PEDRO HENRIQUE MAGALHÃES CARDOSO

Classificação e perfil fenotípico de cepas clínicas e ambientais do complexo

Cryptococcus neoformans mantidas em banco de microrganismos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre de Ciências.

São Paulo
2012

PEDRO HENRIQUE MAGALHÃES CARDOSO

Classificação e perfil fenotípico de cepas clínicas e ambientais do complexo *Cryptococcus neoformans* mantidas em banco de microrganismos

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Claudete Rodrigues Paula

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Cardoso, Pedro Henrique Magalhães.

Classificação e perfil fenotípico de cepas clínicas e ambientais do complexo *Cryptococcus neoformans* mantidas em banco de microrganismos / Pedro Henrique Magalhães Cardoso. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Leveduras patogênicas, características fenotípicas e genotípicas.

Versão do título para o inglês: Classification and phenotypic profile of clinical and environmental strains of *Cryptococcus neoformans* complex kept in stock microorganisms.

1. Cepas clínicas 2. Cepas ambientais 3. *Cryptococcus neoformans*
4. *Cryptococcus gattii* 5. Criptococose I. Paula, Profa. Dra. Claudia Rodrigues II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB083/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 367 referente ao projeto intitulado: *“Características fenotípicas, fatores de virulência “in vivo” e “in vitro” e sensibilidade aos antifúngicos de cepas ambientais e clínicas de C.neoformans e C.gattii”* sob a responsabilidade de **Pedro Henrique Magalhães Cardoso**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 30 de março de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por ter possibilitado força e dedicação frente a inúmeras barreiras e dificuldades que enfrentei ao longo desses quase dois anos e meio em São Paulo,

Ao meu amigo e ex-orientador da UFRRJ Francisco de Assis Baroni , a minha orientadora Dra Claudete Rodrigues Paula pela oportunidade e confiança depositada ao longo do tempo,

E a mim mesmo, pela força e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares (Tio Antônio Carlos Cardoso, Tia Nádia, aos primos Thalles e Patrícia) pela paciência e boa vontade que me possibilitaram oportunidade para que eu me engrenasse inicialmente em São Paulo. Eles foram peças fundamentais para que esse sonho se tornasse realidade. Meu muito obrigado.

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade.

Às minhas amigas de laboratório Elisângela e Vanessa, ao meu amigo Wanderson que me ajudou em todos os experimentos . Aos colegas de laboratório e do departamento pelo apoio e amizade: Diana, Wanderson, Bruno, Ériques, Luciana, Satiko, Carlos, Lú, e a Alice da secretaria de pós pela atenção e esclarecimentos.

Aos professores do ICB pelo convívio e amizade professor Flávio Alterthum, Benedito Corrêa, Irma Nely, Luiziana Ferreira.

Marilena dos Anjos Martins e Maria Walderez do Instituto Adolfo Lutz que também foram responsáveis por parte desse trabalho.

À Fapesp pela apoio financeiro do projeto.

E a todos aqueles que por ventura não foram mencionados aqui, mas que contribuíram para este sonho.

Muito Obrigado !!!

RESUMO

CARDOSO, P. H. M. **Classificação e perfil fenotípico de cepas clínicas e ambientais do complexo *Cryptococcus neoformans* mantidas em banco de microrganismos.** 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Objetivando estudar o perfil fenotípico de leveduras mantidas em banco de microrganismos de *Cryptococcus neoformans*, 40 cepas de origem clínica e 44 de origem ambiental foram escolhidas aleatoriamente. As cepas passaram por tipagem bioquímica para diferenciação em *C. neoformans* e *C. gattii*, e dentre as cepas clínicas 90% foram tipadas como *C. neoformans* e 10% como *C. gattii*, já dentre as cepas ambientais 95,5% foram *C. neoformans* e 4,5% *C. gattii*. As cepas que foram positivas no teste bioquímico para *C. gattii* passaram por tipagem molecular (PCR-RFLP) e verificou-se que apenas quatro cepas eram realmente *C. gattii* (VGII), e duas outras *C. neoformans* (VNI e VNIII). Quando estudado os fatores relacionados a virulência, todas as cepas tanto clínicas quanto ambientais foram produtoras de fosfolipase, sendo que cepas de origem clínica produziram essa enzima em maior quantidade. Todas as cepas tanto clínicas quanto ambientais foram produtoras da enzima protease e todas também apresentaram intensidade de cor da colônia (melanização). Quando avaliado a espessura capsular *in vitro* todas apresentaram cápsula, das cepas clínicas, 67% apresentaram cápsula média e das ambientais 70%. Quando avaliado a sensibilidade aos antifúngicos pelo métodos “E-test” todas as cepas clínicas e ambientais foram sensíveis aos antifúngicos anfotericina B, cetoconazol, fluconazol, voriconazol e posaconazol. O itraconazol também foi testado e apresentou cepas sensíveis à droga, porém uma cepa clínica e duas ambientais tiveram classificação dose dependente. Destacamos que a fosfolipase poderia ser usada como um marcador fenotípico para o complexo *Cryptococcus neoformans* e uma correta identificação das culturas mantidas em banco de microrganismos é necessário.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*. Origem clínica. Origem ambiental. Criptococose.

ABSTRACT

CARDOSO, P. H. M. **Classification and phenotypic profile of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* complex strains maintained in stock culture.** 2012. 91 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Aiming to study the phenotypic profile of yeasts maintained in stock culture identified as *Cryptococcus neoformans*, 40 clinical and 44 environmental strains, were chosen randomly. The strains had undergone biochemical typing for differentiation as *C. neoformans* and *C. gattii*. Among the clinical strains 90% were typed as *C. neoformans* and 10% as *C. gattii*, already among the environmental strains were 95,5% *C. neoformans* and 4,5% *C. gattii*. The strains that were positive in biochemical test for *C. gattii* underwent molecular typing (PCR-RFLP) and found that only four strains were actually *C. gattii* (VGII) and two other *C. neoformans* (VNI and VNII). When the factors related to virulence were studied, both the clinical and environmental strains were phospholipase positive but the clinical strains produced a greater amount of this enzyme. All strains were both clinical and environmental production of protease and also showed an intensity colony color (melanization). When the thickness of the capsule was evaluated, all of it showed a capsule, from the clinical strains 67% had an average capsule and from environmental strains 70% had an average capsule. When assessed by sensitivity to antifungal by E-test method all clinical and environmental strains were sensitive to the anphotericine B, ketoconazole, fluconazole, voriconazole and posaconazole. Itraconazole was tested and the samples showed drug sensitive-strains. We point out that phospholipase production would be used as marked to *C. neoformans* complex and a correct identification of strains maintained in stock culture is necessary.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*. *Cryptococcus gattii*. Clinic strains. Environmental strains. Cryptococcosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Histórico	12
<i>1.1.1 Cryptococcus neoformans, primeiro agente etiológico da criptococose</i>	12
<i>1.1.2 Cryptococcus gattii, segundo agente etiológico da criptococose</i>	13
1.2 Taxonomia	14
1.3 Micologia	14
1.4 Ecologia	15
1.5 Epidemiologia	17
1.6 Patogenia	20
<i>1.6.1 Nos humanos</i>	20
<i>1.6.2 Nos animais</i>	21
1.7 Fatores relacionados à virulência	23
<i>1.7.1 Protease</i>	23
<i>1.7.2 Fosfolipase</i>	24
<i>1.7.3 Melanina</i>	24
<i>1.7.4 Cápsula</i>	26
1.8 Diferenciação molecular	28
1.9 Sensibilidade aos antifúngicos	28
<i>1.9.1 Difusão em ágar E-test</i>	30
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Amostras estudadas	32
3.2 Re-identificação do gênero e espécie	32
3.3 Biotipagem das cepas	32
3.4 Tipagem molecular das cepas classificadas como <i>C. gattii</i> em meio C.G.B33	
<i>3.4.1 Lise e extração de DNA</i>	33
<i>3.4.2 Reação PCR-RFLP</i>	33
<i>3.4.2.1 PCR</i>	33
<i>3.4.2.2 PCR-RFLP</i>	33
3.5 Fatores relacionados à virulência	34
<i>3.5.1 Produção de protease</i>	34

3.5.2 <i>Produção de fosfolipase</i>	35
3.5.3 <i>Produção de melanina</i>	36
3.5.4 <i>Estimativa da espessura capsular</i>	36
3.6 Teste de sensibilidade a antifúngicos – Método Etest	37
3.6.1 <i>Processamento do teste</i>	37
3.6.2 <i>Interpretação dos resultados</i>	38
3.6.3 <i>Drogas utilizadas</i>	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Re-identificação das cepas	40
4.2 Tipagem bioquímica	40
4.3 Tipagem molecular das cepas que foram C.G.B positivo pela técnica PCR-RFLP	41
4.4 Fatores relacionados à virulência	43
4.4.1 <i>Pesquisa de exoenzimas</i>	43
4.4.1.1 <i>Produção de protease</i>	43
4.4.1.2 <i>Produção de fosfolipase</i>	45
4.4.2 <i>Expressão de cor da colônia em meio dopamina</i>	46
4.4.3 <i>Avaliação da espessura capsular</i>	48
4.5 Testes de Sensibilidade a antifúngicos (“E-test”)	50
4.5.1 Antifúngicos	50
4.5.1.1 <i>Anfotericina B</i>	50
4.5.1.2 <i>Cetoconazol</i>	51
4.5.1.3 <i>Itraconazol</i>	52
4.5.1.4 <i>Fluconazol</i>	52
4.5.1.5 <i>Voriconazol</i>	53
4.5.1.6 <i>Posoconazol</i>	54
5 DISCUSSÃO	59
5.1 Identificação das espécies	59
5.1.1 <i>Tipagem bioquímica em meio C.G.B</i>	59
5.1.2 <i>Tipagem molecular das cepas que foram C.G.B positivo</i>	61
5.2 Fatores relacionadas à virulência	62
5.2.1 <i>Protease</i>	62
5.2.2 <i>Fosfolipase</i>	63
5.2.3 <i>Produção de Melanina</i>	64

5.2.4 Cápsula	65
5.3 Teste de Sensibilidade frente aos antifúngicos	66
6 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICES	87
APÊNDICE A - MEIO DOPAMINA	88
APÊNDICE B -MEIO C.G.B	89
APÊNDICE C - MEIO PROTEASE	90
APÊNDICE D - MEIO FOSFOLIPASE	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada que causa infecção em animais e humanos em quase todo o mundo. Esta levedura pode infectar hospedeiros aparentemente saudáveis, mas com maior frequência e severidade em indivíduos imunocomprometidos (PFALLER; MCGINNIS; ANAISSIE, 2009).

A etimologia da palavra *Cryptococcus*, oriundo da palavra grega “Kryptos”, significa “ escondido”, “ secreto”, “misterioso”, “obscuro”. Tal terminologia foi criada em 1833 por Kutzing (HEITMAN et al., 2011).

1.1.1 *Cryptococcus neoformans*, primeiro agente etiológico da criptococose

A criptococose foi primeiramente descrita por Zenker em 1861, porém a validação do caso de Zenker era questionável, pois não havia evidência da cultura do microrganismo (HEITMAN et al., 2011). O crédito da primeira descrição foi então para Otto Busse e Abraham Buschke. Em 1884, Otto Busse, um patologista que trabalhava no “Institute of Pathology at Greifswald University”, na Alemanha, observou corpúsculos ovais obtidos da lesão de sarcoma da tíbia numa mulher de 31 anos (HEITMAN et al., 2011; LACAZ, 2002). Busse isolou a cultura dessa lesão, e a patogenicidade foi confirmada através da re-inoculação na pele de um paciente. O paciente morreu em decorrência da disseminação da infecção. Buschke, um físico que tomava conta do paciente, cultivou o patógeno da erupção cutânea e mencionou que aquele agente etiológico se tratava de um coccídeo. No mesmo ano, Francesco Sanfelice, na Itália isolou uma levedura encapsulada de suco de pêssgo e o nomeou como *Saccharomyces neoformans*. Busse chamava o fungo de *Saccharomyces* e a doença de *saccharomycopsis hominis*. Em 1885, Sanfelice reconheceu a similaridade entre *S. neoformans* e o fungo isolado por Busse. Em 1901 Vuillemin renomeou os fungos isolados por Busse e Sanfelice como *Cryptococcus* e as espécies *C. hominis* e *C. neoformans* respectivamente, esta renomeação foi baseada na inabilidade do mesmo em fermentar fontes de carbono e a não formação de ascósporos, no qual caracteriza as espécies do gênero *Saccharomyces*. Em 1902, Frothingham reconheceu a patogenicidade da levedura através da lesão pulmonar em um cavalo em Massachusetts que era similar aos fungos isolados por Busse e Buschke. E com esses achados comprova-se que o fungo era patogênico tanto para

humanos quanto para animais. A meningite por *Cryptococcus* foi relatada em uma mulher 1914 por Verse por um diagnóstico ante morte. Dois anos depois, Stoddard e Cutler relataram mais dois casos de meningite e nomearam o fungo causador de *Torula histolytica*. Em 1935, Benham conduziu um estudo com numerosas leveduras, sendo 22 cepas patogênicas e outras não patogênicas, isoladas de humanos, inclusive os isolados de Busse. E baseando-se nas observações morfológicas, patológicas e sorológicas, a autora concluiu que todos os isolados humanos eram, provavelmente, uma espécie, *C. hominis* e compreendia duas variedades. Em 1950 Benham propôs que o nome *torulosi* e *torula* meningite fosse renomeada para criptococose e que o nome *Cryptococcus neoformans* fosse conservado (HEITMAN et al., 2011).

1.1.2 Cryptococcus gattii, segundo agente etiológico da criptococose

Em 1885, um ano após a descoberta da criptococose por Busse e Buschke, Ferdinand Curtis, um professor de patologia da “Faculty of Medicine of Lille” na França, descreveu um “parasita vegetal” que pertencia a uma espécie de levedura e que foi isolada de um tumor ínguido-crural de um homem jovem. De acordo com as observações morfológicas o pesquisador nomeou o fungo como *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*, considerando ser distinto de *S. neoformans* de Sanfelice e de *S. hominis* de Busse. Benham rejeitou esta espécie e propôs ser uma variedade de *C. hominis* (*C. hominis* var. *tumefaciens*).

Em 1970 Gattii e Eeckels isolou uma cepa de *C. neoformans* de uma criança de 7 anos no Zaire e que sofria de meningoencefalite. Vanbreuseghem e Takashio (1970) relataram que o isolado produzia células alongadas “in vivo” e na cultura e se assemelhava a um típico isolado de *C. neoformans*. Esse atípico isolado, foi descrito como uma nova variedade e foi nomeado *C. neoformans* var. *gattii*. No entanto, Kwon-Chung et al. (1978) determinaram que *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* diferiam consideravelmente nas características morfológicas, bioquímicas e sorológicas e que o isolado do Zaire era idêntico a uma cepa teleomórfica de *Filobasidiella bacillispora*. E esse achado indicou que *C. neoformans* var. *gattii* era sinônimo de *C. bacillisporus*. Em 2002 o nome *C. bacillisporus* foi renomeado como *C. gattii*, pois o termo “*gattii*” era mais amplamente usado pelo mundo do que “*bacillisporus*” (HEITMAN et al., 2011).

1.2 Taxonomia

Segundo Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), no estado teleomórfico, o complexo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* é classificado em:

- a) Reino Fungi;
- b) Filo Basidiomycota;
- c) Ordem Tremellales;
- d) Família Tremellaceae;
- e) Gênero *Filobasidiella*.

Espécie:

- a) *Filobasidiella neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo A e D);
- b) *Filobasidiella neoformans* var *bacillispora* (sorotipos B e C).

No estado anamorfos os correspondentes são:

- a) *Cryptococcus neoformans* (sorotipos A e D);
- b) *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C).

1.3 Micologia

Os membros do gênero *Cryptococcus* são considerados leveduras não fermentadoras, assimiladoras de inositol, produtoras de urease e reativas ao azul de diazônico B. Atualmente, ao lado das espécies **patogênicas**, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, existem outras 68 espécies de *Cryptococcus* (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011) e estas espécies são encontradas em uma ampla variedade de ambientes (HEITMAN et al., 2011).

A maioria das espécies de *Cryptococcus* não sobrevivem em tecidos de animais de sangue quente, pois estes possuem temperaturas elevadas e um sistema imune que os protege. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são consideradas as únicas espécies de *Cryptococcus* a causarem patogenia em humanos, devido a capacidade de crescer em temperaturas de 37 °C. No entanto outras espécies como *C. albidus*, *C. laurentii* e *C.*

curvatus, tem sido ocasionalmente relatadas como causa de infecção (PFALLER; MCGGINNIS; ANAISSIE, 2009).

O complexo patogênico *Cryptococcus* (*C. neoformans* e *C. gattii*) é representado por leveduras encapsuladas heterotáticas que produzem basidiosporos em condições experimentais. Durante a fase haplóide do seu ciclo de vida, estas leveduras crescem em meio de cultura de rotina, desenvolvendo, em torno de 48-72 horas, uma coloração de branco a creme, com aspecto mucoide devido a presença de cápsula (PFALLER; MCGGINNIS; ANAISSIE, 2009).

1.4 Ecologia

Inicialmente *Cryptococcus* foi isolado de suco de pêssego, mas atualmente dois vastos habitats estão bem estabelecidos, como reservatórios para *C. neoformans* e *C. gattii*. São eles: excretas de pombos e madeira em decomposição. Existem inúmeros isolados globais de cepas pertencentes aos sorotipos A, D e do híbrido AD isolados de madeira em decomposição e de várias espécies de árvores (ESCANDÓN et al., 2006; FRANZOT et al., 1997; GROVER et al., 2007; KAO; SCHAWARZ, 1957; KIDD et al., 2007; LAZERA; PAL, 1997; LAZÉRA et al., 2000; MAHMOUD, 1999; MONTENEGRO; PAULA, 2000, PASSONI, 1999; RANDHAWA et al., 2008; REFOJO et al., 2009; SWINNE-DESGAIN, 1975; WANKE; NISHIKAWA, 1993) e de fezes de pombos e outras aves (BARONI et al., 2006; CASALI et al., 2003; CHEE; LEE, 2005; ELLIS; PFEIFFER, 1990; KOBAYASHI et al., 2005; RIBEIRO; NGAMSKULRUNGROJ, 2008).

De acordo com trabalhos publicados com amostras ambientais, foram sugeridos que cepas de *C. gattii* ocupam nichos ecológicos similares e estão associados à madeira deteriorada, restos de vegetais e solo. Em particular, árvores de eucalipto representam a mais comum e melhor fonte de *C. gattii*. Os isolados ambientais iniciais de *C. gattii* nos continentes Australiano, Asiático e Norte Americano, indicam principalmente as espécies de árvore *Eucalyptus camaldulensis* e outras espécies de *Eucalyptus* (CHAKRABARTI et al., 1997; ELLIS; PFEIFFER, 1990). Desde a descoberta de *C. gattii* em oco de *E. camaldulensis* na Austrália (ELLIS; PFEIFFER, 1990; PFEIFFER; ELLIS, 1992), a associação de *C. gattii* com espécies de eucalipto tem sido bem documentadas na Austrália (HALLIDAY; CARTER, 2003; VILCINS et al., 2002), América do Sul (CASALI et al., 2003; GRANADOS;

CASTANEDA, 2006; MONTENEGRO; PAULA, 2000; REFOJO et al., 2009), América do Norte (PFEIFFER; ELLIS, 1991) e Ásia (CHAKRABARTI et al., 1997).

Swinne-Desgain, em 1975, isolou *Cryptococcus neoformans* do trato digestivo de aves, excretas de pombos, excretas de canários e do ambiente onde as aves estavam presentes. Swinne et al. (1991), relataram o isolamento de *Cryptococcus neoformans* de poeira doméstica em 54% das casas ocupadas por pacientes portadores de HIV com criptococose. E resultados similares foram relatados no Zaire, com isolamento do solo e do ar de casa de pacientes com HIV e criptococose.

Em 1997, Garcia-Hermanoso et al. sugerem que as fezes de pombos são fonte potencial de cepas patogênicas de *C. neoformans*, sorotipo D, ao trabalharem com isolados clínicos e saprofíticos em Bourdeaux, França. O sorotipo A de *Cryptococcus neoformans* tem sido isolado de eucalipto e diversas outras árvores no Brasil e Colômbia (GRANADOS; CASTANEDA, 2005; MONTENEGRO et al., 1999).

