



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATÁLIA DE SOUZA BOTELHO YOSHIZAWA

**ANÁLISE DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS
DE *Cryptococcus gattii sensu lato***

NATÁLIA DE SOUZA BOTELHO YOSHIKAWA

**ANÁLISE DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS
DE *Cryptococcus gattii sensu lato***

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Yoshizawa, Natália de Souza Botelho.

Análise do potencial de virulência de isolados de *Cryptococcus gattii* sensu lato / Natália de Souza Botelho Yoshizawa. - Londrina, 2015.
58 f. : il.

Orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2015.
Inclui bibliografia.

1. *Cryptococcus gattii* - Teses. 2. virulência - Teses. 3. infecção experimental - Teses. I. Yamada Ogatta, Sueli Fumie. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

NATÁLIA DE SOUZA BOTELHO YOSHIKAWA

ANÁLISE DO POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE
Cryptococcus gattii sensu lato

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Prof^a Dr^a Sueli Fumie Yamada
Ogatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra Erika Izumi
Universidade Federal Tecnológica do Paraná -
UTFPR

Prof. Dr. Renan Augusto Ribeiro
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– EMBRAPA

Londrina, 24 de agosto de 2015.

Dedicatória

À minha filha Helena, que me concedeu o título mais importante.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meu marido Juliano, por todo amor, carinho e incentivo nos momentos mais difíceis. À minha querida Helena, pelos sorrisos que derretem meu coração.

À minha irmã Marília, que mesmo de longe, me ajudou com as traduções. Amo muito todos vocês! À Prof.a Dr.a Sueli Fumie Yamada Ogatta por todos esse anos (já são 13!) de orientação e amizade. Nada disso seria possível sem seu apoio.

Aos professores da banca Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni e Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey, presentes também na minha qualificação, agradeço os conselhos, a disposição e a paciência em me auxiliar.

Aos professores convidados Profa. Dra. Erika Izumi e Prof. Dr. Renan Ribeiro, agradeço imensamente sua presença nessa banca. Vocês são muito importantes em minha vida.

Aos Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura e a Profa. Dra. Tania Ueda Nakamura, por me concederem espaço em seu laboratório, pelos conselhos e auxílio em vários momentos desse doutorado.

Aos colegas de laboratório e funcionários da Universidade Estadual de Maringá, pela paciência em me explicar —onde fica o quell e pela ajuda nos experimentos. Em especial, à minha amiga querida Vanessa Kaplum, obrigada por compartilhar seus conhecimentos e ceder um pouco do seu tempo durante os meus trabalhos. Sua amizade foi uma das melhores surpresas desses 4 anos.

À amiga Samara Mireza Correa Lemos, seu auxílio durante minha gravidez foi inestimável. Obrigada pela amizade, pelas lâminas coradas e pelo apoio de sempre.

À amiga Aline Chotte de Oliveira, por tudo! Não tenho palavras para descrever sua importância em nossas vidas e em todo esse processo... Obrigada pelo carinho, amizade, paciência, conselhos, auxílio inestimável...

Agradeço a Deus, pela oportunidade que me foi dada, por eu ter uma família maravilhosa, e por todas essas pessoas já citadas, que fazem a minha vida ser cada vez mais feliz.

YOSHIZAWA, Natália de Sousa Botelho. **Análise do potencial de virulência de isolados de *Cryptococcus gattii sensu lato***. 2015. 58 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

A criptococose é uma doença fúngica que atinge mais de um milhão de pessoas no mundo todo, sendo os principais agentes causadores *Cryptococcus neoformans* e *C.gattii*, que estão amplamente distribuídos pelos mais diversos ambientes. Esse trabalho teve como objetivo analisar os fatores de virulência (produção de cápsula, melanina, crescimento a 37°C e produção de enzimas), determinar o perfil de sensibilidade à anfotericina B e à nanopartículas de prata biológicas de isolados ambientais e clínicos de *Cryptococcus gattii*. Além disso, também foi realizada infecção experimental em camundongos BALB/c e análises histológicas dos órgãos infectados. Todos isolados apresentaram cápsula, apenas dois não apresentaram produção de melanina. Todos isolados cresceram a 37°C, porém, nenhum isolado estudado apresentou elevada produção das enzimas analisadas (proteases e fosfolipases). A concentração inibitória de anfotericina B variou de 0,25 a 8 µg/mL, sendo um isolado de origem ambiental classificado como resistente a este antifúngico (CIM > 16 µg/mL). As CIMs das nanopartículas de prata variaram de 0,39 a 200 µM. Para a infecção experimental foi utilizada a via nasal para inoculação das leveduras nos camundongos. Os animais infectados apresentaram sintomas como pelo eriçado, dificuldade em abrir os olhos, movimentos repetitivos de coçar e andar em círculos, indicando alterações no sistema nervoso central. Durante o período de observação (60 dias) 12,8% dos animais foram a óbito. Em conclusão, os diferentes isolados de *C. gattii*, independente da origem, expressam fatores de virulência e são capazes de desenvolver infecção em camundongo imunocompetente. Outras análises devem ser conduzidas para esclarecer os mecanismos envolvidos na patogênese de *C. gattii* e dessa forma desenvolver novas estratégias de controle da criptococose.

Palavras-chave: *Cryptococcus gattii*. Virulência. Infecção experimental.

YOSHIZAWA, Natália de Sousa Botelho. **Analysis of the virulence potential of *Cryptococcus gattii sensu lato* isolates.** 2015. 58 p. Thesis (Doctoral degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Cryptococcosis is a fungal disease that afflicts more than one million people in the world. Its etiological agents are *Cryptococcus neoformans* and *C.gattii*, which are widely distributed over diverse environment. The aim of this study was to analyze virulence factors (capsule and melanin production, growth at 37°C, enzyme production) of environmental and clinical samples of *C.gattii*, and their susceptibility to Amphotericin B and to silver nanoparticles. Besides that, we performed an experimental infection in Balb/c mice and histological analyzes of infected organs. All isolates presented capsule and only 2 did not presented melanin pigment. All samples grew at 37°C, but there was no significant proteases or phospholipases production. Minimum inhibitory concentration (MIC) of Amphotericin B varied from 0.25 to 8.0 µg/mL and one isolate presented resistance to this substance. Silver nanoparticles MIC varied from 0.39 a 200 µM. Mice were infected through the nose. Mice infected with *C.gattii* isolates presented symptoms as rough fur, difficult in open their eyes, repetitive movements of scratching and walking in circles. These symptoms are related to anomalies at the Central Nervous System. Some mice (12.8%) died during 60 days of observation. In conclusion, regardless of their origins (environmental or clinical), *C.gattii* isolates express virulence factors and are capable to induce infection in healthy mice. More analyses must be conducted to clarify the mechanisms involved in the pathogenesis of *C.gattii* and develop new strategies to control criptococosis.

Keywords: *Cryptococcus gattii*. Virulence. Experimental infection.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nova nomenclatura proposta por Hagen e colaboradores (2015).....	17
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características morfológicas de <i>Cryptococcus</i> spp.....	15
Figura 2: Distribuição global de <i>C.gattii</i> , de acordo com CDC	18
Figura 3: Representação esquemática da estrutura capsular	20
Figura 4: Pigmento castanho produzido em meio Agar Níger, devido à atividade de fenoxidase de isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	21
Figura 5: Tipos de colônias obtidas a partir da amostra SB4	22
Figura 6: Microscopia óptica de biofilme <i>in vitro</i> de <i>C.neoformans</i>	23
Figura 7: Lesão cerebral devido à infecção por <i>C.gattii</i>	24
Figura 8: Lesões de pele em paciente com HIV e criptococose disseminada.....	25
Figura 9: Placas contendo meio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol)	26
Figura 10: Micrografia confocal de sangue periférico humano, evidenciando monócitos contendo <i>Cryptococcus</i> fagocitados	27
Figura 11: Levedura capsulada sendo fagocitada por dois macrófagos	27

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	16
2.1.	Objetivo geral.....	16
2.2.	Objetivos específicos.....	16
3.	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1.	O gênero <i>Cryptococcus</i>	17
3.1.1	<i>Cryptococcus gattii</i>	20
3.1.2.	Fatores de virulência.....	21
3.2.	Criptococose.....	25
3.2.1.	Sintomas e diagnóstico	26
3.2.2.	Tratamento e resistência	30
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
5.	REFERÊNCIAS.....	34
6.	Anexo I – Artigo Análise do potencial de virulência de isolados de <i>Cryptococcus gattii sensu lato</i>	41

1. INTRODUÇÃO

A criptococose é uma doença fúngica que atinge mais de um milhão de pessoas no mundo todo, causando aproximadamente 625.000 mortes/ano. A mortalidade por criptococose é estimada em 10% nos países desenvolvidos chegando a 43% nos países em desenvolvimento, em um tempo médio de sobrevida de 14 dias. Os principais agentes etiológicos são *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que estão amplamente distribuídos pelos mais diversos ambientes (Antinori, 2013; Cogliati, 2013; Pappas, 2013).

C. neoformans e *C. gattii* possuem ciclos de vida saprófitos (no ambiente, no solo, árvores...) e parasitários (hospedeiros humanos e animais). Esses fungos produzem propágulos (esporos ou as próprias leveduras secas) que se espalham no ambiente e entram no hospedeiro através do sistema respiratório. A partir daí, se propagam pelo interior do organismo. *C. neoformans* atinge preferencialmente o sistema nervoso central, causando meningoencefalite, muitas vezes fatal (Bahn, Jung, 2013).

Cryptococcus spp. apresentam diversos fatores de virulência, como a cápsula polissacarídica (Omeara, 2012), capacidade de produzir melanina (Liu, 2009), habilidade para crescer a 37°C, e expressão de enzimas, como fosfolipase e urease (Vecchiarelli, 2013).

O modelo animal é uma ferramenta extremamente importante, já que permite estudar a patogênese, a resposta imunológica e o avanço terapêutico, o que não pode ser realizado em humanos. Os mais utilizados são modelos murinos (ratos e camundongos) e possuem numerosas vantagens, como a disponibilidade de reagentes imunológicos, animais geneticamente definidos, facilidade de manipulação e custo relativamente baixo. Dessa forma, são necessários nos primeiros estágios do desenvolvimento de substâncias antifúngicas (Clemons, Stevens, 2012).

Existem diversos relatos na literatura sobre infecção experimental em camundongos com isolados de *C. neoformans* e *C. gattii*, com o principal objetivo de diferenciar os processos infecciosos entre as duas espécies. Vários autores concordam que a virulência de *C. gattii* em infecções experimentais é relativamente maior do que *C. neoformans*. Porém há discordância com relação ao desenvolvimento da infecção e os órgãos afetados. Thompson e colaboradores (2012) realizaram a inoculação intracraniana de *C. neoformans* e *C. gattii*, observando que os camundongos infectados com *C. gattii* morreram mais rapidamente. As análises histopatológicas mostraram grande quantidade de leveduras no cérebro dos animais, e

maiores danos teciduais nos que foram infectados com *C. gattii*. Já no trabalho descrito por Okubo e colaboradores (2013b), onde a via de infecção foi a respiratória, os órgãos mais lesados pelas amostras de *C. gattii* foram os pulmões. Assim como no trabalho realizado por Ngamskulrunroj e colaboradores (2012), usando a via intraperitoneal. Os autores ainda sugerem que *C. gattii* possui algum mecanismo desconhecido para evadir do reconhecimento dos macrófagos, o que contribui para sua virulência.

A criptococose vem sendo alvo de estudos por todo o mundo. Interessante notar que tanto isolados clínicos quanto ambientais apresentam potencial virulento (Hagen, 2015), dessa forma, o conhecimento sobre formas de contágio e patogenia são importantes para evitar a propagação da doença.

C. neoformans e *C. gattii* apresentam um mecanismo adaptativo de tolerância aos antifúngicos, sendo naturalmente resistentes aos azóis (Sionov, 2013). Dessa forma, o tratamento recomendado para doença pulmonar severa, doença do sistema nervoso central ou criptococemia é Anfotericina B e 5p-fluocitosina. Mesmo sendo o antifúngico de escolha, o uso de Anfotericina B é complicado, devido aos efeitos adversos e nefrotoxicidade, que podem aumentar a mortalidade. Assim, em casos menos severos, podem ser usados fluconazol, em associação com itraconazol e posaconazol (Smith, 2014; Antinori, 2013; Bajwa; Kulshrestha, 2013).

O diagnóstico diferencial é importante tanto para a epidemiologia da doença quanto para melhorar as condições de tratamento dos pacientes. Além dos testes bioquímicos e moleculares, a análise dos tecidos infectados por técnicas histopatológicas é essencial para que possam ser obtidos mais detalhes sobre a interação entre as leveduras e as células do hospedeiro. E, dessa forma, conhecer melhor o desenvolvimento da doença e sugerir novas formas de tratamento (Okubo, 2013a).

Em uma publicação recente, Hagen e colaboradores (2015) utilizando análises filogenéticas, propuseram uma nova classificação do complexo *C. neoformans/C. gattii*, reconhecendo *C. neoformans var. grubii* e *C. neoformans var. neoformans* como duas espécies distintas e ainda cinco novas espécies além de *C. gattii*. De acordo com os autores, as novas espécies diferem com relação a patogenicidade, prevalência e características bioquímicas e fisiológicas. Dessa forma, são necessários mais estudos para se caracterizar de forma adequada essas diferentes espécies.

No presente trabalho, analisamos *C. gattii* isolados do meio ambiente e provenientes de pacientes com criptococose. Realizamos testes para caracterizar o potencial virulento dessas leveduras, como produção de melanina e cápsula, sua sensibilidade frente à Anfotericina B e nanopartículas de prata. Além disso, através de

infecção experimental em camundongos, comparamos o desenvolvimento da criptococose causada por *C. neoformans* e *C. gattii*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar o potencial virulento de isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus gattii sensu lato*

2.2. Objetivos específicos

Analisar fatores de virulência como: produção de cápsula e melanina, produção de enzimas hidrolíticas e crescimento a 37°C;

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados clínicos e ambientais frente ao antifúngico Anfotericina B e Nanopartículas de prata;

Realizar infecção experimental em camundongos pela via intraperitoneal, de forma a observar a progressão da doença e os sintomas relacionados a criptococose

Analisar alterações histológicas dos órgãos afetados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. O gênero *Cryptococcus*

As leveduras deste gênero apresentam formas globosas ou ovais, medindo cerca de 3 a 8 μm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo, de colo estreito, e envolvidas por uma cápsula mucopolissacarídica (Figura 1A). Em meio de cultura Sabouraud Dextrose, apresenta-se como colônia de cor branca a creme, brilhante, de textura mucoide, margem lisa e inteira, crescendo a temperatura de 25 a 37°C (Consenso em Criptococose, 2008) (Figura 1B). As espécies consideradas como patógenos humanos são *C. neoformans* e *C. gattii*, que correspondem à forma assexuada de basidiomicetos zoopatógenos.

