial resposta clínica a terapia com o antifúngico e ajudar a identificar pacientes que não responderão a terapia com fluconazol (ALLER *et al.*, 2000b).

Como a epidemia da AIDS cresce juntamente com a exposição adicional às drogas azólicas, é muito importante e preverível que seja acompanhada a incidência de resistência de isolados de *C. neoformans* a este grupo de antifúngicos (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Pesquisa quanto à susceptibilidade *in vitro* realizado por Aller *et al.*, (2007) na Espanha revelou que nos últimos 11 anos a resistência ao fluconazol tem diminuído.

1.5 ASSOCIAÇÃO TERAPEUTICA

A associação terapêutica é uma promissora forma usada para aumentar a porcentagem de sucesso no tratamento, porém, se faz necessário mais estudos clínicos controlados para verificar a eficácia destas associações (SHAO *et al.*, 2006). Fármacos associados no tratamento da criptococose tem sido estudados por muito tempo no intuito de descobrir qual a melhor associação, porém, estes estudos tem sido realizados *in vitro* e com isolados de diferentes pacientes (BADDLEY e PAPPAS, 2005).

Antifúngicos azólicos associados a outros agentes antifúngicos, com diferentes mecanismos de ação, provavelmente aumentarão a eficácia no tratamento de infecções fúngicas (SHEEHAN *et al.*, 1999), reduzindo o desenvolvimento de

resistência a estes fármacos e, possivelmente, diminuindo a duração da terapia (NGUYEN *et al.*, 1995). O enfoque para novos estudos de associação de fármacos, principalmente contra patógenos eucarióticos que atacam severamente pacientes imunossuprimidos deve ser voltado para regimes terapêuticos, com efeito, fungicida (DEL POETA *et al.*, 2000).

Uma das principais razões para o uso da associação de drogas antifúngicas é a não toxicidade. Dois agentes antifúngicos podem ser usados e, portanto, em concentrações menores ao contrário da monoterapia que exige concentrações tóxicas para serem efetivas (BARCHIESI *et al.*, 2000). Associação terapêutica realizada *in vitro* com anfotericina B e fluconazol mostrou que a combinação destas drogas permitiram o uso de baixas doses de anfotericina B sem contudo resultar em perda de uma resposta clínica (BARCHIESI *et al.*, 2000).

Pesquisa realizada *in vitro* quanto à associação de drogas contra *C. neoformans* apontou para a necessidade de estudos adicionais em modelo animal para confirmar o potencial destas combinações para o tratamento da criptococose (SERENA *et al.*, 2005).

Atualmente a taxa de cura para infecções fúngicas usando as drogas disponíveis através de monoterapia não é muito boa. Nos últimos anos, com a introdução de novas classes de drogas antifúngicas os estudos conduzem para a hipótese de que o uso de novos fármacos, em associação pode ser mais efetiva do que os mesmos usados isoladamente (POWERS, 2004). Na criptococose a associação terapêutica é mais efetiva do que a monoterapia (CISNEROS e MATÍA, 2006).

Estudo da associação da anfotericina B mais fluconazol *in vitro* revelou que a interação entre as drogas foi indiferente (GHANNOUM *et al.*, 1995). POREM,

Em outro estudo associação AMB mais FLC *in vitro* teve interação foi aditiva (BARCHIESI *et al.*, 2000).

A combinação terapêutica pode ser um grande benefício no tratamento de infecções invasivas causadas por leveduras. Todavia, o estudo da interação destas drogas *in vitro* ainda é muito escasso e a interpretação da concentração inibitória fracionária (FIC) pode ser contraditória devido às várias definições (TEDORSTHORST *et al.*, 2002).

A melhora no tratamento da criptococose veio principalmente com o uso da associação de drogas antifúngicas (PARK *et al.*, 1999; NEWTON *et al.*, 2002). Anfotericina B, fluconazol e fluorocitosina são as drogas mais comuns no tratamento da criptococose (SAAG *et al.*, 2000). A combinação terapêutica em doenças causadas por *C. neoformans* é vantajosa (SOBEL, 2004).

Pesquisa *in vivo* usando camundongos BALB/c, machos, infectados experimentalmente com *C. neoformans* demonstrou que a associação de anfotericina B com fluconazol foi mais eficiente no tratamento destes animais do que a associação com fluorocitosina. A adição de fluorocitosina a anfotericina B e ao fluconazol não melhorou a terapia (LARSEN *et al.*, 2004). Segundo Odds *et al.*, (2000) o itraconazol é altamente eficaz no tratamento de infecções por *C. neoformans* em humanos.

Anfotericina B associada com drogas triazólicas é significativamente mais ativa do que seu uso isolado em estudo *in vitro* (BARCHIESI *et al.*, 2000). Segundo os mesmos autores a associação *in vivo* teve efeito aditivo. Estudos da associação entre fluconazol mais anfotericina B na candidemia revelou que não houve antagonismo entre as drogas (REX *et al.*, 2003).

O efeito da anfotericina B associada com azólicos varia de acordo com o momento da administração, sendo que a utilização de um azólico, anteriormente ao uso da anfotericina B, ocasiona antagonismo entre as duas drogas enquanto que, quando administrado simultaneamente, produz efeito sinérgico em relação ao fluconazol (VIUDES *et al.*, 2001). O fluconazol associado a fluorocitosina mostrou maior sinergismo e maior atividade fungicida do que fluconazol associado a anfotericina B (HASSAN e ABDEL SALAM, 2005). A associação terapêutica para o tratamento da criptococose esta estabelecida baseado em evidências clinicas (JOHNSON *et al.*, 2004).

