



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAROLINE SOUZA AZEVEDO

**POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DOS  
COMPLEXOS *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus  
gattii* ISOLADAS DE EXCRETAS DE AVES DA CIDADE DE  
LONDRINA, PARANÁ**

CAROLINE SOUZA AZEVEDO

**POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DOS  
COMPLEXOS *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus  
gattii* ISOLADAS DE EXCRETAS DE AVES DA CIDADE DE  
LONDRINA, PARANÁ**

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

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucy Megumi Yamauchi  
Lioni.

Londrina  
2017

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

Azevedo, Caroline Souza.

Potencial de virulência de leveduras dos complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isoladas de excretas de aves da cidade de Londrina, Paraná. / Caroline Souza Azevedo. - Londrina, 2017.  
64 f.

Orientador: Lucy Megumi Yamauchi Lioni.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2017.  
Inclui bibliografia.

1. *Cryptococcus* spp. - Tese. 2. excretas de aves - Tese. 3. antifúngicos - Tese. 4. fatores de virulência - Tese. I. Lioni, Lucy Megumi Yamauchi. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

CAROLINE SOUZA AZEVEDO

**POTENCIAL DE VIRULÊNCIA DE LEVEDURAS DOS  
COMPLEXOS *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus  
gattii* ISOLADAS DE EXCRETAS DE AVES DA CIDADE DE  
LONDRINA, PARANÁ.**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucy Megumi Yamauchi  
Lioni  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 03 de março de 2017.

Aos meus avós, Ciro e Rosalina (*in  
memoriam*), e Ivone e José; e aos  
meus pais, Lena e Ademar que me  
deram a base para chegar até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela oportunidade e à CAPES pela bolsa de estudos a mim concedida.

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni, por tudo o que me ensinou durante os anos em que fui sua orientanda, pela paciência e confiança depositada em mim durante o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio e ao Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares por aceitarem participar da banca examinadora desse trabalho.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Sueli Fumie Yamada Ogatta, por tudo o que me ensinou e pela ajuda, sempre que necessária, para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, pela amizade, pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho, pela troca de experiências e pelos momentos de descontração. Em especial agradeço ao Eliandro, por tudo que me ensinou sobre *Cryptococcus* spp.; à Thainá, que me ajudou na execução de grande parte dos experimentos; a Jussevania, Pollyana, Gabriella, Ana Elisa, pela troca de experiências, pela amizade e pelos momentos de descontração; a Danielle e Patrícia por toda a ajuda com a experimentação animal.

Agradeço à minha família, minha base, pela dedicação, por me apoiarem mesmo nos momentos mais difíceis e me incentivar a fazer sempre o melhor. Sem o apoio de vocês eu não teria chegado até aqui.

Agradeço aos meus amigos de fora do laboratório, em especial os amigos do Grupo de Oração Espada de São Miguel Arcanjo e do Grupo de Jovens Sagrados Corações pela amizade, por estarem comigo, fortalecendo juntos a nossa fé e motivando sempre a seguir em frente.

Agradeço a Deus, por ser minha base, minha força e proteção.

*“Professor, sê um mestre. Há uma diferença sutil  
entre este e aquele.*

*Este leciona e vai prestes a outros afazeres.*

*Aquele mestreia e ajuda seus discípulos.*

*O professor tem uma tabela a que se apega.*

*O mestre excede a qualquer tabela e é sempre um mestre.*

*Feliz é o professor que aprende ensinando.”*

***Exaltação de Aninha (O Professor) – Cora Coralina***

AZEVEDO, Caroline Souza. **Potencial de virulência de leveduras dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii* isoladas de excretas de aves da cidade de Londrina, Paraná. 2017.** 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

A cidade de Londrina, localizada no norte do Paraná, tem uma grande concentração de pombos no ambiente urbano, cuja presença está relacionada a transmissão de doenças, como a criptococose, infecção causada por leveduras do gênero *Cryptococcus* que podem estar presentes nas excretas de aves. A fim de caracterizar os fungos presentes na cidade, este trabalho teve por objetivo isolar, identificar e caracterizar os perfis de virulência e sensibilidade aos antifúngicos de *Cryptococcus* spp. isolados de excretas de aves da cidade de Londrina, PR. Foram coletadas 100 amostras de excretas de aves, em quatro locais na cidade, que foram processadas, inoculadas em Sabouraud dextrose ágar com cloranfenicol e incubadas a 28 °C por até 7 dias. As colônias leveduriformes foram isoladas e identificadas como *Cryptococcus* spp. por visualização da cápsula através da coloração negativa com tinta da China. A identificação da espécie foi realizada através de testes fenotípicos e moleculares. Foram realizadas a tipagem molecular dos isolados por PCR-RFLP do gene URA5 e identificação do *mating type* por PCR. Foram realizados testes fenotípicos de avaliação das amostras produtoras de urease, fosfolipase, melanina e formação de biofilme. Foi avaliado o perfil de sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B por microdiluição em caldo. Foi avaliada a sobrevivência de camundongos BALB/c após a infecção por quatro isolados de *C. neoformans*. Das cem amostras coletadas, 47% apresentaram crescimento de *Cryptococcus* spp.. De acordo com a identificação fenotípica, 68% dos isolados foram identificados como complexo *C. neoformans* e 32% como complexo *C. gattii*; já na identificação molecular foram 57,4% complexo *C. neoformans* e 42,6% complexo *C. gattii*. Essa diferença deve-se a maior especificidade dos testes moleculares. A tipagem molecular apresentou 31,9% dos isolados tipo VNI, 25,5% VNIII, 40,5% VGI e 2,1% VGII. 82,9% dos isolados foram identificados como MAT $\alpha$  e 17,1% MATa. A produção de urease foi observada em 89,4% dos isolados e de melanina em 31,9%. Os isolados apresentaram índice Pz médio de 0,61 $\pm$ 0,11, classificados como produtores intermediários de fosfolipase. Quanto a formação de biofilme, as leituras oscilaram entre 0,02 $\pm$ 0,03 e 1,70 $\pm$ 0,28. A maioria dos isolados foram sensíveis ao fluconazol, 2,1% dos isolados foram resistentes (CIM > 8  $\mu$ g/mL), enquanto 19,1% foram resistentes a anfotericina B (CIM > 1  $\mu$ g/mL). Na avaliação da virulência, os animais foram acompanhados por 100 dias, e a infecção não foi letal. Este trabalho demonstra que os isolados de *Cryptococcus* spp. encontrados nas excretas de aves de Londrina têm capacidade de produzir diversos fatores de virulência, e alguns também apresentaram resistência à anfotericina B, um dado importante visto que essa resistência é pouco comum. Este trabalho mostrou o isolamento, identificação e a caracterização de virulência e do perfil de sensibilidade de *Cryptococcus* spp. isolados de excretas de aves da cidade de Londrina, Paraná, Brasil.



**Palavras-chaves:** *Cryptococcus* spp.; excretas de aves; antifúngicos; fatores de virulência.

AZEVEDO, Caroline Souza. **Virulence potential of yeasts of the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* complexes isolated from bird excreta in the city of Londrina, PR. 2017.** 61 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Londrina is a city located to the Northern of the Paraná State where there are great population of pigeons in the urban environment, and its presence is related to the disease transmission, such as cryptococcosis, an infection caused by the *Cryptococcus* yeast genus, that can be present in bird excreta. In order to characterize the fungi presents in the city, this work aimed to isolate, identify and characterize the virulence and antifungal susceptibility profiles of *Cryptococcus* spp. isolated in bird excreta in four places in the city. It were collected 100 bird excreta, in four places of the city, that were diluted in PBS with chloramphenicol 0.4 g/L, inoculated in Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol and incubated to 28 °C for up to 7 days. The yeast colonies were isolated and identified as *Cryptococcus* spp. by capsule identification with China ink. Specie identification was performed by phenotypical and molecular tests. The molecular typing of the strains was realized for PCR-RFLP of the URA5 gene, and identification of the mating type by PCR. It were made phenotypic tests of evaluation of the strains producers of urease, phospholipase, melanin and the ability of biofilm formation. It was measured the susceptibility profile to the antifungals fluconazole and amphotericin B by the broth microdilution test. It was evaluated the survival of BALB/c mice after the infection by four isolates of *C. neoformans*. Of the 100 collected samples, 47% of them were identified to *Cryptococcus* spp. In according to the phenotypic test, 68% were identified to *C. neoformans* complex, and 32% were *C. gattii* complex. On the other hand, in the molecular typing were 57.4% *C. neoformans* complex and 42.6% *C. gattii* complex. This difference is due to the superior specificity of molecular tests. The molecular typing showed 31.9% of the strains were VNI, 25.5% VNIII, 40.5% VGI and 2.1% VGII. 82.9% of the isolates were MAT $\alpha$  and 17,1% MATa. Urease production were observed in 89.4% of the strains and melanin in 31.9%. The strains presented Pz medium of 0.61 $\pm$ 0.11, classified such as intermediate producer. As to biofilm formation, the reads ranged from 0.02 $\pm$ 0.03 to 1.70 $\pm$ 0.28. Most of the strains were susceptible to fluconazole, only 2.1% were resistant (MIC > 8  $\mu$ g/mL), while 19.1% were resistant to amphotericin B (MIC > 1  $\mu$ g/mL). In the virulence evaluation, the animals were observed for 100 days, the infection are not lethal. This work exhibit that the *Cryptococcus* spp. strains founded in bird excreta in Londrina have capacity to produce several virulence factors, and some of them presented resistance to amphotericin B, that is an important data because this resistance is uncommon. This work presented to the isolation, identification and the characterization of the virulence and susceptibility profiles of *Cryptococcus* spp. isolated to the bird excreta of Londrina city, Paraná, Brazil.

**Keywords:** *Cryptococcus* spp.; bird excreta; antifungals; virulence factors.

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Tabela 1</b> - Nova proposta de nomenclatura para os complexos <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	15
---	----

### ARTIGO

<b>Tabela 1</b> - Incidência de <i>Cryptococcus</i> spp. em excretas de aves por local de coleta.....	56
<b>Tabela 2</b> - Identificação fenotípica e molecular dos isolados de <i>Cryptococcus</i> spp. de excretas de aves.....	57
<b>Tabela 3</b> - Mating type e fatores de virulência de <i>Cryptococcus</i> sp. isolados de excretas de aves.....	58
<b>Tabela 4</b> - Perfil de sensibilidade de <i>Cryptococcus</i> spp. aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS - REVISÃO

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado)
CGB	L-Canavanina, Glicina, Azul de Bromotimol
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
GalXM	Galactoxilomanana
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos
GXM	Glucuronoxilomanana
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LFA	<i>Lateral Flow Assay</i>
MAT $\alpha$	<i>mating type <math>\alpha</math></i>
MATa	<i>mating type a</i>
MLST	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PLB	Fosfolipase B
PLC	Fosfolipase C
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RNA	Ácido Ribonucléico

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS - ARTIGO

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado)
CGB	L-Canavanina, Glicina, Azul de Bromotimol
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
IGS	Espaço Intergênco
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucuronoxilomanana
MAT $\alpha$	<i>mating type <math>\alpha</math></i>
MATa	<i>mating type a</i>
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBE	tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
2.1	O GÊNERO <i>CRYPTOCOCCUS</i> .....	12
2.1.1	Histórico das Classificações dos Complexos <i>C. Neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	12
2.1.2	Ciclo de Vida dos Complexos <i>C. Neoformans</i> e <i>C. gattii</i> .....	15
2.2	ECOLOGIA DOS COMPLEXOS <i>C. NEOFORMANS</i> E <i>C. GATTII</i> .....	16
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>CRYPTOCOCCUS SPP.</i> .....	17
2.3.1	Cápsula.....	17
2.3.2	Produção de Melanina .....	18
2.3.3	Produção de Enzimas Hidrolíticas .....	19
2.3.3.1	Fosfolipases .....	19
2.3.3.2	Urease.....	20
2.3.4	Formação de Biofilme .....	20
2.3.5	Alterações no Tamanho Celular.....	21
2.4	A <i>CRIPTOCOCOSE</i> .....	21
2.4.1	Distribuição Mundial da Doença.....	21
2.4.2	Patogênese .....	23
2.4.3	Diagnóstico Laboratorial.....	24
2.4.4	Tratamento.....	25
	REFERÊNCIAS .....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	40
3.1	OBJETIVO GERAL.....	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	40
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b> .....	41
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60

## 1 Introdução

A cidade de Londrina localizada na região Norte do estado do Paraná, é uma cidade de médio porte, com cerca de 553.393 habitantes, segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Apresenta clima subtropical úmido mesotérmico, com temperatura média anual de cerca de 20 °C (Prefeitura de Londrina, 2016; IBGE, 2016).

Estima-se que existam 400.000 pombos na região de Londrina, pertencentes a duas espécies: pomba doméstica (*Columba livia*) e pomba amargosa (*Zenaida auriculata*). *C. livia*, espécie nativa do mediterrâneo, foi trazida ao Brasil como ave doméstica; enquanto *Z. auriculata* é nativa da região (SARIS, 2016; GIROLDO et al., 2014). A grande população de pombos no ambiente urbano, principalmente *C. livia*, pode ser considerado um problema de saúde pública por estar relacionada a transmissão de diversas doenças, como a criptococose (GIROLDO et al., 2014, NUNES, 2003; ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008; SPINA-TENSINI et al., 2016).

A criptococose é uma infecção oportunista transmitida por meio da inalação de leveduras capsuladas pertencentes ao gênero *Cryptococcus*, presentes em locais com acúmulo de excretas de aves (principalmente pombos), em árvores, poeira e ar (ALVES et al., 2016; BRITO-SANTOS et al., 2015; CASTRO E SILVA et al., 2016; LEITE Jr. et al., 2012; TAKAHARA et al., 2013; TEODORO et al., 2013; YAMAMURA et al., 2013). As leveduras inaladas alcançam primeiramente os pulmões, de onde se disseminam por via hematogênica, acometendo diversos sítios anatômicos, como a pele, (criptococose cutânea) e o sistema nervoso central, causando meningite (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; KWON-CHUNG; SAIJO, 2015). As principais espécies causadoras de criptococose são as pertencentes aos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*; entretanto, outras espécies do gênero, como *C. laurentii* e *C. albidus*, podem também causar esta infecção (FONSECA; BOEKHOUT; FELL, 2011; KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007).

Spina-Tensini e colaboradores (2016) confrontaram os endereços de pacientes com criptococose na cidade de Curitiba e os locais onde se encontram os pombos na cidade, e observaram que pacientes com criptococose residiam em regiões onde haviam pombos. Dada a presença de pombos encontrada no ambiente

urbano de Londrina, é importante conhecer os perfis de virulência e sensibilidade aos antifúngicos de *Cryptococcus* spp. presentes nas excretas de aves encontradas no ambiente urbano e que estão em contato com a população.



## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 O GÊNERO *CRYPTOCOCCUS*

O gênero *Cryptococcus* é composto por mais de setenta espécies de leveduras não fermentadoras, esferoidais, ovoides, elipsoidais ou alongadas, envoltas por uma cápsula polissacarídica. Os principais patógenos do gênero são as espécies atualmente classificadas nos complexos *C. neoformans* e *C. gattii* (FONSECA; BOEKHOUT; FELL, 2011; HAGEN et al., 2015).

#### 2.1.1 Histórico das classificações dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*

Em 1894, na Itália, Francesco Sanfelice isolou, a partir de suco de pêsego, uma levedura, que foi chamada de *Saccharomyces neoformans* (SANFELICE, 1894). Na mesma época, na Alemanha, Otto Busse e Abraham Buschke isolaram uma levedura numa lesão de tibia de uma mulher, com morfologia semelhante a *Saccharomyces* sp. (BUSSE, 1895; BUSCHKE, 1895). Em 1901, Jean-Paul Vuillemin observou que estes fungos não produziam ascósporo, não podendo, assim, ser classificados como *Saccharomyces* e, conseqüentemente, não sendo ascomiceto. Por essa razão foi necessário reclassificá-los, originando, assim, o gênero *Cryptococcus* e a espécie *C. neoformans* (VUILLEMIN, 1901).

Inicialmente, os complexos *C. neoformans* e *C. gattii* foram classificados em três sorotipos: A, B e C (EVANS, 1950). Posteriormente, foi descrito um quarto sorotipo, o sorotipo D (WILSON; BENNETT; BAILEY, 1968). Em 1970, observou-se que os sorotipos B e C diferenciavam-se dos demais por produzir formas alongadas *in vivo*. Assim, foram classificados como *C. neoformans* var. *gattii* (GATTI; EECKELS, 1970; VANBREUSEGHEM; TAKASHIO, 1970). Em 1999, observou-se que os sorotipos A e D apresentavam diferenças genéticas significantes entre si, dividindo os entre duas variedades: o sorotipo A foi nomeado *C. neoformans* var. *grubii* e o sorotipo D *C. neoformans* var. *neoformans* (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999). Posteriormente, devido a diferenças genéticas, *C. neoformans* var. *gattii* foi então reclassificado como espécie *C. gattii* (KWON-CHUNG et al., 2002).

Com o desenvolvimento da biologia molecular, várias técnicas têm sido utilizadas para estudar as diferenças genéticas entre as espécies do gênero *Cryptococcus*, estabelecer relações filogenéticas entre diferentes cepas, permitindo um maior conhecimento sobre semelhanças e diferenças entre os microrganismos do gênero (SIDRIM et al., 2010).

A técnica de PCR *fingerprinting* consiste na amplificação de sequências de DNA hipervariáveis. Utiliza como oligonucleotídeo iniciador a sequência minissatélite específica do core do tipo selvagem do fago M13 ou sequências microssatélite (GACA)<sub>4</sub> ou (GTG)<sub>3</sub> que após a separação por eletroforese produz um padrão de bandas específico. Esta foi uma das primeiras técnicas desenvolvidas para avaliar variabilidade genética entre diferentes cepas (CASTRO E SILVA et al., 2016; FREIRE et al., 2012; KIDD et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2007; MEYER et al., 1993; 1999; MORA et al., 2010). A técnica de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) consiste na amplificação aleatória do DNA genômico, e permite avaliar a diversidade genética entre as cepas (SORRELL et al., 1996; MEYER et al., 1999). Ambas as técnicas separam *C. neoformans* em quatro tipos moleculares: VNI, VNII, VNIII e VNIV (MEYER et al., 1999; RIBEIRO et al., 2006); e *C. gattii* em: VGI, VGII, VGIII e seus subtipos (CHEN et al., 1997; RUMA et al., 1996; SORRELL et al., 1996).

A técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) consiste em amplificar um fragmento de DNA e depois clivá-lo com enzimas de restrição, produzindo também um padrão de banda específico na eletroforese (SIDRIM et al., 2010). As sequências normalmente amplificadas para *Cryptococcus* são: genes *URA5* (codifica orotidina monofosfato pirofosforilase, enzima responsável por converter ribonucleosídeos em desoxirribonucleosídeos) (CASTRO E SILVA et al., 2016; MEYER et al., 2003); *PLB1* (codifica fosfolipase B1) (LATOUCHE et al., 2003), *CAP59* (gene capsular) (ENACHE-ANGOLVANT et al., 2007; RAIMONDI et al., 2007). Diferencia *C. neoformans* e *C. gattii* em quatro tipos moleculares cada: VNI, VNII, VNIII e VNIV; e VGI, VGII, VGIII e VGIV (ENACHE-ANGOLVANT et al., 2007; LATOUCHE et al., 2003; MEYER et al., 2003).

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) é uma técnica de tipagem molecular composta por quatro fases: clivagem do DNA genômico com enzimas de restrição, ligação de adaptadores às extremidades coesivas dos fragmentos clivados, amplificação dos fragmentos por PCR utilizando iniciadores específicos que reconhecem a sequência dos adaptadores e eletroforese em gel de alta resolução (BOEKHOUT et al., 2001). É uma técnica com alto poder discriminatório, que classifica os tipos moleculares de *Cryptococcus spp.* da seguinte forma: os tipos AFLP1, AFLP1A, AFLP1B, AFLP2 e AFLP3 e seus subtipos *C. neoformans*; os tipos AFLP4, AFLP5, AFLP6, AFLP7 e AFLP10 *C. gattii* (HAGEN et al., 2010). Além desses tipos, já foram descritos alguns híbridos entre *C. neoformans* e *C. gattii*: O híbrido entre *C. neoformans* AFLP2 x *C. gattii* AFLP4 é o tipo AFLP8; o híbrido entre *C. neoformans* AFLP1 x *C. gattii* AFLP4 é o tipo AFLP9 e o híbrido entre *C. neoformans* AFLP1 x *C. gattii* AFLP6 é o AFLP11 (AMINNEJAD et al., 2010; BOVERS et al., 2006; 2008).

MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) é a técnica de tipagem molecular que apresenta maior reprodutibilidade entre laboratórios. Consiste na análise de variação das sequências de genes “*housekeeping*”, ou seja, genes que mantêm funções básicas da célula e são constantemente expressos pelo organismo. Para *C. neoformans* e *C. gattii* foram padronizados os seguintes genes: *CAP59*, *GPD1*, *LAC1*, *PLB1*, *SOD1*, *URA5* e a região IGS1, e a classificação por essa técnica confirma a classificação obtida por RFLP e AFLP (Tabela 1) (MEYER et al., 2009).

Com base na análise das diferenças fenotípicas e genéticas entre os tipos moleculares observada através dessas diferentes técnicas, em 2015 foi proposta uma nova classificação, na qual cada tipo é considerado uma espécie. O complexo *C. neoformans* foi dividido em duas espécies: *C. neoformans* (sorotipo A, VNI e VNII, AFLP 1, AFLP 1 A e AFLP 1B) e *C. deneoformans* (sorotipo D, VNII e AFLP2) e o híbrido *C. neoformans* x *C. deneoformans* (sorotipo AD, AFLP3, VNIII) Já o complexo *C. gattii* foi dividido em cinco espécies: *C. gattii* (sorotipo B, VGI e AFLP4), *C. deuterogattii* (sorotipo B, VGII, AFLP6), *C. decagattii* (sorotipo B, VGIV, AFLP10), *C. bacillisporus* (sorotipo C, VGIII, AFLP5) e *C. tetragattii* (sorotipo C, VGIV, AFLP7); e três híbridos: *C. deneoformans* x *C. gattii* (AFLP8), *C. neoformans* x *C. gattii*

(AFLP9) e *C. neoformans* x *C. deuterogattii* (AFLP11) (Tabela 1) (HAGEN et al., 2015).

**Tabela 1:** Nova proposta de nomenclatura para os complexos *C. neoformans* e *C. gattii*

Nomenclatura conhecida	MLST	AFLP	PCR <i>fingerprinting</i> e RFLP	Nomenclatura proposta
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	Clado F	AFLP1	VNI	<i>C. neoformans</i>
	Clado G	AFLP1A	VNII	
	Clado H	AFLP1B	VNII	
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Clado I	AFLP2	VNIV	<i>C. deneoformans</i>
<i>C. neoformans</i> híbrido intervariedades	-	AFLP3	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
<i>C. gattii</i>	Clado D	AFLP4	VGI	<i>C. gattii</i>
	Clado C	AFLP5	VGIII	<i>C. bacillisporus</i>
	Clado A	AFLP6	VGII	<i>C. deuterogattii</i>
	Clado E	AFLP7	VGIV	<i>C. tetragattii</i>
	Clado B	AFLP10	VGIV/VGIIIc	<i>C. decagattii</i>
Híbrido <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> x <i>C. gattii</i> AFLP4/VGI	-	AFLP8	-	Híbrido <i>C. deneoformans</i> x <i>C. gattii</i>
Híbrido <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> x <i>C. gattii</i> AFLP4/VGI	-	AFLP9	-	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. gattii</i>
Híbrido <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> x <i>C. gattii</i> AFLP6/VGII		AFLP11		Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deuterogattii</i>

**Fonte:** adaptado de Hagen e colaboradores (2015)

### 2.1.2 Ciclo de vida dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii*

Os complexos *C. neoformans* e *C. gattii* podem se reproduzir por duas formas: assexuadamente por brotamento (KWON-CHUNG, 2011), ou por reprodução sexuada bipolar, onde dois *mating types* diferentes, MAT $\alpha$  e MAT $\alpha$ ,

fundem-se, gerando uma nova linhagem, diferente dos seus parentais (KWON-CHUNG, 1975; 1976). O ciclo sexuado do complexo *C. neoformans* foi primeiramente descrito por Kwon-Chung em 1975, e a forma sexuada foi chamada *Filobasidiella neoformans*, e do complexo *C. gattii*, descrita também por Kwon-Chung no ano seguinte, foi chamada *F. bacillispora* (KWON-CHUNG, 1975; 1976). Células haplóides de mating type opostos se conjugam, formando hifas dicarióticas. Posteriormente ocorre a fusão nuclear (cariogamia), recombinação genética e meiose, produzindo basidiósporos haploides, que germinam formando leveduras haploides (BULTER, 2010; KWON-CHUNG, 2011).

O ciclo sexuado é semelhante entre os dois complexos; as diferenças entre eles estão na morfologia dos basidiósporos formados. Os de *F. neoformans* são levemente rugosos, elipsóides ou globosos, enquanto os de *F. bacillispora* são lisos e baciliformes (KWON-CHUNG, 2011).

Tem sido observada elevada frequência do *mating type* MAT $\alpha$  em relação ao MAT $\alpha$ , tanto em isolados clínicos quanto ambientais. Entre 90 – 100% dos isolados encontrados nos trabalhos realizados no país são MAT $\alpha$  (BRITO-SANTOS et al., 2015; CARVALHO et al., 2007; CASTRO E SILVA et al., 2016; FERREIRA-PAIM et al., 2010; LUGARINI et al., 2008; REIMÃO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008; TRILLES et al., 2008). Acredita-se que o ciclo unipolar, que é a reprodução sexuada entre o mesmo *mating type*, tenha se desenvolvido por causa da elevada prevalência de isolados MAT $\alpha$  (FU et al., 2015; PHADKE et al., 2014).

Alguns dados mostram que isolados MAT $\alpha$  seriam mais virulentos que os isolados MAT $\alpha$ . Por essa razão foram realizados estudos com cepas congênicas (cepas com perfil genético idêntico, no qual a única diferença seria o *mating type*) para avaliar seu efeito sobre a virulência em infecções experimentais em modelo murino (NIELSEN et al., 2005; ZHU et al., 2013). Para o complexo *C. neoformans*, observou-se que isolados MAT $\alpha$  são mais virulentos que os isolados MAT $\alpha$ . Entretanto, foi observado que a virulência dos congênicos difere das cepas parentais. Isso indica que outros fatores não diretamente relacionados ao *mating type* podem estar relacionados com a virulência destas cepas (NIELSEN et al., 2005; LIN et al., 2006; 2008). Já para o complexo *C. gattii*, não foi observada diferença de

virulência nem entre os diferentes *mating types* MAT $\alpha$  e MAT $\alpha$ , e nem entre as congênicas e a cepa parental (ZHU et al., 2013).

## 2.2 ECOLOGIA DOS COMPLEXOS *C. NEOFORMANS* E *C. GATTII*

*C. neoformans* e *C. gattii* estão presentes no ambiente, no solo, em excretas de aves e em árvores. Em 1951, Emmons encontrou pela primeira vez isolados de *C. neoformans* no solo (EMMONS, 1951). Nos anos seguintes, observou que as leveduras do complexo *C. neoformans* eram encontradas em locais em que haviam excretas de pombos *Columba livia* (EMMONS, 1951; 1955; 1960).

No Brasil, o primeiro relato de isolamento do complexo *C. neoformans* a partir de excretas de pombos foi em Salvador, Bahia (SILVA; PAULA, 1963). Desde então, diversos trabalhos têm relatado a presença do fungo em diversas regiões do país em excretas desta e de outras aves (ALVES et al., 2016; ANDRADE-SILVA et al., 2010; CONTIN et al., 2011; FÁRIA et al., 2010; FERREIRA-PAIM et al., 2010; LUGARINI et al., 2008; PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2009; RIBEIRO; NGANSKULRUNGROJ, 2008; SOUZA et al., 2009; TAKAHARA et al., 2013; TEODORO et al., 2013). Sua presença também já foi encontrada em outras fontes, como ar, poeira, em *Eucalyptus* spp. e em material vegetal oriundo de diversas espécies de árvores (CASTRO E SILVA et al., 2016; LEITE Jr. et al., 2012; PEDROSO; FERREIRA; CANDIDO, 2009; REIMÃO et al., 2007; YAMAMURA et al., 2013).

Em 1984 foi observado que havia uma elevada incidência do complexo *C. gattii* em regiões tropicais e subtropicais do mundo, especialmente no norte da Austrália, mesmo nicho ecológico de *Eucalyptus camaldulensis*. Assim, concluiu-se à época que havia uma associação espécie-específica entre *C. gattii* e *E. camaldulensis* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1984; ELLIS, 1987; ELLIS; PFEIFER, 1990). No entanto, essa relação não tem sido observada no Brasil, em que o complexo *C. gattii* tem sido isolado de diversas fontes ambientais, como em árvores nativas da Mata Atlântica (BALTASAR; RIBEIRO, 2008) além de poeira, ar e excretas de aves (ABEGG et al., 2006; BRITO-SANTOS et al., 2015; LEITE Jr. et al., 2012; TEODORO et al., 2013).