Devido à ocorrência de vários casos, de acordo com o Consenso em criptococose (2008), passaram a ser considerados como patógenos emergentes em pacientes imunocomprometidos as seguintes espécies: *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus humicola* e *Cryptococcus curvatus*. As manifestações clínicas variam de lesões cutâneas a fungemia. Estas infecções são, em muitas vezes, hospitalares e associadas ao uso de cateter venoso e neutropenia.

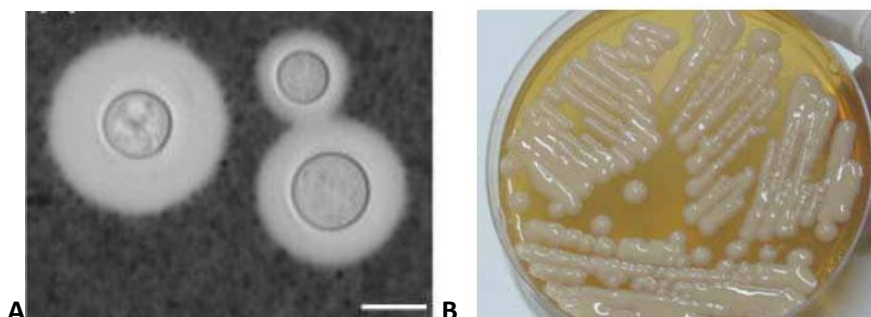


Figura 1: Características morfológicas de *Cryptococcus* spp. **A:** Preparação de *C. neoformans* com tinta nanquim, evidenciando a presença de cápsula (Duin, 2004). **B:** Colônias de *C. neoformans* em meio Sabouraud (Nasser, 2011).

C. neoformans foi descrito pela primeira vez em 1894, por Otto Busse, que isolou o microrganismo a partir de uma paciente com lesão na tíbia.

Essa levedura pode ser encontrada em todo mundo, em diversos locais, como solo, árvores, animais e, principalmente em fezes de aves em ambientes urbanos. Cerca de 80% das crianças que residem em cidades já entraram em contato com *C. neoformans* e não apresentaram nenhuma manifestação clínica (Coelho, 2014).

No passado, *C. gattii* era considerado um subtipo de *C. neoformans*, porém as duas espécies foram separadas baseando-se em diferenças como distribuição geográfica, nichos ecológicos, epidemiologia, patofisiologia, sintomas clínicos e características moleculares. Com a utilização de técnicas modernas de biologia molecular, a taxonomia e filogenia de *C. gattii* vêm se modificando ao longo dos anos. Muitos fatores de virulência são comuns entre *C. gattii* e *C. neoformans*, porém, alguns estudos revelaram que, apesar de terem o genoma semelhante, possuem transcriptomas diversos e apresentam fenótipos de virulência diferentes. *C. gattii* VGII, por exemplo, causa doença pulmonar severa, enquanto *C. neoformans* se dissemina pelo SNC (Chen, 2014).

A espécie *C. neoformans* é classificada em duas variantes, *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D), que podem se recombinar formando a variedade híbrida AD. *C. gattii* é classificada em 2 sorotipos, B e C. A maioria das infecções (95%) é causada por microrganismos mais virulentos, pertencentes ao sorotipo A. O sorotipo D é considerado menos virulento, e em algumas áreas do continente africano 20% dos isolados são classificados como esse sorotipo (Feretzaki, 2014; Park, 2014).

Hagen colaboradores (2015) questionaram esse modelo anterior de classificação das leveduras em um complexo *C. neoformans/C. gattii*, baseados nas diferenças genótípicas e fenotípicas dos subtipos (ou espécies) pertencentes a esse complexo. Os autores reorganizaram o complexo em sete espécies, sendo cinco delas pertencentes ao antigo grupo de *C. gattii*. A Tabela 1 expõe a nova nomenclatura e algumas características das novas espécies.

C. neoformans é altamente incidente em países europeus e na América do Norte, enquanto que *C. gattii* tem maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais. No ambiente, essas leveduras podem ser encontradas no solo, juntamente com plantas e fezes de pássaros em decomposição. No Brasil, já foram isoladas amostras tanto de áreas rurais quanto urbanas, inclusive do interior de bibliotecas (Teodoro, 2013; Leite, 2012).

No Brasil, alguns estudos descreveram o isolamento de *Cryptococcus* spp. em amostras ambientais, tais como de excretas de aves (Silva; Capuano, 2008, Machado, 1993). Takahara e colaboradores (2013) encontraram uma positividade de 17% em amostras recolhidas do solo de residências e 25% em amostras provenientes de igrejas. De acordo com Bulmer (1990) um dos problemas é a longa viabilidade, aproximadamente 2 anos, de *C. neoformans* em excretas secas de aves.

Além de igrejas e residências, as praças, muito comuns em todas as cidades brasileiras, também se tornaram um ambiente propício à presença de *Cryptococcus*

sp. Reolon e colaboradores (2004) analisaram 88 amostras ambientais de praças na cidade de Porto Alegre, e obtiveram 100% de positividade para a presença de *Cryptococcus* sp. Em Cuiabá, Takahara e colaboradores (2013) também isolaram *Cryptococcus* sp, mostrando que essa espécie se adaptou aos diferentes ambientes e climas do nosso país.

Tabela 1: Nova nomenclatura proposta por Hagen e colaboradores (2015).

Nomenclatura atual	PCR-fingerprinting/ RFLP-genotype ^e (Meyer, 2003)	Nova nomenclatura proposta por Hagen (2015)
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> ^a	VNI VNII	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> ^b	VNIV	<i>Cryptococcus deneoformans</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i> intervariety hybrid ^d	VNIII	<i>Cryptococcus neoformans</i> X <i>Cryptococcus</i> <i>deneoformans</i> hybrid
<i>Cryptococcus gattii</i> ^c	VGI VGIII VGII VGIV VGIV ^f /VGIIIc ^g	<i>Cryptococcus gattii</i> <i>Cryptococcus bacillisporus</i> <i>Cryptococcus deuterogattii</i> <i>Cryptococcus tetragattii</i> <i>Cryptococcus decagattii</i>

^aApresentado por Franzot e cols. (1999) para isolados tipo A.

^bApresentado por Franzot e cols. (1999) para isolados tipo D.

^cApresentado por Kwon-Chung e cols. (2002) para elevar *C. neoformans* var. *gattii* ao nível de espécie.

^dDescrito por Bovers e cols. (2006).

^eNomenclatura baseada em PCR-fingerprinting e RFLP-genotipagem, apresentada por Meyer *et al.* (2003).

^fTrilles e cols. (2014) baseado em URA5-RFLP.

^gSpringer e cols. (2014) baseado em MLST.

3.1.1 *Cryptococcus gattii*

C. gattii foi isolado pela primeira vez de uma planta, *Eucalyptus camaldulensis*, na Austrália e desde então tem sido de outras espécies de plantas em diferentes países (Teodoro, 2013). Até o surto ocorrido em Vancouver, Canadá a partir de 1999, *C. gattii* era encontrado exclusivamente em ambientes de clima tropical e subtropical. Esse surto resultou em 200 casos e 8 mortes até 2006.

A criptococose por *C. gattii* já foi registrada no Peru, Colômbia, Argentina, Venezuela, Brasil, Austrália, Nova Guiné, países da África Central, sudeste da Ásia, México e algumas regiões dos Estados Unidos (Figura 2). No Brasil, existem registros de criptococose por *C. gattii* do sistema nervoso central em adultos jovens e crianças das regiões norte e nordeste, com letalidade de 35 a 40%, sendo considerada endêmica em regiões da Amazônia (Hagan, 2014; Nascimento, 2014; Marques, 2012; Chaturvedi Chaturvedi, 2011; Consenso em Criptococose, 2008).

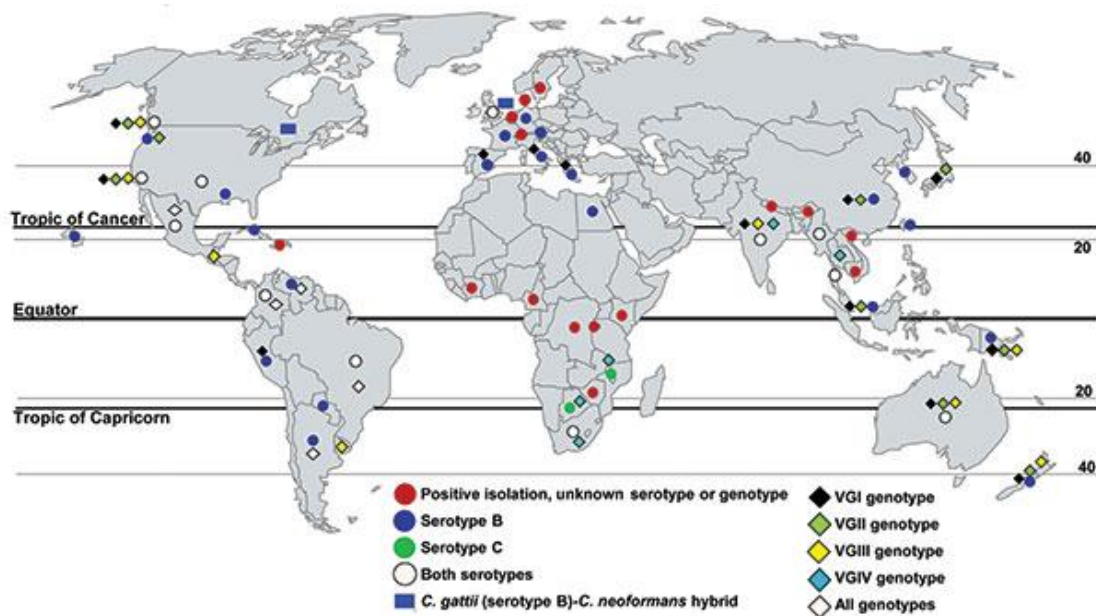


Figura 2: Distribuição global de *C.gattii*, de acordo com CDC, Janeiro de 2010. (Springer, Chaturvedi, 2010).

Além dos casos em humanos, o número de animais domésticos infectados por *C. gattii* aumentou significativamente após o primeiro relato de criptococose (Gullo, 2013; Cheng, 2009). Um laboratório veterinário em Columbia Britânica relatou 313 casos de animais infectados por *C. gattii*, principalmente cães e gatos, mas também

cavalos, furões e pássaros, no período de 2004 a 2006 e 218 casos humanos de 1997 a 2007 (Lester, 2001). De acordo com Hagen (2013) foram contabilizadas 19 mortes de seres humanos até a data de seu estudo devido à infecção por *C. gattii* na ilha de Vancouver. A partir desse evento, médicos e pesquisadores do mundo todo passaram a estudar formas de diagnóstico diferenciado para *C. gattii* e a desenvolver novos esquemas de tratamento.

3.1.2. Fatores de virulência

As duas espécies de *Cryptococcus* descritas neste trabalho possuem diversos fatores de virulência que permitem a invasão, sua sobrevivência e replicação no organismo hospedeiro. Alguns estudos apontam que essa virulência originou-se inicialmente a partir da pressão seletiva do ambiente, já que ambas as espécies são saprófitos ambientais, sendo o ser humano um hospedeiro acidental e não seu nicho ecológico primário (Casadevall, 2013). Os principais fatores são:

- a) Cápsula: a cápsula presente nas células de *C. neoformans* é composta por polissacarídeos complexos, transportados por meio de vesículas e, por ligações não covalentes, aderem-se à superfície celular, formando longos polímeros. A figura 3A mostra uma representação esquemática da cápsula, proposta por Frases e colaboradores (2009). Análises bioquímicas mostraram que a cápsula é composta principalmente por glucuronoxilomanana e glucuronoxilomananogalactana (Fonseca, 2010). De acordo com os autores, na porção mais radial, a cápsula apresenta uma formação difusa (Fig.3B), que interage com a tinta nanquim, levando a visualização de bordas não definidas (Fig. 3C) no microscópio óptico. A principal função dessa estrutura está relacionada a sobrevivência no ambiente, protegendo contra dessecação. Durante o processo infeccioso, a cápsula evita a fagocitose pelos macrófagos. Além disso, a presença da cápsula é essencial para a formação de biofilme, pois contribui na adesão da levedura sobre as mais diversas superfícies (Vecchiarelli, 2013).