Excretas de papagaios como reservatório de *Cryptococcus neoformans* foram mencionados por Bawens et al. (1986), Lopes-Martinez e Castanon-Olivares (1995). Excretas de outras aves, também constam da literatura, como as excretas de frangos (SWINNE, KAYEMBE; NIYIMI, 1986) e fezes de faizão (CHAKRABORTY et al., 1991). Passoni et al. (1998), isolaram *Cryptococcus neoformans* de *Paroaria dominicana*, *Psittacidae*, *Serinus canarius*, *Sicalis flaveola* e *Sporophila caerulescens*. E os materiais foram colhidos em ambientes domésticos do Rio de Janeiro. Baroni et al. (2006) isolou *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos em torres de igreja do Rio de Janeiro. Pereira (2006) no intuito de isolar *C. neoformans* de excretas de aves comercializadas em “Pet Shop”, em um total de 1268 amostras, verificou positividade em 85 (6,7%). A positividade foi mostrada isoladamente para cada ave, e as excretas de *Melapsittacus undulatus*, *Serinus canaria* e outras aves de maior procura pelos clientes destacaram-se pelo alto número de isolados.

Cryptococcus neoformans variedade *grubbii* foi descrita em 1999 por Franzot, Salkin e Casadevall. Soares et al. (2005) analisaram 79 amostras de fezes de pombos e 37 de ar atmosférico, próximo dos excrementos das aves na cidade de Santos, sendo que dessas amostras uma ampla variedade de espécies de *Cryptococcus* foram encontradas, dentre elas 13,9% de *Cryptococcus neoformans* variedade *grubbi*.

Pássaros dificilmente se infectam com *Cryptococcus*, presumivelmente pela alta temperatura destas aves (42.5 °C) (CASADEVALL; PERFECT, 1998), porém bicos, garras, papo e penas de pombos podem ser vetores para disseminação de *Cryptococcus neoformans* (SWINNE-DESGAIN, 1975). Swinne-Desgain, (1976), mostrou que muitos pombos carregam

o agente no inglúvio e a levedura pode sobreviver na passagem do trato digestivo e chegar até as fezes. Células de *Cryptococcus neoformans*, fornecidas aos pombos permanecem viáveis no inglúvio por até 86 dias, sugerindo importante papel destas aves no transporte de *C. neoformans*.

Um dos aspectos relacionados à ecologia de *C. neoformans* é a produção de micocinas ou toxinas “killer”. Tais substâncias, produzidas por alguns fungos, podem controlar o crescimento de outros. Trata-se, segundo Morace et al. (1984), de um fenômeno bem difundido entre as leveduras e dependente da temperatura, de pH e do substrato.

Fazendo um estudo ecológico com tronco em decomposição, oco de tronco e casca de tronco de sete espécies diferentes de árvores (*Tomarindus indica*, *Mangifera indica*, *Pithecolobium dulce*, *Syzygium cumini*, *Terminalia arjuna*, *Cassia fistula* e *Butea monosperma*) na cidade de Jabalpur na Índia, Grover et al. (2007), isolaram *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* e *C. gattii* de seis dessas espécies.

No ano 2000, Lazéra et al. estudaram troncos de árvores vivos de uma região endêmica para criptococose no nordeste Brasileiro. Um total de 18,5% desses troncos foram positivos para *Cryptococcus neoformans*. Sendo que um desses troncos tiveram as espécies *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* compartilhando o mesmo hábitat.

1.5 Epidemiologia

Muitos autores acreditam que a via de infecção no homem, seja pela inalação de leveduras dessecadas, ou basidiósporos, com cápsula incipiente (CASADEVALL; PERFECT, 1998), estruturas fúngicas estas, presentes em variados locais como construções, antigas torres de igreja, praças, estábulos, celeiros e barracões (BARONI et al., 2006; LEVITZ, 1991; PASSONI et al., 1998).

Garcia-Hermanoso et al. (1999), acreditam que no organismo possa ocorrer uma forma latente, culminando em infecção quando o sistema imunológico está alterado. De acordo com Passoni et al. (1999), na cidade do Rio de Janeiro, pacientes com AIDS, expostos à variedade *neoformans*, no ambiente doméstico, apresentavam risco de criptococose duas vezes maior que os pacientes com AIDS não expostos ao fungo em seus domicílios.

Gomes, Boni e Primo (1997), investigaram o padrão infiltrativo de *Cryptococcus neoformans* em camundongos imunocomprometidos, infectando-os por instilação nasal e por injeção no espaço retro-orbital. Por verificarem crescimento infiltrativo ao longo do periósteo, com eventual envolvimento das terminações nervosas da submucosa, invasão ao longo do

nervo olfatório e envolvimento meníngeo, há hipótese de invasão infiltrativa do sistema nervoso central. Nos animais infectados através do espaço retro-orbital, houve crescimento nos espaços perineurais e perivasculares e, às vezes, nas aponeuroses.

A predisposição à criptococose é a presença de HIV, desordens linfoproliferativas e terapias imunossupressivas (LEGGIADRO; BARRET; HUGUES, 1992). Pappas e Perfect (1999), mostraram que dentre os fatores predisponentes à criptococose, nos indivíduos HIV(-), em maior percentual, encontrava-se a glicoterapia, seguida de transplante de órgãos sólidos, síndromes de falência de órgãos, diabetes mellitus, doenças reumatológicas, doenças pulmonares crônicas, doenças hematológicas malignas ou outras doenças malignas

Até alguns anos atrás a prevalência da criptococose na África Subsaariana não era muito bem documentada (PARK et al., 2009). Relatos na África do Norte são poucos (ELIAS et al., 2009). E dentre os pacientes Africanos com AIDS, a criptococose é a doença oportunista mais frequente, levando a quadros de meningite (HAKIM et al., 2000). A ocorrência em crianças é rara, mas a maioria dos relatos são em crianças entre 6 a 12 anos acometidas pela AIDS. Apesar da África Subsaariana ter alta prevalência de crianças acometidas com a AIDS, o número de crianças com criptococose é baixo comparado com os adultos (MIGLIA et al., 2008).

Na China, Zhu et al. (2010) fizeram um estudo retrospectivo com 154 pacientes atendidos no Hospital Huashan em Shangai, acometidos de criptococose meningea, entre os anos de 1997 e 2007. O número de casos aumentou com o tempo e a maioria dos pacientes eram aparentemente saudáveis (66,9%) e apenas 33,1% tinham fatores predisponentes. E, de acordo com os autores, existem outros trabalhos na China mostrando que pacientes com criptococose são predominantemente imunocompetentes, aumentando assim a possibilidade de que a população chinesa pode ser mais susceptível do que outros grupos étnicos.

Na última década ocorreu uma dramática emergência de casos de criptococose em humanos e animais causada por *Cryptococcus gattii* na Ilha de Vancouver na Colúmbia Britânica, no oeste do Canadá. Estes casos contrastaram com os casos esporádicos e associados a AIDS causados pelo *Cryptococcus neoformans* que eram muito bem relatados pela literatura médica e veterinária. A emergência de *C. gattii* possibilitou o desenvolvimento de medidas e implantação de política de saúde pública, como avaliar os riscos para a comunidade a partir da adaptação de um patógeno que anteriormente não era explorado (HEITMAN et al., 2011).

Na Argentina, Bava e Negroni. (1992), revelaram aumento no número de casos a partir de 1988, a maioria acometendo o sexo masculino. Também Dromer et al. (1996), estudando 552 casos na França, verificaram menor possibilidade de infecção em mulheres.

Apesar do grande número de crianças expostos ao risco da doença, a incidência antes da puberdade é rara (MITCHELL; PERFECT, 1995). Darzé et al. (2000), analisando casos de criptococose, ocorridos entre 1972 e 1996, em pacientes com idades variáveis de oito a 79 anos, verificaram que um terço dos casos ocorreu em indivíduos com idade inferior a 15 anos.

O sorotipo A é isolado mundialmente e é o mais frequente em pacientes com AIDS (BOTTONNE et al., 1987; MITCHELL; PERFECT, 1995; RINALDI et al., 1986; ROZEMBAUM et al., 1990; SHIMIZU; HOWARD; CLANCY, 1986), sendo a variedade *gattii* extremamente rara nos pacientes com HIV, mesmo nas áreas tropicais e subtropicais onde é encontrada (DROMER et al., 1992; KNOW-CHUNG; BENNET, 1984; ROZENBAUM et al., 1990).

No ano de 2006, Escanndón et al. fazendo um estudo de cepas clínicas e ambientais isoladas na Colômbia nos anos de 1997 a 2004, revelaram que os sorotipos mais encontrados nesse período foram o A e o B. Das 178 cepas clínicas estudadas 91,1% correspondia ao sorotipo A, 8,4% ao sorotipo B e 0,5% ao sorotipo C. Das 247 cepas ambientais estudadas, 44,2% eram do sorotipo A, 42,5% do sorotipo B e 13,2% do sorotipo C.

Dromer et al. (1999), analisando 1003 casos de criptococose na França, revelaram que 77,5% eram sorotipo A, 21,7% eram sorotipo D e 0,8% eram sorotipo B. Barreto de Oliveira et al 2004, analisando 57 amostras de *Cryptococcus neoformans* verificou a presença de 65% pertencentes ao sorotipo A, 17,5% pertencentes ao sorotipo B, 9% pertencentes ao sorotipo D, 5% pertencentes ao sorotipo AD e 3,5% pertencentes ao sorotipo C.

Sant'anna et al. (1997), analisaram 337 amostras de *C.neoformans*, de líquido de pacientes com neurocriptococose, em sete cidades do estado de São Paulo verificando que 90,2% associados com a AIDS e apenas 2,97% pertencentes à variedade *gatti*. Paula et al, 1998, em São Paulo, quimiotiparam em meio CGB (Glicina, Canavanina e Azul de Bromotimol), 40 amostras de *C. neoformans* isolados de líquido de pacientes HIV negativos, constando a presença da variedade *neoformans* em 62,5% das amostras (sorotipo A/D) e a variedade *gattii* (sorotipo B/C) em 32,5% das amostras.

Sabemos que *Cryptococcus neoformans* é patogênico para vários animais de laboratório e a inoculação experimental clássica para a verificação da virulência dessa levedura tem como modelo camundongos via endovenosa (LACAZ, 2002).

Com o intuito de avaliar a virulência de cepas de *Cryptococcus neoformans* variedade *grubii*, Silva et al. (2006) usaram 62 cepas na inoculação em camundongos “Balb/c”. Nesse estudo 69% das cepas foram significativamente mais letais e foram reisoladas em alta porcentagem (60%) do cérebro e pulmão.

1.6 Patogenia

1.6.1 Nos humanos

Nas últimas décadas foram grandes os avanços para o entendimento da patogênese da criptococose com relação a infecção, latência e doença. A maior ferramenta foi o progresso no desenvolvimento de ensaios sorológicos indicativos de infecção e tipagem molecular das cepas. Essas técnicas juntas e os diversos estudos clínicos, forneceram evidências de que a infecção pode progredir diretamente para a doença ou ficar em estado de latência e, subsequentemente, ser reativada e causar doença (HEITMAN et al., 2011)

O principal agente etiológico da criptococose é *Cryptococcus neoformans*, micose que afeta principalmente, o sistema nervoso central de humanos e é a causa mais freqüente de meningoencefalite em pacientes imunocomprometidos (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Na criptococose do sistema nervoso central, os sinais e sintomas são relativos ao envolvimento das meninges ou ao aumento da pressão intracranial: dores de cabeça, febre, desorientação, vertigem, ambliopia, rigidez da nuca, tonturas, hiporreflexia, sonolência, vômitos, afasia e paralisia dos nervos cranianos (AGUIRREBENGOA et al., 1992; CRISSEY; LANG; PARISH, 1995; LACAZ, 2002). A criptococose do sistema nervoso central pode resultar em óbito, devido ao aumento da pressão intracraniana, com redução do sangue no local circulante (CRISSEY; LANG; PARISH, 1995).

A criptococose pulmonar é menos comum que a cerebral, e é classificada em primária ou secundária de acordo com as doenças de base (KOHNO, 1999). A primária ocorre em qualquer porção do pulmão, bilateral ou não, envolvendo a base ou área média pulmonar, simulando infecção do tipo influenza e pode resolver-se espontaneamente (MITCHEL, 1983).

Lesões cutâneas devido a *Cryptococcus neoformans* também podem ocorrer através da exposição aguda a fontes contaminadas em zonas rurais ou em indivíduos que trabalham ao ar livre (HEITMAN et al., 2011). Christianson et al. (2003) e Neuville et al. (2003) relataram casos de criptococose cutânea primária.

Devido o aumento do número de pacientes imunocomprometidos nas últimas décadas, tem-se observado o aumento da incidência das infecções fúngicas. E com isso, pesquisas com isolados ambientais e clínicos tem contribuído para o entendimento dos mecanismos envolvidos no controle desta doença (DIAS et al., 2006; PAPPALARDO et al., 2003).

1.6.2 Nos animais

A criptococose tem sido citada numa grande variedade de animais domésticos, e uma diferença importante é que é mais frequente nos gatos do que nos cães e outras espécies de animais (CASTELÁ et al., 2008; HEITMAN et al., 2011). Os primeiros sinais de infecção nas vacas em lactação são a diminuição do fluxo de leite, tumefação e rigidez do úbere, hipertrofia ganglionar linfática e anorexia. O leite torna-se viscoso, de cor branca a acinzentada. Acredita-se que um alto percentual dos animais no rebanho possa estar infectados de modo sub clínico (MANUAL MERCK DE VETERINÁRIA, 2008). Como os animais podem repousar em decúbito ventral, favorecendo o contato do úbere com o solo que pode estar contaminado pela levedura, devemos considerar a possibilidade de entrada do agente através dos canais dos tetos.

Nos felinos, pode ocorrer exsudato nasal e ocular, cegueira, incoordenação, febre, tosse, tumefação na cavidade nasal e faríngea por invasão do *C. neoformans* ou *C. gattii*, formando massas expansivas semelhantes às neoplasias, com posterior penetração na cavidade craniana e nervos óticos. Alguns gatos apenas apresentam infecção respiratória crônica de difícil tratamento; com menor frequência, a enfermidade se limita a massas subcutâneas tipo tumoral, podendo, no entanto desenvolver sinais de participação do sistema nervoso central (MALIK et al., 1992, 2006; MANUAL MERCK DE VETERINÁRIA, 2008). Não há descrição de que haja predisposição quanto a idade, sexo ou raça, ainda que em alguns estudos é mais frequente a ocorrência em gatos machos, na faixa de dois a três anos e da raça siamesa (GERDS-GROGAN et al., 1997; MALIK et al., 1992, 2006).

Nos caninos, felinos (MALIK et al., 1992) e nos equinos (ROBERTS et al., 1981), os seios nasais aparentam ser o sítio primário de infecção. Propágulos infecciosos penetrariam através de possível abertura na integridade da mucosa respiratória.

A criptococose felina prevalece nas áreas tropicais e subtropicais, com as principais síndromes respiratória, neurológica, cutânea e ocular (WILKINSON, 1984). Segundo Scott et al. (1995) no comprometimento respiratório, evidencia-se massa poliposa de aspecto cárneo ou granulomatoso, que se exterioriza nas narinas, conhecida como “nariz de palhaço”.

Nos cães, em geral, o cérebro, meninges e seios paranasais são afetados, ocasionando incoordenação, movimentos em círculo, rotação da cabeça, mudança de hábito, hiperestesia e exsudação nasal. Granulomas subcutâneos próximo das orelhas, na face e nas patas podem ocorrer. À necropsia, observa-se inflamação mucopurulenta dos seios paranasais, cavidade nasal e pequenos centros quísticos no cérebro e meninges (MALIK et al., 2006; MANUAL MERCK DE VETERINÁRIA, 2008).

Assim como nos humanos, os animais domésticos parecem apresentar a criptococose associada a fatores predisponentes tais como diabetes, intervenções cirúrgicas, neoplasias e tratamentos com glicocorticoides. O vírus da imunodeficiência felina (FIV) e Leucemia Felina (FeLV) são fatores predisponentes da criptococose em gatos (TABOADA et al., 2005).

Chapman et al. (1990), verificou criptococose em caprinos, com sinais clínicos variados. Foram observadas, individualmente lesões nasais, traqueais, pulmonares e lesões na pele e no topo da cabeça de um quarto animal.

O coala (*Phascolarctos cinereus*), um marsupial arbóreo, tem possivelmente altos índices de criptococose em relação a outras espécies animais. Estudos de necropsia nesses animais revelam que a criptococose causa aproximadamente 3% de morte em coalas, e esta ocorrência o torna uma importante espécie para o estudo em modelo natural, para a epidemiologia e patogenia dessa doença (KROCKENBERGER et al., 2003).

1.7 Fatores relacionados à virulência

Entre os fatores de virulência já conhecidos para *Cryptococcus neoformans*, encontram-se a formação de pigmentos melanínicos, cápsula e a produção de enzimas como fosfolipases e proteases (BARONI, 2001).

1.7.1 Protease

As proteases são produzidas por bactérias, protozoários e fungos, atuando no ciclo de infecção destes microrganismos e também participando do catabolismo de proteínas. Estas enzimas agem tanto nas vias degradativas como nas biossintéticas, na liberação de hormônios peptídicos, na coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos (CALDERONE; FONZI, 2001).

Cryptococcus neoformans tem baixa atividade proteolíticas, mas as proteases, segundo Casadevall e Perfect (1998), contribuem para a virulência dos microrganismos, degradando os tecidos do hospedeiro ou destruindo proteínas imunologicamente importantes.

Amostras de *C. neoformans* var. *neoformans* isoladas de excretas de pombos da cidade do Rio de Janeiro, não foram produtoras desta enzima (BARONI, 2001). Porém, Silva et al. (2004) estudando cepas de *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A) isoladas de excretas de pombos, todas não produtoras de protease e 44% sensíveis aos fluconazol evidenciaram que após a inoculação de dessas cepas não produtoras de protease, 17% passaram a produzir protease, sendo que 25% foram sensíveis ao fluconazol.

Vidotto et al. (2005) avaliaram 151 cepas de *C. neoformans* isoladas de portadores de HIV, em São Paulo, Brasil. Todas apresentaram produção de protease, sendo a maioria fortemente produtora no 8º dia de incubação a 37 °C, com valores de Pz entre 0,399 e 0,00 (80,79%). Também observaram a importância do tempo de incubação, pois até o 4º dia a maioria das cepas avaliadas tinha valores de Pz entre 0,699 e 0,40, que diminuiriam no oitavo dia.

Em 2006, Pereira, analisando 56 cepas isoladas de excretas de aves de “Pet Shop”, verificou que 96% foram fortemente positivas para a produção desta enzima. Campos e Baroni (2010) analisando cepas de *Cryptococcus sp*, verificou que todas eram fortes ou fortemente produtoras para essa enzima.

1.7.2 Fosfolipase

As fosfolipases são compreendidas em cinco classes (A1, A2, B, C e D) dependendo do sítio de hidrólise nas ligações ester fosfolipídicas (VAND DEN BOSCH et al., 1982). São produzidas e secretadas por uma ampla variedade de microrganismos patogênicos, incluindo fungos, como parte de sua virulência (GHANNOUM et al., 2000). Das cinco classes de fosfolipase produzidas pelos microrganismos, a fosfolipase B (PLB) e fosfolipase C (PLC), tem sido implicadas na virulência de *Cryptococcus spp.* A Plb1 é produzida pelo gene PLB1 e é secretada no meio extracelular, onde hidroliza fosfolipídeos do hospedeiro (COX et al., 2001; SIAFAKAS et al., 2006).

Vidotto et al. (1998), verificaram alta prevalência na distribuição da atividade fosfolipásica em cepas de *C. neoformans* provenientes de pacientes com AIDS. Os autores sugerem a função da enzima na invasão do hospedeiro. As fosfolipases têm um papel essencial no processo da infecção fúngica, danificando a membrana celular e facilitando a adesão do fungo às células do hospedeiro. A capacidade de produção de enzimas hidrolíticas por *Cryptococcus neoformans*, tais como as fosfolipases, tem relação com os potenciais de virulência, como a capacidade de causar doenças e de vencer as barreiras naturais do hospedeiro. Estas enzimas catalizam a quebra das ligações peptídicas em proteínas e aminoácidos e *C. neoformans*, provavelmente utiliza o produto de degradação como nutriente para o crescimento da levedura (DIAS, 2006).