1.6 CORRELAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*

A correlação dos resultados da associação AMB-FLC em criptococose experimental com os dados observados *in vitro* confirmou a eficácia do tratamento da doença, (BARCHIESI *et al.*, 2000), esta eficácia foi positiva com relação aos resultados no tratamento em pacientes com infecções por leveduras. (COSTA *et al.*, 2004).

Estudos em modelo animal quanto às novas associações de antifúngicos é crucial, esses modelos são caminhos positivos no trajeto de estudos *in vitro* até os pacientes (GRAYBILL, 2000). A associação entre drogas antifúngicas estão se tornando uma realidade no campo de doenças causadas por leveduras de interesse médico. As discrepâncias verificadas na correlação entre diferentes estudos *in vitro* e *in vivo* pedem que sejam adotadas metodologias padronizadas com adoção de critérios interpretativos comuns (MUKHERJEE *et al.*, 2005).

6 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos no presente trabalho podemos inferir que:

6.1 de acordo com a sensibilidade in vitro apresentada pelas amostras clínicas e ambientais em relação “a anfotericina B das amostras clínicas e ambientais podemos sugerir que os isolados de ambas as fontes foram sensíveis à droga;

6.2 50% das amostras clínicas de *C. neoformans* foram resistentes ao fluconazol, fato que sugere ser esta resistência do tipo intrínseca ou adquirida;

6.3 a resistência de 35% das amostras ambientais de *C. neoformans* sugere que estes isolados podem ter resistência intrínseca ao fluconazol;

6.4 nas condições estudadas constatamos que a levedura apresentou tropismo pelo cérebro;

6.5 a infecção inicial aconteceu 24 horas após a inoculação;

6.6 a meningite aguda estava instalada a partir do 7º dia da inoculação; a meningite crônica a partir do 13º dia, e a manifestação clínica da doença 15 após a inoculação, culminando no óbito de todos os animais;

6.7 em camundongos experimentalmente infectados, a monoterapia com anfotericina B pode reduzir a sobrevivência dos mesmos, enquanto que o tratamento isolado com fluconazol pode prolongá-la, porém ;os animais foram ao óbito;

6.8 o sucesso da terapia combinada depende da concentração do fluconazol na associação. Esta pode ser sinérgica para a anfotericina B, requerendo a metade da concentração máxima desse antifúngico;

6.9 os dados obtidos nos levam a sugerir que a melhor concentração das drogas para o tratamento da doença é AMB 1,5 mg/kg/dia com FLC 30,0 mg/kg/dia e que esta terapia pode ser segura, considerando-se os reduzidos efeitos secundários do poliênico quando associado;

6.10 o tratamento da criptococose deve ser iniciado logo após a suspeita de infecção,

6.11 a profilaxia com a associação AMB mais FLC pode ser benéfica;

.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB BIODISK. **Etest technical guide n. 4:** Antifungal susceptibility testing of yeasts. AB BIODISK, Solna, Sweden, 1993.

AKCAGLAR, S.; SEVGICAN, E.; AKALIN, H.; ENER, B.; TORE, O. Two cases of cryptococcal meningitis in immunocompromised patients not infected with HIV. **Mycoses**, v. 50, p. 235-238, 2007.

ALLER, A.I.; MÁRTIN-MAZUELOS, E.; GUTIÉRREZ, M.J.; BERNAL, S.; CHÁVEZ M.; RÉCIO, F.J. Comparasion of Etest and microdilution method for antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* to four antifungal agents. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 46, p. 997-1000, 2000a.

ALLER, A.I.; MARTIN-MAZUELOS, E.; LOZANO, F.; GOMEZ-MATEOS, J.; STEELE-MOORE, L.; HOLLOWAY, W.J.; GUTIÉRREZ, M.J.; RECIO, F.J.; ESPINEL-INGROFF, A. Correlation of Fluconazole MICs with Clinical Outcome in Cryptococcal Infection. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, p. 1544-1548, 2000b.

ALLER, A.I.; CLARO, R.; CASTRO, C.; SERRANO, C.; COLOM, M.F.; MARTÍN-MAZUELOS, E. Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolates in HIV-Infected Patients to Fluconazole, Itraconazole and Voriconazole in Spain: 1994-1996 and 1997-2005. **Chemotherapy**, v. 35, p. 300-305, 2007.

ALVES, S.H; OLIVEIRA, L.T; COSTA, J.M; LUBECK, I; CASALI, A.K; VAINSTEIN, M.H. In vitro susceptibility antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in southern of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 43, p. 5, 2001.

AOKI, Y.; YOSHIHARA, F.; KONDOH, M.; NAKAMURA, Y.; NAKAYAMA, N.; ARISAWA, M. Ro 09-1470 Is a Selective Inhibitor of P-450 Lanosterol C-14 Demethylase of Fungi. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 37, p. 2662-2667, 1993.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. 2006. Available from:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/;](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/)
<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>

ARAÚJO, I.B.; BRITO, C.R.; URBANO, I.A.; DOMINICI, V.A.; SILVA FILHO, M.A.; SILVEIRA, W.L.; DAMASCENO, B.P.; MEDEIROS, A.C.; EGITO, E.S. Similarity between the *in vitro* activity and toxicity of two different fungizone™ / lipofundin™ admixtures. **Acta. Cir. Brás.**, v. 20, p. 129-133, 2005.