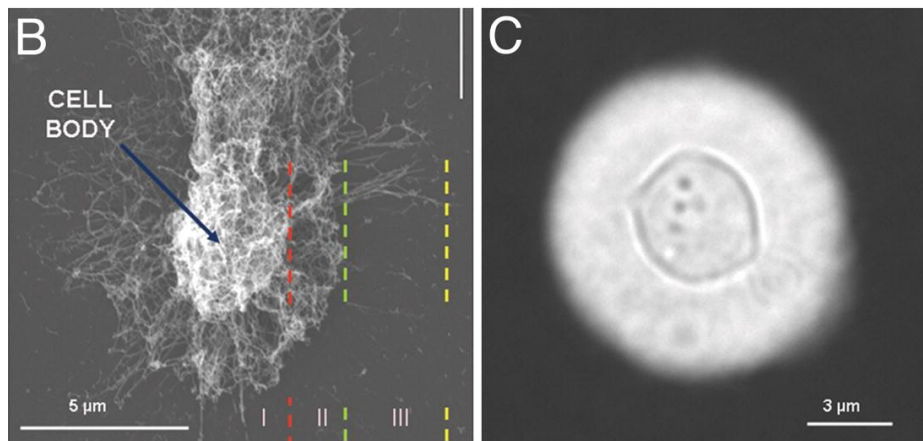
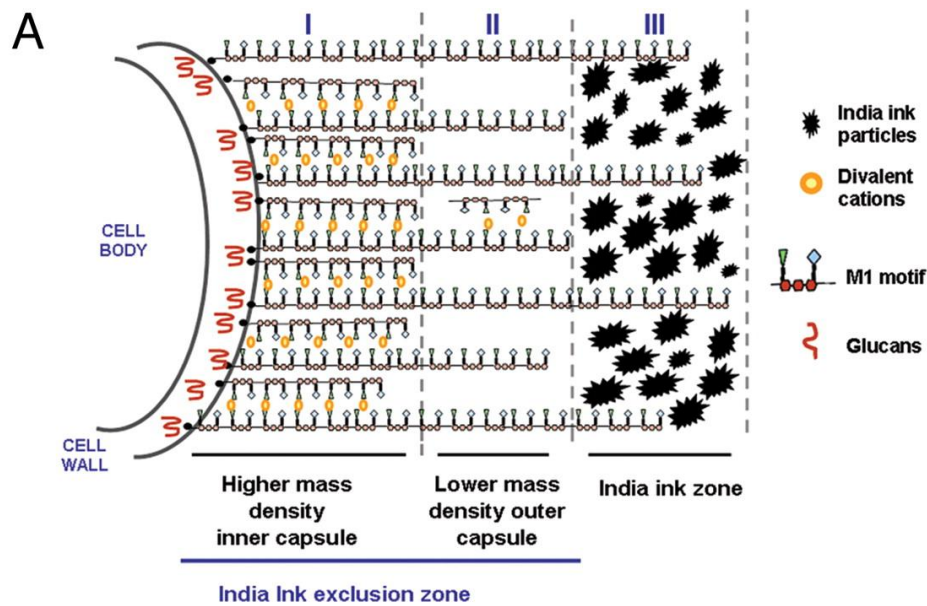


Figura 3: **A:** Representação esquemática da estrutura capsular de *Cryptococcus neoformans*. Nesse modelo proposto por Frases e colaboradores (2009), a cápsula divide-se em 3 zonas, formadas por fibras polissacarídeas glucuronoxilomananas e glucuronoxilomananogalactanas. As fibras se ligam a parede celular por interações não covalentes. Para explicar porque a densidade capsular diminui de acordo com o raio da célula, os autores propõem a existência de 2 populações diferentes de moléculas GMX: as maiores, que percorrem toda a extensão da cápsula e moléculas menores que se ligam a essas maiores e são mais frequentes e próximas à parede celular, contribuindo para a maior densidade dessa região, denominada no esquema como região I. **B:** Microscopia eletrônica de uma célula de *C. neoformans*, onde as zonas I e II da cápsula são evidenciadas pela densidade das fibrilas. **C:** *C. neoformans* em tinta nanquim. De acordo com o modelo proposto em A, a zona II termina em contato com o corante. Existe uma região mais difusa, no final da cápsula, que representa a zona III (Frases, 2009).

- b) Capacidade de crescimento a 37°C: a habilidade de crescimento a 35-37°C está diretamente relacionada ao potencial de disseminação do fungo no organismo do

hospedeiro. No gênero *Cryptococcus*, várias espécies produzem fatores de virulência, como cápsula e melanina, porém apenas as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de sobreviver e proliferar em temperaturas acima de 30°C (Glazier, Panepino, 2014).

- c) Produção de melanina: A produção de melanina que se deposita na parede do fungo ocorre a partir de substratos contendo dopamina e da ação de enzimas catalisadoras como a fenoloxidase. O cérebro é rico em substratos para a fenoloxidase tais como a dopamina e essa poderia ser a razão da propensão destes organismos em infectarem o sistema nervoso (Consenso em Criptococose, 2008). *C. neoformans* produtores de melanina são mais invasivos e sobrevivem ao sistema imunológico, resistindo à fagocitose. Experimentos *in vitro* mostraram que a melanina também interfere na ação e eficácia de agentes antifúngicos. O pigmento, de carga negativa, neutraliza a atividade de neutrófilos e peptídeos catiônicos, além de se ligar avidamente à anfotericina B e caspofungina. A produção de melanina pode ser evidenciada a partir de semeadura em meio Agar Níger (Figura 4), que contém tirosina e ácido clorogênico como substratos para ação da enzima fenoloxidase (Gomes, 2010; Liu, Nizet, 2009).

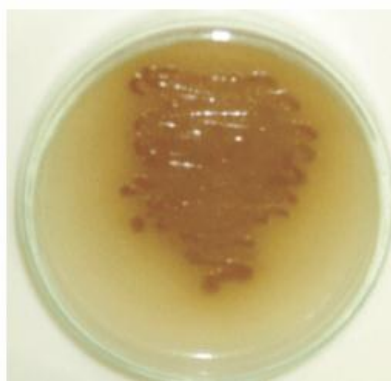


Figura 4: Pigmento castanho produzido em meio Agar Níger, devido à atividade de fenoloxidase de isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Gomes, 2010).

- d) *Switching* fenotípico: o termo *switching* fenotípico refere-se a um mecanismo adaptativo caracterizado por mudanças estruturais da cápsula e parede celular. A modificação para uma forma mais mucoide está associada a maior virulência em *C. neoformans* (Figura 5). Também já foi relatado o *switching* fenotípico reversível em *C. gattii*. Logo após a infecção, a forma mucoide é a mais predominante, entretanto, rapidamente ocorre uma modificação para a forma lisa, caracterizada por diminuição do polissacarídeo capsular, o que facilita a passagem pela barreira hematoencefálica e

disseminação no cérebro (Dixit, 2009). As colônias podem se apresentar morfologicamente como (Figura 5): tipo W (*wrinkled*), tipo S (*smooth*) e tipo C (*serrated*). Camundongos infectados com o tipo W morreram mais rapidamente, e a resposta inflamatória em ratos infectados foi na ordem de C>S>W, indo de uma intensa inflamação granulomatosa com necrose caseosa, quando presente o tipo C até uma inflamação mínima, quando presente o tipo W (Goldman, 1998).



Figura 5: Tipos de colônias obtidas a partir do isolado SB4 de *Cryptococcus neoformans*. A: colônias tipo W (*wrinkled*). B: colônias tipo S (*smooth*) revertentes das colônias tipo C (*serrated*). C: colônias do tipo W revertentes das colônias tipo C (aumento de 4x), (Goldman, 1998).

- e) Produção de enzimas: alguns estudos mostraram que *C. neoformans* e *C. gattii* secretam proteases e urease que alteram a integridade da barreira hematoencefálica, facilitando a invasão do sistema nervosa central (Feder, 2015; Xu, 2014; Pessoa, 2012).

Fosfolipases são enzimas que degradam glicerofosfolídeos, resultando em desestabilização das membranas e lise celular. Estudos ultraestruturais mostraram que as fosfolipases desempenham papel tanto extracelular (degradando tecidos) e intracelular (rompendo compartimentos intracelulares de células fagocíticas, onde as leveduras são internalizadas) (Cox, 2001; Chen, 1997).

- f) Biofilme (Figura 6): biofilmes fúngicos são formados por comunidades microbianas associadas a uma matriz extracelular e seu desenvolvimento é controlado por moléculas de sinalização. Essas estruturas estão associadas a infecções com alto índice de resistência aos medicamentos e alta mortalidade (Cordeiro, 2013). Martinez e Casadevall (2006) avaliaram a ação de anfotericina B, caspofungina, voriconazol e fluconazol e relataram que as células fúngicas planctônicas eram mais sensíveis do que o biofilme a todos os medicamentos. Biofilmes formados por *Cryptococcus* sp. já foram encontrados colonizando equipamentos médicos e em casos de criptococose humana (Robertson, Casadevall, 2009).

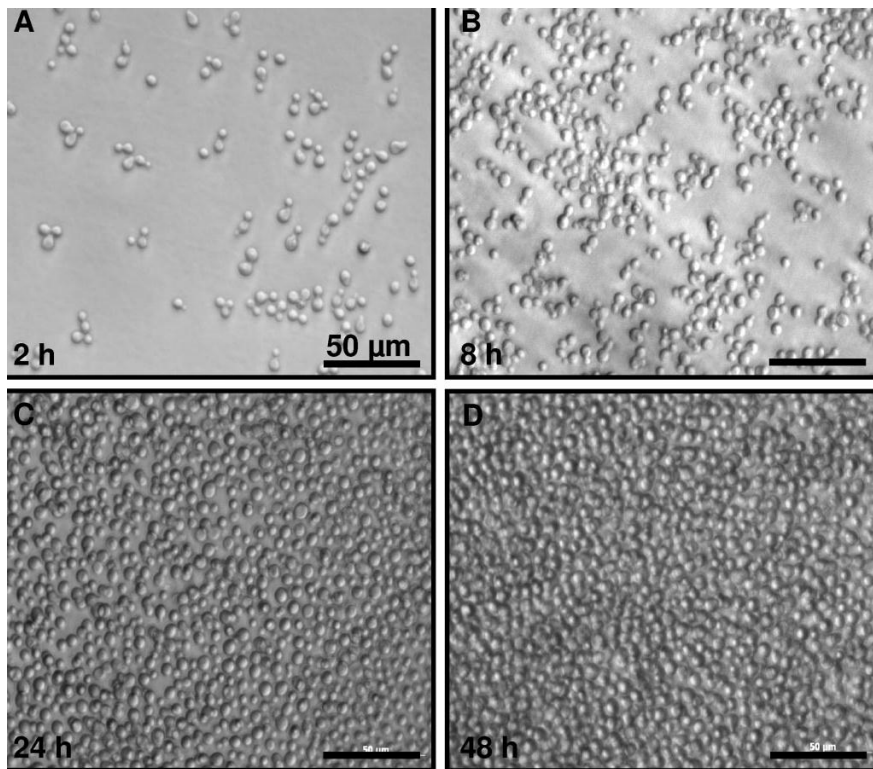


Figura 6: Microscopia óptica de biofilme *in vitro* de *Cryptococcus neoformans*. **A:** fase de adesão (2h). Nessa fase, o biofilme é composto de células sem brotamento ou crescimento em uma camada única; **B:** Fase intermediária (8h). Após a adesão, as células começam a formar microcolônias de células unidas. C e D: fase de maturação (24 a 48h), forma-se uma densa rede de células ligadas a uma matriz polimérica extracelular. Nesta fase, o biofilme consiste em várias camadas de células (Martinez, Casadevall, 2006).

3.2. Criptococose

Em 1970, a criptococose foi descrita como “o gigante adormecido” entre as micoses sistêmicas. Oito anos depois, cientistas concluíram que essa micose não estaria “adormecida” e seria, na verdade, o “gigante acordado”, graças a sua alta mortalidade e morbidade. Desde 1987, permanece como a micose sistêmica com maiores taxas de mortalidade (Negroni, 2012).

Ocorrem aproximadamente 1 milhão de casos de criptococose pelo mundo, sendo estimadas 650 mil mortes anualmente. É considerada a infecção fúngica sistêmica mais comum e a terceira complicação mais frequente em pacientes com AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). A maioria das pessoas afetadas pela doença é soropositiva, em estado avançado de imunodeficiência, mas há um número cada vez maior de criptococose entre pacientes transplantados (ou que recebem imunossupressores), pacientes com imunodeficiência inata ou até mesmo pessoas imunologicamente saudáveis (Marukitira, 2014; Cogliati, 2013; Pappas, 2013). De fato,

existem cada vez mais relatos de criptococose em pacientes imunocompetentes (Bothra, 2014; Goldman, 2010). Brizendine e colaboradores (2013) em uma análise dos pacientes diagnosticados com criptococose entre 1996 e 2010 relataram que dentre esses, 36% eram soropositivos, 28% eram transplantados e 36% eram considerados imunologicamente saudáveis.

3.2.1. Sintomas e diagnóstico

Cryptococcus sp. encontra-se distribuído por todo o mundo e existe em altas concentrações nas fezes secas de pássaros, principalmente pombos e galinhas. Porém, a infecção pode ocorrer, mesmo sem haver o contato direto com as aves. A infecção por *Cryptococcus* sp. inicia-se usualmente pela inalação dos esporos presentes no ambiente. Os esporos depositados nos alvéolos ativam a resposta imunológica levando a uma infecção assintomática e a formação de granulomas pulmonares ou nos linfonodos (Coelho, 2014; Patel, 2013, Warkentien, Crum-Cianflone, 2010).

Em indivíduos imunocomprometidos, o fungo se espalha a partir dos pulmões para o sistema nervoso central (SNC), causando meningoencefalite, que pode ser fatal (Figura 7). A passagem pela barreira hematoencefálica provavelmente ocorre por transcitose, ou seja, penetração transcelular através de células endoteliais microvasculares, sendo essa uma das possíveis funções da cápsula. Alguns estudos mostraram que a severidade da infecção está relacionada à falta de resposta imune do hospedeiro, resultando em baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias que são cruciais para controlar a dispersão do fungo pelo organismo (Srikanta, 2014; Dixit, 2009).

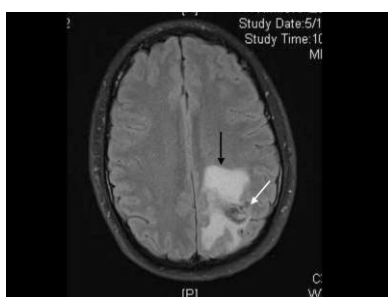


Figura 7: Lesão cerebral devido a infecção por *Cryptococcus gattii* (Goldman, 2010).

As manifestações clínicas mais comuns da criptococose envolvem os pulmões e o SNC, porém a infecção pode comprometer também outros órgãos. O local da

infecção varia de acordo com o sorotipo de *Cryptococcus* spp. e a imunocompetência do hospedeiro. Os sintomas pulmonares são pneumonia aguda ou granulomas não calcificados. Alguns pacientes podem desenvolver tosse persistente ou dispnéia, devido à pneumonia crônica (Warkentien, Crum-Cianflone, 2010).

Pacientes imunologicamente saudáveis tendem a apresentar achados mais localizados, como granulomas com infiltração de monócitos. Os indivíduos imunossuprimidos têm propensão a desenvolver uma infecção multifocal ou difusa, com ausência de inflamação mononuclear ou granulomas (Pappas, 2013).

Sintomas oculares (edemas, perda parcial ou total da visão, paralisia do nervo ocular) são detectados em mais de um terço dos pacientes com criptococose do SNC. Infecção cutânea é rara, e aparece como um tubérculo, nódulo ou abscesso no local da penetração do fungo (quando a infecção se inicia por um trauma na pele), como mostrado na Figura 8. Lesões na pele são observadas em 6% dos pacientes com AIDS e criptococose disseminada (Negroni, 2012).



Figura 8: Lesões de pele em paciente com HIV e criptococose disseminada (Negroni, 2012).

Colombo e colaboradores (2012) analisaram 4824 autopsias, realizadas entre 2000 e 2009, em São José do Rio Preto, SP. Criptococose foi a infecção fúngica mais prevalente entre as causas de morte relatadas, sendo o pulmão a região anatômica mais afetada.