Em 1997, Chen et al. estudando 50 isolados de *C. neoformans* quanto à produção de fosfolipase extracelular, verificaram 49 amostras positivos. Foram identificadas uma fosfolipase B, lisofosfolipase e uma lisofosfolipase-transacilase.

Em 2001, Baroni verificou a produção de fosfolipase em 90,8% das cepas isoladas de fezes de pombos sendo que 44,8 % eram positivos e 46 % fortemente positivo. Pereira (2006), trabalhando com cepas isoladas de fezes de aves comercializadas em “Pet Shop”, descreveu que, 57,12% das amostras eram fortemente produtoras de fosfolipase.

1.7.3 Melanina

Melaninas são macromoléculas sintetizadas por polimerização oxidativa de compostos fenólicos. São hidrofóbicas e negativamente carregadas, que resultam em pigmentos marrons ou pretos.

A produção de melanina por *C. neoformans* foi primeiramente descrita por Staib; que em 1962 relatou colônias de *Cryptococcus* com coloração marrom em ágar contendo extrato de semente de *Guizotia abyssinica*. Através da ação de uma fenoloxidase, especificamente uma lacase, substratos exógenos são oxidados a correspondentes quinino e passam por um rearranjo espontâneo por meio de polimerização sequencial, seguido de auto-oxidação para formar melanocromo e finalmente melanina (HEITMAN et al., 2011).

A capacidade de *Cryptococcus spp* produzir melanina em meios contendo compostos fenólicos é amplamente utilizada na identificação destas espécies em laboratório (LIU; NIZET, 2009).

Jacobson e Tinnell (1993), demonstraram que a melanina é antioxidante, por conter resíduos semelhantes à quinona e à hidroquinona, que consomem superóxidos e outros oxidantes. Por outro lado, para que *C. neoformans* possa produzir compostos melanínicos, necessita produzir a enzima fenoloxidase e adquirir o substrato no local de crescimento. Assim, o cérebro, que é rico em catecolaminas, assim como dopa, norepinefrina e epinefrina, seria alvo favorito para a infecção por este agente .

Para Wang e Casadevall (1994), a melanina localizada na parede celular, onde pode absorver luz ultravioleta, possivelmente, previne danos celulares, pela proteção contra fótons de alta energia.

O crescimento de *C. neoformans* na presença de L-dopa tornaria-o menos suscetível aos efeitos da luz ultravioleta. Após a incubação no L-dopa, as colônias de *Cryptococcus neoformans* se mostram com coloração marrom brilhante a enegrecido (PEREIRA et al., 2009).

Nosanchuk et al. (1999), verificaram que células de *C. neoformans* do ambiente são melanizadas, implicando que a infecção inicial no homem pode envolver exposição à células melanizadas. Cepas que possuem produção deficiente de melanina são pouco invasivas e não sobrevivem bem em órgãos tais como baço, fígado e cérebro (LIU; NIZET, 2009).

A melanina também interfere na ação e eficácia de peptídeos antimicrobianos endógenos e agentes antifúngicos contra *C. neoformans*. O pigmento neutraliza a atividade dos neutrófilos defensivos e outros peptídeos microbianos catiônicos e limita avidamente a anfotericina B e a caspofungina que são duas drogas antifúngicas amplamente usadas no tratamento de infecção fúngica severa (DUIN et al., 2002).

Estudos sugerem que a melanina contribui para a virulência, reduzindo a susceptibilidade de células fúngicas aos mecanismos de defesa do hospeiro e interrompendo

respostas imunes normais (KWON-CHUNG et al., 1982; SALAS et al., 1996). Embora a melanina seja imunogênica, capaz de induzir a uma forte resposta de anticorpos as células T independentes em ratos (NOSANCHUK et al., 1999) e provocar resposta anti-inflamatória (AVRAMIDIS et al., 1998; MOHAGHEGHPOUR et al., 2000), ela pode influenciar as atividades normais do sistema imunológico (NOSANCHUK et al., 1999; ROSAS et al., 2001). A melanina altera os níveis de citocinas inflamatórias durante infecção animal experimental (MEDNICK et al., 2005; MOHAGHEGHPOUR et al., 2000) e a melanização está associada com a diminuição das taxas de fagocitose e com a morte por macrófagos (WANG et al., 1994).

1.7.4 Cápsula

A adaptação de microrganismos em seus ambientes naturais é frequentemente associada a aquisição de certos atributos, que os ajudam a sobreviver em nichos ecológicos específicos. Tais adaptações incluem vias de transdução de sinais que otimizam o metabolismo para responder ao ambiente nutricional, condições de estresse e interação com outros sistemas biológicos, tal como outros microrganismos, predadores ambientais e hospedeiros simbióticos. Além disso, é comum encontrarmos mudanças morfológicas e desenvolvimento de estruturas especializadas que fornece benefício de sobrevivência durante o seu ciclo de vida. Dentre essas estruturas, estão as cápsulas que envolvem a célula, sendo constituídas principalmente por polissacarídeos. Cápsulas são em geral de extrema importância para a sobrevivência de alguns microrganismos, fornecendo resistência a condições de estresse tal como desidratação e tendo papel chave na interação com o ambiente (ZARAGOZA et al., 2009).

Nas últimas décadas a cápsula do complexo *Cryptococcus neoformans* vem sendo extensivamente estudada pela comunidade científica. Os principais aspectos inclui a estrutura, as propriedades antigênicas e sua função como um fator de virulência. A cápsula é composta primariamente por dois polissacarídeos, o glicoronoxilomanana (GXM) e o galactoxilomanana (GalXM), e uma pequena proporção de uma mananoproteínas (MP), sendo o GXM mais amplamente estudado e corresponde a 90% da massa polissacarídica (DE JESUS et al., 2010; ZARAGOZA et al., 2009) e responsável pela diferenciação antigênica dos sorotipos (STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003).

A cápsula pode ser visualizada por uma variedade de técnicas, incluindo coloração com tinta Nankin, reações capsulares resultando da ligação dos anticorpos aos

polissacarídeos, imunofluorescência, e microscopia eletrônica (CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Bulmer et al. (1967), verificaram que mutantes acapsulados e avirulentos, porém originários de cepa capsulada, reverteram para o estado capsulado apresentando variados graus de virulência. Chang e Kwon-Chung (1994), citaram que cepas mutantes acapsulares são menos virulentas.

O tamanho da cápsula é bastante variável, não somente entre as cepas, mas também entre células individuais de uma mesma cepa, a tal ponto que uma mesma cepa pode apresentar grandes diferenças no tamanho, dependendo das condições ambientais específicas (ZARAGOZA et al., 2009).

Durante a cultura *in vitro*, o tamanho da cápsula é pequeno e o alargamento capsular pode ser induzido por vários fatores, incluindo altas concentrações de CO₂ e baixas concentrações de ferro. Com base nestas observações, o aumento da cápsula na infecção do hospedeiro mamífero pode ser relacionado às altas concentrações de CO₂ nos pulmões e à baixa concentração de ferro nos tecidos. O aumento capsular é visível dentro de algumas horas após a infecção, e a virulência pode ser realçada através de propriedades capsulares. Após vários dias de infecção o aumento da cápsula é acompanhado por um aumento no volume celular, tendo como resultado formas gigantes de leveduras (DAMBRÓS, 2005).

Meios que possuem baixa concentração de nutrientes, tal como Sabouraud com pH neutro, induz a um significativo aumento no tamanho da cápsula, corroborando com a hipótese de que o crescimento capsular é inversamente proporcional ao crescimento celular (ZARAGOZA et al., 2009).

Embora a cápsula polissacarídica seja considerada entre os fatores de virulência de *C. neoformans*, apresentando inclusive atividade antifagocítica (HAMILTON; GOODLEY, 1996), no seu isolamento, a partir do ambiente, a maioria destas leveduras apresentam uma cápsula pequena ou mesmo aparentemente inexistente. Tal achado foi também observado nos isolamentos de Baroni (2001) em torres de igreja da cidade do Rio de Janeiro.

1.8 Diferenciação molecular

As espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* são divididos em oito tipos moleculares por reação de cadeia por “polymerase chain (PRC) fingerprint”, “amplification fragment length polymorphism” (AFLP), “restriction fragment length polymorphism” (RFLP) e mais recentemente, “multilocus sequencing typing analyses”. Os tipos moleculares de *Cryptococcus neoformans* são VNI, VNII, VNIII E VNIV; já os tipos moleculares de *Cryptococcus gattii* são VGI, VGII, VGIII E VGIV. Resultados indicam que os genótipos VNI e VNII correspondem ao sorotipo A, VNIII ao sorotipo AD, e VNIV ao sorotipo D. No entanto, VGI, VGII, VGIII E VGIV contém isolados de ambos os sorotipos (B e C) (BARRETO DE OLIVEIRA et al., 2004; BOEKHOUT et al., 2001; MEYER et al., 2003; SANTOS et al., 2008.; SILVA et al., 2012).

O genótipo VNI tem distribuição mundial e é associado principalmente a pacientes com AIDS. Já o genótipo VGI é o mais associado em infecção de hospedeiros imunocompetentes em países asiáticos (FENG et al., 2008; TAY et al., 2006). O genótipo VGII ocorre na Oceania e em países do norte e sul da América (ELLIS et al., 2000; ESCÁNDON et al., 2006; KIDD et al., 2004; MATSUMOTTO et al., 2007; SIONOV et al., 2010). O genótipo VNIII que era relatado em países do sul da Europa, incluindo Itália e França agora também tem sido relatado em países da América do Sul tal como Brasil, Colômbia e Chile (MEYER et al., 2003; TRILLES et al., 2003; VIVIANI et al., 2001).

A maioria dos isolados clínicos e ambientais das regiões sul, sudeste e centroeste do Brasil são VNI, enquanto nas regiões norte e nordeste do Brasil predomina o genótipo VGII, causando doença principalmente em adultos jovens e crianças (MEYER et al., 2003; SANTOS et al., 2008).

1.9 Sensibilidade aos antifúngicos

Os estudos de sensibilidade aos antifúngicos têm despertado grande interesse na comunidade científica devido, principalmente, a fatores como aumento da frequência de infecções fúngicas e síntese de novas drogas. O aumento da incidência de infecções fúngicas está associado a fatores de predisposição, especialmente em portadores de imunodeficiências adquirida ou induzida que incluem: enfermidades malignas, diabetes mellitus, doenças pulmonares dependentes de esteróis e tratamentos quimioterápicos ou imunossupressivos em transplantados (BANERJEE; SHANNON, 2001).

Adicionalmente, aos estudos de caracterização genotípica e bioquímica de *C. neoformans*, várias análises de sensibilidade a agentes antifúngicos têm sido realizadas. Dias et al. (2006) fez uma análise comparativa entre dois testes de sensibilidade (E-test e Eucast) em isolados de *Cryptococcus neoformans* no Brasil.

O grande aumento da casuística de infecções sistêmicas e oportunistas relacionadas a leveduras é devido, em sua maioria, ao uso indiscriminado de agentes antimicrobianos de amplo espectro em pacientes imunocomprometidos, principalmente em pacientes com AIDS (DIAS et al., 2003; GHANNOUM, 1996; SILVA et al., 2011; WEY et al., 1989).

O uso profilático e terapêutico de agentes tais como anfotericina B e azóis, estes últimos menos tóxicos, administrados por períodos prolongados, têm dado origem a casos alarmantes de resistência aos antifúngicos (DIAS, 2006; DIAZ-GUERRA et al., 1998; LOZANO-CHIU et al., 1998).

A anfotericina B foi a primeira droga antifúngica efetiva no tratamento da criptococose meningeana, proporcionando cura em mais de 50% dos pacientes tratados (LACAZ, 2002). Silva et al. (2011) avaliou a eficácia terapêutica das drogas anfotericina B e voriconazol isoladas ou em combinação em camundongos Balb/C SCID imunodeprimidos. Os autores verificaram que a anfotericina B mostrou-se eficaz no aumento da sobrevida dos animais, mas não foi capaz de erradicar as leveduras que foram isoladas dos órgãos alvo (pulmão e cérebro) após o sacrifício, com um número considerável de CFU de *C. neoformans*. O voriconazol não foi efetivo quando administrado isoladamente, mas em combinação com a anfotericina B, aumentou a sobrevida dos animais e após o sacrifício a colonização nos órgãos alvo foi consideravelmente mais baixa.

Os principais testes usados para determinação de CIM (Concentração inibitória mínima), são: 1 – diluição em meio líquido por técnicas de macrodiluição e microdiluição; 2 – diluição em ágar; 3 – difusão em ágar a partir de discos e fitas. A validação e aceitação destes testes foram feitos após diversos estudos que verificaram os principais fatores intervenientes e buscaram soluções para a resolução dos problemas encontrados (HEITMAN et al., 2011).

O método preconizado pelo Clínical and Laboratory Standards Institute (CLSI) é considerado o método de referência para avaliar a susceptibilidade de leveduras a agentes antifúngicos (M27-S3, 2008).

1.9.1 Difusão em ágar: E-test

O “E-test” (AB BIODISK Solna, Estocolomo, Suécia) é um teste de sensibilidade que tem sido amplamente empregado, e segundo Bolmstrom et al., 1993 este teste, na avaliação da sensibilidade de leveduras a azóis, apresenta resultados de CIMs menos dependentes tanto do tamanho do inóculo, quanto do tempo de pré-incubação. Este teste já foi aprovado pelo FDA (MOTTA, 2010).

O método clássico de difusão em ágar usado em bacteriologia, consiste na utilização de discos com concentrações conhecidas dos antimicrobianos (BAUER et al., 1966). Nestas condições são observados os halos de inibição de crescimento e mensurados os diâmetros dos mesmos. De acordo com o tamanho das zonas de inibição, os microrganismos são classificados, qualitativamente, em sensíveis, intermediários ou resistentes à determinada droga.

O E-test é um método de difusão em ágar disponível comercialmente e que oferece a vantagem de produzir resultados quantitativos em valores de CIM (DIAS, 2006).

A metodologia consiste no uso de uma fita plástica, inerte, e não porosa de, aproximadamente, 5 mm de diâmetro, graduada com valores expressos em µg/mL. Este gradiente definido e contínuo contém os antifúngicos, e quando esta fita é colocada sobre o meio de cultura inoculado (90 mm de diâmetro) passa a difundir a droga. Os microrganismos sensíveis à mesma deixam de se desenvolver na área em que ela se difundiu em grau correspondente à sensibilidade apresentada a uma determinada concentração. A leitura é feita na intersecção da elipse de inibição formada. No caso da anfotericina B, a CIM é determinada no ponto de inibição completa (100%). Para a 5-fluorocitosina e os azóis, a leitura é feita no primeiro ponto de inibição significativa, ou seja, no ponto onde ocorre diminuição característica na intensidade de crescimento (80% de inibição) (ESPINEL-INGROFF et al., 1992).

2 OBJETIVOS

Seguindo a linha de pesquisa Leveduras Patogênicas: características fenotípicas e genotípicas, esta pesquisa engloba um dos fungos mais intrigantes e importantes na micologia médica, com relação a sua ecologia, epidemiologia, quadros clínicos e fatores relacionados a virulência. Apesar de estudado na área médica esta levedura merece maior atenção e um maior número de pesquisas, especialmente nos isolados ambientais.

2.1 Objetivos específicos

1 - Re-identificar as amostras de leveduras classificadas como *Cryptococcus neoformans* mantidas na micoteca do Laboratório de leveduras patogênicas do Departamento de Microbiologia do ICB da USP.

2 - Separar o complexo patogênico *Cryptococcus* (*C. neoformans* e *C. gattii*) pela semeadura em meio específico e diferencial (meio CGB).

3 - Confirmar os achados de *C. gattii* por meio da técnica molecular PCR-RFLP.

4 - Investigar os fatores relacionados a virulência (*in vitro*) como proteinase, fosfolipase, produção de melanina e espessura capsular.

5 - Determinar a sensibilidade aos antifúngicos tradicionais e aos novos antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol e posaconazol pelo Método do “Etest[®]”.

6 - Comparar os achados laboratoriais com a origem das cepas (clínicas e ambientais).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras estudadas

Foram estudadas 84 amostras armazenadas como *C. neoformans*, sendo 40 amostras clínicas (isolados de líquido de pacientes humanos com quadro de meningite e uma amostra de felino com criptococose cutânea) e 44 amostras ambientais (isoladas de fezes de aves e folhas de eucaliptos). Estas amostras estão mantidas na micoteca (ágar Sabouraud dextrose e óleo mineral) do laboratório de Leveduras Patogênicas do Departamento de Microbiologia do ICB – USP (LACAZ, 2002). Em todos os testes foram utilizadas amostras padrões (ICB 110 – sorotipo A, ICB134 – sorotipo AD, ICB 162 – sorotipo C e ICB 12A *Candida albicans*).

3.2 Re-identificação de gênero e espécie

A re-identificação foi baseada em Kurtzman e Fell (1998), Kurtzman, Fell e Boekhout (2011).

As cepas foram submetidas à prova de produção de melanina em meio dopamina (APÊNDICE A). A prova foi realizada em tubos de ensaio contendo o meio inclinado e a leitura realizada a partir de 48 horas, estendendo-se até o limite de 15 dias.

Paralelamente, foi realizada a prova de produção de uréase em meio de Christensen (Difco). As cepas produtoras de melanina e urease, foram submetidas a testes bioquímicos para se determinar o perfil de assimilação de açúcares e de fontes nitrogenadas (auxanograma), além de verificarmos a capacidade ou não de fermentação de glicose (zimograma) e assimilação de inositol.

3.3 Biotipagem das cepas

A biotipagem também foi baseada em Kurtzman e Fell (1998), Kurtzman, Fell e Boekhout (2011).

As cepas identificadas como *C. neoformans* foram submetidas à tipagem bioquímica em meio C.G.B (APÊNDICE B), para a identificação das espécies (*C. neoformans* e *C. gattii*). O C.G.B (canavanina, glicina, azul de bromotimol) possui características bioquímicas que difere uma espécie da outra através da coloração do meio. *C. neoformans* é

sensível à L-canavanina e é incapaz de assimilar a glicina como única fonte de carbono e nitrogênio (meio de cultivo com coloração amarela). *C. gattii* consegue crescer no meio C.G.B, e como produz amônia que altera o pH, através da utilização da glicina, faz com que a substância azul de bromotimol, indicadora de pH, torne o meio com coloração azul cobalto.

Para determinação das espécies isoladas, o meio C.G.B foi preparado e distribuído em placas de Petri (20 ml). As cepas foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, EUA), mantidas por 48 horas e depois submetidas ao teste. A semeadura foi em ponto único, colocado no centro das placas de Petri. Os testes foram realizados em duplicata, em capela de fluxo laminar. A incubação foi em estufa de 32 °C. As leituras foram feitas até o máximo de sete dias, observando ou não a ocorrência de crescimento da cepa no meio e alteração ou não da cor para azul. Cepas padrões das espécies *C.neoformans* e *C.gattii* foram empregadas como controles (ICB 110 – sorotipo A, ICB134 – sorotipo AD, ICB 162 – sorotipo C).

3.4 Tipagem Molecular das cepas classificadas como *C. gattii* em meio C.G.B

3.4.1 Lise e extração do DNA

As cepas que na biotipagem foram C.G.B positivo passaram por um processo de fragilização da parede celular. Em seguida houve a etapa de lise celular e extração de DNA que teve como objetivo liberar todo o material intracelular. Após esse procedimento o DNA foi quantificado em espectrofotômetro NANO DROP 1000 para que a reação fosse iniciada (MARTINS et al., 2007).

3.4.2 Reação PCR-RFLP

3.4.2.1 PCR

Para a reação de PCR foi utilizado GoTaq[®] Green Master Mix (Promega). O Volume total de cada reação foi = 25 µL

O Primer utilizado foi: URA5: 5'- ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG-3'

SJ01: 5'- TTAAGACCTCTCTGAACACCGTACTC-3'

Em cada microtubo utilizou-se: 12,5 µL de solução pronta para uso Green Master Mix, 1 µL de DNA, 0,7 µL de primer URA5, 0,7 µL de primer SJ0. E completou com H₂O ultra pura (água Milli Q autoclavada) até completar volume de 25 µL.