BADDLEY, J.W.; PAPPAS, P.G. Antifungal combination therapy: clinical potential. **Drugs**. v. 65, p. 1461-1480, 2005.

BARCHIESI, F.; R. HOLLIS, S. A. MESSER, G. SCALISE, M. G. RINALDI.; M. A. PFALLER. Electrophoretic karyotype and *in vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 23, p. 99–103, 1995.

BARCHIESI, F.; SCHIMIZZI, A.M.; CASELLI, F.; NOVELLI, A.; FALLANI, S.; GIANNINI, D.; ARZENI, D.; DI CESARE, S.; DI FRANCESCO, L.F.; Fortuna, M.; GIACOMETTI, A.; CARLE, F.; MAZZEI, T.; SCALISE, G. Interactions between Triazoles and Amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, p. 2435-2441, 2000.

BARÓ, T.; TORRES-RODRÍGUEZ, J.M.; MORERA, Y. ALÍA, C.; LÓPEZ, O.; MÉNDEZ, R. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Spain. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p.1170-1172, 1999.

BARONI, F. A. **Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos localizadas em torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro: Fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos.** 2001. 232f. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BARONI, F.A.; GONÇALVES DA SILVA, E; VIANI, F.C.; OLIVEIRA, M.T.B.; RIVERA, I.N.G.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. v. 48, p. 71-75, 2006.

BODEY, G. P. Infection in cancer patients: a continuing association Am. **J. Med.**, v. 81, p. 11–26, 1986.

BRANDT, M.E.; PFALLER, M.A.; HAJJEH, R.A.; HAMILL, R.J.; PAPPAS, P.G.; REINGOLD, A.L.; RIMLAND, D.; WARNOCK, D.W. FOR 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. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 45, p. 3065-3069, 2001.

BROUWER, A.; RAJANUWONG, A.; CHIERAKUL, W.; GRIFFIN G.; LARSEN, R.; WHITE, N.; HARRISON, T. Combination antifungal therapies for HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomised trial. **Lancet**, v. 363, p. 1764-1767, 2004.

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

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; IATTA, R.; CAMARDA, A.; MONTAGNA, M.T.; OTRANTO, D. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. **Med. Mycol.**, v. 44, p. 485-492, 2006.

CALVO, B.M.; COLOMBO, A. L.; FISCHMAN, O.; SANTIAGO, A.; THOMPSON, L.; LAZERA, M.S.; TELLES, F.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; TANAKA, R.; MYIAJY, M.; MORETTI-BRANCHINI, M.L. Antifungal Susceptibilities, Varieties, and Electrophoretic Karyotypes of Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2348-2350, 2001.

CANTEY, P.T.; STEPHENS, D.S.; RIMLAND, D. Prevention of cryptococcosis in HIV-infected patients with limited access to highly active antiretroviral therapy: evidence for primary azole prophylaxis. **Hiv. Med.**, v. 6, p. 253-259, 2005.

CAPILLA, J.; MAFFEI, C.M.L.; CLEMONS, K.V.; SOBEL, R.A.; STEVENS, D.A. Experimental systemic infection with *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in normal and immunodeficient mice. **Med. Mycol.**, v. 44, p. 601-610, 2006.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. ***Cryptococcus neoformans***. Washington: American Society for Microbiology, 1998.

CASALI, A. K.; GOULART, L.; KMETZSCH, L.; ROSA, S.; RIBEIRO, ANGELA, A.M.; AMARAL, A. Al.; ALVES, S.H.; SCHRANK, A.; MEYER W.; VAINSTEIN, M.H. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Res.**, v. 3, p. 405-415, 2003.

CHANG, H.C.; CHANG, J.J.; CHAN, S.H.; HUANG, A.H.; WU, T.L.; LIN, M. C.; CHAN, T.C.G. Evaluation of Etest for Direct Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts in Positive Blood Cultures. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 1328-1333, 2001.

CHANG, Y.C.; STINS, M.F.; MCCAFFERY, M.J.; MILLER, G.F.; PARE, D.R.; DAM, T.; PAUL-SATYASEE, M.; KIM, K.S.; KWON-CHUNG, K.J. Cryptococcal Yeast Cells Invade the Central Nervous System via Transcellular Penetration of the Blood-Brain Barrier . **Infect. Immun.**, v. 72, p. 4885-4995, 2004a.

CHANG, W.N.; HUANG, C.R.; LEI, C.B.; LEE, P.Y. CHIEN, C.C.; CHANG, H.W.; CHANG, C.S.; LU, C.H. Serotypes of clinical cerebrospinal fluid *Cryptococcus neoformans* isolates from southern Taiwan and their in vitro susceptibilities to amphotericin B, fluconazole, and voriconazole. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 57, p. 113-115, 2004b.

CHANG, L.W.; PHIPPS, W.T.; KENNEDY, G.E.; RUTHERFORD, G.W. Antifungal interventions for the primary prevention of cryptococcal disease in adults with HIV. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 20, cd 004776, 2005.

CHARLIER, C.; CHRETIEN, F.; BAUDRIMONT, M.; MORDELET, E.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F. Capsule Structure Changes Associated with *Cryptococcus neoformans* Crossing of the Blood- Brain Barrier. **Am. J. Pathol.**, v. 166, p. 421-432, 2005.