O diagnóstico é feito a partir de uma variedade de materiais biológicos, como líquido, urina, lavado broncoalveolar, raspados de lesões cutâneas ou fragmentos de tecidos. O exame direto com tinta da China evidencia a cápsula, confirmando a infecção por *C. neoformans*. O isolamento da levedura em cultura é feito em meios isentos de ciclo-heximida, incubados a 30-32°C. A identificação é feita mediante provas morfológicas, produção de urease e fenoloxidase em meios diferenciais (L-dopa, sementes de girassol ou alpiste), assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio (Lester, 2011; Pedroso, Candido, 2006).

O meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (ágar CGB) pode ser usado para diferenciar entre *C. neoformans* e *C. gattii* de forma eficaz, para fins epidemiológicos e especificidade de tratamento, como mostrado na figura 9 (Lester, 2011; Gomes, 2010). A cor azul é resultado de mudança para o pH alcalino, quando a creatina é degradada em amônia, o que ocorre somente na presença de *C. gattii*.

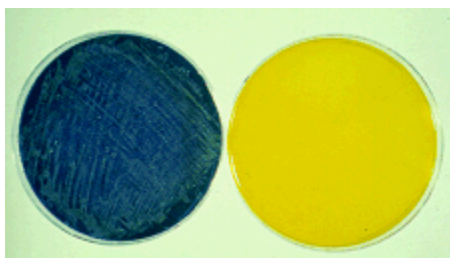


Figura 9: Crescimento de *Cryptococcus gattii* em meio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol). A degradação enzimática de creatina em amônia promove a alteração de cor do meio de cultura de amarelo para azul, indicando uma reação positiva para esta espécie.

O diagnóstico laboratorial de criptococose é feito, na maioria das vezes, a partir do teste de aglutinação em látex por antígenos capsulares. Esse teste apresenta 90% de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de meningite criptocócica. O antígeno-teste pode ser obtido tanto do fluido cérebro-espinhal quanto do soro (Badiie, Hashemizadeh, 2014; Warkentien, Crum-Cianflone, 2010).

A identificação da criptococose por ensaios histopatológicos é baseada na micromorfologia e nas características das células de *Cryptococcus* spp. Podem ser usados diversos corantes, como hematoxilina-eosina ou prata de Grocott. Existem também algumas técnicas especiais, como método mucicarmina de Mayer, que cora a cápsula, e o procedimento Fontana-Masson, que evidencia a melanina presente no fungo (Gazzoni, 2010).

C. gattii é considerado mais virulento do que *C. neoformans*, causando lesões múltiplas nos pulmões e cérebro dos pacientes. Meningoencefalite causada por *C. gattii* responde devagar a terapia padrão, dessa forma, a diferenciação entre os dois microrganismos deve ser feita de forma cuidadosa, para potencializar o tratamento (Chaturvedi, Chaturvedi, 2011).

A resposta protetora contra *C. neoformans* é a do tipo Th1, mediada por células CD4, NK e T helper, além de TNF- α e citocinas IL-12, IFN- γ . Os neutrófilos desempenham atividade fungicida pela oxidação direta das células criptocócicas ou

pela produção de peptídeos antimicrobianos, como defensinas (Okubo, 2013b; Nogueira, 2012).

Um perfil de produção de citocinas Th1-Th17 está associado com aumento da atividade fagocítica e inibição da proliferação de *Cryptococcus* spp., enquanto que uma resposta Th2 está associada com diminuição do controle da infecção pelo hospedeiro. Entretanto, uma resposta Th1 exagerada pode levar a inflamação intensa e danos no organismo (Antachopoulos; Walsh, 2012).

Já foi mostrado que *C. neoformans* ativa uma via alternativa do sistema complemento, enquanto que a via clássica desempenha papel importante no controle da infecção por *C. gattii*. A cápsula, muito evidente em *C. neoformans* bloqueia a via clássica, que ocorre na parede celular das cepas não capsuladas. Também na cápsula de *C. neoformans* ocorre a deposição de fragmentos de C3, principalmente iC3b, o que leva a fagocitose da levedura. Esse é um dos motivos pelos quais *C. gattii* consegue escapar da fagocitose (Mershon, 2009).

Após ser fagocitado (Figuras 10 e 11), *C. neoformans* pode sobreviver e se replicar dentro dos fagolisossomos, mantendo um estado de infecção latente. Após algum tempo, as leveduras podem sair dos macrófagos e permanecer no ambiente extracelular, causando, por exemplo, fungemia, ou podem ser transferidas de um macrófago para outro, permanecendo na fase latente (Antachopoulos; Walsh, 2012).

Coelho e colaboradores (2014) utilizando infecção experimental de camundongos, observaram que uma diminuição das citocinas relacionadas a resposta Th1, como interferon e IL12, diminui a sobrevivência dos animais. E uma diminuição das citocinas de resposta Th2 aumenta a sobrevivência dos camundongos. Também relataram que a redução quantitativa de macrófagos e células dendríticas do hospedeiro reduz drasticamente a sobrevivência após a infecção com *C. neoformans*.

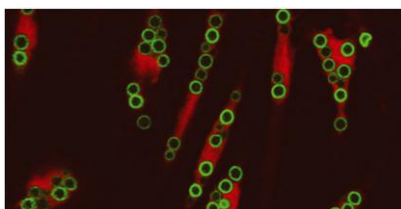


Figura 10: Micrografia confocal de sangue periférico humano, evidenciando monócitos (corados em vermelho) contendo *Cryptococcus neoformans* fagocitados (corados em verde) (Srikanta, 2014).

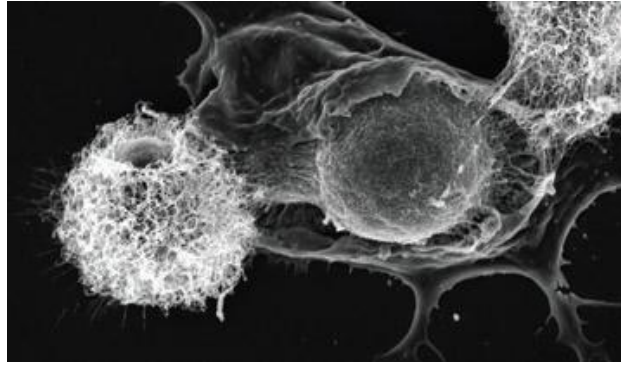


Figura 11: Micrografia eletrônica mostrando *Cryptococcus neoformans* sendo fagocitado por dois macrófagos (Coelho, 2014).

3.2.2. Tratamento e resistência

Existem poucos antifúngicos disponíveis, quando comparado ao número de agentes antibacterianos. Isso ocorre devido a algumas semelhanças entre as células fúngicas e as humanas. Além disso, o tratamento contra a criptococose é ainda mais limitado, apesar de sua importância clínica e na saúde pública (Bahn, Jung, 2013).

A forma e a duração do tratamento da criptococose dependem do local da infecção e do estado imune do paciente. Em casos de criptococose cutânea, o tratamento pode ser feito com fluconazol e debridamento das lesões (Wang, 2015).

O tratamento da meningite ou outras formas invasivas de criptococose é dividido em: duas semanas iniciais (fase de indução), seguidas por oito semanas (fase de consolidação) e uma fase final prolongada (fase de manutenção). Para pacientes com HIV é indicado um tratamento com anfotericina B (0,7 a 1 mg/kg/dia) mais fluocitosina (100 mg/dia), sendo a fase de manutenção prolongada por toda a vida do paciente. Pode ser usada a formulação lipídica da anfotericina B, de forma a reduzir os efeitos prejudiciais nos rins. Em casos de infecção branda, a recomendação é fluconazol, sendo itraconazol e posaconazol agentes usados como segunda opção de tratamento. (Smith, 2014, Perfect, 2010, Warkentien, Crum-Cianflone, 2010).

As equinocandinas são uma nova classe de antifúngicos, sendo que existem três atualmente aprovadas e utilizadas para tratamento de infecções fúngicas invasivas caspofungina, micafungina e anidulafungina. As equinocandinas inibem a $\beta(1-3)$ -glucano sintase, uma enzima que catalisa a polimerização de uridina difosfato-glucose em $\beta(1-3)$ glucana, um dos componentes responsáveis pela integridade e rigidez da parede celular (Vandeputte, 2012). Porém, essa classe de antifúngico não é eficaz contra espécies do gênero *Cryptococcus*. Maligie e Selitrennikoff (2005) mostraram que a baixa eficácia da caspofungina não está relacionada à ausência da

enzima, deve portanto, ser resultado de algum outro mecanismo de resistência ainda desconhecido (Robert, 2015; Feldmeser, 2000).

Em um trabalho publicado por Ferreira e colaboradores (2015) foi observada resistência intrínseca ao itraconazol em todas os isolados de *C. gattii* analisados. Os mecanismos observados foram: redução tanto no tamanho da cápsula quanto no tamanho total da célula, redução da quantidade de ergosterol, alteração na carga negativa da célula e melhoramento do sistema antioxidativo. Além disso, a heterorresistência ao itraconazol também é responsável pelo aumento na fagocitose de *C. gattii* e elevada proliferação das leveduras dentro dos macrófagos.

O tratamento da criptococose permanece um desafio, principalmente com relação aos pacientes imunocomprometidos. A combinação de altas doses de terapia antirretroviral e antifúngicos reduziu a mortalidade em aproximadamente 25% no período de 12 meses e 34% em 24 meses. Porém, a taxa de mortalidade da criptococose aguda em pacientes soropositivos (que ocorre em três meses após a infecção) permanece em 20%. Assim como a taxa de mortalidade em transplantados com criptococose aguda, que também permanece em 28,6% (Antachopoulos, Walsh, 2011).

A infecção por *C. gattii* requer uma terapia antifúngica mais prolongada e, na maioria das vezes, remoção cirúrgica dos criptococomas. Existem poucos dados referentes à sensibilidade aos antifúngicos de isolados de *C. gattii* tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, a falta de fatores de risco aparentes (ou seja, hospedeiro imunologicamente saudável) dificulta e atrasa o diagnóstico por longos períodos. No Brasil, a taxa de mortalidade de infecção por *C.gattii* está em torno de 12,5 a 55,5%, apesar do longo período de tratamento somente com anfotericina B ou mesmo aliada a outros antifúngicos (Cicora, 2015; Thompson, 2012; Byrnes, 2011; Perfect, 2010, Soares, 2008).

O teste de sensibilidade aos antifúngicos não é uma técnica de rotina no início do tratamento, isso porque os testes *in vitro* para espécies de *Cryptococcus* ainda não estão perfeitamente padronizados e os resultados não condizem com o resultado do tratamento. Os testes de sensibilidade devem ser realizados em casos em que a terapia inicial falha ou pacientes que já foram expostos a terapias antifúngicas antes do desenvolvimento da criptococose (Perfect, 2010).

Muitos autores mostram a sensibilidade das espécies do gênero *Cryptococcus* aos mais diversos antifúngicos. Porém, nos últimos anos houve um aumento no número de leveduras resistentes tanto a anfotericina B quanto aos azóis. Na literatura há relatos de *C. gattii* com resistência moderada ao fluconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina, além de *C. neoformans* resistente a anfotericina B, fluconazol e

voriconazol (Basso, 2015; Cordeiro, 2013; Teodoro, 2013). Isolados resistentes ao fluconazol são encontrados com relativa frequência em algumas partes do mundo, principalmente na África, onde há o uso profilático do fármaco, geralmente em monoterapia, como tratamento de escolha para a criptococose (Perfect, 2010). Além disso, Espinel-Ingroff e colaboradores (2012) mostraram que as CIMs (Concentração Inibitória Mínima) dos agentes itraconazol, posaconazol e voriconazol frente a *C. gattii* eram maiores do que o encontrado para *C. neoformans*.

Segundo Ernst e colaboradores (2010) existem quatro mecanismos principais pelos quais uma célula pode resistir à ação de um antifúngico. São eles: 1) alteração do alvo do agente; 2) inativação do agente; 3) redução na captação; 4) expulsão do agente, que ocorre devido à ação de transportadores de membrana. Nos fungos, os transportadores pertencem a dois tipos: proteínas de superfamília ABC (*ATP-cassete binding*) e MFS (*major-facilitator superfamily*). O papel dos transportadores ABC em fungos já foi descrito na última década. Entretanto, pouca atenção foi dada ao *antiporter DrugH+* (DHA), pertencente ao grupo MFS. Porém, a alta concentração dessa proteína em espécies de *Cryptococcus*, *Candida* e *Aspergillus*, sugere que esses transportadores desempenhem um papel importante no funcionamento e sobrevivência desses fungos (Costa, 2014).

Existem algumas alternativas para o tratamento de criptococose em estudos. Coelho e colaboradores (2013) mostraram que uma pré-exposição a doses sub-CIM de antifolato aumentou a sensibilidade de isolados de *Cryptococcus* spp. a anfotericina B. O estudo mostrou que o antifolato causa uma redução na quantidade de ergosterol dos fungos, evitando também a formação de biofilme, além de inibir o biofilme maduro. Derivados de aminopiperidina exibiram atividade *in vitro* contra diversas espécies de leveduras, incluído *C. neoformans* (Hata, 2010). Martinez e Casadevall (2006) mostraram a atividade da caspofungina contra biofilme de *C. neoformans*. Entretanto, não houve efeito quando testada *in vivo*, provavelmente devido a presença de melanina, o que protege o fungo contra a ação do medicamento.

O uso de imunoterapia também já está sendo discutido. Em modelo murino de criptococose pulmonar e disseminada, o uso de IL-12 resultou em aumento das células inflamatórias, redução do número de leveduras viáveis no pulmão e no cérebro, melhorou o efeito antifúngico do fluconazol e aumentou a taxa de sobrevivência dos camundongos. A atualização de 2010 do manual de práticas clínicas da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas diz que deve ser acrescentado IFN- γ ao tratamento padrão, quando há criptococose persistente (Antachopoulos; Walsh, 2012).

Existem diversos estudos que mostram como *Cryptococcus* sp. pode ser eliminado pelas células do sistema imune, porém, ainda não está claro qual o mecanismo exato pelo qual o organismo consegue conter a infecção, e tentativas de demonstrar esse processo *in vitro* não são conclusivas. Provavelmente, é uma combinação de mecanismos e barreiras naturais, que não estão presentes em casos de imunodepressão. Entretanto, se a terapia imune vem como uma alternativa para auxiliar o tratamento, mais estudos devem ser conduzidos de forma a elucidar precisamente todo esse processo (Gibson, Johnston, 2015).

Como a frequência de infecções fúngicas nas últimas décadas vem aumentando, a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos leva os pesquisadores a buscar fontes alternativas de potenciais substâncias. Baixa toxicidade, melhores taxas de aproveitamento e contenção da resistência são características desejadas para aumentar a eficácia do tratamento (Turel, 2011).