## 2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *CRYPTOCOCCUS* SPP.

### 2.3.1 Cápsula

Uma das principais características do gênero *Cryptococcus* é a presença de uma cápsula polissacarídica ao redor da célula. Essa cápsula é composta majoritariamente por glucuronoxilomanana (GXM), polissacarídeo formado por ácido glucurônico, manose e xilose; em menor quantidade contém galactoxilomanana (GalXM), polissacarídeo formado por galactose, manose e xilose; e manoproteínas. O modo como os polissacarídeos se ligam à manose na GXM é que possibilita a distinção dos complexos *C. neoformans* e *C. gatti* em quatro sorotipos (DOERING, 2000; O'MEARA; ALSPAUGH, 2012; ZARAGOZA et al., 2009).

A cápsula de *Cryptococcus* spp. é composta por uma matriz polimérica polissacarídica com densidade e porosidade variáveis. Sua densidade é maior na região mais próxima à parede celular, e decai gradualmente em direção à borda (GATES; THORKILDSON; KOZEL, 2004). Além disso, o seu volume pode variar bastante de acordo com a força iônica do ambiente aquoso ao redor, visto que 90% do volume total é de água (MAXSON et al., 2007). Sua plasticidade é inversamente proporcional à concentração de cálcio, assim, na presença desse íon há a formação de ligações iônicas que estabilizam a cápsula (FRASES et al., 2009).

A cápsula é uma estrutura que serve para a proteção do fungo contra a dessecação e contra a fagocitose por amebas, no ambiente. No hospedeiro serve como defesa contra a fagocitose por macrófagos (ARAUJO et al., 2012; GERSTEIN, NIELSEN, 2017). A GXM confere carga eletrostática negativa às células, o que inibe a migração de leucócitos para o local da infecção e repele as células fagocitárias. Como a carga é proporcional ao tamanho da cápsula, quanto maior a cápsula, maior a resistência à fagocitose. Na natureza, as leveduras podem apresentar cápsula pequena, no entanto, no decorrer da infecção sua espessura aumenta (ARAUJO et al., 2012; COELHO, BOCCA, CASADEVALL, 2014).

### 2.3.2 Produção de melanina

A síntese da melanina por *Cryptococcus* spp. é realizada por uma lacase, e utiliza como substrato compostos fenólicos de origem exógena, como L ou D-DOPA, monofenóis, difenóis e esculina (CHASKES; TYNDALL, 1975; EDBERG et al., 1980; EISENMAN et al., 2007; MENEZES; PENATTI; PEDROSO, 2011; PALIWAL; RANDHAWA, 1978; POLACHEK; PLATT; ARONOVITCH, 1990). Ela é realizada dentro de vesículas localizadas na parede celular que seriam análogas ao melanossoma dos mamíferos (EISENMAN et al., 2009). No complexo *C. neoformans*, a melanina é encontrada não somente na parede celular, mas também em sua membrana plasmática (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003).

A produção de melanina é um mecanismo de defesa do fungo contra os danos oxidativos causados pelo calor (ROSAS; CASADEVALL, 1997), contra moléculas oxidantes produzidas pelo sistema imune do hospedeiro durante a infecção (WILLIAMSON, 1997) e ainda reduz sua sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B e caspofungina, dada a capacidade destes antifúngicos ligarem-se a melanina (DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002; IKEDA et al., 2003).

A inibição da síntese de melanina levam a redução da disseminação e morte da levedura em modelos murinos, reduzindo a carga fúngica e aumentando a sobrevivência dos animais (NOSANCHUK; OVALLE; CASADEVALL, 2001; NOVERR et al., 2004; ROSAS; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2001; SALAS et al., 1996). Dada a sua importância na patogênese do fungo, a via de síntese da melanina é um possível alvo para o desenvolvimento de novos antifúngicos (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015).

### 2.3.3 Produção de enzimas hidrolíticas

#### 2.3.3.1 Fosfolipases

As fosfolipases são um grupo de enzimas que degradam fosfolipídeos de membrana celular, fornecendo nutrientes para a levedura e favorecendo a adesão do fungo às células do hospedeiro. A principal fosfolipase envolvidas na patogênese do gênero *Cryptococcus* é a fosfolipases B (PLB). É uma enzima localizada na parede celular do fungo e está relacionada com a adesão do parasito à célula



hospedeira e a degradação de fosfolipídios da membrana plasmática (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015).

A PLB1 é a fosfolipase mais estudada como fator de virulência de *Cryptococcus* spp.. Promove a invasão do fungo no tecido hospedeiro e hidrolisa os fosfolipídios do surfactante pulmonar e da membrana plasmática, promovendo a disseminação do fungo pela corrente sanguínea (CHEN et al., 1997; CHEN et al., 2000; NOVERR et al., 2003; SANTANGELO et al., 2004; WRIGHT et al., 2007). A PLB1 está presente em diversos fungos não patogênicos, entretanto, em fungos patogênicos como *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. a enzima apresenta maior afinidade sobre fosfolipídeos presentes em membranas celulares e no surfactante pulmonar, como fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina e fosfatidilglicerol (CHEN et al., 2000; DJORDJEVIC, 2010; GERSTEIN; NIELSEN, 2017).

#### 2.3.3.2 Urease

A urease catalisa a hidrólise da uréia em amônia e CO<sub>2</sub>. Como citado anteriormente, *Cryptococcus* spp. é comumente encontrado em excretas de aves, ambiente rico em creatinina, uréia e ácido úrico; e para se beneficiar nesse ambiente o fungo utiliza a enzima (KWON-CHUNG et al., 1987; ROSARIO; ACOSTA; COLOM, 2008; RUTHERFORD, 2014; ZIMMER; ROBERTS, 1979).

A urease é considerada um fator de virulência em *Cryptococcus* spp.. Observou-se que cepas *knockout* para o gene que codifica a urease são menos virulentas que as cepas congênicas originais em modelo murino, e que ela atua na transposição da barreira hemato-encefálica. Acredita-se que isso ocorra devido ao acúmulo de amônia nos capilares, que é tóxica ao endotélio cerebral, levando ao aumento da permeabilidade e facilitando a transmigração da levedura (OLSZEWSKI et al., 2004; SHI et al., 2010; GRIFFITHS, KRETSCHMER, KRONSTAD, 2012).

#### 2.3.4 Formação de Biofilme

Biofilme é uma comunidade de células microbianas aderidas sobre uma superfície e envolta por uma matriz extracelular polimérica (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978). Várias espécies de fungos patogênicos são capazes de formar biofilmes, dentre elas, o gênero *Candida*, os complexos *C. neoformans* e *C. gattii*, *Rhodotorula* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Malassezia pachydermatis*, *Histoplasma*

*capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis* sp., *Coccidioides immitis*, *Trichosporon asahii* (SARDI et al., 2014).

Em *C. neoformans*, a formação de biofilme torna a levedura menos sensível ao calor (aquecimento a 47 °C), frio (-20 °C e -80 °C) e a exposição à luz ultravioleta, sendo, portanto, mais resistente que as células planctônicas às intempéries ambientais (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007). A formação de biofilme também reduz a sensibilidade de *C. neoformans* aos antifúngicos, como fluconazol, voriconazol, anfotericina B e caspofungina (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006b) e ao estresse oxidativo (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006a), em relação às células planctônicas.

Benaducci e colaboradores (2016) observou que *C. neoformans* e *C. gattii* em biofilme apresentaram-se mais virulentos que na forma planctônica. Observou-se também um aumento na expressão de genes relacionados a fatores de virulência, como cápsula, melanina e urease (BENADUCCI et al., 2016).

#### 2.3.5 Alterações no tamanho celular

Quando a levedura está no organismo, ela consegue alterar seu tamanho para uma melhor adaptação ao ambiente hostil do organismo hospedeiro (FELDMESSER; KRESS; CASADEVALL, 2001). A célula titã, que pode estar até 30 vezes maior que o seu tamanho normal (que é entre 4-8 µm), caracteriza-se por apresentar parede celular espessa (a parede de uma célula normal mede até 100 nm de espessura, enquanto a parede de uma célula titã pode chegar a 2 µm), cápsula mais densa na região mais próxima à parede celular e presença de grande quantidade de melanina na parede celular, tornando-a resistente aos radicais livres produzidos pelo sistema imune do hospedeiro (ZARAGOZA et al., 2010).

Enquanto as células normais de *Cryptococcus* spp. são haploides (apresentam um único conjunto de cromossomos), as células titã são poliploides, ou seja, apresentam vários pares de cromossomos, e geram células-filhas haploides e aneuploides (com número de cromossomos diferente do normal da espécie, que é 14 para os complexos *C. neoformans* e *C. gattii*). As células-filhas das células titã são mais resistentes ao estresse que as células-filhas das células normais, facilitando, assim, sua proliferação pelo organismo hospedeiro (GERSTEIN et al.,

2015; MORROW; FRASER, 2013). Como esse fenótipo melhora a sobrevivência e facilita a disseminação do fungo pelo organismo do hospedeiro, a produção de células titã pode ser considerada um fator de virulência (CRABTREE et al., 2012).

Outra mudança morfológica que pode ser encontrada é a redução do tamanho celular. Ainda há poucos estudos sobre essa alteração, mas sabe-se que ela tem a capacidade de ficar latente no organismo hospedeiro, visto que ela permanece metabolicamente inativa por longos períodos (ALANIO et al., 2015).

## 2.4 A CRIPTOCOCOSE

### 2.4.1 Distribuição mundial da doença

A criptococose é a principal causa de meningite fúngica no mundo. O complexo *C. neoformans* acomete principalmente indivíduos imunossuprimidos, mas também existem casos em pacientes sem comprometimento prévio do sistema imune (SCHMIEDEL; ZIMMERLI, 2016; SIFUENTES-OSORIO et al., 2012). A principal população acometida pela doença é a de pacientes portadores do HIV, embora, pacientes transplantados e com câncer também sejam acometidos pela doença (HENAO-MARTÍNEZ; BECKHAM, 2015; LOMES et al., 2016; SCHMALZLE et al., 2016).

O complexo *C. gattii* destacou-se mundialmente após o surto ocorrido em Vancouver, Canadá, entre 1999-2002, com vários casos de criptococose em pacientes aparentemente imunocompetentes causada por *C. deuterogattii* (HOANG et al., 2004; KIDD et al., 2004). Entretanto, é questionável a hipótese de o complexo *C. gattii* ser um patógeno primário, pois em muitos casos os pacientes podem apresentar imunocomprometimento leve, facilitando a infecção (KWON-CHUNG; SAIJO, 2015).

Kwon-Chung e Saijo (2015) defendem que *C. gattii* não é um patógeno primário, pois foram encontrados anticorpos anti-GM-CSF (anticorpos anti-fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos) em pacientes com criptococose por *C. gattii*. A presença desse anticorpo inativa esse fator de crescimento de células do sistema imune, predispondo, assim, o paciente a apresentar infecção por *C. gattii* (KWON-CHUNG; SAIJO, 2015).

Dentre os indivíduos infectados pelo HIV, estima-se que ocorram anualmente cerca de um milhão de novos casos, dos quais 650 000 vão a óbito pela doença (CDC, 2015). A maior prevalência de infecção por HIV no mundo está na África Sub-Saariana; por essa razão, esta região também apresenta a maior taxa de criptococose, com aproximadamente 720 000 casos por ano, levando a 504 000 mortes. Nas Américas e no Caribe, estima-se que ocorram 54 400 casos de criptococose anualmente, dos quais quase 30 000 vão a óbito (PARK et al., 2009; CDC, 2015).

Mundialmente, a espécie mais prevalente é *C. neoformans*, exceto na Austrália e em Papua Nova Guiné, onde *C. gattii* se destaca. Na América Latina, os mais prevalentes são *C. neoformans* e *C. deuterogattii* (COGLIATI, 2013). No Brasil, *C. neoformans* é predominante na macrorregião Sul e *C. deuterogattii* é predominante na macrorregião norte, onde é responsável por 89% das infecções (TRILLES et al., 2008). Dada a elevada prevalência de *C. deuterogattii* no Brasil, o país é considerado um reservatório natural desta espécie (COGLIATI, 2013; HAGEN et al., 2013; SOUTO et al., 2016).

#### 2.4.2 Patogênese

A infecção tem início pela inalação de leveduras dessecadas ou esporos presentes no ambiente. Assim, o trato respiratório é a principal porta de entrada do organismo, alojando-se nos pulmões (MAZIAZ; PERFECT, 2016; MAY et al., 2016). A colonização pulmonar pode ser assintomática, ou pode apresentar sintomas de pneumonia grave, podendo até a causar a síndrome da angústia respiratória, principalmente em pacientes imunossuprimidos (GARCIA-HERMOSO et al., 1999; BRIZENDINE et al., 2011).

A primeira linha de defesa do hospedeiro é a fagocitose pelos macrófagos alveolares. Para evitar a fagocitose, as leveduras dispõe de alguns mecanismos, como a formação de células titã, que são células gigantes, e a repulsão provocada pela cápsula (ARAUJO et al., 2012; ZARAGOZA et al., 2010). Entretanto, se a levedura for fagocitada, ela é capaz de sobreviver dentro do fagolisossomo utilizando fatores de virulência como urease e melanina, que neutralizam os radicais livres e aumentam o pH; e sair de dentro dele por um processo denominado vomocitose, em que é induzida a fusão da membrana do fagolisossomo com a

membrana plasmática, causando a extrusão do fungo. O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda é desconhecido (MAY et al., 2016).

A partir daí ocorre a disseminação pela corrente sanguínea, até alcançar o sistema nervoso central, que é o principal órgão acometido pelo microrganismo. No entanto, também pode infectar outros órgãos, como pele, próstata, olho e ossos (LIU; PERLIN; XUE, 2012; MAY et al., 2016).

Para alcançar o sistema nervoso central é necessário que o fungo consiga atravessar a barreira hematoencefálica, cuja função é manter a homeostase do sistema nervoso central, regulando a entrada de moléculas da corrente sanguínea e bloqueando a entrada de toxinas e microrganismos (LIU; PERLIN; XUE, 2012; TAJES et al., 2014). *Cryptococcus* spp. utiliza-se de três mecanismos para cruzar essa barreira: transcelular, passando por dentro das células endoteliais; paracelular, passando entre as células; e o mecanismo de “Cavalo de Tróia”, no qual o microrganismo transpõe a barreira dentro de macrófagos (LIU; PERLIN; XUE, 2012; MAY et al., 2016).

#### 2.4.3 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da criptococose é relativamente fácil e pode ser realizado por várias técnicas, como: exame direto da amostra clínica (líquor, sangue, lavado broncoalveolar) por microscopia, com coloração negativa com tinta da China, cultura e testes sorológicos (Consenso de Criptococose, 2008; NALINTYA; KIGGUNDU; MEYA, 2016; WILLIAMSON et al., 2017).