CHEE, H.Y.; LEE, K.B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon droppings in Seoul, Korea. **J. Microbiol.**, v. 43, p. 469-472, 2005.

CHEN, S.C.A. Cryptococcosis in Australasia and the treatment of cryptococcal and other fungal infections with liposomal amphotericin B. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49 Suppl S1, p. 57-61, 2002.

CHRÉTIEN, F.; LORTHOLARY, O.; KANSAU, I.; NEUVILLE, S.; GRAY, F.; DROMER, F. Pathogenesis of Cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 522–530, 2002.

CISNEROS HERREROS, J.M.; CORDERO MATÍA, E. Therapeutic armamentarium against systemic fungal infections. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 12 suppl 7, p. 53–64, 2006.

COSTA, M.; PASSOS, S.S.; MIRANDA, A.T.B.; ARAÚJO, R.S.C.; PAULA, C. R.; SILVA, M.R.R. Correlation of in vitro itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. **Mycopathologia**, v. 157, p. 43-47, 2004.

CRISSEY, J.T.; LANG, H.; PARISH, L.C. Manual of Medical Mycology, Spain, **Blackwell Science**, 1995.

CRUZ, M.V.N. **Fenótipos e Sensibilidade aos Antifúngicos de amostras Clínicas e Ambientais de *Cryptococcus neoformans***. 2004. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DANNAOUI, E.; ABDUL, M.; ARPIN, M.; MICHEL-NGUYEN, A.; PIENS, M.A.; FAVEL, A.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F.; THE FRENCH CRYPTOCOCCOSIS STUDY GROUP. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 50, p. 2464-2470, 2006.

DELGADO, A.C.N.; TAGUCHI, H.; MIKAMI, Y.; MYIAJY, M.; VILLARES, M.C.B.; MORETTI, M.L. Human cryptococcosis: relationship of environmental and clinical strains of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from urban and rural areas. **Mycopathologia**, v. 159, p. 7-11, 2005.

DEL POETA, M.; CRISTINA CRUZ, M.; CARDENAS, M.E.; PERFECT, J.R.; HEITMAN, J. Synergistic Antifungal Activities of Bafilomycin A1, Fluconazole, and the Pneumocandin MK-0991/Caspofungin Acetate (L-743,873) with Calcineurin Inhibitors FK506 and L-685,818 against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, p. 739-746, 2000.

DENNING, D.W.; ARMSTRONG, R.W.; LEWIS, B.H.; STEVENS, D.A. Elevated cerebrospinal fluid pressures in patients with cryptococcal meningitis and acquired immunodeficiency syndrome. **Am. J. Med.**, v. 91, p. 267-272, 1991.

DERAY G. Amphotericin B nephrotoxicity. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49 Suppl S1, p. 37-41, 2002.

DIAS, A.L.; MATSUMOTO, F.E.; MELHEM, M.S.; DA SILVA, E.G.; AULER, M.E.; DE SIQUEIRA, A.M.; PAULA, C.R. Comparative analysis of Etest and broth microdilution method (AFST-EUCAST) for trends in antifungal drug susceptibility testing of Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1693-1699, 2006.

DING, J.S.C.; BAUER, M.; DIAMOND, D.M.; LEAL, M.A.E.; JOHNSON, D.; WILLIAMS, B.; THOMAS, A.M.; NAJVAR, L.; GRAYBILL, J.R.; LARSEN, R. Effect of Severity of Meningitis on Fungicidal Activity of Flucytosine Combined with Fluconazole in a Murine Model of Cryptococcal Meningitis. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 14. p. 1589-1593, 1997.

DROMER, F.; PERRONNE, C.; BARGE, J.; VILDE, J.L.; YENI, P. Role of IgG and complement component C5 in the initial course of experimental cryptococcosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 78, p. 412-417, 1989.

ESPINEL-INGROFF, A. Clinical relevance of antifungal resistance. **Infect. Dis. Clin. N. Amer.**, v. 11, p.929-944, 1997.

FERNANDES, O.F.L.; PASSOS, X.S.; SOUZA, L.K.H.; MIRANDA, A.T.B.; CERQUEIRA, C.H.P.V.; SILVA, M.R.R. In vitro susceptibility characteristics of *Cryptococcus neoformans* varieties from AIDS patients in Goiânia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 839-841, 2003.

FORD, B. J. AIDS and Africa. **Biologist**, v. 47, p.224, 2000.

FILIÚ, W.F.OL.; WANKE, B.; AGÜENA, S.M.; VILELA, V.O.; MACEDO, R. C.L.; LAZÉRA, M. Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, v. 35, p. 591-595, 2002.

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

GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G.; DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 3204-3209, 1999.

GARCÍA-MARTOS, P.; NOVAL, J.F.; GARCÍA-TAPIA, A.; MARÍN, P.; PUERTO, J.L.; SEPÚLVEDA, A. Sensibilidad a antifúngicos de especies de *Cryptococcus* de interés clínico. **Méd. Clin. (Barc)**, v. 119, p. 211-213, 2002.

GEORGOPAPADAKOU, N.H.; WALSH, T.J. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. **Science**, v. 264, p. 371-373, 1994.

GEORGOPAPADAKOU, N.H.; WALSH, T.J. Antifungal Agents: Chemotherapeutic Targets and Immunologic Strategies. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 40, p. 279-291, 1996.