Extratos de plantas ou outros organismos vivos são alternativas cada vez mais viáveis para o tratamento da criptococose e a cada dia, novas opções são descobertas e estudadas. Pereira e colaboradores (2015) relataram uma excelente atividade anticriptocócica, tanto contra *C. neoformans* quanto *C. gattii*, do extrato de um fungo endofítico *Mycosphaerella* sp. Estudos recentes também mostram a eficácia de extrato de folhas de sálvia, da aroeira e outras plantas encontradas no cerrado brasileiro contra espécies de *Cryptococcus* (Pereira, 2015; Gehrke, 2013; Funari, 2012; Violante, 2012).

O estudo das nanopartículas é algo novo e vem se mostrando promissor para tratamento de vários tipos de doenças infecciosas. Ishida e colaboradores (2014) testaram nanopartículas de prata obtidas a partir do fungo *Fusarium oxysporum* e observaram alterações estruturais em *C. neoformans* como rompimento da parede celular e membrana plasmática. Além disso, as nanopartículas de prata são obtidas facilmente, com baixo custo e baixo impacto ambiental.

5. REFERÊNCIAS

- Antachopoulos, C.; Walsh, T.J. **Immunotherapy of *Cryptococcus* infections**. Clin Microbiol Infect; 18: 126–133, 2012.
- Badiee, P.; Hashemizadeh, Z. **Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management**. Indian J Med Res 139, pp 195-204, 2014.
- Bahn, Y.S.; Jung, K.W. **Stress Signaling Pathways for the Pathogenicity of *Cryptococcus***. Eukaryotic Cell, 12(12); p. 1564–1577, 2013.
- Basso, L.R.Jr. *et al.* **Identification and properties of plasma membrane azole efflux pumps from the pathogenic fungi *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans***. J Antimicrob Chemother. May;70(5):1396-407, 2015.
- Bian, F. *et al.* **Study on genotype and virulence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* clinical isolates in Guigang, Guangxi Zhuang Autonomous Region**. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. May;36(5):491-5, 2015.
- Bothra, M. *et al.* **Disseminated Cryptococcosis**. Indian pediatrics, 225: (51), 2014.
- Bovers, M. *et al.* **Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii***. FEMS Yeast Res. 6 (4), 599–607, 2006.
- Byrnes, E.J. *et al.* ***Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals**. Microbes Infect. October; 13(11): 895–907, 2011.
- Bulmer, G.S. **Twenty-five years with *Cryptococcus neoformans***. Mycopathologia.; 109:111-22, 1990.
- Casadevall, A. *et al.* **Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies**. Antimicrob. Agents Chemother. 42, 1437–1446, 1998.
- Cavalcante, E.G. *et al.* **Meningite criptocócica fatal em paciente com lúpus eritematoso sistêmico juvenil**. Rev. Bras. Reumatol.; 54 (2): 155–158, 2014.
- Chaturvedi, V.; Chaturvedi, S. ***Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen**. Trends Microbiol. November ; 19(11): 564–571, 2011.
- Chen, S.C. *et al.* ***Cryptococcus gattii* infections**. Clin Microbiol Rev. Oct;27(4):980-1024, 2014.
- Cheng, P.Y. *et al.* ***Cryptococcus gattii* Isolates from the British Columbia cryptococcosis Outbreak Induce Less Protective Inflammation in a Murine Model of Infection than *Cryptococcus neoformans***. Infection and Immunity, Oct. p. 4284–4294, 2009.
- Clemons, K.V.; Stevens, D.A. **Orogastrointestinal model of mucosal and disseminated candidiasis**. Methods Mol Biol. ;845:557-67. doi: 10.1007/978-1-61779-539-8_41, 2012.

- Cicora, F. *et al.* **A rare case of *Cryptococcus gattii* pneumonia in a renal transplant patient.** *Transpl Infect Dis.* doi: 10.1111/tid.12371, 2015.
- Coelho, C. *et al.* **The Intracellular Life of *Cryptococcus neoformans*.** *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 9:219–38, 2014.
- Cogliati, M. **Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types.** *Scientifica*, Article ID 675213, 23 pages, 2013.
- Colombo, T.E. *et al.* **Identification of fungal diseases at necropsy.** *Pathology – Research and Practice* 208, 549– 552 , 2012.
- Consenso em criptococose.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(5):524-544, set-out, 2008.
- Costa, C. *et al.* **MFS multidrug transporters in pathogenic fungi: do they have real clinical impact?** *Frontiers in Physiology*, 5:(197); 2014.
- Cordeiro, R.A. *et al.* **Antifolates inhibit *Cryptococcus* biofilms and enhance susceptibility of planktonic cells to amphotericin B.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32:557–564, 2013.
- Cox, G.M. *et al.* **Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*.** *Molecular Microbiology*, 39(1), 166±175, 2001.
- Dixit, A. *et al.* ***Cryptococcus gattii* : An Emerging Cause of Fungal Disease in North America. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, Article ID 840452, 13 pages, 2009.
- Duin, D.V. *et al.* **Effects of Voriconazole on *Cryptococcus neoformans*.** *Antimicrob Agents Chemother.* Jun; 48(6): 2014–2020, 2004.
- Espinel-Ingroff, A. *et al.* ***Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (56):11; p. 5898–5906, 2012.
- Feder, V. *et al.* ***Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis.** *FEBS J.* Apr;282(8):1406-18, 2015.
- Feldmesser, M. *et al.* **The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*.** *J Infect is.* Dec;182(6):1791-5. Epub 2000 Nov 8, 2000.
- Feretzaki, M. *et al.* ***Cryptococcus neoformans* hyperfilamentous strain is hypervirulent in a murine model of Cryptococcal Meningoencephalitis.** *Plos one*, v.9: (8), August, 2014.
- Ferreira, G.F. *et al.* **Heteroresistance to Itraconazole Alters the Morphology and Increases the Virulence of *Cryptococcus gattii*.** *Antimicrob Agents Chemother.* Aug;59(8):4600-9, 2015.

Fonseca, F.L. **Estudos estruturais e funcionais sobre a glucuronoxilomanana dos patógenos fúngicos *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *Trichosporon asahii***. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

Franzot, S.P. *et al.* ***Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates**. J. Clin. Microbiol. 37 (3), 838-840. 1999.

Frases, S. *et al.* **Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules**. PNAS, 106: (4), 2009.

Funari, C.S. *et al.* **Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil**. Food Chemistry 135: 2086–2094, 2012.

Gazzoni, A.F. *et al.* **Unusual morphologies of *Cryptococcus* spp. in tissue specimens: report of 10 cases**. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 52(3):145-149, May-June, 2010.

Gehrke, I.T.S. *et al.* **Antimicrobial activity of *Schinus molle* (Anacardiaceae)**. Journal of Ethnopharmacology 148; 486–491, 2013.

Gibson, J.F.; Johnston, S.A. **Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis**. Fungal Genet Biol. May; 78: 76–86, 2015.

Glazier, V.; Panepinto, J.C. **The ER stress response and host temperature adaptation in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans***. Virulence 5:2, 351–356; February 15, 2014.

Goldman, J.D. *et al.* **Cryptococcosis in the Immunocompetent Patient**. Respiratory care v. 55 : (11), 2010.

Goldman, D.L. *et al.* **Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents**. Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 8; 95(25): 14967–14972, 1998.

Gomes F.S., *et al.* **Quimiotipagem e caracterização fenotípica de *Cryptococcus***. Rev Pan-Amaz Saude; 1(4):43-49, 2010.

Gullo, F.P. *et al.* **Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment**. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 32:1377–1391, 2013.

Hagan, J.E. *et al.* **Puerperal brain cryptococcoma in an HIV-negative woman successfully treated with fluconazole: a case report**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 47(2):254-256, Mar-Apr, 2014.

Hagen, F. *et al.* **Ancient Dispersal of the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest**. Plos one, v.8: (8), August, 2013.

- Hagen, F. *et al.* **Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex.** Fungal Genetics and Biology 78: 16–48, 2015.
- Hassan, H. *et al.* **Complicated and Protracted Cryptococcal Disease in HIV-Infected Children.** The Pediatric Infectious Disease Journal, DOI : 10.1097/INF.0000000000000480; 2014.
- Hata, M. *et al.* **In Vitro and in Vivo Antifungal Activities of Aminopiperidine Derivatives, Novel Ergosterol Synthesis Inhibitors.** Biol. Pharm. Bull. 33(3) 473—476, 2010.
- Idnurm, A.; Lin, X. **Rising to the challenge of multiple *Cryptococcus* species and the diseases they cause.** Fungal Genet Biol. May;78:1-6, 2015.
- Ishida, K. *et al.* **Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 109(2): 220-228, 2014.
- Kwon-Chung, K.J., **A new genus, *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*.** Mycologia 67 (6), 1197–1200, 1975.
- Lee, Y.C. *et al.* **Comparisons of clinical features and mortality of cryptococcal meningitis between patients with and without human immunodeficiency virus infection.** Journal of Microbiology, Immunology and Infection; 44, 338e345, 2011.
- Leite, D.P. *et al.* ***Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries.** Journal of Occupational Medicine and Toxicology, 7:11, 2012.
- Lester, S.J. *et al.* **Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii*.** Vet Clin Pathol 40/1; 4–17, 2011.
- Liu, G.Y. ; Nizet, V. **Color me bad: microbial pigments as virulence factors.** Trends Microbiol. Sep;17(9):406-13; 2009.
- Machado, C.C. *et al.* ***Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo.;35:77-9, 1993.
- Maligie, M.A.; Selitrennikoff, C.P. ***Cryptococcus neoformans* Resistance to Echinocandins: (1,3) β -Glucan Synthase Activity Is Sensitive to Echinocandins.** Antimicrob Agents Chemother. Jul; 49(7): 2851–2856, 2005.
- Marukutira, T. *et al.* **Clinical characteristics and outcomes in 303 HIV-infected patients with invasive fungal infections: data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance registry, a multicenter, observational study.** HIV/AIDS – Research and Palliative Care:6 39–47, 2014.
- Marques, S.A. *et al.* **Primary cutaneous cryptococcosis in Brazil: report of 11 cases in immunocompetent and immunosuppressed patients.** International Journal of Dermatology 51, 780–784, 2012.

Martinez, L.R.; Casadevall, A. **Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Biofilms to Antifungal Agents In Vitro**. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 1021–1033, 2006.

Mershon, K.L. *et al.* **Role of Complement in Protection against *Cryptococcus gattii* Infection**. *Infection and Immunity*, Mar, p. 1061–1070, 2009.

Meyer, W. *et al.* **Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates**. *Emerg. Infect. Dis.* 9 (2), 189–195, 2003.

Mihu, M.R. *et al.* **The impact of antifungals on toll-like receptors**. *Frontiers in Microbiology*, 5: (99), 2014.

Nascimento, E. *et al.* **Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent patient due to *Cryptococcus gattii* molecular type VGI in Brazil: a case report and review of literature**. *Mycoses*, 57, 442–447, 2014.

Nasser, N. *et al.* **Criptococose cutânea primária em paciente imunocompetente**. *An. Bras. Dermatol.* vol.86 no.6 Rio de Janeiro Nov./Dec, 2011.

Negróni, R. **Cryptococcosis**. *Clinics in Dermatology*, 30, p.599–609, 2012.

Ngamskulrungrroj, P. *et al.* **The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model**. *mBio* 3(3):e00103-12, 2012.

Nogueira, M.R. **Efeito da glucuronoxilomanana (gxm) obtida do *Cryptococcus neoformans* e do *Cryptococcus gattii* sobre a resposta de células mononucleares humanas ao IFN**. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, área de concentração "Patologia Clínica", da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2012.

Okubo, Y. *et al.* (a) **How Histopathology Can Contribute to an Understanding of Defense Mechanisms against Cryptococci**. *Mediators of Inflammation*, Article ID 465319, 2013.

Okubo, Y. *et al.* (b) **Histopathological Study of Murine Pulmonary Cryptococcosis Induced by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans***. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 66, 216-221, 2013.

Pappas, P.G. **Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients**. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, v.124, 2013.

Park, S.H. *et al.* **Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* isolates in Seoul, Korea**. *Mycobiology*, March, 42(1): 73-78, 2014.

Patel, D. *et al.* **Methamphetamine Enhances *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection and Dissemination to the Brain**. *mBio* 4(4):e00400-13. doi:10.1128/mBio.00400, 2013.

Pedrosa, R.S. **Diagnóstico Laboratorial da Criptococose**. *NewsLab*, 77, 2006.

- Pereira, C.B. *et al.* **Endophytic fungal compounds active against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*.** The Journal of Antibiotics| doi:10.1038/ja.2015.11, 2015.
- Perfect, J.R. *et al.* **Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America.** Clinical Infectious Diseases; 50:291–322, 2010.
- Pessoa, C.C.B., *et al.* **Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.** Rev Pan-Amaz Saude; 3(2):59-65, 2012.
- Reolon, A. *et al.* **Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.** J Bras Patol Med Lab.;40:293-8, 2004.
- Robert, V. *et al.* **Distribution and impact of yeast thermal tolerance permissive for mammalian infection.** BMC Biol. 13: 18, 2015.
- Robertson, E.J.; Casadevall, A. **Antibody-Mediated Immobilization of *Cryptococcus neoformans* promotes biofilm formation.** Applied and environmental microbiology, p. 2528–2533, 2009.
- Rodrigues, J. *et al.* **Pathogenic diversity amongst serotype C VGIII and VGIV *Cryptococcus gattii* isolates.** Sci. Rep. 5, 11717; doi: 10.1038/srep11717, 2015.
- Sharon, C. A. *et al.* **Phospholipase Activity in *Cryptococcus neoformans*: A New Virulence Factor?** The Journal of Infectious Diseases;175:414-20, 1997.
- Shi, M. *et al.* **Real-time in vivo imaging of fungal migration to the central nervous system.** Cellular Microbiology, 14(12), 1819–1827, 2012.
- Silva, J.O.; Capuano, D.M. **Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, no excreta de pombos na cidade de Ribeirão Preto, SP, Brasil.** Rev Inst Adolfo Lutz.;67:137-41, 2008.
- Smith, R.M. *et al.* **Treatment and Outcomes among Patients with *Cryptococcus gattii* Infections in the United States Pacific Northwest.** PLoS ONE 9(2): e88875. doi:10.1371/journal.pone.0088875.
- Soares, B.M. *et al.* **Cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*: a case report and antifungal susceptibility testing.** Rev Iberoam Micol; 25: 242-245, 2008.
- Springer, D.J. *et al.* ***Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal.** PLoS Pathog. 10 (8), e1004285, 2014.
- Springer, D.; Chaturvedi, V. **Projecting Global Occurrence of *Cryptococcus gattii*.**Emerging Infectious Diseases, 16 (1), 14-20, 2010.
- Srikanta, D. *et al.* ***Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen.** Yeast, 31: 47–60, 2014.