A técnica de coloração negativa com tinta da China evidencia o fungo, pois a cápsula polissacarídica ao redor da célula não permite que a tinta entre na célula, permitindo a visualização do fungo. Essa técnica apresenta 70-90% de sensibilidade, e identifica o apenas gênero *Cryptococcus* (Consenso de Criptococose, 2008; NALINTYA; KIGGUNDU; MEYA, 2016; WILLIAMSON et al., 2017).

O cultivo do fungo pode ser realizado em diversos meios de cultura sem cicloheximida, como: ágar Sabouraud, ágar sangue e ágar BHI (*Brain Heart Infusion*). *Cryptococcus* spp. cresce entre 25-37 °C (NALINTYA; KIGGUNDU; MEYA, 2016). Para diferenciar entre complexo *C. neoformans* e complexo *C. gattii*, pode-se fazer o

cultivo da levedura em ágar L-Canavanina, Glicina, Azul de Bromotimol (ágar CGB), que é seletivo para o complexo *C. gattii*, pois este tem habilidade de utilizar glicina como única fonte de carbono e nitrogênio (alcalinizando o pH do meio, alteração visível pela mudança da cor do meio de verde para azul promovida pelo indicador de pH azul de bromotimol) e é resistente à L-canavanina. Assim, o complexo *C. gattii* cresce nesse meio, e o complexo *C. neoformans* não (MIN; KWON-CHUNG, 1986).

A detecção do antígeno capsular (GXM) pode ser realizada por aglutinação em látex, ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) ou por imunocromatografia, como o *Lateral Flow Assay* (LFA). A técnica de aglutinação em látex é uma técnica que gera resultado rápido (10-30 minutos), entretanto, pode ter reação cruzada com fator reumatoide (para evitar falso positivo recomenda-se pré-tratamento da amostra com pronase), apresenta baixa sensibilidade para o sorotipo C e o seu custo é intermediário (NALINTYA; KIGGUNDU; MEYA, 2016; VIDAL, BOULWARE, 2015). O imunoensaio enzimático (ELISA) não requer pré-tratamento da amostra, entretanto, apresenta sensibilidade reduzida para os sorotipos C e D, além de a sua realização ser mais trabalhosa e demorada, e seu custo, maior (VIDAL, BOULWARE, 2015).

Atualmente, a técnica que vem se destacando no diagnóstico da criptococose é o LFA (*Lateral Flow Assay*), que é um teste imunocromatográfico, realizado da seguinte forma: a fita de teste é impregnada com anticorpos monoclonais que detectam todos os sorotipos com alta sensibilidade e especificidade. A amostra (que pode ser líquido, soro ou plasma), é aplicada na fita e se o antígeno estiver presente, se ligará ao anticorpo, que produzirá uma linha vermelha. Por ser de execução rápida, baixo custo, e não exigir condições especiais de armazenamento (o kit pode ser armazenado à temperatura ambiente por até dois anos), pode ser facilmente realizada em locais com poucos recursos (KOZEL; BAUMAN, 2012; NALINTYA; KIGGUNDU; MEYA, 2016; VIDAL, BOULWARE, 2015).

Embora o diagnóstico laboratorial seja simples, a criptococose é conhecida por apresentar sintomas inespecíficos. Quando não há um fator predisponente para a infecção os médicos demoram a chegar ao diagnóstico correto, dificultando, assim, o tratamento (PERFECT; BICANIC, 2015).

#### 2.4.4 Tratamento

O tratamento da criptococose é longo e dividido em três fases: fase de indução, consolidação e manutenção. A fase de indução tem por objetivo a negatificação da carga fúngica, e dura no mínimo duas semanas. Utiliza-se normalmente anfotericina B, em monoterapia ou associada à flucitosina, sendo que a associação apresenta efeito sinérgico e reduz o índice de resistência ao tratamento (HATIPOGLU; HATIPOGLU, 2013; SCHWARZ et al., 2007).

A fase de consolidação objetiva manter a negatividade do líquido e normalizar outros parâmetros clínicos e laboratoriais, durando no mínimo oito semanas. Nessa fase utilizam-se azóis, principalmente o fluconazol. A fase de manutenção é preconizada por conta do risco de recidiva. Utiliza-se fluconazol ou itraconazol em dosagem menor à etapa anterior. As dosagens e duração do tratamento varia de acordo com a gravidade da infecção e com o estado imune do paciente (KON et al., 2008; PERFECT et al., 2010).

Anfotericina B é um antifúngico da classe dos polienos, que interage com o ergosterol, esterol da membrana celular fúngica, levando à formação de poros que alteram a permeabilidade da membrana, causando a perda de conteúdo celular. Embora tenha maior afinidade ao ergosterol, a anfotericina B também pode se ligar ao colesterol, esterol de membrana dos mamíferos, e sua nefrotoxicidade está relacionada com este efeito (FILLIPIN; SOUZA, 2006; RUIZ-CAMPOS; CUENCA-ESTRELLA, 2009).

Em sua formulação convencional, a anfotericina B está complexada ao deoxicolato de sódio. Entretanto, foram desenvolvidas formulações lipídicas, como a lipossomal, complexo lipídico e dispersão coloidal, que são menos tóxicas e tão efetivas quanto a convencional. Essas formulações podem ser utilizadas se o paciente apresentar previamente disfunção renal, ou se tiver alguma predisposição a desenvolver esse quadro clínico (FILLIPIN; SOUZA, 2006). Tentando melhorar a segurança no uso desse antifúngico, Antillón e colaboradores produziram um derivado da anfotericina B (L-histidina-metil-éster de anfotericina B) que é tão efetivo quanto o precursor e mais seletivo para o fungo, o que implicou numa menor

toxicidade. Entretanto, estudos clínicos são necessários para comprovar sua segurança e eficácia em humanos (ANTILLÓN et al., 2016).

A flucitosina é um antifúngico da classe das pirimidinas que, na célula fúngica, é convertido em 5-fluorouracil, que será ligado a cadeia de RNA, produzindo RNAs inativos. Apresenta atividade somente contra leveduras, como *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., das quais muitas cepas apresentam-se resistentes. Por essa razão, utiliza-se a flucitosina sempre combinada com a anfotericina B (KON et al., 2008; PERFECT et al., 2010; RUIZ-CAMPOS; CUENCA-ESTRELLA, 2009; SCHWARZ et al., 2007).

Os azóis são uma classe de antifúngicos que atuam bloqueando a síntese de ergosterol por inibição da enzima 14-lanosterol-demetilase, impedindo, assim, o crescimento celular (ZERVOS; MEUNIER, 1993). Existem duas família de azóis: os imidazóis e os triazóis. Os imidazóis foram os primeiros azóis desenvolvidos; entretanto, devido a sua toxicidade são utilizados somente em formulações tópicas (como o cetoconazol). Os triazóis são menos tóxicos e, portanto, têm sido utilizados como alternativas no tratamento de micoses sistêmicas. Estão inclusos nessa classe o fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol (RUIZ-CAMPOS; CUENCA-ESTRELLA, 2009).

A mais nova classe de antifúngicos disponível para tratamento das micoses sistêmicas são as equinocandinas. Pertencem a essa classe: caspofungina, micafungina e anidulafungina. Elas agem inibindo a enzima  $\beta$  (1,3) - glucana sintase, impedindo a síntese de  $\beta$ -glucana, carboidrato da parede celular do fungo (GROLL et al, 2005; JOHNSON; PERFECT, 2003; MAZUELOS; RODRÍGUEZ-TUDELA, 2008) Entretanto, estudos tem demonstrado que *Cryptococcus* spp. apresenta resistência intrínseca a essa classe, por mecanismo ainda desconhecido. Nesses estudos foi demonstrado que, *in vitro*, a enzima  $\beta$  (1,3) - glucana sintase, sintetizada por *Cryptococcus* spp., apresentou sensibilidade à inibição (MALIGIE; SELITRENNIKOFF, 2005; QUINDÓS; ERASO, 2008).



## Referências

- ABEGG, M. A. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. **Mycopathologia**, v. 161, 2006. 83-91.
- ALANIO, A. et al. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. **mBio**, v. 6, n. 2, 2015.
- ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-associated enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v.14, n. 12, 2015. 1173-1185.
- ALVES, G. S. B. et al. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, 59, n. 8, 2016. 509-515.
- AMINNEJAD, M. et al. Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI e *Cryptococcus gattii* VGII. **Mycopathologia**, 173, 2012. 337-346.
- ANDRADE-SILVA, L. et al. Molecular characterization and evaluation of virulence factors of *Cryptococcus laurentii* and *Cryptococcus neoformans* strains isolated from external hospital areas. **Fungal Biology**, v. 114, 2010. p. 438-445.
- ANTILLÓN, A. et al. An amphotericin B derivate equally potent to amphotericin B and with increased safety. **Plos One**, 2016. p. 1-38.
- ANZAI, M. C. et al. *Cryptococcus gattii* VGII in a *Platymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Mycoses**, 2014. p. 414 - 418.
- ARAUJO, G. D. S. et al. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **Plos One**, v. 7, n. 1, 2012. p. 1-11.
- BALTAZAR, L. D. M.; RIBEIRO, M. A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, 2008. p. 449-453.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14:1 medical yeasts. **Yeast**, 2010. p. 875-904.
- BARONI, F. D. A. et al. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n. 2, 2006. p. 71-75.
- BENADUCCI, T. et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. biofilms *in vitro* and *in vivo* using *Galleria mellonella* as an alternative model. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. p. 1-10.
- BOEKHOUT, T. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, 2001. p. 891-907.
- BOVERS, M. et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, 2006. p. 599-607.
- BOVERS, M. et al. AIDS Patient Death Caused by Novel *Cryptococcus neoformans* × *C. gattii* Hybrid. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, 2008. p. 1105-1108.

- BRITO-SANTOS, F. et al. Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro basin. **Plos One**, v. 2, 2015.
- BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Pulmonary cryptococcosis. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, v. 32, n. 6, 2011. p. 727-734.
- BUSCHKE, A. Über eine durch Coccidium hervorgerufene Krankheit des Menschen. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, 1895. p. 14.
- BUSSE, O. Ueber Saccharomycosis hominis. **Archiv. für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin**, 1895. p. 23-46.
- BUTLER, G. Fungal Sex and Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, 2010. p. 140-159.
- CARVALHO, V. G. et al. Serotype and mating type characterization of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, 2007. p. 207-210.
- CASALI, A. K. et al. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, 2003. p. 405-415.
- CASTRO E SILVA, D. M. et al. First isolation of *Cryptococcus neoformans* genotype VNI MAT-alpha from wood inside hollow trunks of *Hymenaea courbaril*. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, 2016. p. 97-102.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **C. neoformans infection statistics**, 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/cryptococcosis-neoformans/statistics.html>>. Acesso em: nov. 2016.
- CHASKES, S.; TYNDALL, R. L. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para- and ortho-diphenols: effect of the nitrogen source. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 6, 1975. p. 509-514.
- CHEN, S. C. A. et al. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* infection in northern Australia: existence of environmental sources other than known host eucalypts. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, 1997. p. 547-550.
- CHEN, S. C. A. et al. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 65, 1997. p. 405-411.
- CHEN, S. C. et al. Purification and characterization of secretory phospholipase B, lysophospholipase and lysophospholipase/transacylase from a virulent strain of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Biochemical journal**, v. 347, 2000. p. 431-439.
- COELHO, C. et al. Analysis of cell cycle and replication of mouse macrophages after *in vivo* and *in vitro* *Cryptococcus* infection using laser scattering cytometry. **Infection and Immunity**, 80, n. 4, 2012. 1467-1478.
- COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 87, 2014. p. 1-41.

- COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. In: SARIASLANI, S.; GADD, G. M. **Advances in Applied Microbiology**. [S.l.]: Elsevier, v. 87, 2014. Cap. 1, p. 1-41.
- COGLIATI, M. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. **Scientifica**, 2013. 23 p.
- CONTIN, J. T. et al. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em fezes de pombos na cidade de Caratinga, MG - Brasil. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 21, n. 1, 2011. p. 19-24.
- CRABTREE, J. N. et al. Titan cell production enhances the virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 11, 2012. p. 3776-3785.
- DJORDJEVIC, J. T. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. 125, 2010.
- DOERING, T. L. How does *Cryptococcus* get its coat? **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 12, 2000. p. 547-553.
- DUIN, D. V.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, 2002. p. 3394-3400.
- EDBERG, S. C. et al. Esculin-based medium for isolation and identification of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, n. 3, 1990. p. 332-335.
- EISENMAN, H. C. et al. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L- DOPA. **Microbiology**, 2007. p. 3954-3962.
- EISENMAN, H. C. et al. Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 155, 2009. p. 3860-3867.
- ELLIS, D. H. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, 1987. p. 430-431.
- ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural Habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, 1990. p. 1642-1644.
- EMMONS, C. W. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. **Journal of Bacteriology**, v. 62, n. 6, p. 685-690, 1951.
- EMMONS, C. W. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **American Journal of Hygiene**, v. 62, p. 227-232, 1955.
- EMMONS, C. W. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. **Public Health Reports**, v. 75, p. 362-364, 1960.
- ENACHE-ANGOULVANT, A. et al. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, 2007. p. 1261-1265.
- EVANS, E. E. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. **The Journal of Immunology**, v. 64, 1951. p. 423-430.

- FARIA, R. O. D. et al. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* em excretas de pombos na cidade de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2, 2010. 198-200.
- FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; CASADEVALL, A. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. **Microbiology**, 147, 2001. 2355-2365.
- FERREIRA-PAIM, K. et al. Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Br. **Mycoses**, 2010. 294-300.
- FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42, n. 2, 2006. 167-194.
- FILIÚ, W. F. D. O.; WANKE, B.; AGÜENA, S. M. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35, n. 6, 2002. 591-595.
- FONSECA, A.; BOEKHOUT, T.; FELL, J. W. Chapter 138: *Cryptococcus* Vuillemin (1901). In: \_\_\_\_ **The Yeasts: A taxonomic Study**. 5th. ed. [S.l.]: Elsevier, v. 3, 2011. p. 1661-1737
- FORTES, S. T. et al. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. **Mycoses**, 2001. p. 137-140.
- FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 838-840, 1999.
- FRASES, S. et al. The elastic properties of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Biophysical journal**, 97, 2009. 937-945.
- FREIRE, A. K. L. et al. Molecular characterisation of the causative agents of cryptococcosis in patients of a tertiary healthcare facility in the state of Amazonas - Brazil. **Mycoses**, 55, 2012. e145-e150.
- FU, C. et al. Unisexual versus bisexual mating in *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, 2015. p. 65-75.
- GARCIA-HERMOSO, D.; JANBON, G.; DROMER, F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, 1999. p. 3204-3209.
- GATES, M. A.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T. R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 1, 2004. p. 13-24.
- GATTI, F.; EECKELS, R. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894 Parte I: Description of the disease and of the strain. **Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale**, v. 50, n. 6, 1970. p. 689-694.
- GERSTEIN, A. C. et al. Polyploid titan cells produce haploid and aneuploid progeny to promote stress adaptation. **mBio**, v. 6, n. 5, 2015.
- GERSTEIN, A. C.; NIELSEN, K. It is not all about us: Evolution and maintenance of *Cryptococcus* virulence requires selection outside the human host. **Yeast**, 2017.