GHANNOUM, M.A.; FU, Y.; IBRAHIM, A.S.; MORTARA, L.A.; SHAFIQ, M.C.; EDWARDS, J.E.; CRIDDLE, R.S. In Vitro Determination of Optimal Antifungal Combinations against *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 39, p. 2459-2465, 1995.

GRAYBILL, J.R. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. **Drug. Resist. Updat.**, v. 3, p. 364-383, 2000.

HASSAN, A.; ABDEL-SALAM. In vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from Egypt to seven antifungal drugs. **Mycoses**, v. 48, p. 327-332, 2005.

HOSSAIN, M.A.; MUKHERJEE, P.K.; REYES G.; LONG, L.; GHANNOUM, M.A. Effects of fluconazole singly and in combination with 5-fluorocytosine or amphotericin B in the treatment of cryptococcal meningoencephalitis in an intracranial murine model. **J. Chemother.**, v. 14, p. 351-360, 2002.

HSUEH, P.R.; LAU, Y.J.; CHUANG, Y.C.; WAN, J.H.; HUANG, W.K.; SHYR, J.M.; YAN, J.J.; YU, K.W.; WU, J.J.; KO, W.C.; YANG, Y.C.; LIU, Y.C.; TENG, L.J.; LIU, C.Y.; LUH, K.T. Antifungal Susceptibilities of Clinical Isolates of *Candida* Species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* Species from Taiwan: Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan Program Data from 2003. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 49, p. 512-517, 2005.

IKEDA, R.; SHINODA, T.; FUKAZAWA, Y.; KAUFMAN, L. Antigenic Characterization of *Cryptococcus neoformans* Serotypes and Its Application to Serotyping of Clinical Isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, p. 22-29, 1982.

JUST-NUBLING, G. Therapy of candidiasis and cryptococcosis in AIDS. **Mycoses**, v.37 suppl 2, p. 56-63, 1994.

JOHNSON, M.D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J.R.; REX, J.H. Combination Antifungal Therapy. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 48, p. 693-715, 2004.

KIM, K.S. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteria to neuronal injury. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 4, p.376-385, 2003.

KLEPSEK, M.E.; WOLFE, E.J.; PFALLER, M.A. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v. 41, p. 397-401, 1998.

KOBAYASHI, C.C. B.A.; SOUZA, L. K. H.; FERNANDES, O. F.L.; BRITO, S. C. A.; SILVA, A.C.; SOUSA, E.D.; SILVA, M.R.R. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 47, p. 203-207, 2005.

KOUAME-ASSOUAN, A.E.; COWPPLI-BONY, P.; AKA-ANGHUI, D.E.; ASSI, B.; DOUMBIA, M.; DIALLO, L.; ADJEN, K.C.; AKANI, E.; SONAN, T.; DIAGANA, M. Two cases of cryptococcal meningitis revealed by an ischemic stroke. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 100, p. 15-16, 2007.

KOVACS, J.A.; KOVACS, A.A.; POLIS, M. Cryptococcosis in the acquire immunodeficiency syndrome. **Ann. Inter. Med.**, v.103, p. 533-538, 1985.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. 4^a ed, Amsterdam: Elsevier Science, 1998. 1055p.

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

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

LAKSHMI, V.; SUDHA, T.; TEJA, V.D.; UMABALA, P. Prevalence of central nervous system cryptococcosis in human immunodeficiency virus reactive hospitalized patients. **Indian. J. Med. Microbiol.**, v. 25, p. 146-149, 2007.

LARSEN, R.A.; BAUER, M.; THOMAS, A. M.; GRAYBILL, J. Amphotericin B and Fluconazole, a Potent Combination Therapy for Cryptococcal Meningitis. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 48, p. 985-991, 2004.

LARSEN, R.A., BAUER, M., THOMAS, A.M., SANCHEZ, A., CITRON, D., RATHBUN, M.; HARRISON, T.S. Correspondence of in vitro and in vivo fluconazole dose-response curves for *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 49, p. 3297- 3301, 2005.

LEITE, A.G.; VIDAL, J.E.; BONASSER, FILHO F.; NOGUEIRA, R.S.; OLIVEIRA, A.C. Cerebral Infarction Related to Cryptococcal Meningitis in an HIV-Infected Patient: Case Report and Literature Review. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 8, p. 175-179, 2004.

LIZARAZO, J.; LINARES, M.; BEDOUT, C.; RESTREPO, Á.; AGUDELO, C.I.; CASTAÑEDA, E.; GRUPO COLOMBIANO PARA EL ESTUDIO DE LA CRIPTOCOCOSIS. Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. **Biomédica**, v. 27, p. 94-106, 2007.

LITVINTSEVA, A.P.; KESTENBAUM, L.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T.G. Comparative Analysis of Environmental and Clinical Populations of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 556-564, 2005.

LÓPEZ-MEDRANO, F.; DÍAZ-PEDROCHE, C.; LUMBRERAS, C.; AGUADO, J.M. Utilidad de la amfotericina B liposomal para la prevención de la infección fúngica en receptores de un trasplante de órgano sólido. **Rev. Esp. Quimioterap.**, v. 18, p. 14-20, 2005.

LORTHOLARY, O.; NICOLAS, M.; SOREDA, S.; IMPROVISI, L.; RONIN, O.; PETITJEAN, O.; DUPONT, B.; TOD, M.; DROMER, F. Fluconazole, with or without dexamethasone for experimental cryptococcosis: impact of treatment timing. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v. 43, p. 817-824, 1999.

LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V.L.; GHANNOUM, M.A.; REX J.H. Detection of Resistance to Amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolates: Performances of Three Different Media Assessed by Using E-Test and National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Methodologies. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2817-2822, 1998.

LUMBRERAS, C.; LIZASOAIN, M.; AGUADO, J.M. Antifúngicos de uso sistémico. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 21, p. 366-379, 2003.

MAFFEI, C.M.L.; MIRELS, L.F.; SOBEL, R.A.; CLEMONS, K.V.; DAVID, A. S. Cytokine and Inducible Nitric Oxide Synthase mRNA Expresión during Experimental Murine Cryptococcal Meningoencephalitis. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2338-2349, 2004.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3365-3367, 2001.

MATAR, M.J.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAETZNICK, V.L.; RODRIGUEZ, J. R.; CHEN, E.; REX, J.H. Correlation between E-Test, Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Fluconazole and Voriconazole. **Antimicrob. Agents. Chemoter.**, v. 47, p. 1647-1651, 2003.

MAXWELL, M.J.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D.J.; PFALLER M.A. Evaluation of Etest Method for Determining Voriconazole and Amphotericin B MICs for 162 Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 97-99, 2003.

MITCHELL TG, PERFECT J.R. Cryptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 515-548, 1995.

MONTENEGRO, H.; PAULA, C.R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil, **Med. Mycol.**, v. 38, p. 385-390, 2000.

MOREIRA, T.A.; FERREIRA, M.S.; RIBAS, R.M.; BORGES, A.S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. **Rev. Soc. Bras. Inst. Med. Trop.**, v. 39, p. 255-258, 2006.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, 1 D.J.; HITCHCOCK, C.A.; GHANNOUM, M.A. Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 163-194, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 2nd ed. M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

NEWTON, P. N.; H., THAI LE; N. Q., TIP; J. M., SHORT; W., CHIERAKUL; A., RAJANUWONG; P., PITISUTTITHUM; S., CHASOMBAT; B., PHONRAT; W., MAEK-A-NANTAWAT; R., TEAUNADI; D. G., LALLOO; N. J., WHITE. A randomized, double blind, placebo-controlled trial of acetazolamide for the treatment of elevated intracranial pressure in cryptococcal meningitis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 769–772, 2002.

NGUYEN, M.H.; BARCHIESI, F.; YU, V.L.; RINALDI, M.G. In vitro evaluation of combination of fluconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 39, p.1691–1695, 1995.

NGUYEN, M.H.; YU, C.Y. *In vitro* comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 42, p. 471–472, 1098.

NUNEZ, M.; PEACKOC, J.E. Jr.; CHIN, R, Jr. Pulmonary cryptococcosis in the immunocompetent host. Therapy with oral fluconazole: a report of four cases and a review of the literature. **Chest**, v. 118, p. 527-534, 2000.

ODDS, F.C.; ORIS, M.; VAN DORSSELAER, P.; GERVEN, F. Activities of an Intravenous Formulation of Itraconazole in Experimental Disseminated *Aspergillus*, *Candida*, and *Cryptococcus* Infections. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.44, p. 3180-3183, 2000.

ORNI-WASSERLAUF, R.; IZKHAKOV, E.; SIEGMAN-IGRA, Y. BASH, E.; POLACHEK, I.; GILAD, M. Fluconazole resistant *Cryptococcus neoformans* isolated from an immunocompetent patient without prior exposure to fluconazole. **Clin. infect. Dis.**, v. 29, p. 1592-1593, 1999.

PAL, M. Pathogenicity of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* in murine model. **Rev. Iberoam. Micol.**, 22, 2005.

PAPPALARDO, M.C.S.M.; MELHEM, M.S.C. CRYPTOCOCCOSIS: A REVIEW OF THE BRAZILIAN EXPERIENCE FOR THE DISEASE. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 45, p. 299-305, 2003.

PARK, M. K.; D. R., HOSPENTHAL; J. E., BENNETT. Treatment of hydrocephalus secondary to cryptococcal meningitis by use of shunting. **Clin.Infect. Dis.**, v. 28, p. 629–633, 1999.

PEDROSO, R.S.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C. In vitro susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 105, p. 239-243, 2006.

PERFECT, J. R.; D. T. DURAK. Treatment of experimental cryptococcal meningitis with amphotericin B, 5-fluorocytosine and ketoconazole. **J. Infect. Dis.** v. 146, p.429–435, 1982.

PERKINS, A.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L; CUENCA-ESTRELLA, M. Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v. 56, p. 1144-1147, 2005.

PETROU, M.A; SHANSON, D.D; Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* by The NCCLS and Etest methods using five defined media. **J. Antimicrob. Chemoter.**, v. 46, p. 815-818, 2000.

PFALLER, M.A.; ZHANG, J.; MESSER, S.A.; BRANDT, M.E.; HAJJEH, R.A.; JESSUP, C.J.; TUMBERLAND, M.; MBIDDE, E.K.; GHANNOUM, M.A. In vitro activities of voriconazole, fluconazole, and itraconazole against 566 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from the United States and Africa. **Antimicrob. Agents. Chemoter.**, v. 43, p.169-71, 1999.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR S.; HOLLIS, R.J.; DIEKEMA, D. J. Evaluation of the NCCLS M44-P Disk Diffusion Method for Determining Susceptibilities of 276 Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* to Fluconazole. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 380-383, 2004.