3.4.2.2 PCR-RFLP

Utilizou-se microtubos de 0,5 µL. O volume de cada reação foi 20 µL.

Colocou-se no microtubo: - 2 µL de tampão tango, - 1 µL de enzima de restrição *Cfr* 13I (isômero *Sau* 96I), 1 µL de enzima de restrição *Hha*I, - 5 µL de produto de PCR, - 1 µL de H₂O ultra pura (água Milli Q autoclavada).

Os microtubos foram colocados em banho maria 37 °C por 3 h e após esse período precedeu-se a corrida eletroforética e documentação em gel.

Os perfis foram assinalados visualmente por comparação com os perfis obtidos com as cepas referência : VNI-VNIV e VGI-VGIV (MEYER et al., 2003)

Obs: Cepas referência representativas de cada tipo molecular (genótipo).

Cryptococcus neoformans - WM 148 – sorotipo A, VNI; WM 626 – sorotipo A VNII; WM 628 – sorotipo AD, VNIII; WM 629 – sorotipo D VNIV.

Cryptococcus gattii - WM 179 – sorotipo B, VGI; WM 178 – sorotipo B, VGII; WM 161 – sorotipo B VGIII; WM 779 – sorotipo C, VGIV.

3.5 Fatores relacionados à virulência

Testes *in vitro*

3.5.1 Produção de protease

Para a pesquisa de produção de protease (RUCHEL et al., 1982) foi empregado um meio de cultura composto de uma parte básica autoclavada, e de uma porção contendo albumina bovina fração V (Sigma, EUA) esterilizada por filtração e em seguida resfriada a 55 °C e distribuído em placas de Petri (APÊNDICE C).

Cada placa de Petri contendo o meio para o teste de produção de protease, recebeu apenas uma cepa. A semeadura foi feita na parte central da superfície do meio. As cepas foram incubadas em estufa de 32 °C por até 15 dias com leitura a partir do 1° até o 15°

dia, em dias intercalados. A produção de protease pela cepa é verificada pela presença de uma zona clara ao redor do ponto de crescimento da colônia.

A atividade proteolítica, denominada (Pz) é expressa através do cálculo da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro formado pela colônia e a zona de degradação (dcp). Uma régua graduada em centímetros com subdivisão em milímetros foi usada para medição dos diâmetros das colônias e das zonas de degradação. A cepa *Candida albicans* (ICB - 12A) também foi utilizada como controle positivo, além dos controles de *Cryptococcus* (ICB 110 – sorotipo A, ICB134 – sorotipo AD, ICB 162 – sorotipo C).

Tabela 1 – Atividade enzimática conforme o Pz e o código.

Pz	Atividade enzimática	Código
= 1	Negativa	1
$\geq 0,64 < 1$	Positiva	2
$< 0,64$	Fortemente positiva	3

FONTE: Ruchel et al. (1982).

3.5.2 Produção de Fosfolipase

Para os testes de produção de fosfolipase (PRICE et al., 1982), foi utilizado o meio ágar fosfolipase (APÊNDICE D) que apresenta em sua composição, gema de ovo. Em meio ao protocolo de experimentação, o meio preparado foi vertido em placas de Petri.

As cepas de *Cryptococcus* (ICB 110 – sorotipo A, ICB134 – sorotipo AD, ICB 162 – sorotipo C) e um controle positivo (*Candida albicans* – ICB 12-A) foram repicadas com antecedência de 48 horas para a realização dos testes, em meio de ágar Sabouraud dextrose (Difco, EUA). Foi utilizado no momento dos testes, uma placa para cada cepa, efetuando-se a semeadura em ponto único, centrado sobre a superfície do meio de cultivo. Os testes foram realizados em triplicata e a incubação foi em estufa de 32 °C, por um período de até 15 dias. As leituras foram realizadas a partir do 1° até o 15° dia.

As cepas produtoras de fosfolipase, ao promoverem sua difusão da enzima no meio, propiciam a formação de uma área de precipitação de cloreto de cálcio, opaca, bastante

visível, em torno da colônia. O valor da atividade fosfolipásica, denominado Pz, foi obtido pelo cálculo da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro formado pela colônia e a zona de precipitação (dcp). As avaliações dos diâmetros dos halos, foram obtidas através de medições efetuadas com régua transparente, graduada em centímetros e com subdivisões em milímetros.

3.5.3 Produção de Melanina - pesquisa da fenoloxidase

Para que os resultados fossem confiáveis, todas as cepas foram testadas em tempo comum. Após o cultivo prévio de 48 horas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco), de partida única, todas as cepas foram diluídas em solução salina estéril, padronizando-se as suspensões de acordo com o nº1 da escala de McFarland.

Cada suspensão de cepa (100µL) foi semeada em pontos fixos, aguardando-se alguns minutos para a absorção do líquido pela superfície do meio, quando então, as placas foram invertidas e incubadas a 32 °C por até 15 dias (BARONI, 2001). Quando o teste é positivo a cor da colônia deve ser amarronzada a enegrecida, sendo avaliada visualmente, podendo-se observar que a medida que os dias vão passando a intensidade vai ficando com intensidade mais forte.

3.5.4 Estimativa da espessura capsular

Todas as cepas foram repicadas em meio ágar Sabouraud dextrose (Difco) desprovido de antibiótico e mantidas por três semanas a 25 °C. De cada cepa, foi preparada uma lâmina com “tinta da China”, procedendo-se a observação em microscópico ótico comum. A avaliação foi realizada através de fotografia de um campo óptico com ocular milimétrica que após fotografia do campo foram escolhidas uma média de cinco células por área e depois foram medidas com régua graduada em milímetros o diâmetro da célula + cápsula. Após esta estimativa, dividimos o diâmetro da célula pelo diâmetro total da célula + cápsula e obtivemos números que variaram de 0.18 a 0,95 (BARONI, 2001; CARDOSO, 2012).

Todas as cepas com cápsulas aparentes, foram aplicado códigos constituídos de números para cada valor bruto da razão célula/cápsula (CARDOSO, 2012). O código 1 foi denominado para as cepas com cápsula de tamanho grande com razão ≤ 0.40 , o código 2

para as cepas com cápsula média com razão $\geq 0,41 < 0,70$ e o código 3 para as cepas com cápsula pequena com razão $\geq 0,71 < 0,95$.

Tabela 2 – Tabela adotada para verificar a razão da espessura capsular em relação a célula.

Pz	Espessura capsular	Código
≤ 0.40	Grande	1
$\geq 0.41 < 0.70$	Média	2
$\geq 0.71 < 0.95$	Pequena	3

FONTE: Cardoso (2012).

3.6 Teste de sensibilidade a antifúngicos - Método E-test

3.6.1 Processamento do teste

O “E-test” (AB BIODISK, SOLNA- SUÉCIA), é um teste comercial de sensibilidade a antifúngicos e é constituído de uma fita plástica não porosa, delgada, de 5mm de largura e 60 mm de comprimento. Um dos lados desta fita é calibrada com valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM), expressos em $\mu\text{g/ml}$ e um código de duas letras que designa o antifúngico. O outro lado da fita apresenta um gradiente da droga, predefinido e exponencial, seco e estabilizado, com a concentração máxima verificada na parte superior da fita onde existe uma barra negra transversal.

Quando aplicadas na superfície do meio de cultivo, ocorre liberação do agente antifúngico, a partir da superfície plástica para o ágar e um gradiente contínuo e estável das várias concentrações da droga é criado diretamente por debaixo da fita. Cada fita contém concentração correspondente a 0.016 a 256 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol e 0,002 a 32 $\mu\text{g/mL}$ para cetozonazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e anfotericina B. Após a incubação, quando o crescimento das células da leveduras se torna visível, uma elipse de inibição simétrica centrada ao longo da fita torna-se detectável. A área da elipse que intercepta a fita é o valor da concentração inibitória mínima do antifúngico.

Suspensões salinas com turbidez padronizada de acordo com o grau 0,5 da escala de McFarland, foram preparadas a partir de cultivos de 48 horas de cada cepa. “Swabs” estéreis foram impregnados nestas suspensões e passadas na superfície de placas de Petri

contendo ágar RPMI 1640 (Probac) + 2% de glicose (J T Baker) + MOPS conforme recomendado pelo fabricante. Para garantir uma perfeita distribuição nas superfícies dos meios, os “swabs” foram passados em quatro sentidos diferentes;

Quinze minutos após o plaqueamento do inóculo, as fitas foram aplicadas na superfície do meio, usando pinças esterilizadas, cuidando-se para sua perfeita aderência, não permitindo formação de bolhas. Estas fitas contendo os antifúngicos foram aplicadas cuidadosamente sobre a superfície do ágar e incubadas a 35 °C e a leitura foi feita durante 24-48 horas.

Para a leitura, indicamos como concentração inibitória mínima o valor encontrado na interceptação da fita pela elipse, conforme pode ser verificado na figura 01 abaixo. Diferentes padrões de crescimento e inibição, no entanto, foram interpretados de acordo com instruções do fabricante.

Figura 1 - Exemplo da determinação da concentração inibitória mínima pelo método “Etest®”

FONTE: Espinel-Ingroff et al. (1992)

3.6.2 Interpretação dos resultados

O critério de sensibilidade/resistência aos antifúngicos foi o recomendado pelo CLSI (suplemento M27-S3, 2008) que preconiza os valores de concentrações de antifúngicos para avaliar a sensibilidade ou resistência aos fármacos pela técnica de microdiluição.

Tabela 3 –Interpretação do comportamento de cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. segundo normas do CLSI (M27S3 – 2008), frente a concentração do antifúngico.

Agente antifúngico	Sensível	Sensível Dose Dependente	Resistente	Referência
Anfotericina B	≤ 1	-	≥ 2	CLSI (2008)
Cetoconazol	-	-	-	CLSI (2008)
Itraconazol	≤ 0.12	0.25 a 0.5	≥ 1	CLSI (2008)
Fluconazol	≤ 8	16 a 32	≥ 64	CLSI (2008)
Voriconazol	≤ 1	2	≥ 4	CLSI (2008)
Posoconazol	≤ 1	2	≥ 4	CLSI (2008)

FONTE: CLSI (2008).

3.6.3 Drogas utilizadas

Foram testadas pelo Método E-test as seguintes drogas: anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol e posoconazol.

4 RESULTADOS

4.1 Re-identificação das cepas

As cepas de origem clínica e ambiental foram re-identificadas e condiziam com a morfologia colonial, celular e características fisiológicas do complexo patogênico *Cryptococcus*, proposto por Kurtzman e Fell (1998) e Kurtzman, Fell e Boekhout (2011).

4.2 Tipagem bioquímica

As cepas de origem clínica e ambiental re-identificadas como o complexo patogênico *Cryptococcus* foram submetidas à tipagem bioquímica em meio C.G.B (canavanina, glicina e azul de bromotimol), para diferenciação entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*. E conforme descrito no quadro 1, observou-se que das 40 cepas de origem clínica, 36 (90%) foram identificadas como *Cryptococcus neoformans* e 4 (10%) como *Cryptococcus gattii*; das 44 cepas de origem ambiental, 42 (95,5%) foram identificadas como *Cryptococcus neoformans* e 2 cepas (4,5%) como *Cryptococcus gattii*. Salienta-se que duas cepas clínicas (81 e 164) deram uma leitura duvidosa no meio C.G.B.

As figura 2 abaixo representa a coloração do meio C.G.B (coloração azul cobalto) quando as cepas inoculadas são *C. gattii* e a figura 3 representa a coloração do meio C.G.B (coloração amarelada) quando as cepas inoculadas são *C. neoformans*.

Quadro 1 – Tipagem de *C. neoformans* e *C. gattii* através do meio C.GB.

Espécie	Origem	
	Ambientais	Clínicas
<i>C. neoformans</i>	42	36
<i>C. gattii</i>	2	4
Total	44	40

FONTE: Cardoso (2012).

Figura 2 - Foto representando meio C.G.B positivo.

FONTE: Cardoso (2012).

Figura 3 - Foto representando meio C.G.B negativo

FONTE: Cardoso (2012).

4.3 Tipagem molecular das cepas que foram C.G.B positivo pela técnica PCR- RFLP

As cepas que na tipagem bioquímicas foram positivas no meio C.G.B foram submetidas a tipagem molecular através da técnica RFLP. Dessas seis cepas, quatro foram genotipadas como VGII (conforme demonstrando na figura 5) , uma como VNI (cepas 164) e uma como VNIII (cepas 81) – (conforme demonstrado na figura 4).

As cepas 81 e 164 que tiveram uma leitura duvidosa no meio C.G.B foram na verdade classificadas geneticamente como *C. neoformans* VNI e VNIII como citado no parágrafo anterior.

Figura 4 - Gel de agarose 2% dos produtos de PCR-RFLP das cepas de *Cryptococcus neoformans*.

FONTE: Cardoso (2012).

Figura 5 - Gel de agarose 2% dos produtos de PCR-RFLP das cepas de *Cryptococcus gattii*.

FONTE: Cardoso (2012).

4.4 Fatores relacionados à virulência

4.4.1 Pesquisa de exoenzimas

4.4.1.1 Produção de protease

Com relação à produção de protease pelas cepas de origem clínica 9 das 40 (23%) apresentaram índice 3 (fortemente positiva), 19 (47%) apresentaram índice 2 (positiva) e 12 (30%) apresentaram índice 1 (negativa), conforme pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Análise da Produção de protease pelas cepas de origem clínica do complexo patogênico *Cryptococcus*

FONTE: Cardoso (2012).

Com relação à produção de protease pelas cepas de origem ambiental 20 das 44 (45%) apresentaram índice 3 (fortemente positiva), 13 (30%) apresentaram índice 2 (positiva) e 11 (25%) apresentaram índice 1 (negativa), conforme pode ser observado na figura 7.

Figura 7- Análise da Produção de protease pelas cepas de origem ambiental do complexo patogênico *Cryptococcus*

FONTE: Cardoso (2012).

Figura 8 - Foto representando zona de degradação em decorrência da protease

FONTE: Cardoso (2012).

4.4.1.2 Produção de fosfolipase

Com relação à produção de fosfolipase pelas cepas de origem clínica 37 das 40 (92%) apresentaram índice 3 (fortemente positiva), 1(3%) apresentou índice 2 (positiva) e 2 amostras (5%) apresentaram índice 1 (negativa), conforme pode ser observado na figura 9.

Figura 9 - Análise da Produção de fosfolipase pelas cepas de origem clínica do complexo patogênico *Cryptococcus*

FONTE: Cardoso (2012).

Com relação à produção de fosfolipase pelas cepas de origem ambiental 24 das 44 (55%) apresentaram índice 3 (fortemente positiva) e 20 (45%) apresentaram índice 2, conforme pode ser observado na figura 10.

Figura 10 - Análise da Produção de fosfolipase pelas cepas de origem ambiental do complexo patogênico *Cryptococcus*

FONTE: Cardoso (2012).

Figura 11- Foto representando a zona de precipitação em decorrência da Fosfolipase

FONTE: Cardoso (2012).

4.4.2 Expressão de cor da colônia em meio Dopamina (pesquisa da fenoloxidase)

Quanto a intensidade da cor da colônia (melanização), 100% das cepas tanto clínicas quanto ambientais apresentaram coloração amarronzada a enegrecida a partir do sexto a sétimo dia após a inoculação. Seis cepas ambientais no entanto demoraram um pouco mais

do que as outras para expressarem intensidade de cor, e começaram a expressar a partir do 12º dia, porém no final do 15º já apresentaram coloração amarronzada.

Foram elas: **PAA5, P8A5, P3B5, P3C11, P20D11 e P3A20**

Figura 12 - Produção de melanina pela cepa ambiental P3C11 no 12º dia após inoculação.

FONTE: Cardoso (2012).

Figura 13 - Produção de melanina pela cepa ambiental P3C11 no 15º dia após inoculação.

FONTE: Cardoso (2012).

Figura 14 - Produção de melanina pela cepa clínica L118/03P no 15º dia após inoculação.

FONTE: Cardoso (2012).

4.4.3 Avaliação da espessura capsular

Todas as cepas tanto as de origem clínica quanto as de origem ambiental apresentaram cápsula. Das 40 cepas de origem clínica doze (30%) apresentaram código 1 (cápsula grande), vinte e sete (67%) apresentaram código 2 (cápsula média) e uma (3%) cepa apresentou código 3 (cápsula pequena). Entre as cepas de origem ambiental treze (30%) apresentaram código 1, trinta e uma (70%) apresentaram código 2 e nenhuma cepa teve código 3. As figuras 15, 16 e 17 abaixo representam os códigos 1, 2 e 3 conforme descrito no Material e Métodos, os quadros 2 e 3 abaixo os valores absolutos da relação célula/cápsula.

Figura 15 - Cápsula classificada com código 1 da cepa P10B10– cápsula grande.

FONTE: Cardoso (2012).

Figura 16 - Cápsula classificada com código 2 da cepa P20B2 – cápsula média.

FONTE: Cardoso (2012).

Figura 17 - Cápsula classificada com código 3 da cepa 107 – cápsula pequena.

FONTE: Cardoso (2012).

4.5 Testes de Sensibilidade a Antifúngicos (“E-test”)

Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM), para todas as cepas em relação às seis drogas antifúngicas estudadas encontram-se expressos nos quadros 4 e 5 abaixo.

4.5.1 Antifúngicos

4.5.1.1 Anfotericina B

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para anfotericina B, variaram, entre as cepas de origem clínica, num intervalo de 0.012 a 0.125 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de 0,0490 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para anfotericina B, variaram, entre as cepas de origem ambiental, num intervalo de 0.002 a 0.19 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de 0,0348 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 18 - Foto da cepa ambiental P3A3 frente ao antifúngico anfotericina B.

FONTE: Cardoso (2012).

4.5.1.2 Cetoconazol

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para cetoconazol, variaram, entre as cepas de origem clínica, num intervalo de 0.002 a 0.064 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de 0,0160 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para cetoconazol, variaram, entre as cepas de origem ambiental, num intervalo de 0.002 a 0.032 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de 0,0120 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 19 - Foto da cepa clínica L195/06 frente ao antifúngico cetoconazol

FONTE: Cardoso (2012).

4.5.1.3 Itraconazol

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para itraconazol, variaram, entre as cepas de origem clínica, num intervalo de 0.008 a 0.25 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de 0,0661 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para itraconazol, variaram, entre as cepas de origem ambiental, num intervalo de 0.008 a 0.50 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de 0,0388 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 20 - Foto da cepa clínica L137/06 frente ao antifúngico itraconazol.

FONTE: Cardoso (2012).

4.5.1.4 Fluconazol

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para fluconazol, variaram, entre as cepas de origem clínica, num intervalo de 0.094 a 4 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de 0,8091 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para fluconazol, variaram, entre as cepas de origem ambiental, num intervalo de 0.032 a 8 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de 0,6200 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 21 - Foto da cepa clínica 170 frente ao antifúngico Fluconazol.

FONTE: Cardoso (2012).

4.5.1.5 Voriconazol

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para voriconazol, variaram, entre as cepas de origem clínica, num intervalo de 0.002 a 0.032 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de 0,0065 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para voriconazol, variaram, entre as cepas de origem ambiental, num intervalo de 0.002 a 0.064 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de 0,0057 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 22 - Foto da cepa clínica 174 frente ao antifúngico voriconazol.

FONTE: Cardoso (2012).

4.5.1.6 *Posoconazol*

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para posoconazol, variaram, entre as cepas de origem clínica, num intervalo de 0.002 a 0.094 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de 0,0214 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para posoconazol, variaram, entre as cepas de origem ambiental, num intervalo de 0.002 a 0.064 $\mu\text{g/mL}$, apresentando média de 0,0178 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 23 - Foto da cepa ambiental P9A5 frente ao antifúngico posoconazol.

FONTE: Cardoso (2012).