- GIROLDO, S. et al. Os pombos na cidade de Londrina. In: ZEQUI, J. A. C.; MAIOLA, M. R. A. **Qualidade de vida em Londrina: Um enfoque ambiental**. Londrina: Unifil, 2014. Cap. 2, p. 33-54.
- GRIFFITHS, F. J.; KRETSCHMER, M.; KRONSTAD, J. W. Aimless mutants of *Cryptococcus*: Failure to disseminate. **Fungal Biology Reviews**, n. 26, 2012. 6p. 1-72.
- GROLL, A. H. et al. Micafungin: pharmacology; experimental therapeutics and clinical applications. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 14, n. 4, 2005. p. 489-509.
- HAGEN, F. et al. *In vitro* antifungal susceptibilities and Amplified Fragment Length Polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, 2010. p. 5139-5145.
- HAGEN, F. et al. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest. **Plos One**, v. 8, n. 8, 2013. p. 1-14.
- HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii* /*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, 2015. p. 16-48.
- HATIPOGLU, N.; HATIPOGLU, H. Combination antifungal therapy for invasive fungal infections in children and adults. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 5, 2013. p. 523-535.
- HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; BECKHAM, J. D. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients. **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 28, n. 4, 2015. p. 300-307.
- HOANG, L. M. N. et al. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, 2004. p. 935-940.
- HORTA, J. A. et al. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **Medical Mycology**, v. 40, 2002. p. 565-571.
- IKEDA, R. et al. Effects of melanin upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungals. **Microbiology and Immunology**, 47, n. 4, 2003. p. 271-277.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Paraná - Londrina. **IBGE - Cidades**. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/2P8>>. Acesso em: nov. 2016.
- JOHNSON, M. D.; PERFECT, J. R. Caspofungin: first approved agent in a new class of antifungal. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 4, n. 5, 2003. p. 807-823.
- KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. *Non-neoformans* Cryptococcal Infections: a systematic review. **Infection**, v. 35, n. 2, 2007. p. 51-58.
- KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, 2004. p. 17258-17263.
- KOBAYASHI, C. C. B. A. et al. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 4, 2005. p. 203-207.

- KON, A. S. et al. Consenso em criptococose - 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, 2008. p. 524-544.
- KOZEL, T. R.; BAUMAN, S. K. CrAg lateral flow assay for cryptococcosis. **Expert Opinion on Medical Diagnosis**, v. 6, n. 3, 2012. p. 245-251.
- KWON-CHUNG, K. J. A New Genus, *Filobasidiella*, the Perfect State of *Cryptococcus neoformans*. **Mycologia**, v. 67, n. 6, 1975. p. 1197-1200.
- KWON-CHUNG, K. J. A New Species of *Filobasidiella*, the Sexual State of *Cryptococcus neoformans* B and C Serotypes. **Mycologia**, v. 68, n. 4, 1976. p. 942-946.
- KWON-CHUNG, K. J. *Filobasidiella* Kwon-Chung (1975). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 5<sup>a</sup>. ed. [S.l.]: Elsevier, v. 3, 2011. Cap. 114, p. 1443-1455.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 55, 1987. p. 1751-1754.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurians* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). **Taxon**, p. 804-806, 2002.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Epidemiologic differences between two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **American Journal of Epidemiology**, v. 120, n. 1, p. 123-130, 1984.
- KWON-CHUNG, K. J.; SAIJO, T. Is *Cryptococcus gattii* a Primary Pathogen? **Journal of Fungi**, v. 1, n. 2, 2015. p. 154-167.
- LATOUCHE, G. N. et al. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the Phospholipase B (PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, 2003. p. 2080-2086.
- LEITE-JR., D. P. et al. *Cryptococcus* spp. isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 11, 2012. p. 1-7.
- LIN, X. et al. Virulence Attributes and Hyphal Growth of *C. neoformans* Are Quantitative Traits and the MAT $\alpha$  Allele Enhances Filamentation. **Plos Genetics**, v. 2, n. 11, 2006. p. 1801-1814.
- LIN, X. et al. Impact of Mating Type, Serotype, and Ploidy on the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, 2008. p. 2923-2938.
- LOMES, N. R. et al. Cryptococcosis in non-HIV/non transplant patients: a Brazilian case series. **Medical Mycology**, 2016.
- LUGARINI, C. et al. *Cryptococcus neoformans* isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v. 166, 2008. p. 61-69.
- MALIGIE, M. A.; SELITRENNIKOFF, C. P. *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3)B-glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, 2005. p. 2851-2856.
- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, 2006. p. 1021-1033.

- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold and UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, 2007. p. 4592-4601.
- MARTINEZ, L.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, 2006. p. 6118-6123.
- MATSUMOTO, M. T. et al. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 1, 2007. p. 41-47.
- MAXSON, M. E. et al. The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, 2007. p. 180-186.
- MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 14, 2016. p. 106-117.
- MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease of North America**, v. 30, 2016. p. 179-206.
- MAZUELOS, E. M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Actividad in vitro de anidulafungina. comparación con la actividad de otras equinocandinas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 14, 2008. p. 7-13.
- MENEZES, R. D. P.; PENATTI, M. P. A.; PEDROSO, R. D. S. Different culture media containing methyl dopa for melanin production by *Cryptococcus* species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, 2011. p. 591-594.
- MEYER, W. et al. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in Polymerase Chain Reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, 1993. p. 2274-2280.
- MEYER, W. et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by Polymerase Chain Reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA - a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. **Electrophoresis**, v. 20, 1999. p. 1790-1799.
- MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, 2003. p. 189-195.
- MEYER, W. et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v. 47, n. 6, 2009. p. 561-570.
- MIN, K. H.; KWON-CHUNG, K. J. The biochemical basis for the distinction between the two *Cryptococcus neoformans* varieties with CGB medium. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology**, v. 261, n. 4, 1986. p. 471-480.
- MONTENEGRO, H.; PAULA, C. R. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. **Medical Mycology**, v. 38, 2000. p. 385-390.
- MORA, D. J. et al. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v. 48, 2010. p. 561-569.

- MORROW, C. A.; FRASER, J. A. Ploidy variation as an adaptive mechanism in human pathogenic fungi. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 24, n. 4, 2013. p. 339-346.
- NALINTYA, E.; KIGGUNDU, R.; MEYA, D. Evolution of Cryptococcal Antigen Testing: What Is New? **Current Fungal Infection Reports**, 2016. p. 1-6.
- NIELSEN, K. et al. Interaction between genetic background and the mating type locus in *Cryptococcus neoformans* virulence potential. **Genetics**, v. 171, n. 3, 2005. p. 975–983.
- NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 5, 2003. p. 203-223.
- NOSANCHUK, J. D.; OVALLE, R.; CASADEVALL, A. Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. **The Journal of Infectious Diseases**, 2001, v. 183. p. 1093-1099.
- NOSANCHUK, J. D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal Melanin: What do we know about structure. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. p. 1-7.
- NOVERR, M. C. et al. CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence. **Infection and Immunity**, v. 72, 2004. p. 1693-1699.
- NOVERR, M. C. et al. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. **Infection and Immunity**, v. 71, 2007. p. 1538-1547.
- NUNES, V. D. F. P. Pombos urbanos: o desafio de controle. **Biológico**, v. 65, n. 1-2, 2003. p. 89-92.
- OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **American Journal of Pathology**, v. 164, 2004. p. 1761-1771.
- O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, 2012. p. 387-408.
- PALIWAL., D. K.; RANDHAWA, H. S. Evaluation of a simplified *Guizottia abyssinica* seed medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 7, n. 4, 1978. p. 346-348.
- PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, 2009. p. 525-530.
- PASSONI, L. F. C. et al. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients of the domestic environment with and without cryptococcosis. **Medical Mycology**, v. 36, 1998. p. 305-311.
- PEDROSO, R. S.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Microbiological Research**, v. 164, 2009. p. 221-227.
- 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**, v. 50, 2010. p. 291-322.



- PERFECT, J. R.; BICANIC, T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: what do we know now? **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, 2015. p. 49-54.
- PHADKE, S. S. et al. Unisexual Reproduction of *Cryptococcus gattii*. **Plos One**, v. 9, n. 10, 2014. p. 1-11.
- POLACHEK, I.; PLATT, Y.; ARONOVITCH, J. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 9, 1990. p. 2919-2922.
- PREFEITURA DE LONDRINA. A Cidade. **Prefeitura de Londrina**. Disponível em: <[http://www.londrina.pr.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1251&Itemid=4&showall=1](http://www.londrina.pr.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1251&Itemid=4&showall=1)>. Acesso em: nov. 2016.
- QUINDÓS, G.; ERASO, E. *In vitro* antifungal activity of anidulafungin. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 2, 2008. p. 83-91.
- RAIMONDI, A. et al. Genotype-based differentiation of the *Cryptococcus neoformans* serotypes by combined PCR-RFLP analysis of the capsule-associated genes CAP10 and CAP59. **Medical Mycology**, v. 45, 2007. p. 491-501.
- REIMÃO, J. Q. et al. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brazil. **Mycoses**, v. 50, n. 4, 2007. p. 261-264.
- RIBEIRO, A. M. et al. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from Eucalypts in South Brazil. **Medical Mycology**, v. 44, 2006. p. 707-713.
- RIBEIRO, M. A.; NGAMSKULRUNGROJ, P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 6, 2008. p. 315-320.
- ROSARIO, I.; ACOSTA, B.; COLOM, F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, 2008. p. S13-S18.
- ROSAS, Á. L.; CASADEVALL, A. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, 1997. p. 265-272.
- ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. **Infection and Immunity**, v. 69, 2001. p. 3410-3412.
- RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos para uso sistémico. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 27, n. 6, 2009. 353-362.
- RUMA, P. et al. Characterization of *Cryptococcus neoformans* by random DNA application. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, 1996. p. 312-316.
- RUTHERFORD, J. C. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 5, 2014. p. 1-3.
- SALAS, S. D. et al. Effect of the laccase gene CNLAC1 on virulence of *Cryptococcus neoformans*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, 1996. p. 377-386.
- SANFELICE, F. Contributto alla morfologia e biologia dei blastomicetti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. **Annali dell'Istituto d'Igiene della R. Università da Roma**, n. 4, 1894. p. 463-495.

- SANTANGELO, R. et al. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infection and Immunity**, v. 72, 2004. p. 2229-2239.
- SARDI, J. D. C. O. et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, 2014. p. 22-29.
- SARIS, S. Superpopulação de pombos segue sem solução há uma década. **Portal Bonde**, 24 jun 2016. Disponível em: <<http://www.bonde.com.br/bondenews/londrina/superpopulacao-de-pombos-segue-sem-solucao-ha-uma-decada-412770.html>>. Acesso em: nov 2016.
- SCHMALZLE, S. A. et al. *Cryptococcus neoformans* infection in malignancy. **Mycoses**, 2016.
- SCHMIEDEL, Y.; ZIMMERLI, S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and Pneumocystis pneumonia. **Swiss Medical Weekly**, 2016.
- SCHWARZ, P. et al. Combination of amphotericin B with flucytosine is active in vitro against flucytosine-resistant isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, 2007. p. 383-385.
- SHI, M. et al. Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, 2010. p. 1683-1693.
- SIDRIM, J. J. C. et al. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, 2010. p. 445-458.
- SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEÓN, D. E.; PONCE-DE-LEÓN, L. A. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, 2012. p. 23-34.
- SILVA, D. M. C. E. et al. First isolation of *Cryptococcus neoformans* genotype VNI MAT-alpha from wood inside hollow trunks of *Hymenaea courbaril*. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, 2016. p. 97-102.
- SILVA, M. E.; PAULA, L. A. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from excrement and nests of pigeons (*Columba livia*) in Salvador, Bahia (Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, p. 9-11, 1963.
- SOARES, M. C. B. et al. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 7, n. 1, 2005. p. 31-36.
- SORRELL, T. C. et al. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by Random Amplification of Polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, 1996. p. 1253-1260.
- SOUTO, A. C. P. et al. Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the Amazon Rainforest to the Semi-arid desert in the Northeast of Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 2016. 19 p.

- SOUZA, L. K. H. et al. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiania city, Goiás, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, 2005. p. 253-256.
- SOUZA, L. K. H. et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. **Mycoses**, 53, 2009. p. 62-67.
- SPINA-TENSINI, T. et al. Geographic distribution of patients attended by *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complexes meningitis, pigeon and tree populations in Southern Brazil. **Mycoses**, 2016. p. 1-8.
- TAJES, M. et al. The blood-brain barrier: Structure, function and therapeutic approaches to cross it. **Molecular Membrane Biology**, v. 31, n. 5, 2014. p. 152-167.
- 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. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 6, 2013. p. 371-376.
- TEODORO, W. L. I. et al. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, 2013. p. 759-764.
- TRILLES, L. et al. Regional pattern of the molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, 2008. p. 455-462.
- VANBREUSEGHEM, R.; TAKASHIO, M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894 Part II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. **Annales de la Societe Belgue de Medecine Tropicale**, v. 50, n. 6, 1970. p. 695-702.
- VIDAL, J. E.; BOULWARE, D. R. Lateral Flow Assay for cryptococcal antigen: an important advance to improve the continuum of HIV care and reduce cryptococcal meningitis-related mortality. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 19, 2015. p. 38-45.
- VUILLEMIN, J.-P. Les blastomycetes pathogènes. **Revue Générale des Sciences Pures et Appliquées**, 1901. p. 732-751.
- WILLIAMSON, P. R. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, 1997. p. 99-107.
- WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 1, 2017. p. 13-24.
- WILSON, D. E.; BENNETT, J. E.; BAILEY, J. W. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 127, n. 3, 1968. p. 820-823.
- WRIGHT, L. C. et al. Cryptococcal lipid metabolism: phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids. **Eukaryotic Cell**, v. 6, 2007. p. 37-47.

YAMAMURA, A. A. M. et al. Estudo dos nichos ecológicos de leveduras patogênicas das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* na cidade de Londrina, PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, 2013. p. 793-804.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 68, 2009. p. 133-216.

ZARAGOZA, O. et al. Fungal cell gigantism during mammalian infection. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 6, 2010.