Takahara, D.T. *et al.* **First report on *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta from public and residential locations in the metropolitan area of Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil.** Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 55(6):371-376, Nov-Dec, 2013.

Teodoro, V.L.L. *et al.* **Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 46(6):759-764, Nov-Dec, 2013.

Thompson, G.R. *et al.* **A murine model of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis.** J Antimicrob Chemother; 67: 1432–1438, 2012.

Trilles, L. *et al.* **Identification of the major molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* by hyperbranched rolling circle amplification.** PLoS ONE 9 (4), e94648, 2014.

Türel, O. **Newer antifungal agents.** Expert Rev Anti Infect Ther. Mar;9(3):325-38. doi: 10.1586/eri.10.163, 2011.

Vandeputte, P. *et al.* **Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections.** International Journal of Microbiology, Article ID 713687, doi:10.1155/2012/713687, 2012.

Vecchiarelli, A. *et al.* **Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule.** Future Microbiol. 8(9), 1107–1116, 2013.

Violante, I.M. *et al.* **Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology: 1302-1308, 2012.

Wang, J. *et al.* **Primary Cutaneous Cryptococcosis Treated with Debridement and Fluconazole Monotherapy in an Immunosuppressed Patient: A Case Report and Review of the Literature.** Case Reports in Infectious Diseases, Article ID 131356, 8 pages, 2015.

Warkentien, T.; Crum-Cianflone, N.F. **An Update on Cryptococcosis Among HIV-Infected Persons.** J STD AIDS. 21(10): 679–684; 2010.

Xu, C.Y. *et al.* **Increased permeability of blood–brain barrier is mediated by serine protease during *Cryptococcus meningitis*.** Journal of International Medical Research 42(1) 85–92, 2014.

6. Anexo I

Artigo

Análise do potencial de virulência de isolados de *Cryptococcus gattii sensu lato*

A criptococose é uma doença fúngica que atinge mais de um milhão de pessoas no mundo todo, causando aproximadamente 625.000 mortes/ano. Os principais agentes etiológicos são *Cryptococcus neoformans sensu lato* e *Cryptococcus gattii sensu lato* (HAGEN *et al.*, 2015), que estão amplamente distribuídos pelos mais diversos ambientes (BYRNES 3rd *et al.*, 2011; ANTINORI, 2013; COGLIATI, 2013; PAPPAS, 2013).

C. gattii s. l. possuem ciclos de vida saprófitos no ambiente, e parasitários em hospedeiros mamíferos (BYRNES 3rd *et al.*, 2011). A distribuição desta espécie no ambiente era considerada como restrito a regiões tropicais e subtropicais, porém o isolamento de *C. gattii s. l.* tem sido reportado em diferentes regiões do mundo (GULLO *et al.*, 2013). Estudos utilizando modelo murino de infecção experimental têm mostrado que *C. gattii* é mais virulento que *C. neoformans* (THOMPSON 3rd *et al.*, 2012). Além disso podem causar infecções também em pacientes imunocompetentes (PAPPAS, 2013; CHATUVERDI & CHATUVERDI, 2011). A infecção por *C. gattii* pode ter início pelo trato respiratório causando um quadro de doenças que varia desde infecções assintomáticas à doença grave, incluindo pneumonia e infecção disseminada em vários sítios, como sistema nervoso central, olhos e pele (GOLDMAN *et al.*, 2010; BAHN, 2013). A presença de fatores de virulência como a cápsula polissacarídica (O'MEARA, 2012), produção de melanina (LIU, 2009), habilidade para crescer a 37 °C, produção de enzimas hidrolíticas como fosfolipase e urease (VECCHIARELLI, 2013) contribui para a virulência de espécies de *Cryptococcus*. Embora as duas espécies possam compartilhar fatores de virulência em comum, vários importantes processos celulares, tais como atividade antioxidante da superóxido dismutase, via biossintética da trealose e via de regulação de *mating-type* influenciam a expressão desses fatores somente em *C. gattii* (NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2011; BARTLETT *et al.*, 2012).

O tratamento recomendado para as infecções causadas por *C. gattii s. l.*, assim como para *C. neoformans s. l.*, é baseado na utilização de anfotericina B e 5-fluocitosina, sendo mais prolongado para a primeira espécie (PERFECT *et al.*, 2010;

CHEN *et al.*, 2013). Assim, anfotericina B pode provocar efeitos adversos que podem contribuir para o aumento da mortalidade dos pacientes infectados. Em casos menos severos, podem ser usados fluconazol, em associação com itraconazol e posaconazol (SMITH, 2014; ANTINORI, 2013; BAJWA & KULSHRESTHA, 2013). Entretanto, infecções causadas por *C. gattii s.l.* vem se mostrando mais resistentes aos tratamentos convencionais (PAPPAS, 2013; CHATUVERDI & CHATUVERDI, 2011).

Este trabalho teve como objetivo analisar o potencial de virulência de isolados ambientais e clínicos de *C. gattii s.l. in vitro* e em modelo murino de infecção. Além disso, o perfil de sensibilidade a anfotericina B e nanopartículas de prata produzidas biologicamente por metabólito extracelular de *Fusarium oxysporum* também foi determinado.

Material e Métodos

Microrganismos

Para o presente trabalho, foram utilizadas 3 isolados ambientais (1a2, 3c5 e 3a1) e 3 isolados clínicos (840244, cg03 e LCF312) de *Cryptococcus gattii* da coleção de fungos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina. *Cryptococcus gattii* ATCC 24066 foi utilizada como controle. As leveduras foram incubadas em caldo Sabouraud dextrose, a 37°C, por 24 horas antes da realização dos testes.

Crescimento a 37 °C e detecção de cápsula

Para avaliação do crescimento a 37°C, os isolados de *Cryptococcus* spp. foram semeados em Ágar Sabouraud Dextrose 2% e mantidos a 37° C por até sete dias. Procedeu-se o ensaio de indução de cápsula, como descrito por Zaragoza e Casadevall (2004), para minimizar a interferência do armazenamento e viabilizar a recuperação do principal fator de virulência de *Cryptococcus* sp. As leveduras foram mantidas em 10 mL de caldo Sabouraud ácido (2% dextrose, 1% peptona, pH 5,7) por 24 h sob leve agitação (150 rpm). Posteriormente, foram lavadas com PBS pH 7,2, inoculadas em caldo Sabouraud diluído dez vezes em água destilada e incubadas a 30° C por pelo menos 18 h. Ao final do ensaio, uma lâmina de microscopia convencional foi preparada com uma alíquota de 10 mL deste cultivo e uma gota de tinta da China, visualizando-se em microscópio óptico (Carl Zeiss) sob aumento de 40x.

Produção de melanina

A produção de melanina foi observada a partir da atividade fenoloxidase dos isolados frente ao extrato de sementes de Níger (*Guizotia abyssinica*) (sementes de Níger 5%, KH₂PO 0,1%, dextrose 0,1%, creatinina 0,1%, ágar 1,5%), que contém tirosina e ácido clorogênico como substratos, seguindo-se a técnica descrita por Paliwal e Randhawa (1978).

Determinação da atividade de protease e fosfolipase

Todos os isolados de *C. gattii* s.l. foram analisados quanto à capacidade de crescer e produzir uma zona de degradação em meios de cultura contendo 0,5% albumina bovina sérica (BSA) e 4,0% de gema de ovo como substratos para protease e fosfolipase, respectivamente.

Para o ensaio de protease (Pontecorvo, 1953) as leveduras foram previamente incubadas por 24 horas sob agitação constante (160 rpm) em meio de indução (meio mínimo suplementado com 0,6% de caseína de leite e ampicilina 100 µg/mL), após o período de incubação o número de células foi avaliado pela contagem direta utilizando-se uma câmara hematimétrica (Improved Neubauer Chamber). Foram transferidos 10 µL (aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células) das culturas em meio de indução para as placas de Petri contendo meio mínimo para fungos pH 6,8 suplementado com BSA. O inóculo foi realizado em orifícios de aproximadamente 3 mm de diâmetro perfurados no ágar (inóculo de “ponto”). As placas foram incubadas a 37 °C por um tempo máximo de 72 horas, sendo analisadas a cada 24 horas. Os isolados que apresentaram um halo de degradação ao redor da colônia, após o período incubado foram consideradas positivas para produção de proteases.

Para atividade de fosfolipase, as leveduras foram incubadas por 24 horas sob agitação constante (200 rpm) em meio Sabouraud. Foram transferidos 10 µL (aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células) das culturas para as placas de Petri contendo meio mínimo pH 4,5 suplementado com emulsão de gema de ovo na concentração final de 4%, NaCl 20g/L e CaCl₂ · 2 H₂O 1g/L. O inóculo foi realizado na superfície do ágar. Para a observação do crescimento celular e atividade de fosfolipase extracelular, as placas foram incubadas a 37 °C por 96 horas, sendo analisadas a cada 24 horas. As amostras que apresentaram um halo de precipitação ao redor da colônia, após o período de incubação foram consideradas positivas para atividade de fosfolipase. A atividade enzimática foi estimada pela razão entre o diâmetro da zona de degradação/precipitação ao redor da colônia e o diâmetro da colônia (PZ), como descrito em Price *et al.* (1982).

Determinação do perfil de sensibilidade aos antifúngicos

Biossíntese de nanopartículas de prata

Nanopartículas de prata AgNP_{bio} foram obtidas a partir da redução de AgNO₃ por metabólitos extracelulares de *Fusarium oxysporum*, e caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura e métodos espectroscópicos como descrito por Durán *et al.*, (2005).

Determinação da concentração inibitória mínima

Foram testados anfotericina B (Sigma, 16,0 – 0,015 µg/mL) e nanopartículas de prata (200 – 0.097 µM). A concentração inibitória mínima (CIM) para os compostos foi obtida pela técnica de microdiluição em caldo, segundo normas preconizadas pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). *C. parapsilosis* ATCC 22019 (FIOCRUZ, RJ) foi incluída como controle de qualidade da reação. A CIM foi obtida pela menor concentração que inibiu 50% do crescimento das leveduras e estas foram classificadas de acordo com os critérios descritos no CLSI (2008).

Infecção experimental em camundongos

Camundongos BALB/c fêmeas de 8 a 12 semanas foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram supridos com ração (C21, autoclavável, Nuvital) e água *ad libitum*. 2 grupos de 5 animais foram utilizados para cada isolado. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios regidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e o presente projeto foi aprovado pelo ao Comitê de Ética em Experimentação Animal CEEA no. 81/10, processo no. 32070.2010.32. Os animais teste foram anestesiados com uma solução de ketamina (10 mg/mL) e xilazina (1 mg/mL), para procedimento de inoculação nasal de 1×10^5 leveduras em 50 µL de PBS. O grupo controle foi inoculado com 50 µL de PBS. Os animais foram observados diariamente para determinação da taxa de sobrevivência até o 60º dia. No 30º dia pós-inoculação, dois animais de cada grupo foram sacrificados e os órgãos (pulmão e cérebro) foram retirados. Os órgãos foram divididos em duas partes, uma metade foi utilizada para determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC, órgãos foram macerados em PBS esterilizado e 100 µL dos homogenatos foram inoculados na superfície do meio SDA, e as placas foram incubadas a 37°C/72 h), e a outra metade foi preparada para análises moleculares.

O segundo animal foi submetido ao processo de perfusão sanguínea com solução salina 0,9%. O pulmão e o cérebro foram retirados e fixados em solução paraformaldeído 4% e após desidratação em concentrações crescentes de etanol

foram incluídos em parafina. Cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina e Grocott.

Resultados e discussão

Os resultados associados à expressão de fatores de virulência estão mostrados na Tabela 1. Os fatores de virulência expressos pelos microrganismos propiciam a colonização do hospedeiro e o desenvolvimento de infecção. Todos isolados estudados neste trabalho foram capazes de crescer a 37°C, *in vitro*. Uma característica comum a todos os microrganismos que causam infecções invasivas em seres humanos é a capacidade de crescer a 37°C, que se relaciona a disseminação pelo organismo e o potencial de formar biofilme (GOMES, 2010). Dentro do gênero *Cryptococcus*, apenas duas espécies possuem essa característica, *C. neoformans* e *C. gattii* (GLAZIER & PANEPINTO, 2014).

A presença de cápsula é um dos fatores mais estudados e é utilizada como teste inicial para identificação de leveduras do gênero *Cryptococcus*. A função dessa estrutura é auxiliar na sobrevivência dos microrganismos a condições adversas do ambiente, como dessecação e falta de nutrientes. A presença da cápsula também evita a fagocitose por macrófagos e é essencial para a formação do biofilme, dada a sua capacidade de aderência a superfícies sólidas (VECCHIARELLI, 2013). Como esperado, todos os isolados apresentaram cápsula após a indução.

A melanina é um importante fator de virulência para leveduras do gênero *Cryptococcus*, relacionada principalmente ao mecanismo de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro, dificultando a fagocitose das leveduras por células efectoras deste sistema (CHASKES, 2014; MENEZES, 2011). Além disso, a melanina também interfere na eficácia de antifúngicos contra *C. neoformans*, e isolados que não produzem melanina são menos invasivos e com menor taxa de sobrevivência no fígado, baço ou cérebro de animais infectados (LIU & NIZET, 2009). Em nosso trabalho, apenas um isolado (1a2), de origem ambiental, apresentou deficiência na produção de melanina. Thompson e colaboradores (2014) estudaram alguns fatores de virulência relacionados a infecção experimental em modelo invertebrado (*Drosophila melanogaster*). Os autores mostraram que a produção de melanina varia entre diferentes tipos moleculares de *C. gattii*.

A produção de enzimas como proteases e fosfolipases, vem sendo amplamente estudada em leveduras do gênero *Candida* e suas funções foram descritas por diversos autores, sendo: 1) digestão de moléculas para fins nutricionais (KVAAL *et al.*, 1999); 2) participação no processo de adesão ao tecido do hospedeiro

(BORG-VON ZEPELIN *et al.*, 1999); 3) invasão e degradação de tecidos e órgãos (Schaller *et al.*, 1999; 2000; 2003; VILLAR *et al.*, 2007); 4) evasão das defesas do hospedeiro pela destruição de células e moléculas do sistema imune (MEILLER *et al.* 2009) ou resistência à fagocitose pelos macrófagos (BORG-VON ZEPELIN *et al.* 1998). Entretanto, existem poucos trabalhos que descrevem a produção de proteases e fosfolipases por *Cryptococcus* sp. Xu e colaboradores (2014) mostraram que a secreção de proteases por *Cryptococcus* spp. altera a integridade da barreira hematoencefálica. Alguns estudos mostram que as fosfolipases têm função extracelular (ruptura de tecidos e surfactante) e intracelular (ruptura de compartimentos intracelulares das células fagocitárias) (CHEN, 1997; COX, 2001).