Quadro 2 – Fatores relacionados a virulência das cepas de origem clínica

Cepa	Espécie	Origem	Protease Código Pz* e	Fosfolipase Código Pz* e	Melanina	Razão célula/cápsula (e código)
L488/04P	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.72 (2)	0.41 (3)	+++	0.40 (1)
L296/04P	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.71 (2)	0.47 (3)	+++	0.49 (2)
L296/04G	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.61 (3)	0.35 (3)	+++	0.50 (2)
L118/03	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.66 (2)	0.41 (3)	+++	0.38 (1)
L512/04P	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.66 (2)	0.41 (2)	+++	0.43 (2)
L83/06G	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.72 (2)	0.32 (3)	+++	0.40 (1)
L137/06	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.72 (2)	0.47 (3)	+++	0.38(1)
L43/98	<i>C.neoformans</i>	LCR	1(1)	0.43 (3)	+++	0.51 (2)
L216/04P	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.76 (2)	0.39 (3)	+++	0.50 (2)
L216/04G	<i>C.neoformans</i>	LCR	1 (1)	0.39 (3)	+++	0.45 (2)a
175	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.75 (2)	0.50 (3)	+++	0.59 (2)
L195/96	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.75 (2)	0.33 (3)	+++	0.41 (2)
L202/04P	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.83 (2)	0.27 (3)	+++	0.49 (2)
174	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.6 (3)	0.30 (3)	+++	0.54 (2)
L129P	<i>C.neoformans</i>	LCR	1(1)	0.39 (3)	+++	0.59 (2)
L118/03G	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.53 (3)	0.36 (3)	+++	0.47 (2)
108	<i>C.neoformans</i>	LCR	1 (1)	0.41 (3)	+++	0.18 (1)
164	<i>C. gattii</i>	LCR	0.53 (3)	0.27 (3)	+++	0.50 (2)
189	<i>C.gattii</i>	Granuloma narina gato	0.86 (2)	0.38 (3)	+++	0.54 (2)
161	<i>C.gattii</i>	LCR	1 (1)	0.33 (3)	+++	0.31 (1)
172	<i>C.neoformans</i>	LCR	1 (1)	0.47 (3)	+++	0.54 (2)
168	<i>C.neoformans</i>	LCR	1 (1)	0.67 (2)	+++	0.43 (2)
169	<i>C.neoformans</i>	LCR	1 (1)	0.35 (3)	+++	0.56 (2)
154	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.72 (2)	0.30 (3)	+++	0.54 (2)
170	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.55 (3)	0.39 (3)	+++	0.28 (1)
105	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.50 (3)	0.28 (3)	+++	0.37 (1)
196	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.83 (2)	0.60 (3)	+++	0.55 (2)
167	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.70 (2)	0.45 (3)	+++	0.39 (1)
283	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.66 (2)	0.42 (3)	+++	0.55 (2)
107	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.58 (3)	0.43 (3)	+++	0.95 (3)
111	<i>C.neoformans</i>	LCR	1 (1)	1 (1)	+++	0.48 (2)
155	<i>C.neoformans</i>	LCR	1 (1)	1 (1)	+++	0.66 (2)
127	<i>C.neoformans</i>	LCR	1 (1)	0.33 (3)	+++	0.34 (1)
L143/03P	<i>C.neoformans</i>	LCR	1 (1)	0.29 (3)	+++	0.56 (2)
89	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.67 (2)	0.37 (3)	+++	0.35 (1)
113	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.64 (2)	0.43 (3)	+++	0.44 (2)
81	<i>C. gattii</i>	LCR	0.4 (3)	0.60 (3)	+++	0.41 (2)
160	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.71 (2)	0.47 (3)	+++	0.51 (2)
98	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.6 (3)	0.29 (3)	+++	0.53 (2)
87	<i>C.neoformans</i>	LCR	0.67 (2)	0.29 (3)	+++	0.39 (1)

*Código Pz = (diâmetro célula/diâmetro total do halo) = índice Pz 1=1; Pz ≥0,64<1 = 2; Pz <0,64=3

** Relação célula/cápsula ≤0,40 = 1; ≥ 0.41 <0.70 = 2; ≥ 0.71 < 0.95 = 3

FONTE: Cardoso (2012)

Quadro 3 – Fatores relacionados a virulência das cepas de origem ambiental

Cepa	Espécie	Origem	Protease e Código Pz*	Fosfolipase e Código Pz*	Melanina	Razão célula/cápsula e código **
B12	<i>C.neoformans</i>	Fezes de pombo	0.40 (3)	0.60 (3)	+++	0.51 (2)
P20D11	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.30 (3)	0.25 (3)	+++	0.37 (1)
P17B5	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	1 (1)	0.76 (2)	+++	0.48 (2)
P8D5	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.68 (2)	0.26 (3)	+++	0.45 (2)
P3A5	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.70 (2)	0.75 (2)	+++	0.41 (2)
P11A8	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.33 (3)	0.73 (2)	+++	0.39 (1)
P20B3	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.52 (3)	0.75 (2)	+++	0.42 (2)
P3A9	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.57 (3)	0.75 (2)	+++	0.39 (1)
P16B9	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.86 (2)	0.44 (3)	+++	0.40 (1)
P15A9	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.66 (2)	0.36 (3)	+++	0.32 (1)
P1C6	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.92 (2)	0.50 (3)	+++	0.51 (2)
P10B14	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.80 (2)	0.45 (3)	+++	0.32 (1)
P3A3	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	1 (1)	0.29 (3)	+++	0.41 (2)
P17A9	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	1 (1)	0.67 (2)	+++	0.47 (2)
P9A5	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	1 (1)	0.71 (2)	+++	0.36 (1)
C11B11	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	1 (1)	0.41 (3)	+++	0.52 (2)
P9A10	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.86 (2)	0.77 (2)	+++	0.65 (2)
P3A20	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.5 (2)	0.71 (2)	+++	0.44 (2)
P3C2	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	1 (1)	0.67 (2)	+++	0.40 (1)
P11B11	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	1 (1)	0.77 (2)	+++	0.44 (2)
P3C11	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.63 (3)	0.72(2)	+++	0.41 (2)
P9B11	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.26(3)	0.22 (3)	+++	0.38 (1)
P20B5	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.95(2)	0.19 (3)	+++	0.31 (1)
P3A3	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.50 (3)	0.45 (3)	+++	0.30(1)
P6B4	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.68 (2)	0.30 (3)	+++	0.55(2)
P3A10	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.75 (2)	0.71(2)	+++	0.52(2)
P10C5	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.75 (2)	0.25 (3)	+++	0.48 (2)
P9C5	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.55 (3)	0.29 (3)	+++	0.43 (2)
B20	<i>C.neoformans</i>	Fezes de pombo	1 (1)	0.47 (3)	+++	0.51 (2)
P9A7	<i>C.neoformans</i>	Fezes de pombo	0.76 (2)	0.47 (3)	+++	0.51 (2)
B51	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.48 (3)	0.73 (2)	+++	0.42 (2)
P3B5	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.66 (2)	0.24 (3)	+++	0.46 (2)
P3C11	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.63 (3)	0.29 (3)	+++	0.41 (2)
P10B8	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.25 (3)	0.21 (3)	+++	0.50 (2)
P16B4	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	1(1)	0.73 (2)	+++	0.25 (1)
P8A5	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	1 (1)	0.69 (2)	+++	0.36 (1)
PAA5	<i>C.neoformans</i>	Fezes aves Pet Shop	0.54 (3)	0.80 (2)	+++	0.51 (2)
B89	<i>C.neoformans</i>	Fezes de pombo	0.57 (3)	0.82 (2)	+++	0.44 (2)
B93	<i>C.neoformans</i>	Fezes de pombo	0.83 (2)	0.73 (2)	+++	0.58 (2)
B9	<i>C.neoformans</i>	Fezes de pombo	1 (1)	0.60 (3)	+++	0.53 (2)
B12	<i>C.neoformans</i>	Fezes de pombo	0.40 (3)	0.60 (3)	+++	0.48 (2)
B51	<i>C.neoformans</i>	Fezes de pombo	0.48 (3)	0.73 (2)	++++	0.42 (2)
184	<i>C.gattii</i>	Folhas de Eucalipto	0.46 (3)	0.63 (3)	+++	0.51 (2)
183	<i>C.gattii</i>	Folhas de Eucalipto	0.55 (3)	0.63 (3)	+++	0.54 (2)

*Código Pz = (diâmetro célula/diâmetro total do halo) = índice Pz 1=1; Pz ≥0,64<1 = 2; Pz <0,64=3

** Relação célula/cápsula = código ≤0,40 = 1; ≥ 0.41 <0.70 = 2; ≥ 0.71 < 0.95 = 3

FONTE: Cardoso (2012)

Quadro 4 – Concentração inibitória mínima dos antifúngicos frente as cepas de origem clínica pelo (método E-test)

Cepas	Anfotericina	Itraconazol	Cetoconazol	Fluconazol	Voriconazol	Posoconazol
L488/04P	0,125	0,094	0,016	0,75	0,003	0,032
L296/04P	0,094	0,094	0,012	0,50	0,003	0,023
L296/04g	0,012	0,023	0,064	0,19	0,008	0,023
L118/03p	0,094	0,016	0,006	0,19	0,004	0,023
L512/04p	0,047	0,094	0,064	3	0,008	0,094
L83/06g	0,047	0,023	0,047	0,50	0,012	0,094
L137/06	0,016	0,016	0,008	0,50	0,003	0,016
L43/98	0,094	0,023	0,006	0,19	0,004	0,012
L216/04p	0,012	0,064	0,008	1,0	0,002	0,008
L216/04g	0,047	0,032	0,023	1,0	0,003	0,016
175	0,016	0,094	0,004	0,50	0,004	0,016
L195/96	0,125	0,19	0,016	0,19	0,012	0,023
L202/04p	0,016	0,016	0,012	0,50	0,002	0,023
174	0,047	0,047	0,023	2	0,008	0,047
L129P	0,016	0,023	0,016	0,25	0,002	0,023
L118/03g	0,064	0,094	0,006	3	0,004	0,008
108	0,094	0,094	0,006	0,75	0,004	0,006
164	0,032	0,016	0,006	0,50	0,004	0,004
189	0,032	0,19	0,047	1,5	0,012	0,094
161	0,032	0,125	0,047	3	0,012	0,094
172	0,032	0,094	0,003	0,38	0,002	0,006
168	0,047	0,125	0,006	0,50	0,008	0,016
169	0,064	0,094	0,006	0,75	0,008	0,004
154	0,012	0,047	0,008	0,75	0,00	0,008
170	0,016	0,25 SDD	0,008	4	0,012	0,032
105	0,032	0,023	0,006	0,50	0,003	0,006
196	0,016	0,125	0,008	0,19	0,008	0,008
167	0,012	0,19	0,008	0,094	0,004	0,006
283	0,047	0,047	0,006	0,50	0,003	0,012
107	0,125	0,016	0,047	0,19	0,012	0,012
111	0,094	0,047	0,006	0,38	0,008	0,008
155	0,023	0,047	0,002	1,5	0,032	0,002
127	0,125	0,008	0,002	0,19	0,002	0,002
L143/03	0,125	0,047	0,006	0,19	0,008	0,012
89	0,032	0,016	0,006	0,25	0,008	0,006
113	0,032	0,012	0,006	0,25	0,002	0,016
81	0,016	0,023	0,016	0,38	0,004	0,008
160	0,016	0,012	0,006	0,19	0,002	0,008
98	0,023	0,032	0,047	0,050	0,023	0,002
87	0,012	0,023	0,002	0,25	0,002	0,008

SDD – Sensível Dose Dependente

FONTE: Cardoso (2012)

Quadro 5 – Concentração inibitória mínima dos antifúngicos frente as cepas de origem ambiental (método E-test)

Cepas	Anfotericina	Itraconazol	Cetoconazol	Fluconazol	Voriconazol	Posoconazol
B12	0,012	0,047	0,023	1,0	0,012	0,023
P20D11	0,012	0,094	0,004	1,5	0,016	0,004
P17B5	0,006	0,008	0,032	0,38	0,003	0,064
P8D5	0,008	0,016	0,032	0,38	0,004	0,032
P3A5	0,064	0,016	0,002	0,38	0,004	0,002
P11A8	0,002	0,016	0,002	0,25	0,004	0,002
P20B3	0,008	0,002	0,023	0,032	0,002	0,016
P3A9	0,008	0,006	0,002	0,047	0,003	0,003
P16B9	0,016	0,012	0,023	0,25	0,002	0,064
P15A9	0,008	0,008	0,008	0,38	0,002	0,016
P1C6	0,125	0,016	0,002	0,25	0,003	0,003
P10B14	0,016	0,008	0,032	0,38	0,003	0,064
P3A3	0,064	0,023	0,003	0,50	0,006	0,008
P17A9	0,008	0,023	0,008	0,50	0,006	0,012
P9A5	0,032	0,023	0,032	0,38	0,002	0,012
C11B11	0,016	0,008	0,006	0,25	0,006	0,004
P9A10	0,047	0,50 SDD	0,008	8	0,064	0,016
P3A20	0,016	0,125	0,003	1,5	0,008	0,008
P3C2	0,094	0,006	0,032	0,19	0,004	0,064
P11B11	0,003	0,019	0,023	4	0,023	0,032
P3C11	0,047	0,008	0,016	0,032	0,003	0,032
P9B11	0,064	0,016	0,016	0,064	0,002	0,016
P20B5	0,008	0,008	0,008	0,064	0,002	0,008
P3A3	0,012	0,023	0,003	0,50	0,006	0,008
P6B4	0,016	0,008	0,008	0,25	0,003	0,012
P3A10	0,047	0,012	0,002	0,047	0,002	0,016
P10C5	0,008	0,004	0,032	0,032	0,002	0,032
P9C5	0,023	0,012	0,006	0,125	0,002	0,008
B20	0,047	0,023	0,006	0,125	0,002	0,008
P9A7	0,016	0,006	0,012	0,047	0,003	0,016
B51	0,012	0,012	0,008	0,19	0,003	0,016
P3B5	0,064	0,032	0,012	0,50	0,006	0,016
P3C11	0,047	0,008	0,016	0,032	0,003	0,032
P10B8	0,094	0,008	0,002	0,19	0,003	0,002
P16B4	0,032	0,016	0,008	0,38	0,004	0,016
P8A5	0,016	0,023	0,023	2	0,003	0,047
PAA5	0,064	0,032	0,002	0,19	0,004	0,002
B89	0,008	0,004	0,002	0,032	0,002	0,002
B93	0,047	0,016	0,002	0,047	0,002	0,002
B9	0,19	0,008	0,002	0,125	0,003	0,002
B12	0,012	0,047	0,023	1,0	0,012	0,023
B51	0,012	0,012	0,008	0,19	0,003	0,016
184	0,016	0,016	0,016	0,19	0,002	0,016
183	0,016	0,38 SDD	0,002	0,38	0,002	0,003

SDD – Sensível Dose Dependente

5 DISCUSSÃO

O estudo de cepas de *Cryptococcus spp* mantidas em micoteca é de extrema importância. *Cryptococcus neoformans* era agrupado em três variedades: *C. neoformans* variedade *gattii* (sorotipo B e C), *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A) e *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo D e AD) (FRANZOT et al., 1999). Atualmente, o que era conhecido como a antiga variedade *gattii* corresponde hoje à espécie *Cryptococcus gattii* e as variedades *grubii* e *neoformans* à espécie *Cryptococcus neoformans* (HEITMAN et al., 2011; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Muitas cepas podem estar armazenadas com a antiga nomenclatura e uma correta re-identificação é de extrema importância pelos mantenedores das micotecas para um possível estudo posterior.

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* são consideradas as espécies de *Cryptococcus spp.* a causarem patogenia em humanos, devido à capacidade de crescerem em temperaturas de 37 °C (PFALLER; MCGINNIS; ANAÏSSIE, 2009).

5.1 Identificação das espécies

Das 84 cepas escolhidas aleatoriamente na micoteca do ICB II - USP (40 cepas de origem clínica e 44 cepas de origem ambiental) todas tiveram resultados positivos para *Cryptococcus neoformans*, o que corrobora com as identificações anteriormente realizadas pelos mantenedores da micoteca deste laboratório.

5.1.1 Tipagem bioquímica em meio C.G.B

Em nosso estudo, as cepas escolhidas passaram pela quimiotipagem em meio C.G.B, para diferenciação das mesmas em *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. O crescimento do *C. gattii* no meio C.G.B resulta numa coloração azul cobalto do meio, indicando a assimilação de glicina, enquanto *C. neoformans* não cresce e não causa mudança na coloração do meio (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Klein et al. (2009) analisaram 102 cepas de leveduras para verificar atividade à urease, produção de melanina e assimilação de glicina no meio C.G.B bem como sequenciamento. As 17 cepas de *C. gattii* testadas foram C.G.B positivo, as 54 cepas de *C. neoformans* foram C.G.B negativa sendo que uma dessas apresentou atividade de coloração fraca no meio, seis de 20 outras espécies de *Cryptococcus* também foram C.G.B positivo, mas

negativas para produção de melanina, quatro de cinco espécies de *Trichosporon* foram C.G.B positivo e negativos para produção de melanina, e uma de seis espécies de outras leveduras foi positiva em meio C.G.B e negativa para produção de melanina. Esse estudo mostra que o C.G.B não pode ser usado isoladamente para diferenciação da levedura, já que outras espécies de leveduras também podem assimilar a glicina e tornar o meio azul, o ideal é usar também um meio para produção de melanina e uma técnica molecular tal como PCR .

No nosso estudo, das **40 cepas de origem clínica**, quatro (10%) foram identificadas como *Cryptococcus gattii* e 36 (90%) como *Cryptococcus neoformans* . Já dentre as cepas de origem ambiental, duas (4,5%) foram identificadas como *Cryptococcus gattii* e 42 (95,5%) como *Cryptococcus neoformans*.

Barreto de Oliveira et al. (2004) em um estudo semelhante, analisando 57 amostras de *Cryptococcus neoformans*, relatou a presença de 21% de *C. gattii* e 79% de *C. neoformans*. Em 2006, Dias estudando isolados clínicos e ambientais também encontrou maior percentual de *C. neoformans* em comparação a *C. gattii* . Verifica-se portanto que nossos resultados estão de acordo com a literatura, que aponta que a espécie *Cryptococcus neoformans* tem uma maior prevalência do que *Cryptococcus gattii*. No trabalho da autora anteriormente citada a espécie mais predominantemente encontrada foi *C. neoformans* em 95,5% das cepas clínicas e 94% das cepas ambientais e *C. gattii* foi 4,5% das cepas clínicas e 3% para ambientais.

Estudos verificam que a epidemiologia da infecção e a ecologia de *C. neoformans* estão relacionadas entre si. *Cryptococcus neoformans* é encontrado na maioria das infecções criptocócicas no mundo inteiro (principalmente em pacientes com AIDS) e apresenta as excretas de pombos como principal reservatório (ASHENG et al., 1994; BARONI, 2001; DIAS, 2006; HEITMAN et al., 2011; MONTENEGRO; PAULA, 2000).

Salienta-se que a maioria das cepas de origem ambiental utilizadas no nosso estudo eram provenientes de fezes de pombos e outras aves, onde a espécie mais frequente é *C. neoformans* (BARONI et al., 2006; ESCANDÓN et al, 2006; LAZÉRA et al., 2000; REFOJO et al., 2009). Duas outras cepas de origem ambiental (minoria) era provenientes de folhas de eucalipto. A literatura sugere que apesar de *C. neoformans* e *C. gattii* ocuparem nichos ecológicos similares, o *C. gattii* está associado principalmente à madeira deteriorada, restos vegetais e solo. Em particular, as árvores de eucalipto representam a mais comum e melhor fonte de *C. gattii* (CASALI et al., 2003; GRANADOS; CASTANEDA, 2006; MONTENEGRO; PAULA, 2000; REFOJO et al., 2009) e nosso estudo comprovou isso, pois as cepas que eram provenientes de folhas de eucalipto eram *C. gattii*.

Um fator importante observado e que merece ser mencionado, foi que, uma cepa clínica de *C. gattii* (VGII), era proveniente de granuloma cutâneo da narina de um gato, conhecido na literatura como nariz de palhaço. Casos em gatos na América do norte e na Austrália são bastante relatados (HEITMAN et al., 2011), sendo o *C. gattii* a espécie de *Cryptococcus* mais frequentemente isolada desses animais, porém no Brasil pouco se tem relatado sobre a criptococose em animais, ou pela falha no diagnóstico ou pela omissão nos casos encontrados por parte dos médicos veterinários.