ZERVOS, M.; MEUNIER, F. Fluconazole (Diflucan®): a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 3, 1993. p. 147-170.

ZHU, P. et al. Congenic strains for genetic analysis of virulence traits in *Cryptococcus gattii*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 7, 2013. p. 2616-2625.

ZIMMER, B. L.; ROBERTS, G. D. Rapid and selective urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 10, 1979. p. 380-381.

## 3 Objetivos

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Isolamento, identificação e caracterização das leveduras dos complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isolados de excretas de aves da cidade de Londrina, PR quanto aos fatores de virulência e perfil de sensibilidade aos antifúngicos.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento de *Cryptococcus* spp. a partir de excretas de aves em diversos locais na cidade de Londrina, PR, Brasil
- Identificação a nível de espécie das leveduras pertencentes aos complexos *C. neoformans* e *C. gattii* isoladas de excretas de aves em Londrina, PR
- Avaliação da produção de fosfolipase pelos isolados de *Cryptococcus* spp.;
- Avaliação da produção de melanina pelos isolados de *Cryptococcus* spp.
- Avaliação da capacidade de formação de biofilme desses isolados;
- Identificação do *mating type* dos isolados de *Cryptococcus* spp.;
- Avaliação do perfil de sensibilidade dos isolados de *Cryptococcus* spp. à anfotericina B e ao fluconazol;

## 4 Artigo

### Potencial de virulência de leveduras dos complexos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* isoladas de excretas de aves da cidade de Londrina, Paraná.

#### Resumo

A cidade de Londrina, localizada no norte do Paraná, tem um problema com a população de pombos no ambiente urbano. As excretas acumuladas no ambiente tornam o local favorável para a presença de leveduras do gênero *Cryptococcus*, causadoras de doença pulmonar e meningite. Essa infecção afeta principalmente indivíduos imunossuprimidos, como os portadores de HIV. Para entender os fatores relacionados a virulência e patogenicidade dos fungos ambientais, este trabalho teve por objetivo isolar, identificar e caracterizar os perfis de virulência e sensibilidade aos antifúngicos de *Cryptococcus* spp. isolados de excretas de aves da cidade de Londrina, PR. Foram coletadas 100 amostras de excretas de aves, em quatro locais, que foram processadas e inoculadas em Sabouraud dextrose ágar com cloranfenicol. As colônias leveduriformes foram isoladas e identificadas como *Cryptococcus* spp. através de métodos fenotípicos e moleculares. Foram realizadas a genotipagem dos isolados, a identificação do *mating type* por PCR e testes fenotípicos que incluem a análise se as amostras são produtoras de urease, fosfolipase, melanina e capacidade de formação de biofilme. Foi avaliado o perfil de sensibilidade aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B por microdiluição em caldo; e o potencial de virulência destes isolados em camundongos BALB/c. Das cem amostras coletadas, 47% apresentaram crescimento de *Cryptococcus* spp. identificadas fenotipicamente da seguinte forma: 68% dos isolados foram identificados como complexo *C. neoformans* e 32% como complexo *C. gattii*; já a identificação molecular teve 57,4% complexo *C. neoformans* e 42,6% complexo *C. gattii*. A tipagem molecular apresentou 31,9% dos isolados tipo VNI, 25,5% VNII, 40,5% VGI e 2,1% VGII. 82,9% dos isolados foram identificados como MAT $\alpha$  e 17,1% MATa. A produção de urease foi observada em 89,4% dos isolados e de melanina em 31,9%. Os isolados apresentaram índice Pz médio de  $0,61 \pm 0,11$ , classificados como produtores intermediários de fosfolipase. Quanto a formação de biofilme, as leituras oscilaram entre  $0,02 \pm 0,03$  e  $1,70 \pm 0,28$ . 2,1% dos isolados foram resistentes (CIM > 8  $\mu\text{g/mL}$ ), enquanto 19,1% foram resistentes a anfotericina B (CIM > 1  $\mu\text{g/mL}$ ). Os animais foram acompanhados por 100 dias, e a infecção não foi letal. Este trabalho mostra que os isolados de *Cryptococcus* spp. encontrados nas excretas de aves de Londrina têm capacidade de produzir diversos fatores de virulência, e alguns apresentaram também resistência à anfotericina B. Este trabalho mostrou o isolamento, identificação e a caracterização de virulência e do perfil de sensibilidade de *Cryptococcus* spp. isolados de excretas de aves da cidade de Londrina, Paraná, Brasil.

**Palavras-chaves:** *Cryptococcus* spp.; excretas de aves; antifúngicos; virulência

## Introdução

A criptococose é uma infecção oportunista causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, que é adquirida a partir da inalação de propágulos presentes no ambiente, em excretas de aves (principalmente pombos) em diversas árvores e material vegetal em decomposição (MAY et al., 2016; MAZIARZ; PERFECT, 2016). O fungo inalado instala-se nos pulmões, de onde podem disseminar-se pela corrente sanguínea, alcançando diversos órgãos, principalmente o sistema nervoso central, onde causará meningite (LIU; PERLIN; XUE, 2012; MAY et al., 2016).

A taxonomia destes fungos está em constante revisão desde a descoberta do fungo em 1894 por Francesco Sanfelice, Otto Busse e Abraham Buschke (BARNETT, 2010). De acordo com a mais recente proposta de nomenclatura (HAGEN et al., 2015), os complexos *C. neoformans* e *C. gattii* são divididos em sete espécies e três híbridos classificados como: complexo *C. neoformans*, composto por *C. neoformans* (sorotipo A, VNI e VNII, AFLP 1 A e AFLP 1B) *C. deneoformans* (sorotipo D, VNII e AFLP2) e um híbrido *C. neoformans* x *C. deneoformans* (VNIII). Já o complexo *C. gattii* foi dividido em cinco espécies: *C. gattii* (sorotipo B, VGI e AFLP4), *C. deuterogattii* (sorotipo B, VGII, AFLP6), *C. decagattii* (sorotipo B, VGIV, AFLP10), *C. bacillisporus* (sorotipo C, VGIII, AFLP5) e *C. tetragattii* (sorotipo C, VGIV, AFLP7); e três híbridos: *C. deneoformans* x *C. gattii* (AFLP8), *C. neoformans* x *C. gattii* (AFLP9) e *C. neoformans* x *C. deuterogattii* (AFLP11).

O complexo *C. neoformans* acomete principalmente pacientes imunossuprimidos, dentre os quais destacam-se os portadores de HIV. No entanto, pacientes que fazem uso de corticosteroides ou outros imunossupressores, transplantados e diabéticos também são acometidos por essa infecção (HENAO-MARTÍNEZ; BECKHAM, 2015; LOMES et al., 2016; SCHMALZLE et al., 2016). *C. gattii* é um patógeno emergente, que começou a despertar maior atenção após o surto de Vancouver, em 1999, devido à capacidade apresentada pelo tipo molecular VGII (*C. deuterogattii*) em causar doença em indivíduos aparentemente imunocompetentes (KIDD et al., 2004; KWON-CHUNG; SAIJO, 2015).

Diversos fatores contribuem para a virulência de *Cryptococcus* spp.. A cápsula polissacarídica, composta por glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e manoproteínas tem por função proteger as leveduras de fagocitose (ARAUJO et al., 2012; COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014). A melanina, pigmento produzido a partir de compostos fenólicos como a L-DOPA, protege o fungo contra os radicais livres produzidos durante o estresse oxidativo (ALSPAUGH, 2014; EISENMAN et al., 2007; SABIITI; MAY, 2012). Algumas enzimas hidrolíticas também atuam como fator de virulência, como as fosfolipases e a urease. As fosfolipases são enzimas que hidrolisam fosfolipídeos presentes nas membranas celulares, desestabilizando-as (ALMEIDA; WOLF; CASADEVALL, 2015); e a urease hidrolisa a ureia em amônia e carbamato, lesionando a barreira hemato-encefálica, facilitando a transmigração do microrganismo (ALSPAUGH, 2014; OLSZEWSKI et al., 2004; SINGH et al., 2013). A formação de biofilme torna a levedura mais resistente aos extremos de temperatura, a exposição à luz ultravioleta, aos antifúngicos e ao estresse oxidativo em relação às células planctônicas, tornando este fenótipo mais virulento que o planctônico (BENADUCCI et al., 2016; MARTINEZ; CASADEVALL, 2006a, 2006b, 2007).

No tratamento da criptococose são utilizado antifúngicos como anfotericina B, flucitosina e fluconazol (PERFECT et al., 2010). A anfotericina B é usada na primeira fase do tratamento, que é chamada fase de ataque, cujo objetivo é negatizar a cultura. Pode ser utilizada sozinha ou em associação com a flucitosina (HATIPOGLU; HATIPOGLU, 2013; SCHWARZ et al., 2007). Nas fases posteriores, são utilizados azóis, principalmente o fluconazol (PERFECT et al., 2010).

A cidade de Londrina é uma cidade de médio porte localizada no norte do Paraná, com 553.393 habitantes (IBGE, 2016). Apresenta um problema comum a várias cidades de médio e grande porte: a presença de pombos na área urbana, que está relacionada à transmissão de criptococose (SPINA-TENSINI et al., 2017). Com o intuito de compreender melhor a patogênese das leveduras do gênero *Cryptococcus* presentes nas excretas dessas aves, este trabalho teve como objetivo avaliar seus perfis de virulência e sensibilidade aos antifúngicos.



## **Metodologias**

### *Coleta e isolamento de Cryptococcus spp.*

As excretas de aves foram coletadas entre julho/2012 e fevereiro/2013, no período da manhã, na cidade de Londrina, Paraná, Brasil. Foram realizadas 5 coletas em 4 locais: Bosque Central, Praça da Bandeira, pombal do cemitério São Pedro e um pombal doméstico. Em cada coleta foram obtidas 20 amostras, transportadas e processadas no Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, da Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram diluídas em PBS 1x com 0,4 g/L de cloranfenicol (Inlab, Brasil), inoculadas em Sabouraud dextrose ágar (Himedia, Índia) com 0,4 g/L de cloranfenicol e incubadas a 28 °C por até 7 dias, com o crescimento monitorado diariamente.

### *Cultivo e manutenção dos microrganismos*

Os microrganismos isolados foram armazenados sob refrigeração a 4 °C e estocados em freezer -80 °C. Para a realização dos experimentos, os microrganismos foram cultivados em Sabouraud Dextrose Caldo e incubados a 37 °C sob agitação por 48 h.

### *Identificação fenotípica dos isolados de Cryptococcus sp.*

As colônias que apresentavam características de levedura foram isoladas e identificadas à partir da visualização da cápsula polissacarídica por microscopia óptica após coloração negativa com tinta da China (WILLIAMSON et al., 2016). Aqueles que apresentaram cápsula foram semeados em ágar CGB (L-canavanina, glicina e azul de bromofenol) e incubados por 48 h a 28 °C (KWON-CHUNG; POLACHEK; BENNETT, 1982).

### *Extração de DNA de Cryptococcus spp.*

O DNA genômico foi extraído conforme Jain e colaboradores (2001). As leveduras foram cultivadas em 5 mL de *Sabouraud* Dextrose Caldo a 37 °C por 48 horas sob agitação e coletadas por centrifugação a 6000 x g. As células foram rompidas em tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA; 100 mM cloreto de sódio; 2% Triton X-100; 1% SDS) sob agitação com pérolas de vidro. A suspensão

foi homogeneizada mecanicamente e extraída duas vezes com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v). O DNA foi precipitado em 2,5 volumes de etanol (J. T. Baker, USA), lavado com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em água ultrapura. A concentração do DNA foi determinada por absorvância ( $\lambda$  260 nm) medida por espectrofotômetro (Synergy HT, Biotek, USA) e ajustado a 50 ng/ $\mu$ L.

#### *Identificação molecular dos isolados de Cryptococcus spp.*

A diferenciação entre os complexos *C. neoformans* e *C. gattii* foi realizada por amplificação da região IGS1 do DNA ribossomal por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), segundo Tavares e colaboradores (2016). As amostras foram incubadas em um termociclador (Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA) por: 2 min a 95 °C, 30 s a 95 °C, 30 s a 70 °C, 30 s a 72 °C (sendo as três últimas etapas repetidas por 30 ciclos), e 5 min a 72 °C. O fragmento correspondente a cada espécie foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%.

#### *Tipagem molecular de Cryptococcus spp.*

A tipagem molecular foi realizada por amplificação do gene URA5 seguido de digestão com enzimas de restrição, conforme Meyer e colaboradores (2003). Assim, a PCR foi realizada da seguinte forma: foram utilizados 100 ng de DNA de cada isolado, 0,25 mM dNTPs, 1  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador, tampão de PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM e 0,65 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, USA). As amostras foram incubadas em um termociclador (Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA) por: 2 min a 95 °C, 45 s a 95 °C, 2 min a 61 °C, 1 min a 72 °C (sendo as três últimas etapas repetidas por 35 ciclos), e uma incubação final de 1 min a 72 °C. O produto de PCR foi digerido pelas enzimas de restrição *Sau* 96T e *Hha*I (Biolabs, USA) por 3 h a 37 °C, e os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

#### *Identificação do mating type de Cryptococcus spp. por PCR*

A identificação do *mating type* foi realizada por PCR, conforme Chaturvedi e colaboradores (2000) foram utilizados 100 ng de DNA, 0,25 mM de dNTPs, 1  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador específico para identificação de MAT- $\alpha$  ou para MAT-a, tampão de PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM e 0,65 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen,

USA). As amostras foram incubadas em termociclador (Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA) por: 3 min a 95 °C, 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C, 1 min a 72 °C (sendo que as três últimas etapas foram repetidas por 30 ciclos), e uma incubação final de 7 min a 72 °C. O fragmento correspondente a cada *mating type* foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%.

#### *Avaliação das amostras de Cryptococcus spp. produtoras de urease*

Os isolados foram semeados em ágar ureia de Christensen (Himedia, Índia), e incubadas por 48 h a 30 °C. A produção de urease foi verificada através da mudança de cor do meio de cultura pelo aumento do pH.

#### *Avaliação das amostras de Cryptococcus spp. produtoras de fosfolipase*

O ensaio foi realizado conforme Chen e colaboradores (1997). O inóculo foi ajustado da seguinte forma: foi preparada uma suspensão celular em solução salina 0,85% e ajustada à densidade óptica de  $0,075 \pm 0,025$  ( $\lambda = 590$  nm). Dessa suspensão celular 10  $\mu$ L foram inoculados sobre a superfície do meio *Sabouraud* Dextrose Ágar suplementado com NaCl 1 M (Synth, Brasil), CaCl<sub>2</sub> 0,005 M (Synth, Brasil), 8% de gema de ovo, e incubados a 28 °C por 72 h. O Índice Pz foi calculado através da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo. Valores de Pz=1 foram considerados não produtores de fosfolipase, Pz entre 0,64 e 0,99 considerados fracamente produtores, Pz entre 0,3 e 0,63 considerados produtores intermediários e Pz menor que 0,3 fortes produtores de fosfolipase (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982).