Pessoa e colaboradores (2012) detectaram uma elevada produção dessas enzimas na maioria dos isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* de origem clínica. Chan e Tay (2010) também observaram atividade de protease e fosfolipase em isolados ambientais e clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii*. Em nosso trabalho, sete (87,5%) isolados foram considerados como moderadamente produtores de proteases e um (12,5%) moderadamente produtor de fosfolipase. Essas diferenças podem ocorrer devido a variações nas condições de cultivo. Além disso, a produção desses fatores de virulência está associada a estímulos exógenos que influenciam a ativação da expressão gênica durante o curso da infecção e favorecem o estabelecimento dos patógenos no organismo do hospedeiro.

Tabela 1: Fatores de virulência em *Cryptococcus gattii* de origem ambiental e clínica.

Fungo	Origem	Melanina	Presença de cápsula	Crescimento a 37°C	Protease ^a	Fosfolipase ^a
1a2	Ambiental	N	S	S	++	-
3c5	Ambiental	S	S	S	++	+
3a1	Ambiental	S	S	S	++	-
840244	Clinica	S	S	S	++	-
Cg03	Clinica	S	S	S	++	++
LCF312	Clinica	S	S	S	+	-
ATCC 24066	-	S	S	S	++	+

^a: A atividade de protease e fosfolipase foi classificada como: $Pz = 1$ (-); $0.64 \leq Pz < 1$ (+); $0.30 \leq Pz < 0.64$ (++) ; $Pz < 0.30$ (+++), onde Pz refere-se a razão entre o diâmetro da zona de degradação/precipitação ao redor da colônia e o diâmetro da colônia (Price *et al.*, 1982). S: sim, fator de virulência detectado; N: não, fator de virulência não detectado.

O perfil de sensibilidade ao antifúngico anfotericina B, que é utilizado como tratamento de escolha em casos de infecção sistêmica por *Cryptococcus* sp., foi determinado pelo método de microdiluição Também foi analisada a atividade antifúngica de nanopartículas de prata obtidas de *F. oxysporum*, para avaliar o seu potencial para o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento de infecções por *C. gattii*. Para anfotericina B, a maior concentração testada foi de 16 µg/mL, como preconizado pelo CLSI (2008) e das nanopartículas de prata estabelecemos a concentração de 200 µM como inicial. Os resultados estão expressos na tabela 2.

Tabela 2: Concentração inibitória mínima de anfotericina B e nanopartículas de prata produzidas por metabólitos de *Fusarium oxysporum* para *Cryptococcus gattii*.

Fungo	Anfotericina B (µg/mL)	NP de prata (µM)
1a2	0,0312	0,39
3c5	>16	200
3a1	0,0312	0,39
840244	0,0312	0,39
Cg03	8	100
Lcf312	0,25	50
ATCC 24066	0,5	200

Apenas o isolado 3c5 apresentou resistência a anfotericina B (CIM > 16 µg/mL). Em vários trabalhos, a maioria dos isolados de *Cryptococcus* sp. de origem ambiental mostrou-se sensível aos mais diversos antifúngicos. Pfaller e colaboradores (1999) testaram posaconazol, itraconazol e fluconazol frente a isolados ambientais, não

detectando nenhum isolado resistente. Theodoro e colaboradores (2013) incluíram a anfotericina B, além dos antifúngicos já citados acima e relataram que nenhum isolado apresentou resistência. Souza e colaboradores (2013) testaram isolados clínicos de *Cryptococcus* sp. e também não relataram resistência. Entretanto, no estudo de Andrade-Silva e colaboradores (2013), 10,5% dos isolados de *C. neoformans* e 6,2% dos isolados de *C.gattii* apresentaram resistência a anfotericina B e ao fluconazol, respectivamente. No Brasil, Silva e colaboradores (2008) detectaram dois isolados clínicos resistentes a anfotericina B, sendo um *C. gattii* e outro, *C. neoformans* em um hospital universitário.

Alguns autores também encontraram diferenças entre as duas espécies com relação a resistência aos antifúngicos, sendo *C. gattii* relativamente mais resistente do que *C. neoformans* (BYRNES, 2011; TRILLES, 2004; ALVES, 2001). O que corrobora os estudos clínicos, de que a infecção por *C. gattii* apresenta um pior prognóstico e maior dificuldade de tratamento (SPEED & DUNT, 1995; CHEN, 2000; WALRAVEN, 2011; NGAMSKULRUNGROJ, 2012).

Muitos trabalhos mostram atividade antifúngica de nanopartículas de prata sobre *Candida* sp. e sua baixa toxicidade para células humanas (MONTEIRO, 2013; AHMED, 2010; CHALOUPKA, 2010; PANACEK, 2009). Recentemente, Ishida e colaboradores (2014) mostraram a ação das nanopartículas de prata sobre *C. neoformans*. Foram observadas alterações na parede celular e membrana citoplasmática. Em nosso estudo, observamos que as nanopartículas não inibiram o crescimento do isolado 3c5 e da cepa de referência ATCC 24066 mesmo na maior concentração testada.

Por fim, realizamos a infecção em camundongos BALB/c fêmeas através de inoculação nasal. O gráfico 1 mostra a curva de morte dos animais no período de 60 dias. Apenas os isolados Lcf312, 840244 e ATCC 24066 levaram os animais a óbito no período analisado (60 dias).

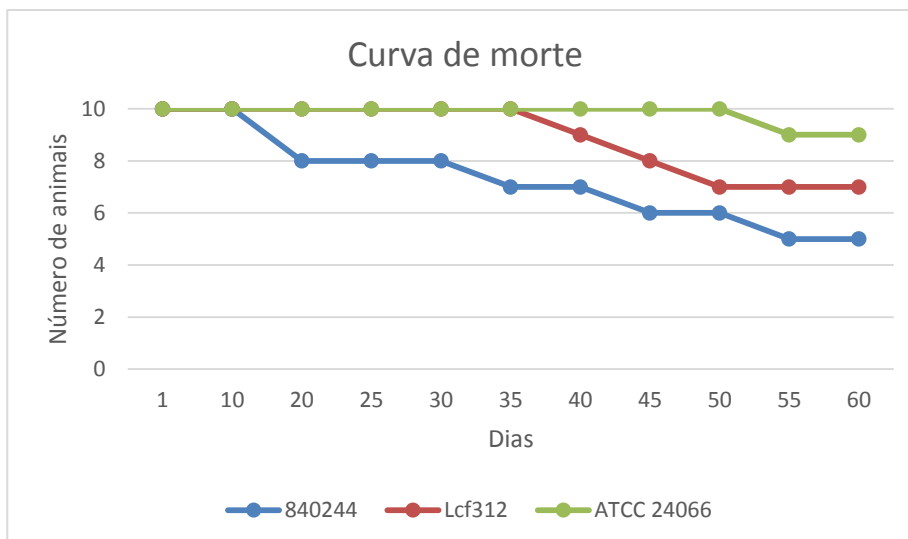


Gráfico 1: Curva de morte de animais infectados por *C. gattii*.

Alguns autores (CHENG, 2009; OKUBO, 2013; THOMPSON, 2012) descreveram que a infecção por *C.gattii* foi mais fatal, diferente do que encontramos, porém nesses trabalhos foram utilizadas vias diferentes de infecção, como intracraniana e traqueal, e condições diferentes, como animais em estado de imunossupressão. Os animais sobreviventes apresentaram alguns sintomas como: pelo eriçado, dificuldade em abrir os olhos, movimentos repetitivos de coçar e andar em círculos. Essas características indicam anomalias no sistema nervoso central.

Confirmando dados já estabelecidos por diversos autores (OKUBO, 2013; MENDES, 2009; NGAMSKULRUNGROI, 2012) *C. gattii* causa uma infecção pulmonar grave (Fig.1) e não parece ser neurotrópico, diferente de *C. neoformans*, que se dissemina com relativa rapidez no cérebro. A presença de leveduras dentro dos alvéolos, na infecção por *C. gattii*, diminuiu a capacidade pulmonar dos animais. Os isolados estudados apresentaram-se predominantemente extracelulares (não fagocitadas) e não associadas a necrose tecidual.

Em nosso estudo, notamos a presença de *C. gattii* no tecido cerebral, porém, a resposta inflamatória local é bem reduzida, quando comparada com *C. neoformans* (Fig.2). Os isolados de *C.neoformans* levaram a uma resposta inflamatória intensa, com grande quantidade de células microgliais e, nos pulmões, presença de células gigantes multinucleadas. Estudos *in vitro* sobre a função das células microgliais na infecção criptocócica cerebral indicaram que tais células são capazes de internalizar e conter inicialmente as leveduras dentro de fagolisossomas (MENDES, 2009).

Esses dados sugerem que a patofisiologia das infecções causadas por *C. gattii* e *C. neoformans* são diferentes.

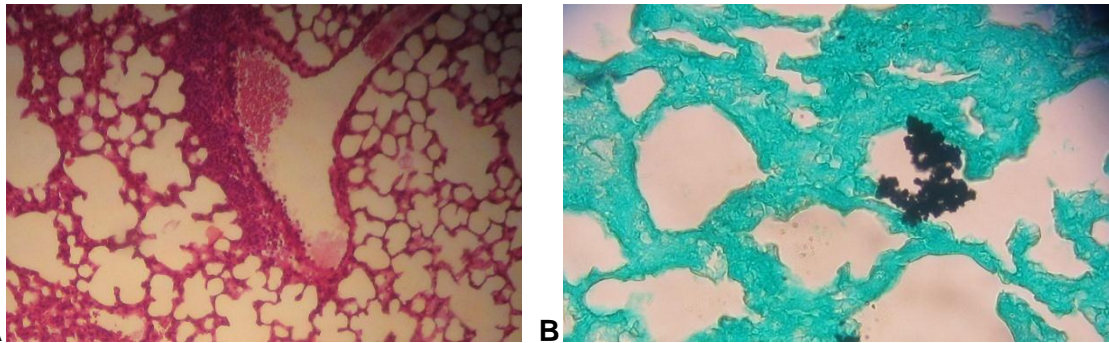


Figura 1: Detalhes das lâminas referentes ao pulmão de camundongo infectado com a amostra clínica de *C.gattii*. **A:** Coloração HE, aumento 400x, mostrando grande quantidade de células inflamatórias ao redor da estrutura bronquivascular. **B:** Coloração de grocott, aumento 400x, evidenciando, em preto, as estruturas fúngicas no interior de um alvéolo pulmonar.

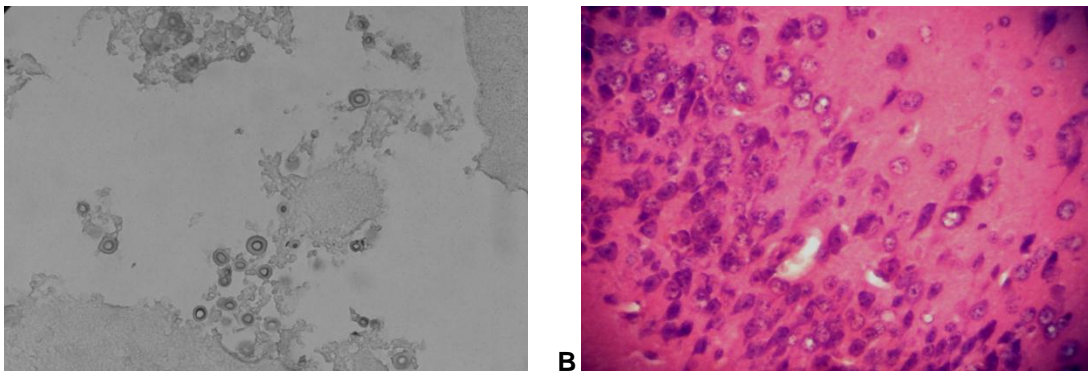


Figura 2: **A:** Presença de *C.neoformans* no tecido cerebral de camundongos. Coloração de Grocott, 400x. **B:** reação inflamatória intensa no tecido cerebral, em resposta a infecção por *C.neoformans*; presença de células microgliais. Coloração HE, 400x.

Em 1995, Dunt e Speed descreveram as diferenças clínicas entre as duas espécies de *Cryptococcus* que causam meningoencefalite em seres humanos. Os autores mostraram que a mortalidade relacionada à *C. neoformans* foi mais elevada, porém os pacientes infectados com *C. gattii* apresentaram sequelas neurológicas que necessitaram de cirurgia ou terapia prolongada. Outra preocupação dos clínicos é a capacidade de *C. gattii* de causar infecção em pacientes imunocompetentes (GOLDMAN, 2010), que se inicia nos pulmões e leva geralmente a formação de um abscesso cerebral (O'MEARA, 2012).

Dessa forma, podemos concluir que há diferenças na virulência e isso reflete na patogenia da infecção causada por *C. gattii* quando comparado a *C. neoformans*.

Além disso, como já discutido na literatura, isolados ambientais de *C.gattii* apresentam também potencial virulento.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criptococose é uma doença causada pelas leveduras que compõe o complexo *C. neoformans/C. gattii*. Com o passar dos anos, foram se evidenciando características cada vez mais diversas dentro desse grupo. Além de diferenças genotípicas e fenotípicas, diferenças no desenvolvimento da doença e na resposta ao tratamento (RODRIGUES, 2015).

Na 9ª Conferência em *Cryptococcus* e Criptococose, foi-se discutido uma revisão na taxonomia e a subdivisão de *C. neoformans* e *C. gattii* em sete novas espécies de *Cryptococcus*. O estudo dessas novas espécies se faz necessário para refinar o conhecimento e melhorar o tratamento da criptococose (IDNUM, LIN, 2015).

Em nosso trabalho, analisamos diferentes isolados de *C. gattii*, de fontes ambientais e clínicas e observamos diferenças nos fatores de virulência e no desenvolvimento da infecção. Além disso, um dos isolados de origem ambiental se mostrou resistente a Anfotericina B.

Modelos animais são necessários para estudar a criptococose e o comportamento do sistema imune frente à infecção, ou seja, o que leva a contenção da doença e quais fatores predispõe ao desenvolvimento de sintomas e ao óbito. Dados clínicos são importantes, porém há ainda muito a ser descoberto, principalmente com relação as diferentes espécies dentro do complexo *C. neoformans/C. gattii* (GIBSON, JOHNSTON, 2015).