Infecções fúngicas de caráter sistêmico podem causar lesões semelhantes, como por exemplo nos casos de Feoifomicose causada por fungos demaciáceos (pigmentados) ou nos casos de esporotricose causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*. Os dois fungos citados anteriormente podem apresentar lesões granulomatosas nas narinas e na pele dos gatos, que muitas vezes se assemelham com as lesões causadas por *C. neoformans* e *C. gattii* (WILKINSON; HARVEY, 1997) e essa semelhança pode causar erro no diagnóstico, e por isso, é interessante o médico veterinário clínico conhecer todos os possíveis diagnósticos diferenciais possíveis. O diagnóstico clínico associado ao laboratorial é de extrema importância para uma correta identificação e escolha certa de medicamento na hora do tratamento.

5.1.2 Tipagem molecular das cepas que foram C.G.B positivo

O trabalho feito por Klein et al. (2009) apontou uma questão importantíssima, pois muitos laboratórios não usam a técnica molecular como complementar dos testes bioquímico. E com o intuito de avaliar a eficácia da nossa identificação no meio C.G.B as seis cepas (quatro clínicas e duas ambientais) que foram C.G.B positivo passaram pela reação de PCR-RFLP e verificou-se que duas cepas (clínicas) eram na realidade *C. neoformans* VNI E VNIII e não *C. gattii* como apontada pela tipagem bioquímica. E as outras quatro cepas (duas clínicas e duas ambientais) foram confirmadas como sendo *C. gattii* VGII. E mais uma vez é importante salientar que associado aos testes bioquímicos, também devemos usar uma técnica molecular tal como a PCR-RFLP para uma identificação mais correta e confiável.

A ocorrência da VNI é mundial, sendo a mais frequente nos isolados de *Cryptococcus neoformans* e o VNIII que antigamente não era relatado no Brasil, Chile e Colômbia, vem aparecendo atualmente, embora que com uma frequência menor. Dentre os isolados de *C. gattii* o VGII aparece com maior frequência em países norte e sul americanos e no Brasil é mais frequente nas regiões norte e nordeste (ELLIS et al., 2000; ESCANDON et

al., 2006; FENG et al., 2008; KIDD et al., 2004; MATSUMOTTO et al., 2007; MEYER et al., 2003; SANTOS et al., 2008; SILVA et al., 2012; SIONOV et al., 2010; TRILLES et al., 2003; VIVIANI et al., 2001). Salienta-se mais uma vez esse achado, VGII na região sudeste do Brasil (São Paulo).

Um estudo futuro de tipagem molecular das 78 cepas de *Cryptococcus neoformans* seria interessante para saber a frequência dos VNs das cepas clínicas e ambientais mantidas na micoteca.

5.2 Fatores relacionados a virulência

5.2.1 *Protease*

Na investigação da produção de protease pelo complexo patogênico *Cryptococcus* (cepas clínicas), **23% foram fortemente positivas e 47% positivas**. Já as cepas ambientais do complexo *Cryptococcus* apresentaram o seguinte resultado: **45% fortemente positivas e 30% positivas**.

Sánchez et al. (2008), realizando estudos com isolados clínicos do Instituto Nacional de Saúde de Bogotá classificou a atividade *in vitro* da produção da enzima protease de *C. neoformans* e *C. gattii* em alta, média e baixa. A maioria das cepas de *C. neoformans* e *C. gattii* tiveram de média a alta atividade proteolítica. Embora 14,3% das cepas de *C. neoformans* e 32% de *C. gattii* terem apresentado baixa atividade.

Por sua vez, Baroni (2001) verificou que nenhum dos isolados ambientais provenientes de fezes pombos foram produtores da enzima, discordando portanto dos nossos achados. Porém, Silva (2004) estudando cepas de *C. neoformans* todas não produtoras de protease, verificou que após a inoculação em camundongos, 17% passaram a expressar esta atividade enzimática. Neste caso, a inoculação em camundongos e a consequente colonização dos vários órgãos, pode ter ativado este fator.

Já Pereira (2006) estudando a produção de protease por cepas provenientes de isolados ambientais de fezes de aves comercializadas em “Pet Shops” na cidade do Rio de Janeiro verificou que 96% foram fortes produtores de protease.

Raros são os estudos que comparam a produção de protease com achados clínicos e ambientais do complexo *Cryptococcus*. Com relação aos nossos achados, a maior produtividade de protease (índice 3 – fortemente positiva) pelas cepas ambientais pode ser explicada pelo papel protetor desta enzima em condições adversas do seu nicho ecológico.

5.2.1 Fosfolipase

Na investigação da produção de fosfolipase pelo complexo patogênico *Cryptococcus* (cepas de origem clínica) **92% foram fortemente positivo e 3% positivas**. A produção de fosfolipase pelo complexo patogênico *Cryptococcus* (cepas de origem ambiental) foi **55% fortemente positiva e 45% positivas**.

No estudo de Pereira (2006), 57,12% dos isolados ambientais foram fortemente positivos e eram provenientes de fezes de aves comercializadas em Pet Shops da cidade do Rio de Janeiro. Sánchez et al. (2008) estudando cepas de origem clínica de *C. neoformans* e *C. gattii* classificou a atividade *in vitro* da enzima fosfolipase em média a alta. Sendo que 68,6 % das cepas de *C. neoformans* e 84,2% das cepas de *C. gattii* foram classificadas com atividade alta.

Vidotto et al. (1996), testaram 23 cepas de *C. neoformans* quanto à produção de fosfolipase e verificaram positividade em 22 cepas, com um pz variando de 0,271 a 0,949. Segundo os autores, ocorreu correlação entre a produção de fosfolipase e espessura capsular nos isolados provenientes de pacientes portadores de AIDS. Porém, em nosso estudo, não foi possível estabelecer relação entre a espessura capsular e produção de fosfolipase.

Baroni (2001) verificou que 90,8% das cepas isoladas de fezes de pombos foram produtoras da enzima fosfolipase, sendo que 46% foram fortemente positivas e 44,8% foram positivas. E segundo o autor, considerando a distribuição dos diferentes pontos de coleta das amostras, deve-se pensar na possibilidade de risco de infecção de transeuntes e trabalhadores com estas cepas virulentas.

Portanto, em nosso estudo, esta enzima foi produzida em grande quantidade pelas cepas clínicas (95%) e ambientais (100%) e pelos nossos resultados com relação a estas duas exoenzimas (proteínase e fosfolipase), a fosfolipase pode ser a mais importante na patogênese da criptococose, pois em cepas clínicas a porcentagem do índice fortemente positivo foi maior (92%) enquanto que para as ambientais o índice 3 foi de 55%. Estes resultados podem ser verificados **na seção 4.4.12** dos Resultados.

De acordo com Santagelo et al. (1999) a concentração de fosfolipase B, lisofosfolipase e lisofosfolipase transacilase produzida por *Cryptococcus neoformans* tem relação com a virulência em camundongos. E estudos com o rompimento do gene fosfolipase B, tem demonstrado grande importância nas pesquisas com modelos animais, pois há diminuição da virulência do fungo quando este é alterado.

Santagelo et al. descreveram pela primeira vez em 2005 a detecção por ELISA de anticorpos para fosfolipase B criptocócica em soro de pacientes infectados com *C. neoformans* e *C. gattii*. Com esse estudo os autores proporcionaram a primeira evidência confirmatória da produção *in vivo* de fosfolipase criptocócica durante infecção humana por *C. neoformans* e *C. gattii*.

5.2.2 Produção de Melanina

No nosso ensaio, tratamos apenas da expressão da fenoloxidase, caracterizada pela intensidade de pigmentação. E todas as cepas, tanto as de origem clínicas quanto as de origem ambiental tiveram intensidade de amarronzada a enegrecida no final do 15º dia. Porém, deparamo-nos com seis cepas (PAA5, P8A5, P3B5, P3C11, P20D11, P3A20) que só no 12º dia depois da semeadura começou a expressar intensidade de melanina, diferente das outras que já a partir do sexto a sétimo dia de crescimento já apresentavam-se melanizadas e no final dos 15º já estavam completamente melanizadas (coloração amarronzada – conforme verificado nas Figuras com legendas na seção 4.4.2). Estas cepas podem ter efeito retardado por algum motivo desconhecido, mas que de certa forma poderia influenciar na patogenicidade. E como se trata de um processo enzimático, seria difícil estabelecer uma relação entre a produção enzimática e uma imediata ou não produção de pigmentação. E para que seja elucidado esse fenômeno estas cepas deverão ser inoculadas em um estudo futuro.

Existem observações de Jacobson e Tinnell (1993) em que a melanina apresenta função antioxidante, devido aos resíduos semelhantes à quinona e à hidroquinona, que são consumidores de superóxidos e, observações de Wang e Casadevall (1994) de menor susceptibilidade de células melanizadas aos oxidantes. Jacobson et al. (2005) no intuito de entender melhor a estrutura e mecânica de células melanizadas verificaram que a parede destas cepas são mais reticuladas e menos porosas. Essa redução na porosidade das células melanizadas pode proteger a levedura contra enzimas líticas e outras proteínas tóxicas. Por estas informações, achamos importante, em estudo posterior, avaliar o período de expressão da enzima por diferentes cepas, assim como dosar bioquimicamente a produção da enzima.

Ikedo et al. (2003) verificando o efeito da melanização sobre a susceptibilidade de cepas de *Cryptococcus* frente aos antifúngicos anfotericina B e fluconazol observaram que a CIM das drogas não foram alterados pela melanização. Porém, as concentrações efetivas da droga podem ter sido reduzidas pela ligação da melanina às drogas; pois quando analisados os poços da placa que continham células inibidas, encontraram células vivas apenas nos poços

onde *C. neoformans* apresentava-se melanizado. Dias (2006) estudando o efeito da melanização de cepas de *Cryptococcus neoformans* na sensibilidade dos antifúngicos 5-fluorocitosina, anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol verificou que o estado de melanização não alteram a eficácia *in vitro* da maioria dos antifúngicos analisados. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa na comparação entre os valores de CIM das células melanizadas e não melanizadas, exceto no caso de anfotericina B. As células melanizadas apresentaram-se menos sensíveis a anfotericina B de que as células não melanizadas da maioria cepas.

5.2.3 Cápsula

A metodologia que empregamos baseou-se em avaliação através da Fotografia do campo microscópico de cada cepa, escolhendo-se cinco células de cada campo, medindo o diâmetro da célula e da cápsula e dividindo os valores conforme mencionado no material e métodos na seção 3.5.4.

A cápsula polissacarídica é considerada um fator de virulência de *C. neoformans* e *C. gattii*, apresentando inclusive atividade antifagocitária (CASADEVALL; PERFECT, 1998; HAMILTON; GOODLEY, 1996) no seu isolamento, a partir do meio ambiente, a maioria destas leveduras apresentam apenas uma cápsula pequena ou mesmo aparentemente inexistente. Tais observações também foram verificadas por Baroni (2001) nos isolamentos realizados na cidade do Rio de Janeiro em excretas de pombos.

Segundos os autores citados abaixo, durante a infecção o tamanho da cápsula varia dependendo do órgão infectado, sendo o pulmão o órgão de maior tamanho capsular relatado, o que indica que microambientes durante infecções tem um impacto grande no tamanho da cápsula. Outro que contribui bastante para o aumento capsular é a concentração de ferro. O ferro é um nutriente essencial para a vida da levedura, cuja concentração no hospedeiro é normalmente baixa, e a levedura deve competir com ligação de proteínas do hospedeiro tal como a transferina. Não se sabe ao certo o porquê *C. neoformans* responde a limitação de ferro através do aumento da espessura capsular, mas sugere-se que a cápsula poderia contribuir para o aumento da absorção de ferro pela levedura (RIVERA et al., 1998; ZARAGOZA et al., 2004, 2009).

Nossos achados, no entanto, demonstraram que não houve diferenças significativas entre cepas de origem clínica e de origem ambiental, pois 30% das cepas de origem clínica e 30% das cepas de origem ambiental tiveram o tamanho da cápsula

classificado como grande, e 67% das cepas de origem clínica e 70% das cepas de origem ambiental tiveram o tamanho da cápsula classificada como média. O fato dessas cepas já estarem armazenadas, a um certo tempo em laboratório sob condições semelhantes, como tipo de meio de cultivo, condições nutricionais semelhantes e temperatura, podem de alguma forma ter contribuído para que essas começassem a expressar esta característica fenotípica de forma semelhante. E é válido lembrar que todas as cepas de origem clínica, algum dia já foram de origem ambiental e portanto, possuem uma mesma origem e nada as impede de voltarem a expressar determinada característica fenotípica quando estão sob as mesmas condições.

5.3 Teste de Sensibilidade frente aos Antifúngicos

A terapêutica farmacológica nos casos de infecções criptocócicas em humanos consiste, geralmente, de terapia primária com anfotericina B, associada ou não à 5-fluorocitosina, quase sempre seguida por terapia de manutenção com algum antifúngico azólico, principalmente, fluconazol. Altas taxas de predomínio fúngico e casos de reincidência da criptococose têm sido considerados como potenciais associados à emergência de resistência antifúngica dentre os isolados de *C. neoformans* (BERG; GLANCY; NGUYEN, 1998; BRANDT et al., 2001; DIAS, 2006).

Na medicina veterinária o tratamento de eleição para cães e gatos com sintomatologia nervosa é a combinação da anfotericina B com 5-fluorocitosina. A anfotericina não é um medicamento tão caro, mas devido a sua aplicação parenteral nos animais pode requerer visitas frequentes ao hospital. E também evita-se o uso frequente devido seu efeito nefrotóxico. Assim como para os humanos, é utilizada na fase inicial do tratamento e em seguida usa-se terapia de manutenção com azólicos. Nos cães e gatos o antifúngico de eleição é o fluconazol com doses de 50 mg a cada 12 horas por via oral. O itraconazol possui uma eficácia semelhante ao fluconazol, porém possui efeito hepatotóxico. O cetoconazol é o antifúngico com o menor custo, porém as doses que são efetivas causam efeitos que não são desejados tal como o vômito e a inapetência (CASTELLÁ et al., 2008; MALIK et al., 1992; MEDLEAU et al., 1995).

Diante deste quadro, faz-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de métodos de rotina para determinação do perfil de sensibilidade de isolados de *C. neoformans* a diferentes agentes antifúngicos e que, além disso, permitam a avaliação da eficácia dos tratamentos utilizados e a evolução da doença.

Os testes *in vitro* de susceptibilidade a agentes antifúngicos estão ganhando um papel importante na seleção de drogas antifúngicas, com ajuda na descoberta de medicamentos e estudos de desenvolvimento. Estes estudos podem rastrear o aparecimento de resistência aos antifúngicos existentes, através de pesquisas epidemiológicas (ALEXANDER et al., 2006; ALLER et al., 2000; HEITMAN et al., 2011; PFALLER et al., 2005; 2009; REX et al., 2002).

O “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) Subcomissão para testes antifúngicos tem o desenvolvimento da microdiluição em caldo padronizado como método para testar a susceptibilidade *in vitro* de *Candida spp* e *C. neoformans*.

Embora existam preocupações de que os métodos do CLSI não sejam ideais para testar *C. neoformans* (GHANNOUM et al., 1992; WITT et al., 1996), a microdiluição em caldo e o método de difusão em ágar tem sido aplicado em todo o mundo para estudar a emergência de uma série de isolados de *C. neoformans*. Pode-se assim estabelecer uma comparação da atividade de novos e consagrados agentes contra *C. neoformans* e *C. gattii* e identificar as tendências geográficas e temporais na resistência a antifúngicos, identificando cepas clínicas e laboratoriais que podem ser usadas para estudos de mecanismos de resistência a antifúngicos (HEITMAN et al., 2011).

No nosso estudo usamos os testes de difusão em disco, o “kit” comercial “E-test” que tem sido descrito como um bom método para uso em rotina laboratorial, provando ter um uma boa alternativa para testes de sensibilidade *in vitro* (MATSUMOTO et al., 2007). Este método permite a determinação da concentração inibitória mínima, e têm mostrado excelentes benefícios, como fácil execução e rapidez nos resultados (NEGRI et al., 2009). Este método demonstra boa correlação com o método padrão (CLSI) que é de difícil execução e tempo longo de leitura.

Levando em consideração o perfil da concentração inibitória mínima, a farmacologia, o mecanismo de resistência e resultados clínicos à vários agentes antifúngicos, é razoável adaptar os “breakpoints” desenvolvidos pelo CLSI para *Candida spp*, para o uso na discussão de resistência a antifúngicos em *C. neoformans* e *C. gattii*.

As leituras das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) nos testes de sensibilidade que empregamos (“Etest”) seguiram a orientação do fabricante do produto (AB BIODISK – Solna, Suécia).

Tanto as cepas de origem clínica, quanto as de origem ambiental foram 100% sensíveis ao polieno anfotericina B. Os valores das concentrações inibitórias mínimas para anfotericina B, variaram, entre as cepas de origem clínica, num intervalo de 0.012 a 0.125

µg/mL, apresentando média de 0,0490 µg/mL. As cepas de origem ambiental variaram, num intervalo de 0.002 a 0.19 µg/mL, apresentando média de 0,0348 µg/mL. Segundo o CLSI (2008), valores de breakpoints com concentrações inibitórias mínimas ≤ 1 µg/mL são sensíveis ao antifúngico anfotericina B, sendo resistente apenas quando esses valores são ≥ 2 µg/mL.

Com exceção de uma cepa clínica e duas ambientais que apresentaram classificação dose dependente frente ao itraconazol, todas as demais foram sensíveis aos antifúngicos azólicos.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para Itraconazol, variaram, entre as cepas de origem clínica, num intervalo de 0.008 a 0.25 µg/mL, apresentando média de 0,0661 µg/mL. As cepas de origem ambiental variaram, num intervalo de 0.008 a 0.50 µg/mL, apresentando média de 0,0388 µg/mL. O CLSI estabelece que os valores de breakpoints ≤ 0.12 µg/mL são considerados sensíveis, de 0.25 a 0.5 µg/mL são considerados sensíveis dose dependente e ≥ 1 µg/mL são considerados resistentes.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para Cetoconazol, variaram, entre as cepas de origem clínica, num intervalo de 0.002 a 0.064 µg/mL, apresentando média de 0,0160 µg/mL. As cepas de origem ambiental variaram, num intervalo de 0.002 a 0.032 µg/mL, apresentando média de 0,0120 µg/mL.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para Fluconazol, variaram, entre as cepas de origem clínica, num intervalo de 0.094 a 4 µg/mL, apresentando média de 0,8091 µg/mL. As cepas de origem ambiental variaram, num intervalo de 0.032 a 8 µg/mL, apresentando média de 0,6200 µg/mL. O CLSI estabelece que os valores de breakpoints ≤ 8 µg/mL são considerados sensíveis, de 16 a 32 µg/mL são considerados sensíveis dose dependente e ≥ 64 µg/mL são considerados resistentes.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para Voriconazol, variaram, entre as cepas de origem clínica, num intervalo de 0.002 a 0.032 µg/mL, apresentando média de 0,0065 µg/mL. As cepas de origem ambiental variaram, num intervalo de 0.002 a 0.064 µg/mL, apresentando média de 0,0057 µg/mL. O CLSI estabelece que os valores de breakpoints ≤ 1 µg/mL são considerados sensíveis, de 2 µg/mL são considerados sensíveis dose dependente e ≥ 4 µg/mL são considerados resistentes.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas para Posaconazol, variaram, entre as cepas de origem clínica, num intervalo de 0.002 a 0.094 µg/mL, apresentando média de 0,0214 µg/mL. As cepas de origem ambiental variaram, num intervalo de 0.002 a 0.064 µg/mL, apresentando média de 0,0178 µg/mL.

No nosso estudo testamos o cetoconazol e apesar do mesmo ter tido uma boa resposta “*in vitro*”, na prática clínica, por via oral, o que acontece não é exatamente isso, pois para que a droga tenha um efeito desejável é necessário altas doses do medicamento, ocasionando efeitos colaterais indesejáveis aos pacientes. Seu uso fica portanto quase sempre restrito à aplicação tópica como em pacientes com granuloma cutâneo conhecido nos gatos como “nariz de palhaço” (CASTELLÁ et al., 2008).

Tanto para cepas clínicas quanto para as ambientais, os antifúngicos anfotericina B, posaconazol e voriconazol se mostraram altamente eficientes nos testes *in vitro*, e estes resultados demonstram que nosso estudo está de acordo com a literatura mundial. Vários são os trabalhos publicados que relataram que a anfotericina B, bem como os novos triazóis (voriconazol e posaconazol) possuem potente atividade contra *C. neoformans*, onde mais de 99% dos isolados se mostram com MICs $\leq 1 \mu\text{g/mL}$, independente da origem geográfica dos isolados (ALVES et al., 2001; BII et al., 2006; CAPOOR et al., 2008; CHANDENIER et al., 2004; YILDIRAN et al., 2002).