#### *Avaliação da produção de melanina por Cryptococcus spp.*

Para a análise da produção de melanina foi utilizado o seguinte meio de cultura: 5% de extrato de semente de *Guizotia abyssinica*, 1% de glicose (Synth, Brasil), 0,1% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth, Brasil), 0,1% de creatinina (Sigma-Aldrich, USA), 0,1% de bifenil (Sigma-Aldrich, USA) e 1,5% de ágar (Difco, BD, USA). A produção de melanina foi observada pelo crescimento de colônias marrom escura após incubação a 28 °C por até 15 dias (PALIWAL; RANDHAWA, 1978).

#### *Avaliação da capacidade de formação de biofilme*

Para a formação do biofilme,  $10^7$  células/poço foram inoculados em placa de poliestireno de 96 poços, em meio *Sabouraud* Dextrose caldo, e incubadas a 37 °C

por 48 h sem agitação (MARTINEZ; CASADEVALL, 2007). Após esse período, as células não aderidas foram lavadas com PBS (Tampão Fosfato-Salino) e a massa do biofilme formado foi determinada indiretamente pela coloração com cristal violeta da seguinte forma: o biofilme foi corado com solução de cristal violeta 0,4% por 45 min, lavado com água destilada e descorado com etanol 95% por 45 min. A solução descorante foi transferida para uma nova placa e analisada por espectrofotometria a 595 nm (Synergy HT, Biotek, USA) (MELO et al., 2011).

#### *Avaliação do perfil de sensibilidade de Cryptococcus spp. ao fluconazol e à anfotericina B*

O teste de microdiluição em caldo de fluconazol e anfotericina B para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado segundo as normas do documento CLSI M27-S4 (2012). Foi utilizado como controle positivo o meio de cultivo com microrganismo e como controle negativo somente o meio de cultivo. A amostra referência utilizada para a validação dos testes foi *C. parapsilosis* ATCC 22019 (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil).

Para a realização do teste, as leveduras foram previamente cultivadas em *Sabouraud* Dextrose Caldo por 48 h a 37 °C, sob agitação. A densidade celular foi ajustada de acordo com a turvação da escala 0,5 de *McFarland* ( $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/ mL) em 1 mL de cloreto de sódio 0.9%(v/v) e essa suspensão foi diluída 1:1000 em meio RPMI 1640 (Invitrogen, USA) pH 7,0 tamponado com 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS). O teste foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços com fundo em “u” e as concentrações de antifúngicos testadas foram de 0,125 - 64 µg/mL para fluconazol, entre 0,06 – 16 µg/mL para anfotericina B. As amostras foram incubadas a 37 °C e a leitura visual dos resultados foi realizada após 72 h. A CIM foi determinada pela menor concentração capaz de inibir o crescimento das leveduras (CLSI, 2012). Foram considerados sensíveis à anfotericina B os isolados que apresentaram CIM até 1 µg/mL e ao fluconazol os isolados que apresentaram CIM até 8 µg/mL (ESPINEL-INGROFF et al., 2012a, 2012b).

## **Resultados**

### *Isolamento e identificação de Cryptococcus spp. a partir de excretas de aves*

Neste trabalho, foram realizadas coletas de 100 amostras de excretas de aves em praças e pombais da cidade de Londrina. Inicialmente foi observada a presença da cápsula por microscopia óptica após coloração negativa com tinta da China em 47 amostras, sugerindo serem leveduras do gênero *Cryptococcus* (Tabela 1). A maior incidência de *Cryptococcus* spp. foi encontrada nos pombais, tanto no pombal doméstico quanto no pombal localizado no cemitério (Tabela 1).

Quando estes isolados foram cultivados em ágar CGB, verificou-se que 32 isolados (68%) das amostras foram indicadas como pertencentes ao complexo *C. neoformans* e 15 (32%) ao complexo *C. gattii*. Já a identificação molecular dos complexos exibiu resultado diferente: 27 isolados (57,4%) pertencem ao complexo *C. neoformans* e 20 isolados (42,6%) fazem parte do complexo *C. gattii* (Tabela 2). De acordo com a classificação proposta por Hagen e colaboradores (2015), foram encontrados 15 isolados de *C. neoformans* (VNI), 12 híbridos *C. neoformans* x *C. deneoformans* (VNIII), 19 *C. gattii* (VGI) e 1 *C. deuterogattii* (VGII) (Tabela 2).

#### *Determinação do mating type de Cryptococcus spp. isolados de excretas de aves*

O *mating type* dos isolados determinado por amplificação dos genes MAT $\alpha$  e MAT $a$  classificou 39 (82,9%) como MAT $\alpha$  e 8 (17,1%) como MAT $a$  (Tabela 3). Dentre os 27 isolados pertencentes ao complexo *C. neoformans*, 21 (80,8%) foram MAT  $\alpha$  e 6 (19,2%) MAT  $a$ . Dos 20 isolados do complexo *C. gattii*, 18 (85,7%) foram MAT  $\alpha$  e 2 (14,3%) MAT  $a$  (Tabela 3).

#### *Avaliação dos fatores de virulência de Cryptococcus spp. isolados de excretas de aves*

A produção de urease foi observada em 42 (89,4%) isolados, sendo 22 (84,6%) do complexo *C. neoformans* e 20 (95,2%) do complexo *C. gattii*. A avaliação da produção de fosfolipase resultou em um índice Pz médio de  $0,61 \pm 0,11$ , classificados como produtores intermediários (Tabela 3).

A avaliação da produção de melanina mostrou que dos 47 isolados, 15 (31,9%) foram considerados produtores, sendo 11 pertencentes ao complexo *C. neoformans*, e 4 ao complexo *C. gattii* (Tabela 3). Com relação à capacidade de formação de biofilme, para o complexo *C. gattii* a leitura média obtida foi de

0,47±0,40, variando entre 0,02±0,03 e 1,70±0,28; e para o complexo *C. neoformans* a média foi de 0,46±0,3, variando entre 0,08±0,03 e 1,31±0,24 (Tabela 3).

#### *Perfil de sensibilidade de Cryptococcus spp. aos antifúngicos*

Para o fluconazol, todos os isolados pertencentes ao complexo *C. neoformans* apresentaram CIM ≤ 8 µg/mL, variando entre 0,5 - 8 µg/ml, sendo considerados sensíveis. Os isolados do complexo *C. gattii* exibiram valores entre 0,125 - 16 µg/mL, com um dos isolados apresentando CIM de 16 µg/mL, sendo, portanto, considerado resistente (ESPINEL-INGROFF et al., 2012a) (Tabela 4).

O perfil de sensibilidade à anfotericina B para ambos os complexos variou entre 0,06 - 8 µg/mL, sendo que 4 (15,4%) isolados de *C. neoformans* e 5 (23,8%) *C. gattii* foram classificados como resistentes, com CIM > 1 µg/mL (Tabela 4).

## **Discussão**

Os resultados obtidos mostram uma elevada prevalência de *Cryptococcus* sp. em excretas de aves em Londrina, com 47% das excretas coletadas positivas para o gênero, dos quais os principais tipos moleculares encontrados foram *C. neoformans* VNI e *C. gattii* VGII, e *mating type* α. Estes isolados apresentaram, em sua maioria, capacidade de produzir *in vitro* diversos fatores de virulência, como urease, fosfolipase, melanina e biofilme; e sensibilidade aos antifúngicos.

Como observado em outros trabalhos no país, o complexo prevalente foi *C. neoformans*, tipo molecular VNI (ALVES et al., 2016; COGLIATI, 2013; TAKAHARA et al., 2013; TEODORO et al., 2013). Foi observada divergência entre os resultados da identificação fenotípica e molecular de alguns isolados. Essa diferença deve-se a maior especificidade e sensibilidade das metodologias moleculares quando comparadas com os testes fenotípicos (MCTAGGART et al., 2011; TAVARES et al., 2016).

Dentre os dados obtidos, destaca-se o achado de *C. gattii* nas excretas, uma vez que normalmente ele é fortemente relacionado a outras fontes ambientais, principalmente com árvores (ANZAI et al., 2014; HAGEN et al., 2013). Alguns trabalhos têm mostrado o isolamento de complexo *C. gattii* em poeira. Por essa

razão, acredita-se que o fungo pode ter sido trazido pelo ar para o local de onde foi isolado (BRITO-SANTOS et al., 2015; LEITE et al., 2012).

A maioria dos isolados apresentaram-se produtores de urease, entretanto houveram alguns urease negativos. Embora seja incomum, há relatos na literatura de isolados urease negativos, como os encontrados neste trabalho, causando infecção, indicando que o fungo pode causar infecção sem este fator de virulência (BAVA; NEGRONI; BIANCHI, 1993; LI; GUO; WU, 1993; RUANE; WALKER; GEORGE, 1988).

Quanto à produção de fosfolipase, nossos isolados foram classificados como moderadamente produtores. Souza e colaboradores (2010) compararam a produção de fosfolipase em isolados clínicos e ambientais, e observaram que os isolados clínicos apresentaram maior produção de fosfolipase que os de origem ambiental, indicando que a capacidade de produzir essas enzimas é um fator importante para a sobrevivência do fungo no hospedeiro.

O *mating type* prevalente foi MAT $\alpha$ , considerado o mais comum e mais virulento. Estes resultados foram similares a outros trabalhos, em que a maioria dos isolados ambientais também foram MAT $\alpha$  (ALVES et al., 2016; BRITO-SANTOS et al., 2015; CASTRO E SILVA et al., 2016).

No nosso trabalho observamos que o tipo molecular VNIII foi quem apresentou maior capacidade de formação de biofilme, e o tipo VNI foi quem apresentou menor capacidade de formação. Benaducci e colaboradores (2016) observaram que há um aumento na expressão de genes relacionados à expressão de fatores de virulência, como urease, lacase e cápsula nas células em biofilme, tornando estes fungos mais virulentos.

O perfil de sensibilidade aos antifúngicos mostrou apenas um isolado de *C. gattii* resistente ao fluconazol; entretanto, observou-se resistência à anfotericina B em isolados de *C. neoformans* (VNI) e *C. gattii* (VGI). Existem relatos de isolados ambientais resistentes ao fluconazol, entretanto, não há relatos de nenhum isolado ambiental resistente a anfotericina B, embora este perfil em *Cryptococcus* spp. já tenha sido relatado em isolados clínicos (CASTRO E SILVA et al., 2016; MATOS et al., 2012; SOUZA et al., 2010; TEODORO et al., 2013). A resistência à anfotericina B

é preocupante por ser este o antifúngico mais utilizado na fase de ataque do tratamento da criptococose, e em caso de falha terapêutica, poucas são as opções alternativas disponíveis (GRUPO DE CONSENSO DE CRIPTOCOCOSE, 2008; PERFECT et al., 2010).

Este trabalho caracterizou os isolados de *Cryptococcus* spp. presente nas excretas de aves na cidade de Londrina quanto a sua virulência e sensibilidade aos antifúngicos. Os dados encontrados mostraram que esses isolados possuem capacidade de produzir diversos fatores de virulência *in vitro*, o que podem ser considerados como potencialmente patogênicos. A maioria dos isolados foram sensíveis aos antifúngicos, alguns deles foram resistentes a anfotericina B, um dado importante, visto que a resistência a este antifúngico é pouco comum.

## Referências

ALMEIDA, F.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. Virulence-Associated Enzymes of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic cell**, v. 14, n. 12, p. 1173–85, 2015.

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 55–58, 2014.

ALVES, G. S. B. et al. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 8, p. 509–15, 2016.

ANZAI, M. C. et al. *Cryptococcus gattii* VGII in a *Plathymenia reticulata* hollow in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Mycoses**, v. 57, n. 7, p. 414–8, 2014.

ARAUJO, G. DE S. et al. Capsules from pathogenic and non-pathogenic *Cryptococcus* spp. manifest significant differences in structure and ability to protect against phagocytic cells. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e29561, 2012.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 14:1 medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. **Yeast**, v. 27, n. 11, p. 875–904, 2010.

BAVA, A. J.; NEGRONI, R.; BIANCHI, M. Cryptococcosis produced by a urease negative strain of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**: bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology, v. 31, n. 1, p. 87–9, 1993.

BENADUCCI, T. et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms *In Vitro* and *In Vivo* using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 290, 2016.



BRITO-SANTOS, F. et al. Environmental isolation of *Cryptococcus gattii* VGII from indoor dust from typical wooden houses in the deep Amazonas of the Rio Negro basin. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0115866, 2015.

CASTRO E SILVA, D. M. et al. First isolation of *Cryptococcus neoformans* genotype VNI MAT-alpha from wood inside hollow trunks of *Hymenaea courbaril*. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p. 97–102, 2016.

CHATURVEDI, S. et al. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MATalpha and MATa pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 2007–9, 2000.

CHEN, S. C. et al. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175, p. 414–420, 1997.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. M27–S4. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 4th informational supplement. 2012. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**, v. 28, p. 1–35, 2012.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 87, p. 1–41, 2014.

COGLIATI, M. Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An atlas of the molecular types. **Scientifica**, v. 2013, n. 23, p. 1–23, 2013.

EISENMAN, H. C. et al. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. **Microbiology**, v. 153, n. 12, p. 3954–3962, 2007.

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**, v. 56, n. 11, p. 5898–5906, 2012a.

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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3107–13, 2012b.

GERSTEIN, A. C.; NIELSEN, K. It's not all about us: evolution and maintenance of *Cryptococcus* virulence requires selection outside the human host. **Yeast**, 2017.

GRUPO DE CONSENSO DE CRIPTOCOCOSE. Consenso em criptococose - 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524–544, 2008.

HAGEN, F. et al. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71148, 2013.

HATIPOGLU, N.; HATIPOGLU, H. Combination antifungal therapy for invasive fungal infections in children and adults. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 5, p. 523–35, maio 2013.

HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; BECKHAM, J. D. Cryptococcosis in solid organ transplant recipients. **Current opinion in infectious diseases**, v. 28, n. 4, p. 300–7, ago. 2015.

**IBGE Cidades - Londrina**. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/J0BK>>. Acesso em: 4 fev. 2017.

JAIN, P. et al. Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and-sensitive strains of *Candida albicans*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 41, n. 3, p. 113–119, nov. 2001.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17258–63, 2004.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 535–7, 1982.

KWON-CHUNG, K. J.; SAIJO, T. Is *Cryptococcus gattii* a Primary Pathogen? **J Fungi (Basel)**, v. 1, n. 2, p. 154–167, 2015.

LEITE, D. P. et al. *Cryptococcus* spp isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 11, 2012.