Utilizando um modelo de infecção em camundongos, observamos diferenças com relação aos órgãos afetados e a gravidade dos sintomas. Em nosso trabalho, utilizamos animais saudáveis, sem nenhum tipo de deficiência no sistema imunológico. E ainda assim, todas as leveduras conseguiram se estabelecer nos hospedeiros, colonizando os órgãos estudados. Assim, mais análises devem ser conduzidas para esclarecer os mecanismos envolvidos na patogênese de *C. gattii* e dessa forma desenvolver novas estratégias de controle da criptococose.

Referências bibliográficas

ABADI, M.F. *et al.* **Silver nanoparticles as active ingredient used for alcohol-free mouthwash.** GMS Hyg Infect Control. Apr 29;8(1):Doc05; 2013.

AHMED, M. *et al.* **Silver nanoparticle applications and human health.** Clin Chim Acta. Dec 14;411(23-24):1841-8, 2010.

ALVES, S.H. *et al.* **In vitro** susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in southern of Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo vol.43 no.5 São Paulo Sept./Oct., 2001.

ANDRADE-SILVA, L. *et al.* **Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil.** Med Mycol; 51:635-640, 2013.

ANIL S. *et al.* **The impact of polyene, azole, and DNA analogue antimycotics on the cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in HIV infection.** Mycopathology 153: 179-185, 2002.

ANTINORI, S. **New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis.** Hindawi Publishing Corporation, Article ID 471363, 22 pages, Volume 2013.

AUSUBEL, F.M., *et al.* **Short protocols in molecular biology (4th ed.).** New York: John Wiley and Sons, 1999.

BAHN, Y.S. & JUNG, K.W. **Stress signaling pathways for the pathogenicity of *Cryptococcus*.** Eukaryot Cell. Dec;12(12):1564-77; 2013.

BAJWA, S.J. & KULSHRESTHA, A. **Fungal Infections in Intensive Care Unit: Challenges in Diagnosis and Management.** Ann Med Health Sci Res. Apr-Jun; 3(2): 238–244; 2013.

BATISTA, G.C. *et al.* **Oral colonization: A possible source for candidemia in low-weight neonates.** J Mycol Med. Jan 16. pii: S1156-5233(13)00196-0. doi: 10.1016/j.mycmed.2013.11.004. [Epub ahead of print] 2014.

BORG-VON ZEPELIN, M. **The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages.** Mol Microbiol 28: 543-554, 1998.

BORIOLO, M.F. *et al.* **Distribution and hydrolytic enzyme characteristics of *Candida albicans* strains isolated from diabetic patients and their non-diabetic consorts.** Oral Microbiol Immunol. Dec;24(6):437-50, 2009.

BYRNES, E.J. *et al.* ***Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals.** Microbes Infect. Oct;13(11):895-907, 2011.

CALDERONE R.A. & FONZI, W.A. **Virulence factors of *Candida albicans*.** Trends Microbiol 9:327- 35., 2001.

CAPISTRANO, H.M. *et al.* **Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis.** Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:947980. doi: 10.1155/2013/947980. Epub May 2, 2013.

CHALOUPKA, K. *et al.* **Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications.** Trends Biotechnol. Nov;28(11):580-8; 2010.

CHAN, M.Y.; TAY, S.T. **Enzymatic characterisation of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* and other environmental *Cryptococcus* spp.** Mycoses. Jan;53(1):26-31, 2010.

- CHASKES, S. *et al.* **Pigment Production on L-Tryptophan Medium by *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*.** PLoS ONE 9(4): e91901, 2014.
- CHATUVERDI, V. & CHATUVERDI, S. ***Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen.** Trends Microbiol. Nov;19(11):564-71; 2011.
- CHEN, S.C.A. *et al.* **Phospholipase Activity in *Cryptococcus neoformans*: A New Virulence Factor?** The Journal of Infectious Diseases;175:414-20, 1997.
- CHEN, S.C. *et al.* **Antifungal therapy and management of complications of cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii*.** Clin Infect Dis. Aug;57(4):543-5 1, 2013.
- CHEN, Y.C. *et al.* **Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan.** Diagn Microbiol Infect Dis. Mar;36(3):175-83, 2000.
- CHENG, P.Y. *et al.* ***Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in amurinemodel of infection than *Cryptococcus neoformans*.** Infection and Immunity, vol. 77, no. 10, pp. 4284–4294, 2009.
- COGLIATI, M. **Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types.** Hindawi Publishing Corporation Volume 2013, Article ID 675213, 23 pages, 2013.
- CONTANTE, C.C. *et al.* **Different risk factors for candidemia occur for *Candida* species belonging to the *C. parapsilosis* complex.** Med Mycol. May 1;52(4):403-6; 2014.
- COX, G.M. *et al.* **Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*.** Molecular Microbiology 39(1), 166±175, 2001.
- DEORUKHAR, S.C. *et al.* **Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile.** Int J Microbiol. 2014;2014:456878. doi: 10.1155/2014/456878. Epub Apr 2; 2014.
- DURÁN, N. *et al.* **Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains.** J Nanobiotechnol, 3: (8), 2005.
- ENDO, E.H. *Et al.* **Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*.** Research in Microbiology 161, 534e540, 2010.
- ESPINEL-INGROFF, A. *et al.* ***Cryptococcus neoformans* - *Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole.** Antimicrob. Agents Chemother. 56 (11), 5898–5906, 2012.

- ESPINEL-INGROFF, A., *et al.* **Cryptococcus neoformans - Cryptococcus gattii species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (6), 3107–3113, 2012.
- GLAZIER, V.; PANEPINTO, J.C. **The ER stress response and host temperature adaptation in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*.** *Virulence* 5:2, 351–356; February 15, 2014.
- GOLDMAN, J.D. *et al.* **Cryptococcosis in the immunocompetent patient.** *Respiratory care*, nov. vol 55 no 11, 2010.
- GOMES, F.S. *et al.* **Quimiotipagem e caracterização fenotípica de *Cryptococcus*.** *Rev Pan-Amaz Saude*; 1(4):43-49, 2010.
- GULAT, S. & DOLUCA DERELI, M. **Investigation of the expression levels of efflux pumps in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates.** *Mikrobiyol Bul.* Apr;48(2):325-34. 2014.
- GULLO, F.P. *et al.* **Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Nov;32(11):1377-91, 2013
- ISHIDA, K. *et al.* **Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Apr;109(2):220-8, 2014.
- JEBALI, A. *et al.* **Triangular gold nanoparticles conjugated with peptide ligands: A new class of inhibitor for *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase.** *Biochem Pharmacol.* May 30; 2014.
- KVAAL, C.A. *et al.* **Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection.** *Infect Immun*, 67: 6652-6662, 1999.
- LIU, G.Y. & NIZET, V. **Color me bad: microbial pigments as virulence factors.** *Trends Microbiol.* Sep;17(9):406-13; 2009.
- MACEDO, D.P. *et al.* **Esophagitis caused by *Candida guilliermondii* in diabetes mellitus: first reported case.** *Medical Mycology*, September 2010, Vol. 48, No. 6 : Pages 862-865, 2010.
- MARAS, B. *et al.* **Glutathione Metabolism in *Candida albicans* Resistant Strains to Fluconazole and Micafungin.** *PLoS One.* Jun 4;9(6): 2014.
- MEILLER, T.F. *et al.* **A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide.** *PlosOne*, 4: e5039, 2009.
- MENDES, F.E.S. **Correlação entre a susceptibilidade *in vitro* e a atividade *in vivo* do fluconazol em modelo murino de infecção cerebral causada por *Cryptococcus gattii*.** Dissertação de mestrado, Programa de Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Vale do Rio Doce, Gov.Valadares, MG, Brasil. 2009.

MENEZES, R.P. *et al.* **Different culture media containing methyl dopa for melanin production by *Cryptococcus* species.** Rev Soc Bras Med Trop 44(5):591-594, set-out, 2011.

MIHU, M.R. *et al.* **The impact of antifungals on toll-like receptors.** Front Microbiol. Mar 14;5:99. eCollection, 2014.

MONTEIRO, D.R. *et al.* **Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms.** Mycoses, 56, 672–680, 2013,

MONTERRUBIO, V. *et al.* **Fungemia due to *Rhodotorula mucilaginosa* in an immunocompetent, critically ill patient.** Kansenshogaku Zasshi. Sep;87(5 Suppl 8):10-2. 2013.

NGAMSKULRUNGROI, P. *et al.* **The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model.** MBio 3(3):e00103-12, 2012.

OKUBO, Y. *et al.* **How Histopathology Can Contribute to an Understanding of Defense Mechanisms against *Cryptococcus* sp.** Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation, Volume 2013, Article ID 465319, 11 pages, 2013.

O'MEARA, T.R. & ALSPAUGH, J.A. **The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield.** Clin Microbiol Rev. Jul;25(3):387-408; 2012.

PALIWAL, D. & RANDHAWA, .HS. **Evaluation of a simplified *Guizotia abyssinica* seed medium or differentiation of *Cryptococcus neoformans*.** J Clin Microbiol. Apr;7(4):346-8, 1978.

PANACEK, A. *et al.* **Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp.** Biomaterials. Oct;30(31):6333-40, 2009.

PAPPAS, P.G. **Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients.** Trans Am Clin Climatol Assoc.,124:61-79, 2013.

PARISA, B. & HASHEMIZAD, Z. **Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management.** Indian J Med Res 139, pp 195-204, February 2014.

PESSOA, C.C.B. *et al.* **Produção de fatores de virulência in vitro por isolados de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*.** Rev Pan-Amaz Saude 3(2):59-65, 2012.

PFALLER, M.A. *et al.* **In vitro activities of voriconazole, fluconazole, and itraconazole against 566 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from the United States and Africa.** Antimicrob. Agents Chemother., 43: 169-171, 1999.

PIRES, C.A.A. *et al.* **Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis.** An Bras Dermatol.;89(2):259-64, 2014.

PONTECORVO, G. *et al.* **The genetics of *Aspergillus nidulans*.** *Advances in Genetics*, San Diego, v. 5, p. 141-238, 1953.

POZZATTI, P. *et al.* **Activities of essential oils in the inhibition of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* germ tube formation** *Journal de Mycologie Médicale*) 20, 185—189 ; 2010.

PRICE, M.F., *et al.* **Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*.** *Sabouraudia*, 20: 14-20, 1982.

RAMOS, L.D. *et al.* **Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis.** *Rev Iberoam Micol.* May 20. pii: S1130-1406(14)00041-2. doi: 10.1016/j.riam.2014.01.003. [Epub ahead of print] 2014.

ROJAS-GARCIA, O.C. *et al.* **Coccidioidomycosis cutánea primaria en infante.** *Gaceta Médica de México.*;150:175-6, 2014.

SAHIN I. *et al.* **Prevalance and risk factors for yeast colonization in adult diabetic patients.** *Ethiop Med J* 43(2):103-109, 2005.

SANTOS, J.R. *et al.* **Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis.** *PLoS One.* Nov 13;9(11):e112669, 2014.

SCHALLER M. *et al.* **The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium.** *Infect Immun*, 71: 3227-3234, 2003.

SCHALLER, M. *et al.* **Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis.** *Mol Microbiol*, 34: 169-180, 1999.

SCHALLER, M. *et al.* **Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis.** *J Invest Dermatol*, 114: 712-717, 2000.

SILVA, J.M. & DOS SANTOS, S DE S. **Sepsis in AIDS patients: clinical, etiological and inflammatory characteristics.** *J Int AIDS Soc.* Jan 30;16:17344; 2013.

SILVA, P.R. *et al.* **Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.41 no.2 Uberaba Mar./Apr. 2008.

SIONOV, E. *et al.* **Azole heteroresistance in *Cryptococcus neoformans*: emergence of resistant clones with chromosomal disomy in the mouse brain during fluconazole treatment.** *Antimicrob Agents Chemother.* Oct;57(10):5127-30, 2013.

SMITH, R.M. *et al.* **Treatment and outcomes among patients with *Cryptococcus gattii* infections in the United States Pacific Northwest.** *PLoS One.* Feb 19;9(2):e88875, 2014.

- SOUZA, L.K. *et al.* **Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiânia city, Goiás, Brazil.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. Sep-Oct;47(5):253-6, 2005.
- SPEED, B.; DUNT, D. **Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*.** Clin Infect Dis. Jul;21(1):28-34; 1995.
- SULLIVAN, D.J., *et al.* **Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*.** FEMS Yeast Res 4: 369-376, 2004.
- STAN, C.D. *et al.* **Echinocandins--new antifungal agents.** Rev Med Chir Soc Med Nat IasiApr-Jun;118(2):528-36, 2014.
- TEODORO, V.L.I. *et al.* **Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 46(6):759-764, Nov-Dec, 2013.
- THOMPSON, G.R. *et al.* **Phenotypic Differences of *Cryptococcus* Molecular Types and Their Implications for Virulence in a *Drosophila* Model of Infection.** Infect Immun. Jul;82(7):3058-3065. Epub 2014 May 5, 2014.
- THOMPSON, G.R. *et al.* **A murine model of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis.** J Antimicrob Chemother; 67: 1432–1438, 2012.
- TRILLES, L. *et al.* **In Vitro Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus gattii*.** Journal of Clinical Microbiology, , p. 4815–4817 Vol. 42, No. 10, Oct. 2004.
- VECCHIARELLI, A. *et al.* **Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule.** Future Microbiol. Sep;8(9):1107-16; 2013.
- VILLAR, C.C. *et al.* **Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p.** Infect Immun, 75: 2126-2135, 2007.
- VIUDA-MARTOS, M. *et al.* **Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly.** JOURNAL OF FOOD SCIENCE, Vol. 73, Nr. ; 2008.
- WALRAVEN, C.J. *et al.* **Fatal Disseminated *Cryptococcus gattii* Infection in New Mexico.** PLoS ONE 6(12): e28625, 2011.
- XIE, J.L. *et al.* **Elucidating drug resistance in human fungal pathogens.** Future Microbiol. Apr;9:523-42, 2014.
- XU, C.Y. *et al.* **Increased permeability of blood–brain barrier is mediated by serine protease during *Cryptococcus meningitis*.** Journal of International Medical Research 42: 85, 2014.
- YANGO, Y.L. *et al.* **Characterization of *Candida* species from different populations in Taiwan.** Mycopathologia. Aug;172(2):131-9; 2011.
- ZARAGOZA, O. & CASADEVALL, A. **Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*.** Biol Proced Online.;6:10-5, 2004.