Com mais de 50 anos de uso, casos de resistência a anfotericina B são raros em cepas de *C. neoformans* e *C. gattii*. Casos de resistência primária não são muito relatados e casos de resistência secundária são raros (CHEN et al., 2000). Pressupõe-se que o mecanismo de resistência a anfotericina B, pode ser a partir de uma alteração quantitativa ou qualitativa do teor de esterol das células (KELLY et al., 1994), pois o ergosterol é o esterol com primeiro sítio marcado pela anfotericina B na membrana da célula fúngica, e células resistentes possuem uma menor quantidade dessa droga ligada a elas do que células susceptíveis (GHANNOUM et al., 1999).

Apesar de todas as cepas, tanto clínicas quanto ambientais terem sido sensíveis ao fluconazol, casos de resistência cruzada entre a droga e os novos triazóis (voriconazol e posaconazol) não estão completamente claros, no entanto 80% das cepas resistentes ao fluconazol são susceptíveis ao voriconazol (PFALLER et al., 2005).

Resistência primária ao fluconazol e aos outros azóis também é incomum entre cepas de *C. neoformans*, embora casos de resistência secundária estão bem descritos em indivíduos com AIDS e meningite criptocócica recidivante (ALLER et al., 2000). A resistência das leveduras aos azóis pode ser em decorrência de uma modificação quantitativa ou qualitativa na enzima de marcação (esterol 14 α -demetilase), que reduz o acesso da droga a enzima alvo, ou alguma combinação desse mecanismo (WHITE et al., 1998).

Segundo Heitman et al. (2011) uma melhor compreensão nos mecanismos de resistência aos antifúngicos para o complexo patogênico *Cryptococcus* (*C. neoformans* e *C. gattii*), poderá contribuir na batalha contra a emergência de resistência.

Quando o clínico escolher um agente terapêutico para tratamento da criptococose, ele deve avaliar uma série de situações, tal como: a condição do paciente, a eficácia da droga e os efeitos colaterais que poderão ser ocasionados em decorrência do uso. Nem sempre a droga mais barata terá os melhores resultados. O trabalho de escolha deve ser bastante cauteloso pois, em alguns casos, em vez de melhorar o estado do paciente, pode até piorar dependendo das condições do mesmo, ocasionando inclusive casos de resistências.

6 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos podemos concluir que:

- Pelo estudo de fenótipos (meio C.G.B), determinou-se 6 cepas de *C. gattii*. Estas 6 foram passaram pela tipagem molecular pela técnica de PCR-RFLP e 4 foram confirmadas como *C. gattii*.

- Salienta-se que uma cepa de *C. gattii* (VGII) foi isolada da lesão granulomatosa de um gato.

- Entre os fatores relacionados à virulência estudados, com exceção da fosfolipase, não houve correlação entre cepas clínicas e ambientais de *C. neoformans* e *C. gattii*.

- A produção de fosfolipase foi maior em cepas clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii*, sugerindo-se que esta enzima pode ser usada como um marcador fenotípico para cepas provenientes de isolados clínicos.

- Pelo método E-test, todas as cepas tanto clínicas, quantos as ambientais foram 100% sensíveis aos agentes antifúngicos anfotericina B, cetoconazol, fluconazol, voriconazol e posaconazol, com exceção do itraconazol que teve uma cepa clínica e duas ambientais classificadas como sensível dose dependente.

- Conclui-se que é importante a identificação de cepas mantidas em banco de microrganismos, como a atualização da nomenclatura.

REFERÊNCIAS¹

- AGUIRREBENGOA, L.; MONTEJO, M.; PRIETA, R.; UTERGA, J.; GAZTELURRUTIA, L.; ARCE, M. D; AGUIRRE, C. Cryptococcal meningitis and AIDS. Clinical description of 10 patients. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 10, p. 97-102, 1992.
- ALLER, A. I.; MARTIN-MANUELOS, E.; LOZANO, F.; GOMEZ-MATEOS, J.; STEELE-MOORE, L. HOLLOWAY, W.J.; GUTIEREZ, M. J.; RECIO, F. J.; ESPINEL-INGROFF, A. Correlation of fluconazole MICs with clinical outcome in cryptococcal infection. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 44, p. 1544-1548, 2000.
- ALVES, S. H.; OLIVEIRA, L. T.; COSTA, J. M.; LUBECK, I.; CASALI, A. K.; VAINSTEIN, M. H. In vitro susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Southern Brazil, **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 43, p. 267-270, 2001.
- ANSHENG, L.; NISHIMURA, K.; TAGUCHI, H.; TANAKA, R.; SHAOKI, W.; MIYAJI, M. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinical sourced isolates in China. **Mycophatologia**, v. 124, p. 143-150, 1994.
- AVRAMIDIS, N.; KOUROUNAKIS, A.; HADJIPETROU, L.; SENCHUK, V. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of grape melanin. Inhibitory effects on paw edema and adjuvant induced disease. **Arzneimittelforschung**, v. 48, p. 764-771, 1998.
- BANERJEE, A.; SHANNON, K. M. Leukemic transformation in patients with severe congenital neutropenia. **J.Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 23, p. 487-495, 2001.
- BARONI, F. A. **Espécies de *Cryptococcus neoformans* isoladas de torres de igrejas na cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil**. 2001. 150 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- BARONI, F. A.; PAULA, C. R.; SILVA, E. G.; VIANI, F. C.; RIVERA, I. N. G.; OLIVEIRA, M. T. B.; GAMBALE, W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 48, n. 2, p. 71-75, 2006.
- BARRETO DE OLIVEIRA, M. T.; HEITMAN, J.; BOEKOUT, T.; PAULA, C. R. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1356-1359, 2004.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 453-456, 1966.
- BAVA, A. J.; NEGRONI, R. The epidemiological characteristics of 105 cases of Cryptococcosis diagnosed in the Republic of Argentina between 1981-1990. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 34, p. 335-340, 1992.

¹ De acordo com:

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

BAWENS, L.; SWINNE, D.; DE VROEY, C.; MEURICHY, D. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Gardens. **Mykosen**, v. 29, p. 292-294, 1986.

BERG, J.; CLANCY, J. C.; NGUYEN, M. H. The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis for patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 186-187, 1998.

BII, C. C.; MAKIMURA, K.; ABE, S.; TAGUCHI, H.; MUGASIA, O. M.; REVATHI, G.; WAMU, N. C.; KAMIYA, S. Antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* from clinical sources in Nairobi, Kenya. **Mycoses**, v. 50, p. 25-30, 2006.

BOEKHOUT, T.; THEELEN, B.; DIAZ, M.; FELL, J. W.; HOP, W. C.; ABELN, E. C.; DROMER, F.; MEYER, W. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology**, v. 147, p. 891-907, 2001.

BOTTONE, E. J.; SALKIN, I. F.; HURD, N. J.; WORMSER, G. P. Serogroup Distribution of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. **J. Infect. Dis.**, v. 156, p. 238-242, 1987.

BRANDT, M. E.; PFALLER, M. A.; HAJJEH, R. A.; HAMILL, R. H.; PAPPAS, A. G.; REINGOLD, A.L.; RIMLAND, D.; WARNOCK, D.W. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 3065-3069, 2001.

BULMER, G. S.; SANS, M. D.; GUNN, C. M. *Cryptococcus neoformans*. I. Nonencapsulated mutants. **J. Bacteriol.**, v. 94, n. 5, p. 1475-1479, 1967.

BULMER, G. S.; TAKER, J. R. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by alveolar macrophages. **Infect. Immunol.**, v. 11, p. 73-79, 1975.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 327-335, 2001.

CAMPOS, F. L.; BARONI, F. A. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* e *C. laurentii* produtores de protease e fosfolipase. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 2, p. 83-89, 2010.

CAPOOR, M. R.; MANDALL, P.; DEB, M.; AGGARWAL, P.; BANERJEE, U. Current scenario of cryptococcosis and antifungal susceptibility pattern in India: a cause for reappraisal. **Mycoses**, v. 51, p. 258-265, 2008.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press, 1998. 541 p.

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

CASTELÁ, C.; ABARCA, M. L.; CABANES, F. J. Cryptococosis y animales de compañía. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 25, p. 19-24, 2008.

CHAKRABARTI, T.; BASAK, D. K.; BHOWMIK, M. K.; MAZUMDER, B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from captive birds. **Indian. Vet. J.**, v. 68, p. 517-520, 1991.

CHAKRABARTI, T.; JATANA, M.; KUMAR, P.; CHATHA, L.; KAUSHAL, A.; PADHYE, A.A. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from *Eucalyptus camadulensis* in India. **J. Clinic. Microbiol.**, v. 35, p. 3340-3342, 1997.

CHANDENIER, J.; ADOU-BRYN K. D.; DOUCHET, C.; SAR, B.; KOMBILA, M. SWINNE, D.; THERIZOL-FERLY, M.; BUISSON, Y.; RICHARD-LENOBLE, B. In vitro activity of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Africa and Cambodia. **Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.**, v. 23, p. 506-508, 2004.

CHANG, Y. C.; KWONG-CHUNG, K. J. Complementation of a capsule-deficient mutation of *Cryptococcus neoformans* restores its virulence. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, p. 4912-4919, 1994.

CHAPMAN, H. M.; ROBINSON, W. F.; BOLTON, J. R.; ROBERTSON, J. P. *Cryptococcus neoformans* in goats.. **Austr. Vet. J.**, v. 67, p. 263-265, 1990.

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

CHEN, S. C.; WRIGTH, L. C.; SANTANGELO, R. T.; MULLER, M.; MORAN, V. R.; KURCHEL, P. W.; SORRELL, T.C. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 405-411, 1997.

CHEN, Y. C.; CHANG, S. C.; SHIH, C. C.; HUNG, C. C.; LUH, K. T.; PAN, Y. S.; HSIEH, W. S. Clinical features and in vitro susceptibilities of two varieties of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 36, p. 175-183, 2000.

CHRISTIANSON, J. C.; ENGBER, W.; ANDES, D. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 177-188, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**: informational supplement. 3rd ed. Wayne, Pa.: CLSI, 2008. (Document M27-S3).

COX, G. M.; MCDADE, H. C.; CHEN, S. C.; TUCKER, S. C.; GOTTFREDSSON, M.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, S. D. LEIDICH, A.; CASADEVALL, A.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 166-175, 2001.

CRISSEY, J. T.; LANG, H.; PARISH, L. C. **Manual of medical mycology**. Cambridge, Spain: Blackwell Science, 1995.

DAMBRÓS, B. P. **Variabilidade genética de *Cryptococcus neoformans* isolado de pacientes HIV positivos atendidos no Hospital Nereu Ramos de Florianópolis, Santa**

Catarina. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado-Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

DARZÉ, C.; LUCENAR, R.; GOMES, I.; MELO, A. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptococócica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, p. 31-36, 2000.

DE JESUS, D. M.; NICOLA, A. M.; CHOW, S-K.; LEE, I. R.; NONG, S.; SPECHT, C. A.; LEVITZ, S. M.; CASADEVALL, A. Glucuronoxylomannan, galactoxylomannan and mannoprotein occupy spatially separate and discrete regions in the capsule. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 500-508, 2010.

DIAS, A. L. T.; MATSUMOTO, F. E.; MELHEM, M. S. C.; COSTA, S. O. P.; SIQUEIRA, A. M.; PAULA, C. R. Evaluation of broth microdilution method for susceptibility testing of brazilian clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates to five antifungal drugs. Trends. **Med. Mycol.**, v. 6, p. 123-125, 2003.

DIAS, A. L. T. **diversidade fenotípica e genotípica de isolados ambientais e clínicos de *cryptococcus neoformans***: sorotipos, “mating-type”, cariótipos, sensibilidade aos antifúngicos e isoenzimas superóxido dismutase. 2006. 186 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DIAS, A. L. T.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; COLEPÍCOLO, P.; SIQUEIRA, A. M.; GONÇALVES DA SILVA, E.; PAULA, C. R. Superoxide Dismutase in *Cryptococcus neoformans* varieties *gattii*, *grubii*, and *neoformans*. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 101, p. 107-109, 2006.

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

DIAZ-GUERRA, T. M.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V.; LAGUNA, F.; VALENCIA, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Change in fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans* isolated. **AIDS**, v. 12, p. 1601-1610, 1998.

DROMER, F.; LORTHOLARY, O.; MATHOULIN, S.; SITBON, K.; GOUVELLO, A.; DUPONT, B. French Cryptococcosis Study Group. Epidemiological and clinical aspects of *Cryptococcus neoformans* infection in France. In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON *CRYPTOCOCCUS* AND CRYPTOCOCCOSIS, 1999, Boston. **Abstracts...** Boston, 1999. p. 82.

DROMER, F.; MATHOULIN, S.; DUPONT, B.; LAPORTE, A. Epidemiology of Cryptococcosis in France: a 9 years survey (1985-1993). **Clin. Infect. Dist.**, v. 23, p. 82-90, 1996.

DROMER, F.; RONIN, O.; DUPONT, B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* from an asian patient in France: evidence for dormant infection in healthy subjects. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, n. 395-397, 1992.

ELIAS, M. L.; SOLIMAN, A. K.; MAHONEY, F. J.; KARAM EL-DIN, A. Z.; EL-KEBBI, R. A.; ISMAIL, T. F.; WASFY, M. M.; MANSOUR, A. M.; SULTAN, Y. A.; PIMENTEL, G.; EARHART, K. C. Isolation of *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus*, *Rhodotorula* and *Nocardia* from meningitis patients in Egypt. **J. Egypt. Public Health Assoc.**, v. 84, p. 169-181, 2009.

ELLIS, D.; MARRIOT, D.; HAIJEH, R. A.; WARNOCK, D.; MEYER W.; BARTON, R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 173-182, 2000.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var *gattii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 1642-1644, 1990.

ESCANDÓN, P.; SÁNCHEZ, A.; MARTINEZ, M.; MEYER, W.; CASTAÑEDA, E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the cryptococcus neoformans species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Columbia. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, p. 625-635, 2006.

ESPINEL-INGROF, A.; KISH, C. W.; KERKERING, T. M.; FROMTILING, R. A.; BARTIZAL, K.; GALGANI, J. N.; PFALLER, M. A.; GERARDEN, T.; RINALDI, M. G.; FOTHERGILL, A. Collaborative comparison of both macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. **J. Clin. Microbil.**, v. 30, p. 3138-3145, 1992.

FENG, X.; YAO, Z.; REN, D.; LIAO, W.; WU, J. Genotype and mating type analyses of Cryptococcosis neoformans and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p. 930-938, 2008.

FRANZOT, S. P.; HAMDAN, J. S.; CURRIE, B. P.; CASADEVALL, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2243-2251, 1997.

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

GARCIA-HERMOSO, D.; MATHOULIN-PÉLISSIER, S.; COUPRIE, B.; RONIN, O.; DUPONT, B.; DROMER, F. DNA typing suggests pigeon droppings as a source of pathogenic *Cryptococcus neoformans* serotype D. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2683-2685, 1997.

GERDS-GROGAN S.; DAYRELL-HART, B. Feline Cryptococcosis: a restropective evaluation. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 33, p. 118-122, 1997.

GHANNOUM, M. A. Is antifungal susceptibility testing useful in guiding Fluconazol theprapy ? **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, p. 161-165, 1996.

GHANNOUM, M. A.; IBRAHIM, A. S.; FU, Y.; SHAFIA, M. C.; EDWARDS, J. E.; CRIDDLE, R. S. Suceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a microdiluiition technique. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 2881-2886, 1992.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanism of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 2881-2886, 1999.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 122-143, 2000.

GOMES, N. G. L.; BONI, M.; PRIMO, C. C. The invasive behaviour of *Cryptococcus neoformans*: a possibility of direct access to the central nervous system. **Mycopathologia**, v. 140, p. 1-11, 1997.

GRANADOS, D. P.; CASTAÑEDA, E. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992-2004. **FEMS Yeast Res.**, v. 6, p. 636-644, 2006.

GRANADOS D. P.; CASTANEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colômbia, and study of ecologycal conditions in área. **Microl Ecol.**, v. 49, p. 282, 2005.

GROVER, N.; NAWANGE, S. R.; NAIDU, J.; SINGH, S. M.; SHARMA, A. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* an *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. **Mycopathologia**, v. 164, p. 159-170, 2007.

HALLIDAY, C. L.; CARTER, D. A. Clonal reproduction and limited dispersal in an environmental population of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolates from Australia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 703-711, 2003.

HAKIM, J. G.; GANGAIDZO, I. T.; HEYDERMAN, R. S.; MIELKE, J.; MUSHANGI, E.; TAZIWA, A.; ROBERTSON, V. J.; MUSVAIRE, P.; MASON, P. R. Impact of HIV infection on meningitis in Harare, Zimbabwe: a prospective study of 406 predominantly adult patients. **AIDS**, v. 14, p. 1401-1407, 2000.

HAMILTON, A. J.; GOODLEY, J. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v. 7, p. 19-42, 1996.

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

IKEDA, R.; SUGITA, T.; JACOBSON, E. S.; SHINODA, T. Effects of melanina upon susceptibility of *Cryptococcus* to antifungal. **Microbiol. Immunol.**, v. 47, p. 271-277, 2003.

JACOBSON, E. S.; TINNELL, S. B. Antioxidant function of fungal melanin. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 7102-7104, 1993.

JACOBSON, E. S.; IKEDA, R. Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. **Med. Micol.**, v. 43, p. 327-333, 2005.

KAO, C. J.; SCHAWARZ, J. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon nests; with remarks on the identification of virulent cryptococci. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 27, p. 652-663, 1957.

KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; TAYLOR, M.; CORRAN, A. J.; BALDWIN, B. C.; POWDERLY, W. G. Resistance to amphotericin B associated with defective sterol $\Delta 8 \rightarrow 7$ isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 122, p. 39-42, 1994.

KIDD, S. E.; CHOW, Y.; MAK, S. BACH, P. J.; CHEN, H.; HINGSTON, A. O.; KRONSTAD, J. W.; BARTLETT, K. H. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen, *Cryptococcus gattii*, in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 1433-1443, 2007.

KIDD, S. E.; HAGEN, F.; TSCHARKE, R. L.; HUYNH, M.; BARTLETT, K. H.; FYFE, M.; MACDOUGALL, L.; BOEKHOUT, T.; KWON-CHUNG, K. J.; MEYER, W. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proc. Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 17258-17263, 2004.

KLEIN, K. R.; HALL, L.; DEML, S. M.; RYSAVY, J. M.; WOHLFIELD, S. L.; WENGENACK, N. L. Identification of *Cryptococcus gattii* by Use of L-Canavanine Glycine Bromothymol Blue Medium and DNA Sequencing. **Journ of Clin. Microbil.**, v. 47, n. 11, p. 3669-3672, 2009.

KROCKENBERGER, M. B.; CANFIELD, P. J.; MALIK, R. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in the Koala (*Phascolarctos cinereus*): a review of 43 cases of cryptococcosis. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 225-234, 2003.

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

KOHNO, S. Clinical spectrum and management of cryptococcosis in Japan. In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON CRYPTOCOCCUS AND CRYPTOCOCCOSIS. Tokyo, Japan, 1999. **Abstracts...** Tokyo, Japan, 1999. p. 73.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts : a taxonomic study**. 4th ed. New York: ACM Press, 1998. 1055 p.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *Cryptococcus*. In: _____. **The yeasts: a taxonomic study**. 5th ed. New York: ACM Press, 2011. p. 1661-1662.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in tropical and subtropical regions. **Zentralbl. Bakteriол. Hyg.**, v. 257, p. 213-218, 1984.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNET, J. E.; THEODORE, T. S. *Cryptococcus bacillisporus* sp. Nov.: serotype B-C of *Cryptococcus neoformans*. **Int. Syst. Bacteriol.**, v. 28, p. 616-620, 1978.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; POPKIN, T. J. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. **J. Bacteriol.**, v. 150, p. 1414-1421, 1982.

LACAZ, C. S. **Micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the City of Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 449-454, 1993.

LAZÉRA, M. S.; CAVALCANTI SALMITO, M. A.; LONDERO, A. T.; TRILLES, L.; NISHIKAWA, M. M.; WANKE, B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 379-383, 2000.