PFALLER, M.A.; MESSER, S.A; BOYKEN, L.; RICE, C.; TENDOLKAR, S.; HOLLIS, R.J.; DOERN, G.V.; DIEKEMA, D.J. Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* (1990 to 2004). **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 2163-2167, 2005.

PFISTER, H.W.; BORASIO, G.D.; DIRNAGL, U.; BAUER, M. & EINHÄUPL, K.M. Cerebrovascular complications of bacterial meningitis in adults. **Neurology.**, v. 42, p. 1497-1504, 1992.

PITISUTTITHUM, P.; S., TANSUPHASAWADIKUL; A. J., SIMPSON; P. A., HOWE and N. J., WHITE. A prospective study of AIDS-associated cryptococcal meningitis in Thailand treated with high-dose amphotericin B. **J. Infect**, v. 43, p. 226–233, 2001.

POWERS, J.H.; Considerations in clinical trials of combination antifungal therapy. **Clin. Infect. Dis**, Suppl 4, p. S228-235, 2004.

POWDERLY, W. G.; SAAG M. S.; CLOUD G. A.; ROBINSON P.; MEYER R. D.; JACOBSON J. M.; J. R. GRAYBILL; A. M. SUGAR; V. J. MCAULIFFE; S. E.

FOLLANSBEE *et al.* A controlled trial of fluconazole or amphotericin B to prevent relapse of cryptococcal meningitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.** v. 326, p. 793–798, 1992.

POWDERLY, W.G. Cryptococcal meningitis in HIV-infected patients. **Curr. Infect. Dis. Rep.** v. 2, p. 352-357, 2000.

QUINTERO, E.; CASTAÑEDA, E.; RUIZ, A. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca-Colombia. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, p. 93-98, 2005.

REIMÃO, J.Q.; DRUMMOND, E.D.; TERCETI, M.S.; LYON, J.P.; FRANCO, M.C.; SIQUEIRA, A.M. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brazil. **Mycoses**, v. 50, p. 261-264, 2007.

REX, J.H.; PAPPAS, P.G.; KARCHMER, A.W.; SOBEL, J.; EDWARDS, J.E.; HADLEY, S.; BRASS, C.; VAZQUEZ, J.A.; CHAPMAN, S.W.; HOROWITZ, H.W.; ZERVOS, M.; MCKINSEY, D.; LEE, J.; BABINCHAK, T.; ROBERT W.; BRADSHER, R.W.; CLEARY, J.D.; COHEN, D.M.; DANZIGER, L.; GOLDMAN, M.; GOODMAN, J.; HILTON, E.; HYSLOP, N.E.; KETT, D.H.; LUTZ, J.; RUBIN, R. H.; SCHELD, W.M.; SCHUSTER, M.; SIMMONS, B.; STEIN, D.K.; WASHBURN, R.G.; MAUTNER, L.; CHU, TENG-CHIAO; PANZER, H.; ROSENSTEIN, R.B. AND BOOTH, J.A, FOR THE NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES MYCOSES STUDY GROUP. A Randomized and Blinded Multicenter Trial of High-Dose Fluconazole plus Placebo versus Fluconazole plus Amphotericin B as Therapy for Candidemia and Its Consequences in Nonneutropenic Subjects. **Clin. Infect. Dis.**, v.36, p. 1221-1228, 2003.

RIBEIRO, M.; PAULA, C.R.; PERFECT J.R.; COX, G.M. Phenotypic and genotypic evaluation of fluconazole resistance in vaginal *Candida* strains isolated from HIV-infected women from Brazil. **Med. Micol.**, v. 43, p. 647-650, 2005.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. **Fungal infection – Diagnosis and management.** London : Blackwell, 1993. Cap.3: Antifungal drugs: 17-43.

RIVAS, P. & SERRANO, R.Q. Utilidad Clínica de las Pruebas de Susceptibilidad Antimicótica. **REVISTA COLOMBIANA DE CANCEROLOGÍA**, p. 34-42, 2003.

RIVERA, J.; FELDMESSER, M.; CAMMER, M.; CASADEVALL, A. Organdependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5027–5030, 1998.

ROBINSON, P. A.; M. BAUER; M. A., LEAL; S. G., EVANS; P. D., HOLTOM; D. A., DIAMOND; J. M., LEEDOM; R. A., LARSEN. Early mycological treatment failure in AIDS-associated cryptococcal meningitis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, p. 82–92, 1999.

RODRIGUES-TUDELA, J.L; MARTIN-DIEZ, F; CUENCA-ESTRELLA, M; RODERO, L; CARPINTEIRO, Y; GORGOJO, B. Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: comparison of the NCCLS standard M27A

medium, buffered yeast nitrogen base, and RPMI-2% glucose. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v.44, p. 400-404, 2000.

RODRIGUES-TUDELA, J.L. Method for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of Fermentative yeast. In: SUBCOMMITTEE ON ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING (AFST) of the ESCMID European COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, Munich, Germany: EUCAST, Jun 2002.

ROGERS, T.R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 27. p. 7-11, 2006.

RUBIN, L.L. The cell biology of the blood-brain barrier. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 22, p. 11-28, 1999.

SAAG, M. S.; J. R. GRAYBILL; R. A. LARSEN; P. G. PAPPAS; J. R. PERFECT; W. G. POWDERLY; J. D. SOBEL.; W. E. DISMUKES. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. **Clin. Infect. Dis**, v. 30, p. 710–718, 2000.