LI, A.; GUO, N.; WU, S. A strain of urease negative *Cryptococcus neoformans* isolated from the environment in China. **Chinese Medical Sciences Journal - Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih**, v. 8, n. 1, p. 52–4, 1993.

LITVINTSEVA, A. P.; MITCHELL, T. G. Most environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) are not lethal for mice. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3188–95, 2009.

LIU, T.-B.; PERLIN, D. S.; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 173–181, 2012.

LOMES, N. R. et al. Cryptococcosis in non-HIV/non-transplant patients: A Brazilian case series. **Medical Mycology**, v. 54, n. 7, p. 669–76, 2016.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents *In Vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021–1033, 2006a.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* cells in biofilms are less susceptible than planktonic cells to antimicrobial molecules produced by the innate immune system. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6118–23, 2006b.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4592–601, 2007.

MATOS, C. S. et al. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus* spp. in Bahia, Brazil: molecular types and antifungal susceptibilities. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**: official publication of the European Society of Clinical Microbiology, v. 31, n. 7, p. 1647–52, 2012.

MAY, R. C. et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106–17, 2016.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 179–206, 2016.

MCTAGGART, L. et al. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, and *C. gattii* by use of rapid biochemical tests, differential media, and DNA sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 7, p. 2522–2527, 2011.

MELO, A. S. et al. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 253–262, 2011.

MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 189–95, 2003.

OLSZEWSKI, M. A. et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–71, 2004.

PALIWAL, D. K.; RANDHAWA, H. S. Evaluation of a simplified *Guizotia abyssinica* seed medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 346–348, 1978.

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**, v. 50, n. 3, p. 291–322, fev. 2010.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7–14, 1982.

RUANE, P. J.; WALKER, L. J.; GEORGE, W. L. Disseminated infection caused by urease-negative *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 10, p. 2224–5, 1988.

- SABIITI, W.; MAY, R. C. Capsule independent uptake of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* into brain microvascular endothelial cells. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35455, 2012.
- SCHMALZLE, S. A. et al. *Cryptococcus neoformans* infection in malignancy. **Mycoses**, v. 59, n. 9, p. 542–552, 2016.
- SCHWARZ, P. et al. Combination of amphotericin B with flucytosine is active *in vitro* against flucytosine-resistant isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 383–5, 2007.
- SINGH, A. et al. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. **mBio**, v. 4, n. 3, p. e00220-13, 2013.
- SOUZA, L. K. H. et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 62–7, 2010.
- SPINA-TENSINI, T. et al. Geographic distribution of patients affected by *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complexes meningitis, pigeon and tree populations in Southern Brazil. **Mycoses**, v. 60, n. 1, p. 51–58, 2017.
- 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. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 6, p. 371–6, 2013.
- TAVARES, E. R. et al. Accurate and sensitive real-time PCR assays using intergenic spacer 1 region to differentiate *Cryptococcus gattii sensu lato* and *Cryptococcus neoformans sensu lato*. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p. 89–96, 2016.
- TEODORO, V. L. I. et al. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 759–64, 2013.
- WILLIAMSON, P. R. et al. Cryptococcal meningitis: epidemiology, immunology, diagnosis and therapy. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 1, p. 13–24, 25 nov. 2016.

**Tabela 1:** Incidência de *Cryptococcus* spp. em excretas de aves por local de coleta

<b>Local de coleta</b>	<b>Amostras excretas</b>	<b>Isolados obtidos</b>
Bosque Central (23/07/2012)	20	6
Bosque Central (25/08/2012)	20	5
Pombal do Cemitério (06/10/2012)	20	11
Praça da Bandeira (13/12/2012)	20	9
Pombal doméstico (07/02/2013)	20	16
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>47</b>

**Tabela 2:** Identificação fenotípica e molecular dos isolados de *Cryptococcus* spp. de excretas de aves

Isolado	Identificação Fenotípica		Identificação molecular	
	CGB <sup>1</sup>	Espécie <sup>2</sup>	Tipo molecular	Espécie (Hagen et al., 2015) <sup>3</sup>
1A1	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
1B4	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
1C5	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
1D4	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
1D5	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
2B1	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
2C3	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
2C4	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
2C5	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
5A2	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
5C5	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
5D1	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	VNIII	Híbrido <i>C. neoformans</i> x <i>C. deneoformans</i>
3B1	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
3B2	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
3B4	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
3D5	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
4B3	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
4C5	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
4D2	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
4D4	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
5A3	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
5A4	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
5B3	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
5B5	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
5C1	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
5D4	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i>	VNI	<i>C. neoformans</i>
1A2	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
3A1	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
3A4	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
3C1	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
3C3	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
3C5	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
3D1	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
3D2	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
4B2	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
4B5	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
4D1	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
4D5	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
5A1	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
5A5	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
5B4	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
5C3	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
5D2	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
5D3	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
5D5	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGI	<i>C. gattii</i>
2B4	<i>C. gattii</i>	<i>C. gattii</i>	VGII	<i>C. deuteroformans</i>

1- CGB: Cultivo em Ágar contendo L-Canavanina, Glicina, Azul de bromotimol. 2- Espécie: Determinada por amplificação da região IGS1 com iniciadores específicos (TAVARES et al., 2016). 3- Espécie de acordo com Hagen e colaboradores (2015).

**Tabela 3:** Mating type e fatores de virulência de *Cryptococcus* sp. isolados de excretas de aves

Isolado	Espécie	Mating type	Urease	Fosfolipase <sup>1</sup>	Melanina	Biofilme <sup>2</sup>
1A1	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,64 ± 0,02	+	0,28 ± 0,08
1B4	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,65 ± 0,11	-	0,92 ± 0,39
1C5	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,65 ± 0,03	+	1,32 ± 0,24
1D4	<i>C. neoformans</i>	A	-	0,34 ± 0,05	-	0,95 ± 0,22
1D5	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,60 ± 0,00	-	0,63 ± 0,32
2B1	<i>C. neoformans</i>	A	-	0,67 ± 0,01	-	1,22 ± 0,26
2C3	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,64 ± 0,00	-	0,84 ± 0,18
2C4	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,49 ± 0,01	+	0,46 ± 0,39
2C5	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,44 ± 0,03	-	0,47 ± 0,10
5A2	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,65 ± 0,07	-	0,10 ± 0,11
5C5	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,79 ± 0,01	+	0,36 ± 0,14
5D1	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,63 ± 0,10	-	0,30 ± 0,14
3B1	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,56 ± 0,08	+	0,21 ± 0,11
3B1	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,56 ± 0,08	+	0,21 ± 0,11
3B2	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,47 ± 0,07	-	0,29 ± 0,12
3B4	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,66 ± 0,08	+	0,33 ± 0,07
3D5	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,69 ± 0,11	+	0,56 ± 0,09
4B3	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,67 ± 0,08	-	0,13 ± 0,05
4C5	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,59 ± 0,00	-	0,26 ± 0,12
4D2	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,53 ± 0,01	+	0,47 ± 0,38
4D4	<i>C. neoformans</i>	A	-	0,60 ± 0,00	-	1,08 ± 0,23
5A3	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,44 ± 0,01	-	0,08 ± 0,12
5A4	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,73 ± 0,04	+	0,36 ± 0,13
5B3	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,56 ± 0,05	+	0,13 ± 0,06
5B5	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,62 ± 0,01	-	0,08 ± 0,03
5C1	<i>C. neoformans</i>	A	-	0,74 ± 0,05	+	0,27 ± 0,07
5D4	<i>C. neoformans</i>	A	+	0,74 ± 0,06	-	0,26 ± 0,07
1A2	<i>C. gattii</i>	A	+	0,61 ± 0,04	-	0,96 ± 0,73
3A1	<i>C. gattii</i>	A	+	0,67 ± 0,05	-	0,46 ± 0,12
3A4	<i>C. gattii</i>	A	+	0,48 ± 0,03	-	0,18 ± 0,08
3C1	<i>C. gattii</i>	A	+	0,61 ± 0,00	+	0,46 ± 0,40
3C3	<i>C. gattii</i>	A	+	0,40 ± 0,06	-	0,46 ± 0,08
3C5	<i>C. gattii</i>	A	+	0,48 ± 0,03	-	0,60 ± 0,08
3D1	<i>C. gattii</i>	A	+	0,49 ± 0,01	+	0,78 ± 0,07
3D2	<i>C. gattii</i>	A	+	0,82 ± 0,10	-	0,83 ± 0,13
4B2	<i>C. gattii</i>	A	-	0,43 ± 0,07	-	1,70 ± 0,28
4B5	<i>C. gattii</i>	A	+	0,73 ± 0,01	-	0,07 ± 0,03
4C4	<i>C. gattii</i>	A	+	0,48 ± 0,13	+	0,11 ± 0,10
4D1	<i>C. gattii</i>	A	+	0,84 ± 0,00	-	0,41 ± 0,12
4D5	<i>C. gattii</i>	A	+	0,66 ± 0,04	-	0,30 ± 0,15
5A1	<i>C. gattii</i>	A	+	0,55 ± 0,15	-	0,36 ± 0,16
5A5	<i>C. gattii</i>	A	+	0,60 ± 0,11	-	0,41 ± 0,19
5B4	<i>C. gattii</i>	A	+	0,65 ± 0,05	-	0,11 ± 0,06
5C3	<i>C. gattii</i>	A	+	0,83 ± 0,04	+	0,20 ± 0,08
5D2	<i>C. gattii</i>	A	+	0,79 ± 0,04	-	0,15 ± 0,05
5D3	<i>C. gattii</i>	A	+	0,74 ± 0,02	-	0,14 ± 0,03
5D5	<i>C. gattii</i>	A	+	0,73 ± 0,08	-	0,32 ± 0,05
2B4	<i>C. gattii</i>	A	+	0,66 ± 0,07	-	0,84 ± 0,12

1-Atividade de fosfolipase calculada pelo índice Pz médio ± desvio padrão (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982). 2-Capacidade de formação de biofilme calculada pela DO média de leitura da técnica de Cristal Violeta (MELO et al, 2011).

**Tabela 4:** Perfil de sensibilidade de *Cryptococcus* spp. aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B

Isolado	Espécie	CIM fluconazol (µg/mL)	Classificação <sup>1</sup>	CIM anfotericina B (µg/mL)	Classificação <sup>2</sup>
1A1	<i>C. neoformans</i>	0,5	Sensível	0,5	Sensível
1B4	<i>C. neoformans</i>	8	Sensível	0,5	Sensível
1C5	<i>C. neoformans</i>	4	Sensível	1	Sensível
1D4	<i>C. neoformans</i>	8	Sensível	0,25	Sensível
1D5	<i>C. neoformans</i>	2	Sensível	0,5	Sensível
2B1	<i>C. neoformans</i>	4	Sensível	0,25	Sensível
2C3	<i>C. neoformans</i>	8	Sensível	0,25	Sensível
2C4	<i>C. neoformans</i>	4	Sensível	0,5	Sensível
2C5	<i>C. neoformans</i>	8	Sensível	0,125	Sensível
5A2	<i>C. neoformans</i>	8	Sensível	1	Sensível
5C5	<i>C. neoformans</i>	8	Sensível	0,125	Sensível
5D1	<i>C. neoformans</i>	2	Sensível	1	Sensível
3B1	<i>C. neoformans</i>	2	Sensível	0,5	Sensível
3B2	<i>C. neoformans</i>	4	Sensível	2	Resistente
3B4	<i>C. neoformans</i>	8	Sensível	2	Resistente
3D5	<i>C. neoformans</i>	4	Sensível	0,06	Sensível
4B3	<i>C. neoformans</i>	0,5	Sensível	0,5	Sensível
4C5	<i>C. neoformans</i>	4	Sensível	0,125	Sensível
4D2	<i>C. neoformans</i>	8	Sensível	0,25	Sensível
4D4	<i>C. neoformans</i>	2	Sensível	2	Resistente
5A3	<i>C. neoformans</i>	4	Sensível	8	Resistente
5A4	<i>C. neoformans</i>	2	Sensível	1	Sensível
5B3	<i>C. neoformans</i>	2	Sensível	1	Sensível
5B5	<i>C. neoformans</i>	4	Sensível	2	Resistente
5C1	<i>C. neoformans</i>	8	Sensível	1	Sensível
5D4	<i>C. neoformans</i>	4	Sensível	1	Sensível
1A2	<i>C. gattii</i>	1	Sensível	0,5	Sensível
3A1	<i>C. gattii</i>	2	Sensível	0,125	Sensível
3A4	<i>C. gattii</i>	16	Resistente	0,06	Sensível
3C1	<i>C. gattii</i>	4	Sensível	0,25	Sensível
3C3	<i>C. gattii</i>	0,5	Sensível	0,5	Sensível
3C5	<i>C. gattii</i>	0,25	Sensível	0,25	Sensível
3D1	<i>C. gattii</i>	4	Sensível	0,25	Sensível
3D2	<i>C. gattii</i>	2	Sensível	4	Resistente
4B2	<i>C. gattii</i>	4	Sensível	0,5	Sensível
4B5	<i>C. gattii</i>	2	Sensível	0,25	Sensível
4C4	<i>C. gattii</i>	2	Sensível	0,125	Sensível
4D1	<i>C. gattii</i>	8	Sensível	1	Sensível
4D5	<i>C. gattii</i>	8	Sensível	1	Sensível
5A1	<i>C. gattii</i>	0,5	Sensível	0,25	Sensível
5A5	<i>C. gattii</i>	2	Sensível	1	Sensível
5B4	<i>C. gattii</i>	0,125	Sensível	1	Sensível
5C3	<i>C. gattii</i>	0,125	Sensível	2	Resistente
5D2	<i>C. gattii</i>	0,25	Sensível	8	Resistente
5D3	<i>C. gattii</i>	0,25	Sensível	2	Resistente
5D5	<i>C. gattii</i>	2	Sensível	8	Resistente
2B4	<i>C. gattii</i>	1	Sensível	0,5	Sensível

1-Classificação de acordo com Espinel-Ingroff e colaboradores (2012a). 2-Classificação de acordo com Espinel-Ingroff e colaboradores (2012b).



## 5 Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho mostram o perfil de isolados dos complexos *C. neoformans* e *C. gattii* presentes na cidade de Londrina. Este percentual elevado de *Cryptococcus* (47% das amostras positivas) pode ser explicado pelo acúmulo de excretas dessas aves, tornando o ambiente favorável para o fungo. O tipo molecular prevalente foi VNI (*C. neoformans*). Os isolados apresentaram capacidade de produzir diversos fatores de virulência *in vitro*, como: urease, melanina, fosfolipase e biofilme. A maioria dos isolados foi sensível aos dois antifúngicos testados. Alguns dos isolados foram considerados resistentes a anfotericina B, um antifúngico muito utilizado no tratamento da criptococose, e que tem poucos casos de resistência descritos.