LEGGIADRO, R. J.; BARRET, F. F.; HUGUES, W. T. Extrapulmonary Cryptococcosis in immunocompromised infants and children. **Pediatric. Infec. Dis.**, v. 11, p. 43-47, 1992.

LIU, G. Y.; NIZET, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. **Trends Microbiol.**, v. 17, p. 406-413, 2009.

LOPES-MARTINEZ, R.; CASTANON-OLIVARES, L. R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in México City. **Mycopathologia**, v. 129, p. 25-28, 1995.

LOZANO-CHIU, M. J.; PAIETZNICK, V. L.; GHANNOUM, M. A.; REX, J. H. Detection of resistance to amphotericin B among *Cryptococcus neoformans* clinical isolates: performances of three different media assessed by using Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards M-27 A methodologies. **J.Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2817-2822, 1998.

MALIK, R.; WIGNEY, D. I.; MUIR, D. B.; GREGORY, D. J.; LOVE, D. N. Cryptococcosis in cats: clinical and mycological assessment of 29 cases and evaluation of treatment using orally administered fluconazole. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 133-134, 1992.

MALIK, R.; KROCKENBERGER, M.; O'BRIEN, C. R.; MARTIN, P.; WIGNEY, D.; MEDLEAU, L. Cryptococcosis. In: GREENCE, C. E. (Ed.) **Infections diseases of the dog and cat**. 3rd ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 584-598.

MAHMOUD, Y. A. G. First environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* and var *gattii* from the Gharbia Governorate. **Egypt. Mycophatologia**, v. 148, p. 83-86, 1999.

MERCK & Co. **Manual Merck de veterinária**. São Paulo: Roca, 2008. 2336 p.

MARTINS, M. A.; PAPPALARDO, M. C. S. M.; MELHEM, M. S. C.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of Sao Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 707-784, 2007.

MATSUMOTO, F. E.; DIAS, A. L. T.; MELHEM, M. S. C.; SZESZS, M. A.; AULER, M. E.; RUIZ, L. S.; SILVA, E. G.; GANDRA, R. F.; PAULA, C. R. Antifungal susceptibility of bloodstream yeasts isolated at a public children's hospital in Brazil: comparison of the Etest and the AFST-EUCAST microdilution method. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 63-69, 2007.

MEDLEAU, L.; JACOBS G. J.; MARKS, M. A. Itraconazole for the treatment of cryptococcosis in cats. **J. Vet. Int. Med.**, v. 9, p. 39-42, 1995.

MEDNICK, A. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2012-2019, 2005.

MEYER, W.; CASTANEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTANEDA, E.; Ibero American Cryptococcal Study Group. Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg. Infect. Dis.** v. 9, p. 189-195, 2003.

MIGLIA, K. J.; MEIRING, S.; GOVENDER, N. P.; ROSSOUW, J.; MITCHELL, T. G. Molecular analysis of 82 strains of *Cryptococcus* species obtained from South African pediatric patients during 2005 and 2006. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON *CRYPTOCOCCUS* AND *CRYPTOCOCCOSIS*, 7., 2008, Nagasaki, Japan. **Abstract...** Nagasaki, Japan, 2008.

MITCHEL, T. G. Micoses sistêmicas. In:_____. **Microbiologia**. 17. ed. Buenos Aires: Panamericana, 1983. p. 1247-1276.

MITCHEL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical. Microbiol. Rev.**, v. 8, p. 515-48, 1995.

MOHAGHEGHPUR, N.; WALEH, N. GARGER, S. J.; DOUSMAN, L.; GRILL, L. K.; TUSE, D. Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines. **Cell Immunol.**, v. 199, p. 25-36, 2000.

MONTENEGRO, H.; MAZZUIIA, E. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* in decaying wood forming hollow in a tree of *Caesalpinia peltophoroides* (leguminosae), São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON *CRYPTOCOCCUS* AND *CRYPTOCOCOSIS*, 4., 1999, London. **Abstract...** London, 1999.

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

MORACE, G.; ARCHIBUSACI, C.; SESTITO, M.; POLONELLI, L. Strain differentiation of pathogenic yeast by the killer system., **Mycopathologia**, v. 84, p. 81-85, 1984.

MOTTA, A. L. Analysis of candidemia epidemiological data and antifungigram by distinct methodologies in large Brazilian teaching Hospital **J. Infect. Dis.**, v. 14, p. 205, 2010.

NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; OLIVEIRA, R.; PAULA, C. R. Correlation between Etest, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of species from infection and colonization. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, p. 324-330, 2009.

NEUVILLE, S.; DROMER, F.; MORIN, O.; DUPONT, B.; RONIN, O.; LORTHOLARY, O. Primary cutaneous cryptococcosis: a distinct clinical entity. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36, p. 337-347, 2003.

NOSANCHUK, J. D.; VALADON, P.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. Melanization of *Cryptococcus neoformans* in murine infection. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 745-750, 1999.

PAL, M. First report of isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Kathmandu, Nepal. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 14, p. 181-183, 1997.

PARK, B. J.; WANNERMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDER, N. P.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, p. 525-530, 2009.

PAPPAS, P. G.; PERFECT, J. Cryptococcosis in the non-HIV infected patient. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON *CRYPTOCOCCUS* AND CRYPTOCOCCOSIS, 1999, Vancouver, Canada. **Abstract...** Vancouver, Canada, 1999. p. 23.

PASSONI, L. F. C.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M.; LAZERA, M. S. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: an analysis of the domestic environment of AIDS patients with and without cryptococcosis. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 305-11, 1998.

PASSONI, L. F. C. Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. **Rev. Iber. Micol.**, v. 16, p. 77-81, 1999.

PAULA, C. R.; ITO, C. H.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; CORREA, B.; MINAMI, P. S. Biochemical serotyping and other physiological characteristics of 40 *Cryptococcus neoformans* samples isolated from clinical material in Brazil. **Rev. Iber. Micol.**, v. 5, p. 105, 1998.

PEREIRA, C. B.; BUENO, F. L.; DIAS, A. L. T.; BRIGADAO, M. R. P. L.; PAULA, C. R.; SIQUEIRA, A. M. Evaluation of laccases and melanization in clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* samples by non-denaturing PAGE. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 563-566, 2009.

PEREIRA, J. R. **Isolamento e caracterização de *Cryptococcus neoformans* de excretas de aves em lojas de animais do município do Rio de Janeiro**. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; BIJIE, H.; DZIERZANOWSKA, D.; KLIMKO, N. N.; LETSCHER-BRU, V.; LISALOVA, M.; MUCHLETHALER, K.; RENNISON, C.; ZAIDA, M. The Global Antifungal Surveillance Group. Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2007.:10.5-year analysis of susceptibilities of noncandidal yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 117-123, 2009.

PFALLER, M. A.; MCGINNIS, M. R.; ANAÏSSIE, E. J. **Clinical mycology**. 2nd ed. New York: Churcill Livingstone, 2009. 688 p.

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

PFEIFFER, T. J.; ELLIS, D. H. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans gattii* from California. **J. Infect. Dis.**, v. 163, p. 929-930, 1991.

PAPPALARDO, M. C. S. N.; MELHEM, M. S. C. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 45, p. 299-305, 2003.

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

RANDHAWA, H. S.; KOWSHIK, T.; CHOWDHARY, A.; PREETI, S. K.; KHAN, Z. U.; SUN, S.; XU, J. The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus neoformans gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India. **Med. Mycol.**, v. 46, p. 823-833, 2008.

REFOJO, N.; PERROTTA, D. E.; BRUDNY, M.; ABRANTES, R.; HEVIA, A. I.; DAVEL, G. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. **Med. Mycol.**, v. 47, p. 177-184, 2009.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 983-989, 2002.

RIBEIRO, M. A.; NGAMSKULRUNGRO, J. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. **Med. Mycol.**, v. 47, p. 177-184, 2009.

RINALDI, M. G.; DRUTZ, D. J.; HOWELL, A.; SANDE, M. A.; WOFSEY, C. B.; HADLEY, W. K. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. **J. Infect. Dis.**, v. 153, p. 642, 1986.

RIVERA, J.; FELDMESSER, M.; CAMMER, M.; CASADEVALL, A. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. **Infect Immun.**, v. 66, n. 10, p. 5027-5030, 1998.

ROBERTS, M. C.; SUTTON, R. L. H. L.; LOVELL, D. K. A protracted case of cryptococcal nasal granuloma in a stallion. **Austr. Vet. J.**, v. 57, p. 287-91, 1981.

ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3410-3412, 2001.

ROZENBAUM, R.; GONÇALVES, A. J.; WANKE, B.; VIEIRA, W. *Cryptococcus neoformans* var *gattii* in Brazilian AIDS patient. **Mycopathologia**, v. 112, p. 33-34, 1990.

RUCHEL, R.; TEGELLER, R.; TROST, M. A. Comparasion of secretory Proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouradia**, v. 20, p. 233-244, 1982.

SALAS, S. D.; BENNETT, J. E.; KWON-CHUNG, K. J.; PERFECT, J. R.; WILLIAMSON, P. R. Effect of the lacase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*, **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 377-386, 1996.

SÁNCHEZ, A.; ESCANDÓN, P.; CASTAÑEDA, E. Deteriminacion in vitro de la actividad de los factores asociados com la virulência de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 25, p. 145-149, 2008.

SANTAGELO, R. T.; NOURI-SORKHABI, M. H.; SORRELL, T. C.; CAGNEY, M.; CHEN, S. C.; KUCHEL, P. W.; WRIGHT, L. C. Biochemical and functional characterization of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. **J. Med. Microbiol.**, v. 48, p. 731-740, 1999.

SANTANGELO, R. T.; CHEN, S. C.; SORRELL, T. C.; WRIGHT, L. C. Detection of antibodies to phospholipases B in patients infected with *Cryptococcus neoformans* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Med. Mycol.**, v. 43, p. 335-341, 2005.

SANT'ANNA J. V.; MARTINS, M. A.; PUKINSKAS, S. R. B. S.; MELHEM, M. S. C. Laboratory Group on Cryptococcosis,. Varietics of *Cryptococcus neoformans* in the state of São Paulo, Brazil. In: CONGRESS OF ISHAM, 13., 1997, Parma, Italy. **Abstract...** Pharma, Italy, 1997. p. 119.

SANTOS, W. R.; MEYER, W.; WANKE, B.; COSTA, S. P.; TRILLES, L.; NASCIMENTO, J. L.; MEDEIROS, R.; MORALES, B. P.; BEZERRA, C. D. E. C.; MACÊDO, R. C.; FERREIRA, S. O.; BARBOSA, G. G.; PEREZ, M. A.; NISHIKAWA, M. M.; LAZÉRA, M. S. Primary endemic Cryptococcosis gattii by molecular type VGII in the state of Para, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 813-818, 2008.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Small animal dermatology**. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1995. p. 373-378.

SHIMIZU, R. Y.; HOWARD, D. H.; CLANCY, M. N. The variety of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. **J. Infect. Dis.**, v. 154, p. 1042, 1986.

SIAFAKAS, A. R.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; DJORDJEVIC, J. T. Lipid rafts in *Cryptococcus neoformans* concentrate the virulence determinants phospholipase B1 and Cu/Zn superoxide dismutase. **Eukaryot. Cell.**, v. 5, p. 488-498, 2006.

SILVA, D. C.; MARTINS, M. A.; SZESZS, M. W.; BONFIETTI, L. X.; MATOS, D.; MELHEM, M. S. C. Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 72, p. 332-339, 2012.

SILVA, E. G.; BARONI, F. A.; AULER, M. E.; GRANDA, R. F.; CRUZ, M. V. N.; RUIZ, L. S.; MATSUMOTO, F. E.; CURY, A. E.; RIVERA, I. N. G, GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Produção de proteinase e sensibilidade a fluconazol em *C. neoformans*: novo parâmetro a ser investigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 4., 2004, Ouro Preto, MG. **Anais...** Ouro Preto, MG, 2004. p. 144.

SILVA, E. G.; BARONI, F. A.; VIANI, F. C.; RUIZ, L. D. S.; GANDRA, R. F.; AULER, M. E.; DIAS, A. L. T.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Virulence profile of strains of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* evaluated by experimental infection in BALB/c mice and correlation with exoenzyme activity. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 139-142, 2006.

SILVA, E. G.; PAULA, C. R.; RODRIGUES, M. A.; RUIZ, L. D. S.; GAMBALE, W.; PRATES, R. A.; RIBEIRO, M. S. Combination efficacy of Voriconazole and Amphotericin B in the Experimental Disease in Immunodeficient Mice caused by Fluconazole-resistant *Cryptococcus neoformans*.; **Mycopathologia**, v. 171, p. 261-266, 2011.

SIONOV, E.; LEE, H.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. **PLoS Pathog.**, v. 6, p. 848-852, 2010.

SOARES, M. C. B.; PAULA, C. R.; DIAS, A. L. T.; CASEIRO, M. M.; COSTA, S. O. P. Environmental Straits of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, p. 31-37, 2005.

STEENBERGEN J. N.; CASADEVALL, A. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 667-675, 2003.

SWINNE-DESGAIN, D. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. **Sabouraudia**, v. 13, p. 303-308, 1975.

SWINNE-DESGAIN, D. *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons following its experimental administration. **Sabouraudia**, v. 14, p. 13-17, 1976.

SWINNE-DESGAIN, D.; DEPPNER, M.; MANIRATUNG, S.; LAROCHE, R.; FLOCH, J. J.; KADENDE, P. AIDS: associated cryptococcosis in Bujumbura, Burundi: an epidemiological study. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p. 25-30, 1991.

SWINNE, D.; KAYEMBE, K.; NIYIMI, M. Isolation os saprophytic *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* in Kinxhasa, Zaire. **Ann. Soc. Belge Med. Trop.**, v. 66, p. 57-61, 1986.

TABOADA, J.; GROOTERES, A. M. Systemic mycoses. In: ELTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.). **Text book of vetererinary internal medicine: disease of the dog and cat**. 6th ed. Philadelphia: WB Sauders, 2005.

TAY, S. T.; TANTY, H. T.; ROHANI, M. Y.; HAMIMAH, H. In vitro susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs. **Mycoses**, v. 49, p. 324-330, 2006.

TRILLES, L.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 383-390, 2003.

VAN DEN BOSCH, J. S.; SMALS, A. G.; VALK, I. M.; KLOPPENBORG, P. W. Lack of difference in growth simulating effect between weekly single and multiple human chorionic gonadotrophin administration in boys with delayed puberty. **Clin. Endocrinol.**, v. 16, p. 1-9, 1982.

VIDOTTO, V.; SINICCO, A.; Di FARIA, D.; CARDAROPOLIS, S.; AOKI, S.; ITO-KUWA, S. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 136, p. 119-123, 1996.

VIDOTTO, V.; LEONE, R.; SINICCO, A.; ITO-KUWA, S.; CRISEO, G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bird droppings. **Mycopathologia**, v. 142, p. 71-76, 1998.

VIDOTTO, V.; MELHEM, M.; PUKINSKAS, S.; AOKI, S.; CARRAGA, C.; PUGLIESE, A. Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 22, p. 29-33, 2005.

VILCINS, I.; KROCKENBERGER, M. B.; AGUS, H.; CARTER, D. A. Environmental sampling for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from the Blue Mountains National Park, Sydney, Australia. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 383-390, 2002.

VIVIANI, M. A.; WHEN, H.; ROVERSELLI, A.; CALDERALLI-STEFAÑO, R. COGLIATI, M. FERRANTE, P. TORTORANO, A. M. Identification by polymerase chain reaction finger-printing of *Cryptococcus neoformans* serotype AD. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 35, p. 355-360, 2001.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to U.V. Light. **Applied Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 3864-3866, 1994.

WEY, S. B.; MORI, M.; PFALLER, M. A.; WOOLSON, R. F.; WENZEI, R. P. Risk factors for hospital-acquired candidemia. A matched case-control study. **Arch. Inter. Med.**, v. 149, p. 2349-2353, 1989.

WILKINSON, G. T. Feline cryptococcosis. **Austr. Vet. Pract.**, v. 14, p. 64, 1984.

WILKINSON, G. T.; HARVEY, R. G. **Atlas colorido de dermatologia dos pequenos animais**: guia para o diagnóstico. 2. ed. São Paulo: Manole, 1997.

WITT, M. D.; LEWIS, R. J.; LARSEN, R. A.; MILEFCHIK, E. N.; LEAL, M. A.; HAUBRICK, R. H.; RICHIE, J. A.; EDWARDS, J. E.; GHANNOUM, M. A. Identification of patients with acute AIDS-associated cryptococcal meningitis who can be effectively treated

with fluconazole: the role of antifungal susceptibility testing. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, p. 322-328, 1996.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contributed to antifungal resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 382-402, 1998.

YILDIRAN, S. T.; FOTHERGILL, A. W.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G. In vitro susceptibilities of cerebro-spinal fluid isolates of *Cryptococcus neoformans* collected during a ten-year period against fluconazole, voriconazole and posaconazole (SCH56592). **Mycoses**, v. 45, p. 378-383, 2002.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biol. Preced Online**, v. 6, p. 10-15, 2004.

ZARAGOZA, O.; RODRIGUES, M. L.; JESUS, D. M.; FRASES, S.; DADACHOVA, E.; CASADEVALL, A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 68, p. 133-216, 2009.

ZHU, L. P.; WU, Q. J.; XU, B.; OU, X. T.; ZHANG, Q. Q.; WENG, X. H. Cryptococcal meningitis in non- HIV-infected patients in a Chinese tertiary care hospital, 1997-2007. **Medical Mycology**, v. 48, p. 570-579, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A - MEIO DOPAMINA

Solução base:

KH ₂ PO ₄ .7H ₂ O	0,4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
Tiamina	1mg
Glicose	0,5 g
Ágar	2,5 g
H ₂ O destilada	80 mL

Solução com substrato (DOPA):

Dopa	0,004 g
Asparagina	0,1 g
Glutamina	0,1 g
Glicina	0,1 g
H ₂ O destilada	20 mL

Ajuste de pH em 5.5, se necessário com o uso de K₂PO₄ (1M). Filtração da solução contendo DOPA em membrana Millipore (0,22µm) e união à solução base após autoclavação da mesma e resfriamento a 55°C. Distribuição em placas.

APÊNDICE B - MEIO C.G.B

Solução A (Estoque)

L-canavanina	30 mg
Glicina	10 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
Tiamina	1 mg
H ₂ O destilada	100 ml

Ajuste de pH para 5.6 e esterilização por filtração em membrana Millipore (0,22 µm).

Solução com indicador de pH (azul de bromotimol):

Azul de bromotimol	0,4 g
NaOH (0,01N)	64 mL
H ₂ O destilada	36 mL

Solubilização de 0,4 g de azul de bromotimol em 64 mL de NaOH (0,01N).
Adição de 36 mL de água destilada

Solução B

Adição de 20 mL da solução com indicador de pH (azul de bromotimol a 0,4%) a 880 mL de água destilada. Adição de 20 g de ágar e autoclavação a 55 °C.

Adicionar 100 mL da solução A à 900 mL da solução B. Homogeneização e distribuição em placas.

APÊNDICE C - MEIO PROTEASE

Meio base:

Ágar (Difco)	18 g
H ₂ O destilada	900 mL

Esterilizar por autoclavação a 121 °C.

Meio contendo albumina:

Yeast Nitrogen Base (Difco)	11,7 g
Albumina bovina (fração V – Sigma)	2 g
Tiamina	1 mg
H ₂ O destilada	100 mL

Esterilização por filtração em membrana Millipore (0,22 µm)

Resfriamento do meio base a 50 °C e união ao meio contendo albumina.
Distribuição em placas.

APÊNDICE D - MEIO FOSFOLIPASE

Preparo de gema de ovo:

Gema de ovo 80 g

Os ovos, previamente a este preparo, são imersos em álcool iodado por 1 hora. Em seguida, as gemas são separadas e colocadas em recipiente estéril. O volume necessário é pipetado a fim de evitar a entrada de membrana da gema na composição final.

Meio ágar fosfolipase

NaCl (Reagen) 57,3 g

CaCl₂ 0,55 g

Sabouraud dextrose (Difco) 65 g

H₂O destilada 1000 mL

Esterilização a 121 °C por 15 minutos em autoclave. Resfriamento a 50 °C e mistura com emulsão de gema de ovo. Distribuição em placas de Petri.