SANGLARD, D. Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 20, p. 462-70, 2002.

SANATI, H.; MESSER S. A.; PFALLER M.; WITT M., ESPINEL-INGROFF A.; GHANNOUM. M. Multicenter evaluation of broth microdilution method for susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* against fluconazole. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, p.1280–1282, 1996.

SERENA, C.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; PASTOR, F.J.; TRILLES, L.; LAZÉRA, M.S.; NOLARD, N.; GUARRO, J. In Vitro Interactions of Micafungin with Other Antifungal Drugs against Clinical Isolates of Four Species of *Cryptococcus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 2994-2996, 2005.

SCHAARS, C.F.; MEINTJES, G.A.; MORRONI, C.; POST, F.A.; MAARTENS, G. Outcome of AIDS-associated cryptococcal meningitis initially treated with 200 mg/day or 400 mg/day of fluconazole. **BMC. Infect. Dis.**, v. 6, p. 118, 2006.

SCHEVEN, M.; SCHWEGLE, F. R. Antagonistic interactions between azoles and amphotericin B with yeasts depend on azole lipophilia for special test conditions in vitro. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 38, p. 371–373, 1995.

SHAO, P.L.; HUANG, L.M.; HSUEH, P.R. Invasive fungal infection — laboratory diagnosis and antifungal treatment. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 39, p. 178-188, 2006.

SHEEHAN, D.J.; HITCHCOCK, C.A.; SIBLEY. C.M. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 40-79, 1999.

SILVA, E.G.; BARONI, F de A.; VIANI, F. C.; RUIZ, L. S.; GANDRA, R.F.; AULER, M. E.; DIAS, A.L.T.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Virulence profile of strains of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* evaluated by experimental infection in BALB/c

mice, and the correlation with exoenzyme activity. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 139-142, 2006.

SOARES, M.C.B.; PAULA, C.R.; DIAS, A.L.T.; CASEIRO, M.M.; COSTA, S.O.P. - Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 47, p. 31-36, 2005.

SOBEL, J.D. Combination therapy for invasive mycoses: evaluation of past clinical trial designs. **Clin. Infect. Dis**, Suppl 4, p. S224-227, 2004.

SOUZA, L.K.H.; FERNANDES, O.F.L.; KOBAYASHI, C.C.B.A.; PASSOS, X. S.; COSTA, C.R.; LEMOS, J.A.; SOUZA-JÚNIOR,¹ A.H.; SILVA, M.R. R. Suscetibilidade antifúngica de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Goiânia, Goiás, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 47, p. 253-256, 2005.

STEENBERGEN, J.N.; CASADEVALL, A. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A) Isolates in New York City. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1974-1976, 2000.

SUGAR, A. M. Use of amphotericin B with azole antifungal drugs: what are we doing? **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 39, p. 1907–1912, 1995a.

SUGAR, A. M.; HITCHCOCK, C. A., TROKE, P. F.; PICARD, M. Combination therapy of murine invasive candidiasis with fluconazole and anphotericin B. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 39, p.598–601, 1995b.

TE DORSTHORST , D. T. A.; VERWEIJ ,P. E.; MELETIADIS , J.; M.; BERGERVOET ,N. C. PUNT; MEIS, J. F. G. M.; MOUTON,J. W. In Vitro Interaction of Flucytosine Combined with Amphotericin B or Fluconazole against Thirty-Five Yeast Isolates Determined by both the Fractional Inhibitory Concentration Index and the Response Surface Approach. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, p. 2982-2989, 2002.

THIPINE, M.; LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. **Transpl. Infect. Dis.**, v. 1, p. 273-283, 1999.

VAZQUEZ, J.; ARGANOZA, M.; VAISHAMPAYAN, J.; AKINS, R. In vitro interaction between amphotericin B and azoles in *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, p. 2511–2516, 1996.

VIUDES, A.; PEMAM, J.; CANTON, E.; LOPES-RIBOT., J; GOBERNADO, M. The Activity of Systemic antimycotic drug combinations. **Rev. Esp. Quimioter.**, v. 14, p. 30-39, 2001.

ZARAGOZA, O.; MIHU, C.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J.D. Effect of amphotericin B on capsule and cell size in *Cryptococcus neoformans* during murine infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 4358-4361, 2005.

YAMAZUMI, T.; PFALLER, M.A.; MESSER, S.A.; HOUSTON, A.K.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R.J.; FURUTA, I.; JONES, R.N. Characterization of Heteroresistance to

Fluconazole among Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 267-272, 2003.

WALSH, T.J.; KASAI, M.; FRANCESCONI, A.; LANDSMAN, D.; CHANOCK, S.J. New evidence that *Candida albicans* possesses additional ATP-binding cassette MDR-like genes: implications for antifungal azole resistance. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 35, p. 133-137, 1997.

WASAN, K. M.; J. S. CONKLIN. Enhanced amphotericin B nephrotoxicity in intensive care patients with elevated levels of low-density lipoprotein cholesterol. **Clin. Infect. Dis.** V.24, p. 78–80, 1997.

WEHN, S.M.; HEINZ, E.R. BURGER, P.C.; BOYKO, O.B. Dilated Virchow-Robin spaces in cryptococcal meningitis associated with AIDS: CT and MR findings. **J. Comput. Assist. Tomogr.**, v. 13, p. 756-762, 1989.